Botanička obilježja, fitokemijski profil i biološki učinci vrsta roda Globularia L.

Friščić, Maja

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:242648

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Maja Friščić

BOTANIČKA OBILJEŽJA, FITOKEMIJSKI PROFIL I BIOLOŠKI UČINCI VRSTA RODA *GLOBULARIA* L.

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2017.

University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Maja Friščić

BOTANICAL CHARACTERISTICS, PHYTOCHEMICAL PROFILE AND BIOLOGICAL EFFECTS OF *GLOBULARIA* L. SPECIES

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017

Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Maja Friščić

BOTANIČKA OBILJEŽJA, FITOKEMIJSKI PROFIL I BIOLOŠKI UČINCI VRSTA RODA *GLOBULARIA* L.

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Kroata Hazler Pilepić

Zagreb, 2017.

University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Maja Friščić

BOTANICAL CHARACTERISTICS, PHYTOCHEMICAL PROFILE AND BIOLOGICAL EFFECTS OF *GLOBULARIA* L. SPECIES

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Prof. Kroata Hazler Pilepić, Ph.D.

Zagreb, 2017

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen na Zavodu za farmaceutsku botaniku Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te na University of Graz, Institute of Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmacognosy, Graz, Austrija, na Zavodu za mikrobiologiju, Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju, Zavodu za farmaceutsku kemiju, Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova te Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u Laboratoriju za molekularnu biljnu biologiju i biotehnologiju Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković i Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, na University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy, Ljubljana, Slovenija, na Zavodu za organsku kemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Splitu te u Centru za istraživanje materijala Istarske županije METRIS u Puli, a u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Kroate Hazler Pilepić.

ZAHVALE

Najljepše zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Kroati Hazler Pilepić na pruženoj prilici i ukazanom povjerenju te kontinuiranom usmjeravanju i neizmjernoj pomoći prilikom izrade ovog rada, od odabira teme, preko prikupljanja i identifikacije biljnog materijala, pa sve do provođenja eksperimentalnog dijela rada. Zahvaljujući njezinom velikom angažmanu i uspostavljenim kontaktima svi postavljeni ciljevi uspješno su ostvareni. Hvala joj na svim savjetima, dobronamjernim kritikama i prenesenom znanju, kao i na tome što je uvijek bila dostupna za razgovor i otvorena za nove ideje te me podupirala u stjecanju novih znanja i iskustava. Hvala joj i na njezinoj dobroti i iskrenosti te spremnosti da sa mnom podijeli sve uspjehe i neuspjehe tijekom zadnjih šest godina. Za kraj, hvala joj na velikom razumijevanju, strpljenju i podršci koju mi je pružila u vrijeme pisanja ovog rada.

Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Franzu Bucaru s Instituta za farmaceutske znanosti Sveučilišta u Grazu na ukazanom povjerenju i suradnji. Zahvaljujući njegovoj susretljivosti omogućeno mi je provođenje velikog dijela fitokemijskih istraživanja te olakšano stjecanje novih znanja i vještina u području pripreme i analize biljnog materijala. Hvala mu na vrijednim savjetima, ustupljenom vremenu, opremi i materijalima, a posebno na velikom strpljenju pri provjeri podataka vezanih uz identifikaciju sastavnica temeljenu na tandemskoj masenoj spektrometriji. Hvala i svim kolegama sa Sveučilišta u Grazu na prijateljskoj i poticajnoj radnoj atmosferi, a posebno tehničkoj suradnici Elviri Knauder, kojoj sam se u svakom trenutku mogla obratiti za pomoć.

Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Ivanu Kosalcu na ukazanom povjerenju i pristupu uređajima potrebnim za pripremu biljnog materijala i istraživanje bioloških učinaka, kao i na savjetima i brojnim idejama vezanim uz istraživanje antimikrobnog učinka. Hvala i svim kolegicama sa Zavoda za mikrobiologiju na ugodnoj i prijateljskoj radnoj atmosferi, a posebno hvala tehničkoj suradnici Štefici Babić, koja je sa mnom rado podijelila dio svojih praktičnih znanja i iskustava u radu s bakterijskim kulturama te zahvaljujući kojoj mi nikad nije ponestalo hranjivih podloga.

Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Roberti Petlevski sa Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju na višegodišnjoj suradnji i pomoći u provođenju ispitivanja antidijabetskog učinka. Hvala joj i na strpljenju i spremnosti da odgovori na sva moja pitanja.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Biljani Nigović koja je bila otvorena za suradnju i ustupila nam uređaje Zavoda za analitiku i kontrolu lijekova. Hvala i njezinim suradnicama doc. dr. sc. Mirandi Sertić i izv. prof. dr. sc. Ani Mornar Turk na pomoći kod provođenja kromatografske analize te kod pisanja zajedničke publikacije.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Marici Medić-Šarić i kolegama sa Zavoda za farmaceutsku kemiju koji su mi omogućili provođenje početnih fitokemijskih određivanja sekundarnih metabolita na njihovom zavodu.

Hvala i prof. dr. sc. Sandi Vladimir Knežević koja nam je omogućila korištenje aparature za destilaciju eteričnih ulja na Zavodu za farmakognoziju.

Veliko hvala prof. dr. sc. Višnji Besendorfer s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i prof. dr. sc. Borutu Bohancu s Biotehničkog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani na suradnji i pomoći u provođenju citoloških istraživanja. Zahvaljujući njihovom znanju i iskustvu olakšano je dobivanje podataka koji doprinose rješavanju taksonomskog spora između istraživanih vrsta.

Veliko hvala i izv. prof. dr. sc. Maji Matulić i dr. sc. Josipu Maduniću, također suradnicima s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, koji su proveli eksperimentalni dio istraživanja citotoksičnog učinka.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Hrvoju Fulgosiju na ustupljenom prostoru i opremi Laboratorija za molekularnu biljnu biologiju i biotehnologiju Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u kojem su provedena filogenetska istraživanja.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Igoru Jerkoviću i doc. dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću na suradnji i pomoći pri analizi sastavnica eteričnih ulja te doc. dr. sc. Slavici Dudaš i dr. sc. Danijeli Poljuha na pomoći u statističkoj obradi dobivenih podataka i pripremi zajedničke publikacije. Posljednjoj suradnici hvala i na omogućenom provođenju analize biljnog materijala atmosferskom pretražnom elektronskom mikroskopijom u Centru za istraživanje materijala Istarske županije METRIS.

Posebno hvala našim suradnicima Semiru Masli i dr. sc. Radi Gariću koji su pomogli u prikupljanju biljnog materijala s područja Mostara i Konavoskih stijena. Hvala i Zvonimiru Drvaru na pomoći u prikupljanju biljnog materijala s područja Dinare kao i svima drugima koji su nam, zahvaljujući svom iskustvu i ustupljenim podacima, olakšali pronalazak pojedinih staništa, uključujući dr. sc. Milenka Milovića, dr. sc. Vanju Stamenkovića i Josipa Čičovačkog.

Hvala i našim studenticama Ani, Karolini, Kristini, Josipi, Mateji, Sandri, Sari i Suzani, koje su svojim vrijednim radom olakšale pojedine eksperimentalne dijelove ovog rada.

Zahvaljujem dr. sc. Dariu Kremeru, voditelju Farmaceutskog botaničkog vrta „Fran Kušan", na ustupljenom prostoru za sadnju glavulja, a posebno hvala tehničkoj suradnici Mirjani Kolar na pomoći i savjetima kod vrtnog uzgoja.

Srdačno zahvaljujem dekanu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i predstojniku Zavoda za farmaceutsku botaniku prof. dr. sc. Željanu Malešu na pruženoj prilici i omogućenom provođenju početnih fitokemijskih istraživanja. Hvala mu i što je podržao moje znanstveno usavršavanje u inozemstvu, kao i prisustvovanje različitim edukacijama i seminarima, odnosno sudjelovanje u znanstveno-popularnim aktivnostima, koje su me uvijek iznova poticale da dam ono najbolje od sebe.

Iskreno zahvaljujem i svim svojim učiteljima, profesorima i kolegama koji nisu bili izravno uključeni u izradu ovog rada, ali čija su me znanja i postignuća te ljubav prema podučavanju i istraživanju nadahnuli da i sama iskušam svoje granice te me oblikovali u osobu koja sam danas.

Hvala mojim prijateljima, a posebno hvala Željki, Valentini, Samanti, Gorani i Vaski koje su mi, svaka na svoj način, pomogle u trenucima kada je to bilo najpotrebnije, kako moralnom podrškom, razmjenom iskustava i dobronamjernim savjetima, tako i pribavljanjem nedostupne literature i ustupanjem smještaja pri terenskom radu, odnosno ponekim obrokom i toplim riječima nakon napornog radnog dana.

Najveću zahvalnost dugujem svom suprugu Alenu, koji je bio moj najbolji prijatelj i najveći oslonac u svakodnevnim izazovima, kao i najvjerniji pratitelj na terenskim istraživanjima te vrijedan pomoćnik u prikupljanju biljnog materijala. Hvala mu na njegovoj beskrajnoj ljubavi, dobroti i iskrenosti te podršci, razumijevanju i radosti koju mi svakodnevno pruža.

Veliko hvala mojoj obitelji na pruženoj moralnoj, emocionalnoj i tehničkoj podršci, posebno u završnim fazama izrade doktorskog rada, na razumijevanju i ljubavi te na svim zajedničkim trenucima, kojih je nažalost često bilo premalo, ali su unatoč tome bili neprocjenjivi. Hvala mojim nećacima Janu, Eli, Rei i Lovri na velikoj radosti i veselju koju mi pružaju naše igre i zajednička druženja.

Za kraj, na poseban način želim zahvaliti svojim roditeljima, koji su me naučili da se znanje, marljivi rad i ulaganje u sebe uvijek isplati te su me nesebično podržavali kroz cijelo moje školovanje i time uvelike olakšali ostvarenje mnogih ambicija i snova. Hvala im i što su me uvijek bili spremni saslušati, utješiti i ohrabriti, kada je to bilo potrebno, te što su vjerovali u mene i veselili se zajedno sa mnom svim malim i velikim uspjesima. Dragi mama i tata, vama posvećujem ovaj doktorski rad!

U sjećanje na moju voljenu profesoricu i iznimnu mentoricu i na sve lijepe trenutke koje smo zajedno proživjele veseleći se našim globularijama.

SAŽETAK

Vrsta *Globularia alypum* L. široko je primjenjivana biljna vrsta u narodnoj medicini mediteranskih zemalja i najbolje istražena predstavnica roda *Globularia* L. U okviru ovog doktorskog rada prvi je put provedeno opsežno usporedno istraživanje botaničkih obilježja, fitokemijskog profila i bioloških učinaka četiriju vrsta roda *Globularia*, koje je, uz vrstu *G. alypum*, uključivalo tri slabije istražene srodne vrste: *G. cordifolia* L. (*G. cordifolia* subsp. *cordifolia* (L.) Hayek), *G. meridionalis* (Podp.) O. Schwarz (*G. cordifolia* subsp. *bellidifolia* (Ten.) Wettst.) i *G. punctata* Lapeyr. Istraživanjem su obuhvaćeni uzorci 19 samoniklih populacija, sabrani u vrijeme cvatnje na području Hrvatske i okolice kroz više različitih sezona (do pet). U cilju procjene biomedicinskog potencijala slabije istraženih vrsta provedena je kvalitativna i kvantitativna kemijska analiza biološki aktivnih sastavnica primjenom različitih kromatografskih i spektroskopskih tehnika (TLC, HPLC-DAD-ESI-MS, LC-PDA-ESI-MS^n, UV/Vis spektrofotometrija, GC-FID, GC-MS), a prikladnim metodama u uvjetima *in vitro* ispitani su odabrani biološki učinci prethodno utvrđeni kod vrste *G. alypum* (antidijabetski, antioksidativni, protuupalni, antimikrobni i citotoksični). Navedenim istraživanjima prethodila su temeljna botanička istraživanja na ekološkoj, morfološkoj, histološko-anatomskoj, citološkoj i molekularnoj razini, kojima se u kombinaciji s fitokemijskim istraživanjima pokušalo pridonijeti rješavanju taksonomskog spora oko razdvojenosti vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*. Sve četiri istraživane vrste pokazale su antidijabetski, antioksidativni, protuupalni, antimikrobni i citotoksični učinak u uvjetima *in vitro*, što je bilo moguće povezati s njihovim utvrđenim fitokemijskim profilima. Rezultati usporedbe fitokemijskog profila ukazali su na veću sličnost vrste *G. punctata* (podrod *Globularia*) s vrstom *G. alypum* (podrod *Abolaria*) od ostalih dviju vrsta (podrod *Abolaria*). Podjelu na podrodove nije podupirala ni usporedba histološko-anatomskih, molekularnih i fitokemijskih značajki, koja je ukazala na veću sličnost vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* s vrstom *G. punctata*. Također, kod uzoraka uključenih u ovo istraživanje nisu uočena karakteristična ekološka, morfološka, histološko-anatomska, citološka, molekularna ili fitokemijska obilježja koja bi podupirala razdvajanje na vrste *G. cordifolia* i *G. meridionalis*.

Ključne riječi: *Globularia*, biljni dijelovi, metode ekstrakcije, metanolni ekstrakti, ukupni fenoli, iridoidi, feniletanoidi, verbaskozid, flavonoidi, kondenzirane trjeslovine, eterično ulje, tandemska masena spektrometrija, svjetlosna mikroskopija, ESEM, 2C-vrijednost, broj kromosoma, ITS, *rbc*L, *trn*L-*trn*F, inhibicija α-glukozidaze, Hep G2, hiperglikemijski uvjeti u uvjetima *in vitro*, antioksidativni enzimi, glutation, DPPH, ABTS, inhibicija ciklooksigenaze-I, metoda difuzije iz bunarića, metoda mikrodilucije, MRSA, MDA-MB-231, A1235

SUMMARY

Globularia alypum L. is a plant species widely used in folk medicine of Mediterranean countries and the best explored representative of the genus *Globularia* L. In this doctoral thesis, a comprehensive comparative study of botanical characteristics, phytochemical profile and biological effects of four *Globularia* species, which, apart from *G. alypum*, included three less explored related species: *G. cordifolia* L. (*G. cordifolia* subsp. *cordifolia* (L.) Hayek), *G. meridionalis* (Podp.) O. Schwarz (*G. cordifolia* subsp. *bellidifolia* (Ten.) Wettst.) and *G. punctata* Lapeyr., was conducted for the first time. Samples from 19 natural populations, collected during flowering time in Croatia and surrounding area in several different seasons (up to five), were used in this study. In order to evaluate the biomedical potential of less investigated species, qualitative and quantitative chemical analyses of biologically active constituents were conducted using different chromatographic and spectroscopic techniques (TLC, HPLC-DAD-ESI-MS, LC-PDA-ESI-MS^n, UV/Vis spectrophotometry, GC-FID, GC-MS), while suitable *in vitro* methods were used to evaluate selected biological effects, previously established for *G. alypum* (antidiabetic, antioxidative, anti-inflammatory, antimicrobial and cytotoxic). The aforementioned research was preceded by basic botanical research on ecological, morphological, histo-anatomical, cytological and molecular level, by which, in combination with the phytochemical research, an attempt was made to contribute to the resolution of the taxonomic dispute over the separation of the species *G. cordifolia* and *G. meridionalis*. All four examined species showed antidiabetic, antioxidative, anti-inflammatory, antimicrobial and cytotoxic activity *in vitro*, which could be linked to their established phytochemical profiles. The results of the comparison of phytochemical profiles showed greater similarity of *G. punctata* (subgenus *Globularia*) to *G. alypum* (subgenus *Abolaria*) than those of the other two species (subgenus *Abolaria*). The division into subgenera was also not supported by the comparison of histo-anatomical, molecular and phytochemical characteristics, which indicated greater similarity of *G. cordifolia* and *G. meridionalis* to *G. punctata*. Moreover, no ecological, morphological, histo-anatomical, cytological, molecular or phytochemical characteristics, that would support the separation of *G. cordifolia* and *G. meridionalis* into different species, were observed for the samples included in this study.

Keywords: *Globularia*, plant parts, extraction methods, methanolic extracts, total phenolics, iridoids, phenylethanoids, verbascoside, flavonoids, condensed tannins, essential oil, tandem mass spectrometry, light microscopy, ESEM, 2C-value, chromosome number, ITS, *rbc*L, *trn*L-*trn*F, α-glucosidase inhibition, Hep G2, hyperglycemic conditions *in vitro*, antioxidant enzymes, glutathione, DPPH, ABTS, cyclooxygenase-I inhibition, well-diffusion method, microdilution method, MRSA, MDA-MB-231, A1235

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1. Botanička obilježja vrsta roda *Globularia* L. 2
1.1.1. *Globularia alypum* L. 12
1.1.2. *Globularia cordifolia* L. (*G. cordifolia* subsp. *cordifolia* (L.) Hayek) 15
1.1.3. *Globularia meridionalis* (Podp.) O. Schwarz (*G. cordifolia* subsp. *bellidifolia* (Ten.) Wettst.) 18
1.1.4. *Globularia punctata* Lapeyr. 20
1.2. Pregled dosadašnjih botaničkih istraživanja vrsta roda *Globularia* L. 23
1.2.1. Anatomska istraživanja 24
1.2.2. Citološka istraživanja 25
1.2.3. Molekularna istraživanja 26
1.2.4. Srodstveni odnosi između vrsta roda *Globularia* L. 28
1.2.5. Taksonomska problematika kompleksa *G. cordifolia* s.l. 29
1.3. Fitokemijski profil vrsta roda *Globularia* L. 40
1.3.1. Iridoidi 40
1.3.2. Feniletanoidi 41
1.3.3. Flavonoidi 42
1.3.4. Biološki učinci iridoida, feniletanoida i flavonoida 43
1.4. Pregled dosadašnjih istraživanja fitokemijskog profila vrsta roda *Globularia* L. 45
1.4.1. Kvalitativna fitokemijska istraživanja 45
1.4.2. Sadržaj sekundarnih metabolita 45
1.4.3. Sastavnice ekstrakata 49
1.4.4. Kemotaksonomski značaj izoliranih spojeva 56
1.4.5. Lakohlapljive sastavnice vrste *G. alypum* 57
1.5. Primjena vrsta roda *Globularia* L. u liječenju i samoliječenju 58
1.5.1. Etnobotanička istraživanja 60
1.5.2. Primjena gotovih proizvoda dobivenih iz vrsta roda *Globularia* L. nekad i danas 67
1.6. Pregled dosadašnjih istraživanja bioloških učinaka vrsta roda *Globularia* L. 68
1.6.1. Istraživanja antidijabetskog učinka 68
1.6.2. Istraživanja antioksidativnog učinka 71
1.6.3. Istraživanja protuupalnog učinka 75
1.6.4. Istraživanja antimikrobnog učinka 76
1.6.5. Istraživanja antitumorskog učinka 79
1.6.6. Istraživanja ostalih bioloških učinaka i toksičnosti 80
2. OBRAZLOŽENJE TEME 82
3. MATERIJALI I METODE 84
3.1. Biljni materijal 85
3.2. Metode istraživanja botaničkih obilježja 88
3.2.1. Metode istraživanja morfoloških obilježja 88
3.2.2. Metode istraživanja histološko-anatomskih obilježja 88
3.2.2.1. Svjetlosna mikroskopija 88
3.2.2.2. Atmosferska pretražna elektronska mikroskopija 88
3.2.3. Metode istraživanja citoloških obilježja 89
3.2.3.1. Protočna citometrija 89
3.2.3.2. Fluorescentna mikroskopija 90
3.2.4. Metode molekularne filogenije 90
3.2.4.1. Izolacija DNA 90

3.2.4.2. Umnažanje ITS područja jezgrine DNA te genskog *rbc*L i međugenskog *trn*L-*trn*F područja kloroplastne DNA ... 91
3.2.4.3. Polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata ... 92
3.2.4.4. Pročišćavanje i sekvenciranje PCR produkata ... 92
3.2.4.5. Poravnavanje i usporedba sljedova ... 92
3.2.5. Statistička obrada rezultata istraživanja botaničkih obilježja ... 93
3.2.5.1. Histološko-anatomska istraživanja ... 93
3.2.5.2. Citološka istraživanja ... 93
3.3. Metode istraživanja fitokemijskog profila ... 94
3.3.1. Metode pripreme uzoraka ... 94
3.3.1.1. Dekokcija (kuhanje u refluksnim uvjetima) ... 94
3.3.1.2. Ultrazvučna ekstrakcija ... 94
3.3.1.3. Maceracija ... 94
3.3.1.4. Soxhlet ekstrakcija ... 95
3.3.1.5. Vodena destilacija ... 95
3.3.2. Metode kvalitativnih fitokemijskih istraživanja ... 95
3.3.2.1. Flavonoidi ... 95
3.3.2.2. Trjeslovine ... 95
3.3.2.3. Flobatanini ... 96
3.3.2.4. Antocijani ... 96
3.3.2.5. Iridoidi ... 96
3.3.2.6. Steroidi ... 96
3.3.2.7. Triterpeni ... 96
3.3.2.8. Saponini ... 96
3.3.2.9. Antrakinoni ... 97
3.3.3. Metode istraživanja sadržaja sekundarnih metabolita ... 97
3.3.3.1. UV/Vis spektrofotometrija ... 97
3.3.3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s fotodiodnom detekcijom i masenom spektrometrijom ... 98
3.3.4. Metode istraživanja sastavnica ekstrakata ... 100
3.3.4.1. Tankoslojna kromatografija ... 100
3.3.4.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s fotodiodnom detekcijom i tandemskom masenom spektrometrijom ... 101
3.3.5. Metode istraživanja lakohlapljivih sastavnica ... 104
3.3.5.1. Plinska kromatografija spregnuta s plamenoionizacijskom detekcijom i masenom spektrometrijom ... 104
3.3.6. Statistička obrada rezultata istraživanja fitokemijskog profila ... 105
3.3.6.1. Sadržaj sekundarnih metabolita ... 105
3.3.6.2. Sastavnice ekstrakata ... 106
3.3.6.3. Lakohlapljive sastavnice ... 106
3.4. Metode istraživanja bioloških učinaka ... 107
3.4.1. Metode istraživanja antidijabetskog učinka ... 107
3.4.1.1. Inhibicija aktivnosti α-glukozidaze ... 107
3.4.1.2. Uzgoj i tretman stanica Hep G2 u kulturi ... 107
3.4.1.3. Koncentracija ukupnih proteina u lizatu stanica ... 108
3.4.1.4. Sadržaj slobodnih tiolnih skupina (–SH skupina) u lizatu stanica ... 109
3.4.1.5. Sadržaj reduciranog glutationa (GSH) u lizatu stanica ... 109
3.4.1.6. Aktivnost glutation peroksidaze (GPx) u lizatu stanica ... 109
3.4.1.7. Aktivnost glutation S-transferaze (GST) u lizatu stanica ... 110
3.4.1.8. Vijabilnost stanica Hep G2 ... 110

3.4.2. Metode istraživanja antioksidativnog učinka ... 111
3.4.2.1. UV/Vis spektrofotometrija ... 111
3.4.2.2. Tankoslojna kromatografija ... 112
3.4.3. Metode istraživanja protuupalnog učinka ... 113
3.4.3.1. Priprema otopina pufera i reagensa za PGE_2 i TMPD test ... 113
3.4.3.2. Inhibicija ciklooksigenazne aktivnosti COX-I (PGE_2 test) ... 114
3.4.3.3. Inhibicija peroksidazne aktivnosti COX-I (TMPD test) ... 115
3.4.4. Metode istraživanja antimikrobnog učinka ... 115
3.4.4.1. Uzgoj bakterijskih kultura i priprema inokuluma ... 116
3.4.4.2. Metoda difuzije ... 116
3.4.4.3. Metoda mikrodilucije ... 117
3.4.5. Metode istraživanja citotoksičnog učinka ... 117
3.4.5.1. Uzgoj i tretman stanica MDA-MB-231 i A1235 u kulturi ... 118
3.4.5.2. MTT test ... 118
3.4.6. Statistička obrada rezultata istraživanja bioloških učinaka ... 119
3.4.6.1. Antidijabetski učinak ... 119
3.4.6.2. Antioksidativni učinak ... 119
3.4.6.3. Protuupalni učinak ... 119
3.4.6.4. Antimikrobni učinak ... 120
3.4.6.5. Citotoksični učinak ... 120
4. REZULTATI I RASPRAVA ... 121
4.1. Botanička obilježja odabranih vrsta roda *Globularia* ... 122
4.1.1. Rasprostranjenost i morfološka obilježja ... 122
4.1.1.1. Rasprostranjenost i morfološka obilježja vrste *G. alypum* ... 122
4.1.1.2. Rasprostranjenost i morfološka obilježja vrste *G. cordifolia* ... 122
4.1.1.3. Rasprostranjenost i morfološka obilježja vrste *G. meridionalis* ... 125
4.1.1.4. Rasprostranjenost i morfološka obilježja vrste *G. punctata* ... 126
4.1.1.5. Suhi biljni material ... 130
4.1.2. Histološko-anatomska obilježja ... 133
4.1.2.1. Histološko-anatomska obilježja vrste *G. alypum* ... 133
4.1.2.2. Histološko-anatomska obilježja vrste *G. cordifolia* ... 140
4.1.2.3. Histološko-anatomska obilježja vrste *G. meridionalis* ... 147
4.1.2.4. Histološko-anatomska obilježja vrste *G. punctata* ... 153
4.1.3. Citološka obilježja ... 162
4.1.3.1. Ploidnost i veličina genoma ... 162
4.1.3.2. Broj kromosoma u tjelesnim stanicama ... 166
4.1.4. Molekularna filogenija ... 167
4.1.4.1. ITS područje jezgrine DNA ... 167
4.1.4.2. Gensko *rbc*L i međugensko *trn*L-*trn*F područje kloroplastne DNA ... 168
4.2. Fitokemijski profil odabranih vrsta roda *Globularia* ... 172
4.2.1. Kvalitativna fitokemijska istraživanja ... 172
4.2.2. Sadržaj sekundarnih metabolita ... 174
4.2.2.1. Usporedba između različitih biljnih dijelova ... 174
4.2.2.2. Usporedba između različitih populacija ovisno o sezoni ... 185
4.2.2.3. Usporedba između vrsta temeljena na njihovom višegodišnjem praćenju ... 192
4.2.2.4. Usporedba između različitih metoda ekstrakcije ... 194
4.2.2.5. Sadržaj sekundarnih metabolita u ekstraktima listova koji su primijenjeni u istraživanjima bioloških učinaka ... 197
4.2.3. Sastavnice ekstrakata ... 198
4.2.3.1. Metanolni ekstrakti nadzemnih dijelova dobiveni dekokcijom ... 198

4.2.3.2. Metanolni ekstrakti nadzemnih dijelova dobiveni ultrazvučnom ekstrakcijom 240
4.2.3.3. Metanolni ekstrakti nadzemnih dijelova dobiveni maceracijom..... 244
4.2.3.4. Metanolni ekstrakti nadzemnih dijelova dobiveni Soxhlet ekstrakcijom 266
4.2.3.5. Metanolni ekstrakti listova dobiveni ultrazvučnom ekstrakcijom 269
4.2.3.6. Kemotaksonomska karakterizacija vrsta s obzirom na sastavnice ekstrakata 275
4.2.4. Lakohlapljive sastavnice 280
4.2.4.1. Kemotaksonomska karakterizacija vrsta s obzirom na lakohlapljive sastavnice 284
4.3. Biološki učinci odabranih vrsta roda *Globularia* 287
4.3.1. Antidijabetski učinak..... 287
4.3.1.1. Antidijabetski učinak odabranih vrsta roda *Globularia*..... 291
4.3.2. Antioksidativni učinak 299
4.3.2.1. Antioksidativni učinak odabranih vrsta roda *Globularia*..... 301
4.3.3. Protuupalni učinak..... 308
4.3.3.1. Protuupalni učinak odabranih vrsta roda *Globularia*..... 310
4.3.4. Antimikrobni učinak 315
4.3.4.1. Antimikrobni učinak odabranih vrsta roda *Globularia*..... 317
4.3.5. Citotoksični učinak..... 324
4.3.5.1. Citotoksični učinak odabranih vrsta roda *Globularia*..... 325
4.3.6. Ostali biološki učinci i toksičnost 330
5. ZAKLJUČCI 331
6. LITERATURA 342
7. PRILOZI 392
8. ŽIVOTOPIS..... 394
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD 397

1. UVOD

1.1. Botanička obilježja vrsta roda *Globularia* L.

Vrste roda *Globularia* L., hrv. glavulje (Horvatić, 1954; Domac, 1973; Radić, 1976), mračnice ili mračice (Šulek, 1879; Horvatić, 1954), višegodišnje su i obično vazdazelene zeljaste biljke s drvenastom bazom, polugrmovi i grmovi (Hegi, 1918; Holländer i Jäger, 1994). Naziv roda potječe od lat. riječi *globulus* (poput kuglice, loptice), a odnosi se na cvatne glavice kuglastog oblika (Coombes, 1989).

Prema novijim klasifikacijama (APG, 1998; APG II, 2003; APG III, 2009), koje se temelje na molekularnim biljezima, odnosno na analizi sljedova DNA (Olmstead i sur., 2001; Albach i sur., 2005; Oxelman i sur., 2005), vrste ovog roda svrstavaju se u porodicu Plantaginaceae (www.theplantlist.org), hrv. terputnice, terputnjače ili trpuci (hirc.botanic.hr). U ranijim klasifikacijama, koje su se temeljile na morfološkim značajkama, glavulje su svrstavane u zasebnu porodicu Globulariaceae - glavuljače, glavuljke, mračnice (Tablica I) (Cronquist, 1981; hirc.botanic.hr).

Tablica I. Taksonomska klasifikacija roda *Globularia* L.

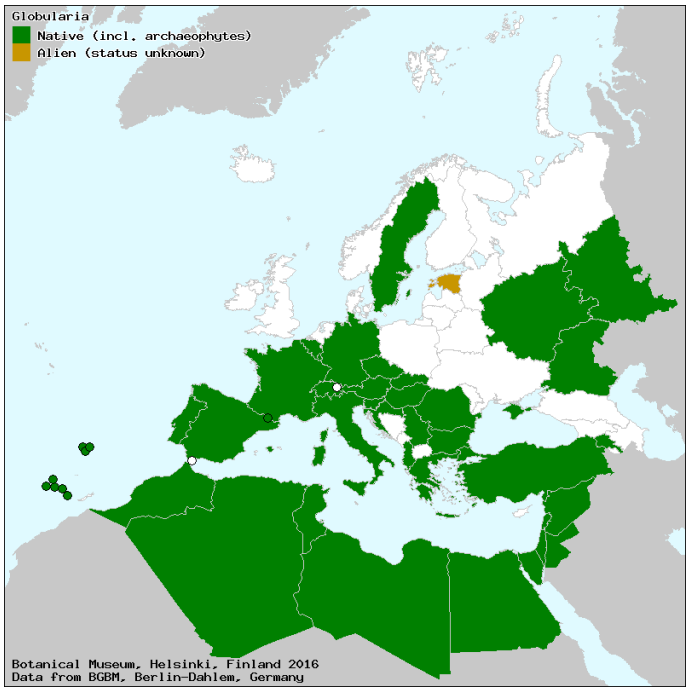
	APG klasifikacija (APG II, 2003; APG III, 2009)	**Cronquistov sustav klasifikacije** (Cronquist, 1981)
Carstvo	Plantae Haeckel	Plantae Haeckel
Podcarstvo	Tracheophyta Sinnott ex Cav.-Sm.	Tracheophyta Sinnott ex Cav.-Sm.
Nadodjeljak	Spermatophyta Britton & A. Brown	Spermatophyta Britton & A. Brown
Odjeljak	Angiospermae Lindley (P. D. Cantino & M. J. Donoghue)	Magnoliophyta Cronquist, Takht. & Zimmerm.
Razred	Eudicotae	Magnoliopsida Cronquist, Takht. & Zimmerm.
Podrazred	Asteridae Takht.	Asteridae Takht.
Nadred	Lamiidae	-
Red	Lamiales Bromhead	Scrophulariales Lindl.
Porodica	Plantaginaceae Juss.	Globulariaceae DC.
Podporodica	Globularieae (Globulariaceae) s.s.	-
Rod	*Globularia* L.	*Globularia* L.

- – nije navedeno

Rod *Globularia* obuhvaća tridesetak vrsta (www.theplantlist.org), koje su najvećim dijelom rasprostranjene u sredozemnom području (Hegi, 1918; Kušan, 1943), odnosno na području južne Europe i sjeverne Afrike, od kuda se njihova staništa prostiru dalje prema Makaroneziji, središnjoj i sjevernoj Europi te Bliskom istoku (Wagenitz, 2004) (Slika 1). Rodu pripada velik broj endemičnih vrsta i podvrsta, koje su ograničene na područje Baleara, Kanarskih i Zelenortskih otoka, gorja Atlas, Grčke, Italije, Španjolske i Turske (Schwarz, 1949; Bramwell i Kunkel, 1974; López González, 1980; Gomes i sur., 1999; López Udias i

sur., 2000; Duman, 2001; Mateos i Valdés, 2006; Duran i sur., 2009; www.emplantbase.org), kao i nekoliko hibridnih vrsta (López González, 1980; Barreno i sur., 1984; Villar Pérez i sur., 1997). Prema podacima Međunarodne unije za očuvanje prirode i prirodnih resursa (engl. *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*, IUCN, 2005), *G. sarcophylla* Svent. (González González i Reyes Betancort, 2011) i *G. stygia* Orph. ex Boiss (Delipetrou, 2011) imaju i status osjetljivih vrsta, dok je *G. ascanii* Bramwell & G. Kunkel kritično ugrožena vrsta (Marrero Rodriguez i Almeida Pérez, 2011).

Podaci o rasprostranjenosti glavulja (Tutin, 1972; www.emplantbase.org) prikazani su u Tablici II zajedno s prihvaćenim nazivima postojećih svojti i njihovim sinonimima (Ehrendorfer, 1973; Holländer i Jäger, 1994; www.emplantbase.org; www.theplantlist.org) te nazivima osam sekcija u koje su glavulje razvrstane prema posljednjoj predloženoj klasifikaciji (Holländer i Jäger, 1994; Duman, 2001; Mateos i Valdés, 2006; Duran i sur., 2009).



Slika 1. Prikaz rasprostranjenosti vrsta roda *Globularia* L. (www.emplantbase.org)

Na području Hrvatske prisutne su sljedeće vrste: *Globularia alypum* L. (grmasta glavulja), *G. cordifolia* L. (srcolika glavulja), *G. meridionalis* (Podp.) O. Schwarz (modra glavulja) i *G. punctata* Lapeyr. (Vilkomova glavulja) (hirc.botanic.hr). Navedene vrste, u usporedbi s drugim vrstama glavulja, široko su rasprostanjene i na području sjeverne Afrike i/ili Europe (Slike 2-5).

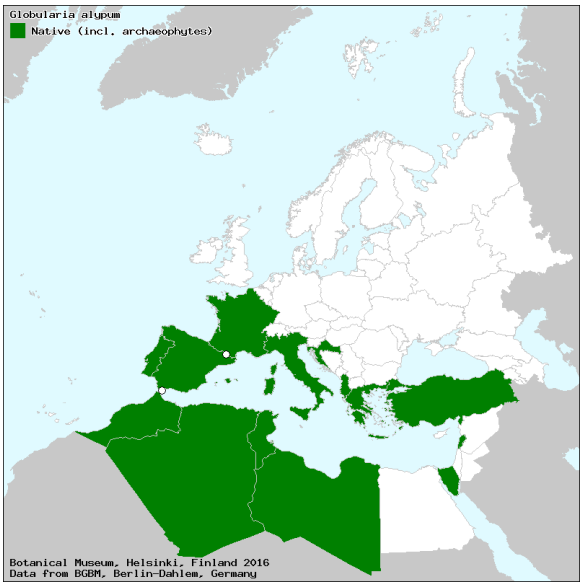
Tablica II. Postojeće svojte roda *Globularia* L., sinonimi, rasprostranjenost i podjela po sekcijama

Sinonimi	Rasprostranjenost	Sekcija
***G. alypum* L.**		
Alypum monspeliensium Fourr.; *Alypum salicifolium* Fisch.; *G. alypa* St.-Lag., *G. turbith* Willk.; *G. virgata* Salisb.	sredozemno područje (Ae, Ag, Al, Bl, Co, Cr, Ct, Ga, Gr, Hs, IJ, It, Ju, Le, Li, LS, Lu, Ma, Sa, Si, Sn, Tn, Tu)	*Alypum*[a]
***G. amygdalifolia* Webb**		
-	endem, planine Zelenortskih otoka (Cv)	*Lytanthus*[b]
***G. anatolica* A. Duran, Ö. Çetin & M. Öztürk**		
-	endem, JZ Anatolija (Tu)	*Polycephalium*[b]
***G. arabica* Jaub. & Spach**		
G. alypum var. *arabica* (Jaub. & Spach, Cavara & Grande) Pamp.; *G. eriocephala* Pomel; *G. trichocalyx* Steud.	arapske zemlje sredozemnog područja (Ag, Eg, Ir, Jo, Li, Ma, Sn, Tn)	*Alypum*[a]
***G. ascanii* Bramwell & G. Kunkel**		
-	endem, SZ dio otoka Gran Canaria (Ca)	*Lytanthus*[b]
***G. cambessedesii* Willk.**		
G. majoricensis Gand.	endem, S obala Mallorce (Bl)	*Globularia*[b]
***G. cordifolia* L.**		
G. cordifolia subsp. *cordifolia* (L.) Hayek; *G. minima* Vill.; *G. saxatilis* Salisb.	planine C i J Europe, od Karpata do SI Španjolske i J Bugarske (Al, Au, Bu, Cs, Ct, Ga, Ge, Gr, He, Hs, Hu, It, Ju, Sk, Sl, Sr, Tu)	*Empetron*[a]
***G. cordifolia* var. *borjae* (G. López) O. Bolòs & al.**		
G. borjae (G. López) López Udias, Fabregat & G. Mateo; *G. repens* subsp. *borjae* G. López	endem, C Španjolska (Hs)	*Empetron*[a]
***G. davisiana* O. Schwarz**		
-	endem, JZ Anatolija (Tu)	*Polycephalium*[b]
***G. dumulosa* O. Schwarz**		
-	endem, JZ Anatolija (Tu)	*Hellenion*[b]
***Globularia* × *fuxeensis* Giraudias (*G. nudicaulis* x *G. repens*)**		
-	endem, Pireneji (An, Ga, Hs)	*Gymnocladium*[a]
***G. hedgei* H. Duman**		
-	endem, J Anatolija (Tu)	*Polycephalium*[b]
***G. incanescens* Viv.**		
Carradoria incanescens A. DC.; *G. glauca* Balb. ex Steud.	endem, S Apenini i Apuanske Alpe (It)	*Carradoria*[b]

***Globularia* × *indubia* (Svent.) G. Kunkel (*G. salicina* x *G. sarcophylla*)**		
× *Lytanthobularia indubia* Svent.	endem, otok Gran Canaria (Ca)	*Lytanthus*[b]
G. liouvillei Jahand. & Maire		
-	endem, Atlas (Ma)	*Gymnocladium*[a]
***G. liouvillei* subsp. *greuteri* (Mateos & Valdés) Fennane**		
G. greuteri Mateos & Valdés	endem, S Maroko (Ma)	*Gymnocladium*[a]
***Globularia* × *losae* L. Villar, Sesé & Ferrández (*G. nudicaulis* subsp. *gracilis* x *G. repens*)**		
-	endem, Pireneji (Hs)	*Gymnocladium*[a]
***G. meridionalis* (Podp.) O. Schwarz**		
G. bellidifolia Ten.; *G. cordifolia* subsp. *bellidifolia* (Nyman) Wettst.; *G. cordifolia* subsp. *bellidifolia* (Ten.) Hayek; *G. cordifolia* subsp. *bellidifolia* (Ten.) Wettst.; *G. cordifolia* subsp. *meridionalis* Podp.; *G. nana* subsp. *bellidifolia* Nyman	C i J Apenini (Al, Au, Bu, Ct, Gr, It, Ju, Sr)	*Empetron*[a]
***Globularia* × *montiberica* G. López (*G. repens* x *G. vulgaris*)**		
-	endem, C Španjolska (Hs)	*Empetron*[a]
***G. nainii* Batt.**		
-	endem, Maroko (Ma)	*Alypum*[a]
***G. neapolitana* O. Schwarz**		
-	endem, J Italija, Napulj (It)	*Empetron*[a]
***G. nudicaulis* L.**		
G. alpina Salisb.	Alpe, Pireneji, planine S Španjolske (Au, Ct, Ga, Ge, He, Hs, It, Ju, Sl)	*Gymnocladium*[a]
***G. nudicaulis* subsp. *gracilis* (Rouy & J. A. Richt.) O. Bolòs & al.**		
G. gracilis Rouy & J. A. Richt.	endem, Pireneji (Hs)	*Gymnocladium*[a]
***G. orientalis* L.**		
-	JI i C Anatolija, Libanon, Sirija (Le, Sy, Tu)	*Polycephalium*[b]
***G. punctata* Lapeyr.**		
G. aphyllanthes auct.*; *G. bisnagarica* L.*; *G. elongata* Hegetschw.; *G. tenella* Lange; *G. vulgaris* auct., non L.; *G. vulgaris* subsp. *willkommii* (Nyman) Wettst.; *G. willkommii* Nyman	od S Francuske, Češke i Slovačke do S Španjolske, J Italije i SI Grčke; centralno, J i I europski dio Rusije (An, Au, Be, Bu, Co, Cs, Ct, Es, Ga, Ge, Gr, He, Hs, Hu, It, Ju, Rm, Rs, Sa, Sk, Sl, Sr, Tu)	*Globularia*[b]

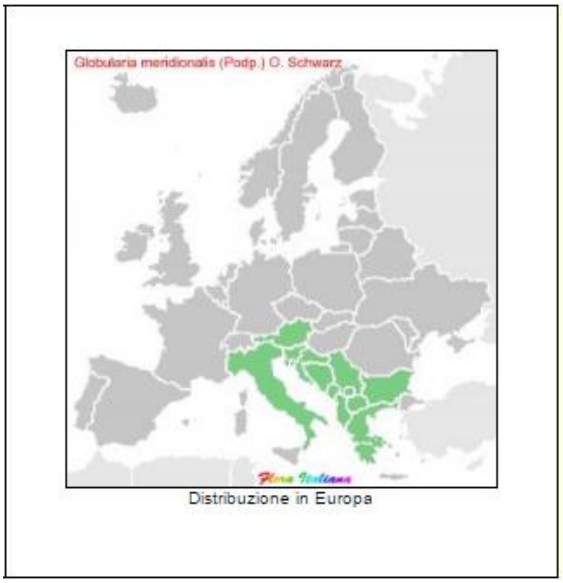
***G. repens* Lam.**		
G. cordifolia subsp. *nana* P. Fourn.; *G. nana* Lam.; *G. oscensis* Coincy	planine JZ Europe (An, Ga, Hs, It)	*Empetron*[a]
***G. salicina* Lam.**		
G. longifolia Aiton; *G. procera* Salisb.	endem, Kanarski otoci i Madeira (Ca, Md)	*Lytanthus*[b]
***G. sarcophylla* Svent.**		
-	endem, otok Gran Canaria (Ca)	*Lytanthus*[b]
***G. sintenisii* Hausskn. & Wettst.**		
-	endem, JI Anatolija (Tu)	*Polycephalium*[b]
***G. spinosa* L.**		
G. bellidifolia Salisb.; *G. ilicifolia* Willk.; *G. spinosa* var. *subscaposa* Pau ex G. López	endem, SI Španjolska (Hs)	*Globularia*[b]
***G. stygia* Orph. ex Boiss**		
-	endem, planine S Peloponeza (Gr)	*Hellenion*[b]
***G. trichosantha* Fisch. & C. A. Meyer**		
G. macrantha K. Koch ex Walp.; *G. pallida* K. Koch	I dio Balkanskog poluotoka (Ar, Bu, Le, Sy, Tcs, Rs-Krim, Tu, Uk)	*Globularia*[b]
***G. valentina* Willk.**		
G. vulgaris subsp. *valentina* (Willk.) Mateo & Figuerola	SI Španjolska, C Portugal (Ga, Hs, Lu)	*Globularia*[b]
***G. vulgaris* L.**		
G. aphyllanthes Crantz**; *G. bisnagarica* L.**; *G. caespitosa* Ortega ex A. DC.; *G. cambessedesii* subsp. *hispanica* Willk.; *G. castellana* Sennen; *G. collina* Salisb.; *G. linifolia* Lam.; *G. linifolia* subsp. *hispanica* (Willk.) M. B. Crespo & Mateo; *G. linnaei* Rouy; *G. multicaulis* Ten. ex Nyman; *G. pungens* Pourr. ex Willk. & Lange; *G. spinosa* var. *minor* Willk.; *G. suecica* Nyman; *G. vulgaris* var. *oelandica* Lange	planine S, C i I Španjolske te J Francuske, švedski otoci Öland i Gotland (Ga, Hs, Su; zabilježena i za An, Bu, Co, Ct, Ju, Lu, Tu)	*Globularia*[b]

* – primjenjuje se i za vrstu *G. vulgaris*; ** – primjenjuje se i za vrstu *G. punctata*; Ae – Istočnoegejski otoci, Ag – Alžir, Al – Albanija, An – Andora, Ar – Armenija, Au – Austrija i Lihtenštajn, Be –Belgija i Luksemburg, Bl – Baleari, Bu – Bugarska, Ca – Kanarski otoci, Co – Korzika, Cr – Kreta, Karpatos, Kasos i Gavdos, Cs – Češka, Ct – Hrvatska, Cv – Zelenortski otoci, Eg – Egipat, Es – Estonija, Ga – Francuska, Ge – Njemačka, Gr – Grčka, He – Švicarska, Hs – Španjolska, Hu – Mađarska, IJ – Izrael-Jordan, Ir – Izrael, It – Italija, Jo – Jordan, Ju – bivša Jugoslavija, Le – Libanon, Li – Libija, LS – Libanon-Sirija, Lu – Portugal, Ma – Maroko, Md – Madeira, Rm – Rumunjska, Rs – Rusija, Sa – Sardinija, Si – Sicilija i Malta, Sk – Slovačka, Sl – Slovenija, Sn – Sinaj, Sr – Srbija s Kosovom i Vojvodinom, Su – Švedska, Sy – Sirija, Tcs – Transkavkazija (Azerbejdžan, Armenija, Gruzija), Tn – Tunis, Tu – Turska, Uk – Ukrajina; [a] – podrod *Abolaria* Schwarz; [b] – podrod *Globularia* Holländer & Jäger (podrod *Jasionopsis* Schwarz)



Slika 2. Rasprostranjenost vrste *G. alypum* L. (www.emplantbase.org)

Slika 3. Rasprostranjenost vrste *G. cordifolia* L. (luirig.altervista.org)



Slika 4. Rasprostranjenost vrste *G. meridionalis* (Podp.) O. Schwarz (luirig.altervista.org)

Slika 5. Rasprostranjenost vrste *G. punctata* Lapeyr. (luirig.altervista.org)

Flora Hrvatske, na temelju manjeg broja opažanja i/ili starijih literaturnih navoda spominje i prisutnost dodatnih dviju vrsta, *G. nudicaulis*, hrv. jednousnata mračnica (Horvatić, 1954), golostabljična glavulja ili bezlistna glavulja (hirc.botanic.hr), i *G. vulgaris*, hrv. capice mačje, gumbek, puljka ili listana glavulja (Nikolić, 2000; hirc.botanic.hr). Koliko je do danas poznato, vrsta *G. vulgaris* rasprostranjena je samo na francusko-španjolskom području i na području švedskih otoka Öland i Gotland (Hegi, 1918; Schwarz, 1938; Tutin, 1972), dok starija literatura navodi njezinu prisutnost i na hrvatskom području, primjerice na planinskim pašnjacima Velebita, otoku Hvaru (Schlosser i Vukotinović, 1869), brežuljcima Skradinskog Polja i na Biokovu (Visiani, 1826). Prethodno spomenute literaturne zapise mogu objasniti navodi mnogih autora, prema kojima se naziv *G. vulgaris* često pogrešno upotrebljavao za široko rasprostranjenu vrstu *G. punctata* (*G. willkommii*) (Heckel, 1894; Wettstein, 1895b; Coste i Flahault, 1906; Fiori, 1925-1929; Schwarz, 1938; Kušan, 1943; Schwarz, 1944; Stojanov i Stefanov, 1948; Hegnauer, 1966; Pignatti, 1982; Milletti i Jarvis, 1987; Praprotnik, 2007). Starija literatura navodi prisutnost vrste *G. nudicaulis* na planinskim pašnjacima Hrvatske (Kušan, 1943), primjerice na području Ličke Plješivice (Schlosser i Vukotinović, 1869), dok prema drugim navodima ova vrsta u Hrvatskoj nije prisutna, već je riječ o zamjeni s vrstom *G. cordifolia* (Degen, 1938). Prema novijim navodima, prisutnost vrste *G. nudicaulis* zabilježena je na području Istre, uključujući područje Učke, te na području NP Risnjak (hirc.botanic.hr).

Glavulje najčešće rastu na slabo kiselom do bazičnom tlu (pH 7,5-8,5) (Topić i sur., 2006; Testiati i sur., 2013) otvorenih, suhih i često kamenitih terena (Tutin, 1972; Wagenitz, 2004), a neke se uzgajaju i kao ukrasne vrste u vrtnim kamenjarima (Sweet, 1830; Kušan, 1943; Sambamurty, 2005) i gradskim dvorištima, primjerice vrsta *G. cordifolia* (Raszka i sur., 2014), a posebno njezini kultivari „Alba“ (bijeli cvjetovi) i „Rosea“ (ružičasti cvjetovi) (Edmondson, 2004).

Vrste ovog roda osobito su raširene na krškom (vapnenačkom) tlu brdskih i planinskih područja kontinentalne i primorske Hrvatske (Slika 6), uglavnom na suhim i sunčanim livadama i travnjacima (Kušan, 1943; Topić i sur., 2006) te kamenim obroncima (Radić, 1976; Hasanagić, 1984). Poznata staništa vrste *G. punctata* su travnjaci uspravnog ovsika i srednjeg trpuca te travnjak glavulje i kršina, dok se vrsta *G. cordifolia* može naći na sljedećim staništima: kamenjarski pašnjak šaša crljenike i žute kraške zečine, travnjaci uskolisne šašike i šaša crljenike, kamenjare uspravnog ovsika i isprekidane šašike, kamenjare primorskog kovilja i šaša crljenike, kamenjara crvenog primorskog vriska i šaša crljenike, kamenjare uskolisne žutilovke i šiljastog šaša te kamenjare vlasaste mišjakinjice i kamenjarske žutilovke

(hirc.botanic.hr). Vrsta *G. alypum* relikt je stare mediteranske flore, a raste uz morsku obalu u pukotinama vapnenačkih stijena i kamenjarama konavoskog područja (Kušan, 1943; Šugar, 1994). Istraživanje provedeno u Francuskoj pokazalo je da može rasti čak i na metalima zagađenom području (Testiati i sur., 2013). Vrste *G. cordifolia* i *G. meridionalis* moguće je naći i u planinskim vrištinama i šumama crnog bora (Kušan, 1969).

Slika 6. Rasprostranjenost glavulja u Republici Hrvatskoj (hirc.botanic.hr)

Morfološki, glavulje karakteriziraju jednostavni kožasti listovi bez palistića, koji su smješteni naizmjenično na stabljici i/ili u rozeti te peteročlani jednosimetrični (zigomorfni) dvospolni sjedeći cvjetovi, koji su gusto zbijeni u cvat glavicu i smješteni terminalno na konveksnom cvjetištu (receptakulu) stabljike i njezinih ogranaka (Lindley, 1836; Tutin, 1972; Wagenitz, 2004).

Glavicu, koja je obično modre ili svijetloljubičaste, a iznimno bijele boje (Domac, 1950; Domac, 1973), odnosno žute kod vrste *G. nainii* (Schwarz, 1963), okružuje ovoj zaštitnih pricvjetnih listova (brakteja), odnosno involukrum. Korijen ovih vrsta vrlo je opsežan, primjerice kod vrste *G. punctata* može narasti do dubine i širine od 1 m (Slika 7) (Holländer i Jäger, 1998).

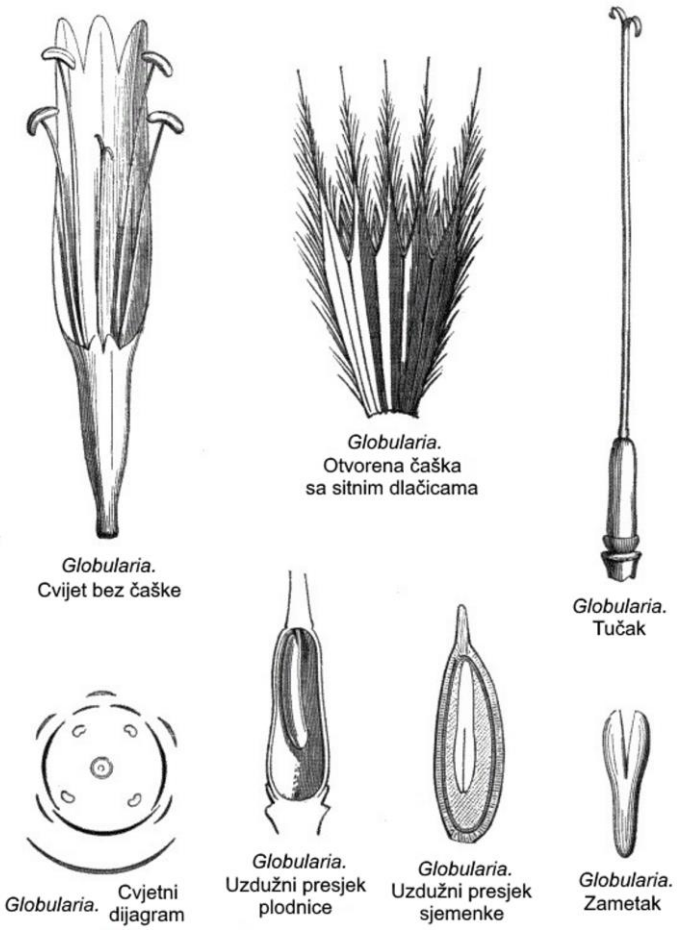
Ocvijeće glavulja je dvostruko, građeno od čaške i vjenčića. Čaška je sulapna, građena od pet sraslih lapova, čiji zupci su ušiljeni i dugi jednako ili duži od cijevi čaške, te dvousnata ili gotovo pravilna (aktinomorfna). Vjenčić je duži od čaške, sulatičan, građen od pet sraslih latica te dvousnat, pri čemu je gornja usna obično kraća i podijeljena u dva režnja (rjeđe jedan ili nijedan), a donja duža i podijeljena u tri režnja. Iz cijevi vjenčića obično vire četiri dvomoćna prašnika i vrat tučka, čija njuška je podijeljena u dva dijela. Plodnica tučka je

jajolika i nadrasla te ju obično okružuje nektarijski disk ili nekoliko žlijezda. Jednogradna je i sadrži jedan sjemeni zametak (Slika 8). Iz njega se nakon oprašivanja i oplodnje razvija sitni suhi jednosjemeni plod nepucavac (oraščić) tanke stijenke, koji ostaje zatvoren u čvrstoj čaški (Wettstein, 1895a; Hegi, 1918; Domac, 1950; Hegi, 1974; Wagenitz, 2004). Sjemenka sadrži uljasti endosperm (Watson i Dallwitz, 1992). Peludna zrnca su trikolpatna, manje-više okruglasta do izdužena (Hegi, 1974).

Slika 7. Botanički prikaz vrste *G. punctata* (nepoznati autor, 1955)

Oprašivanje je entomogamno, a najvažniji oprašivači su leptiri (Hegi, 1922; Domac, 1950; Wagenitz, 2004), od kojih moguće potječe jedan od naziva vrste *G. vulgaris* (srp. *leptirica*) (Milovanović, 2005). Ostali oprašivači mogu biti pčele i osolike muhe. Oprašivanje može biti unakrsno (alogamija) ili samooprašivanje (autogamija) (Honnay i sur., 2007), primjerice kod vrsta *G. cordifolia* i *G. punctata* (Wettstein, 1895a). Sjemenke se rasprostranjuju padanjem na tlo uslijed djelovanja gravitacije (barohorno) (www.tela-botanica.org), vjetrom (anemohorno), vezanjem čaški za krzno životinja (epizoohorno) ili životinjama koje se njima hrane kao što su miševi (endozoohorno) (Holländer i Jäger, 1998). Osim spolnim putem (sjemenom) (Holländer i Jäger, 1998), glavulje se mogu razmnožavati i

vegetativno (vriježama) (Edmondson, 2004; Marrero Rodriguez i Almeida Pérez, 2011). Vrsta *G. punctata* može doseći životni vijek od 20 do 25 godina (Holländer i Jäger, 1998), dok je kod vrste *G. cordifolia* prosječan životni vijek 10 do 35 godina (Molisch i Fulling, 1938), a može doseći čak i do 60 godina (Schweingruber, 2007).



Slika 8. Morfološka obilježja cvijeta glavulja (preuzeto i prilagođeno iz Watson i Dallwitz, 1992)

Još jedna karakteristična pojava kod glavulja je da prilikom sušenja biljni materijal često poprima zeleno-sivu do crnu boju (Geiger, 1829; Lindley, 1836; Paris, 1946) (Slika 7), posebno ako je sušen u vlažnoj atmosferi. Ona se pripisuje hidrolizi ili oksidaciji prisutnih iridoidnih glukozida (npr. aukubina, asperulozida, globularina) pod djelovanjem emulzina (β-D-glukozidaze) te vjerojatno posljedičnoj polimerizaciji oslobođenih aglikona (Paris, 1946; Paris i Chaslot, 1955; Hegnauer, 1966; Hegi, 1974). Navedena pojava mogla bi objasniti zašto su u hrvatskom i slovenskom jeziku vrste roda *Globularia* poznate pod nazivima mračnice ili mračice (Šulek, 1879; Piskernik, 1941; Horvatić, 1954).

1.1.1. *Globularia alypum* L.

Objašnjenje naziva: grč. ἄλυπος, *alypos* – bez boli, grč. *alypon* – biljka koja uklanja bol (Kušan, 1943; actaplantarum.org)

Narodni nazivi na hrvatskom jeziku: Alipo (Šulek, 1879), Glavičica (Hasanagić, 1984; Tucakov, 1984), Pokus (Šulek, 1879; Kušan, 1938; Hasanagić, 1984; Tucakov, 1984; Šugar 2008), Grmasta glavulja (hirc.botanic.hr), Subotica (Kušan, 1956)

Strani nazivi: ar. *'Aynūn* (Hammiche i sur., 2013), *Ain Larneb*, *Tasselgha* (Azzi i sur., 2012), *Chebra* (Allali i sur., 2008), *Sanna beldi*, *Sene du pays* (Hammiche i sur., 2013), *Taslka* (Cheriti i sur., 1995), *Tesselgha* **(Alžir)** (Sarri i sur., 2015), *Âin lerneb, Taselgha* (Boukhira i sur., 2013; Katiri i sur., 2017), *Tirka* (Montanari, 2012; Montanari, 2014), *Taslgha* **(Maroko)** (Saadi i sur., 2013), *Zerreiga* (El-Mokasabi, 2014a), *Zerga* **(Libija)** (Bogdadi i sur., 2007), *Zoreka* **(Palestina)** (Jaradat, 2005), *Selgha, Tasselgha, Zriga* **(Tunis)** (Leporatti i Ghedira, 2009), *Hallab rwa* **(Zapadna Sahara)** (Hammiche i sur., 2013), engl. *Shrubby Globularia* (www.tela-botanica.org), *Three-toothed Globularia* (Sweet, 1830), *Wild senna* (Hänsel i sur., 1993), fr. *Alypon* (Kušan, 1943), *Globulaire alypum*, *Globulaire buissonnante* (www.tela-botanica.org), *Globulaire turbith*, *Herbe terrible*, *Séné arabe*, *Séné de Provence*, *Séné sauvage*, *Turbith*, *Turbith blanc* (Hänsel i sur., 1993), gr. *Staurias*, *Sideri* (Kušan, 1943), kat. *Cogullada*, *Cruixillada*, *Escorsillada*, *Foixarda*, *Sevillana*, niz. *Drietandkogelbloem*, *Turpethkogelbloem*, njem. *Dreizähnige Kugelblume* (www.tela-botanica.org), šp. *Álipo*, *Boja*, *Cardenilla*, *Cebollada*, *Cogullada*, *Corona/Coronilla del fraile/rey*, *Coronilla real*, *Cujarda*, *Globularia Segullada*, *Rocha*, *Servencia*, *Siemprenjuta*, *Turbith blanco*, *Zeballada*, *Zocolada* (Kušan, 1943; Hänsel i sur., 1993; Sales i Hedge, 2001; www.tela-botanica.org), tal. *Erva bianca* (Tuttolomondo i sur., 2014; Licata i sur., 2016), *Sena di Provenza*, *Sena falsa* (Kušan, 1943; Hänsel i sur., 1993), *Vedovelle cespugliose* (Pignatti, 1982)

Slika 9. *Globularia alypum* L. (Konavoske stijene)

Životni oblik: hamefit (hirc.botanic.hr)

Broj kromosoma: 2*n* = 16 (Tutin, 1972)

Morfološka i organoleptička obilježja: Zimzeleni (polu)grm visine do 60 cm (30-80 cm), uspravne ili ponekad prilegnute drvenaste svijetlosivosmeđe stabljike s brojnim ograncima. Mlađi ogranci nose u pršljenovima sakupljene svjetlozelene do plavičasto zelene kožaste listove kratkih peteljki, koji su obrnuto lancetastog do obrnuto jajolikog oblika sa zašiljenim vrhom ili s dva do tri zubića na vrhu te sjajnim točkicama s obje strane (karbonatni sekret), dok su na glavnim stabljikama listovi ravnomjerno raspoređeni. Mirisne plavičaste (rijetko bijele) cvatne glavice smještene su terminalno, ponekad sa sjedećim cvatnim glavicama u pazušcima ispod njih. Promjera su 1 do 2,5 cm i obavijene kožastim okruglastim ili jajastim braktejama tupog vrha i trepavičasto dlakavog ruba, koje se gusto preklapaju i čija dužina je dvostruko veća od širine. Zubići čaške približno su dvostruko duži od cijevi čaške, čekinjasti su i prekriveni brojnim dugim dlakama (Slika 9) (Coste i Flahault, 1906; Fiori, 1925-1929; Kušan, 1943; Pignatti, 1972; Tutin, 1972). Listovi su trpkog i vrlo gorkog okusa, koji je sličan okusu kinina (prag gorčine 1:3000) (Martius, 1857; Peyer, 1942) i imaju poseban aromatičan miris (Peyer, 1942), koji podsjeća na vrste iz porodice Lamiaceae (Walz, 1857) ili na svježu koru vrbe (Martius, 1857).

Period cvatnje: jedan do dva puta godišnje (Prieto i sur., 2008), u zimu i proljeće (Coste i Flahault, 1906), X-III (Pignatti, 1982), do VI (Kušan, 1943),

Tip staništa: kamenita i suha mjesta, morske litice i rubovi miješanih šuma u kojima prevladava alepski bor, pukotine vapnenačkih stijena i kamenjare, zimzeleno obalno i donje brdsko područje (Kušan, 1943; Šugar, 1994), kamenjare i garig (Quezel i Santa, 1963)

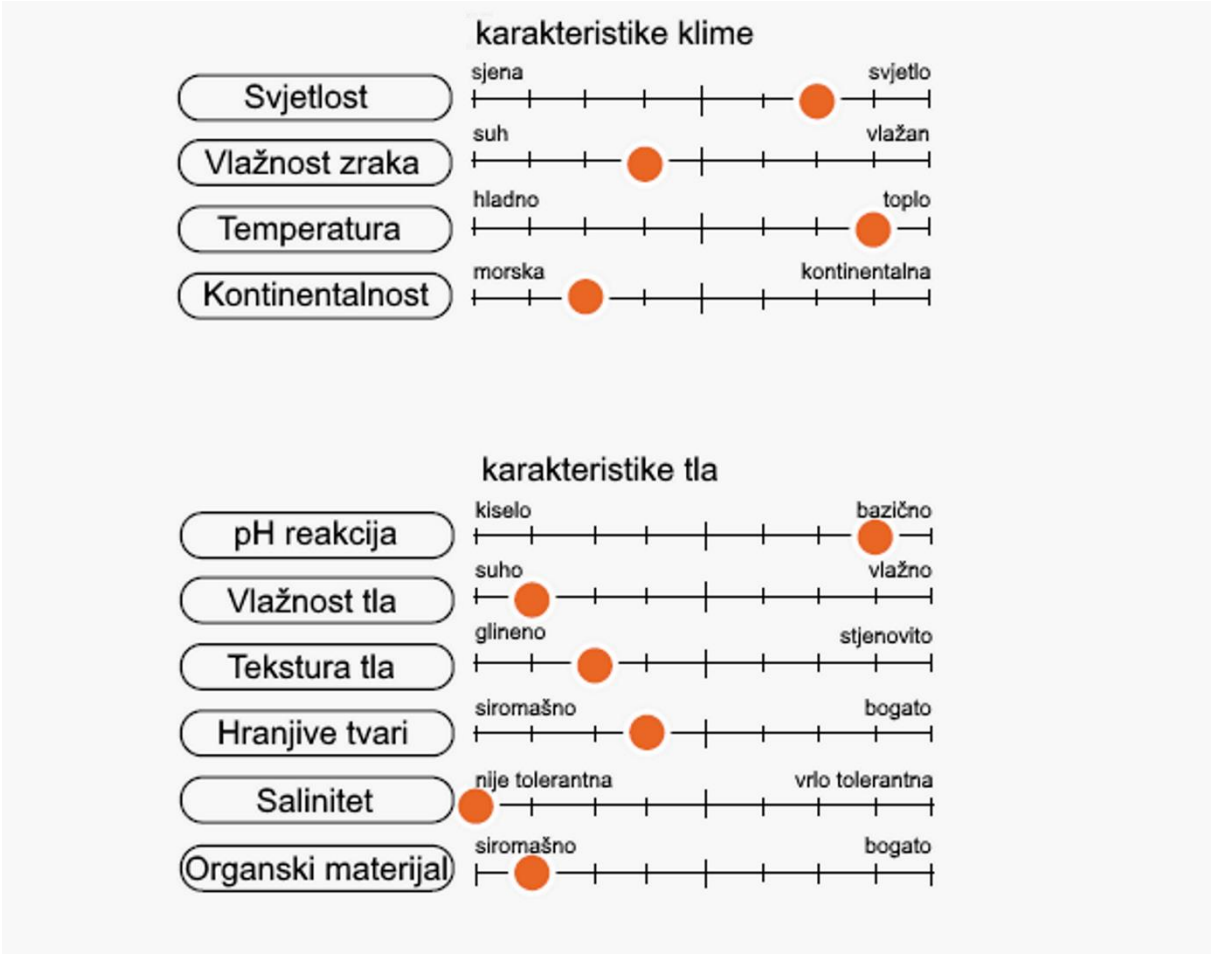
Nadmorska visina: 50-200 m (Kušan, 1943), 0-600 m (Pignatti, 1982)

Rasprostranjenost u RH: Konavoske stijene (hirc.botanic.hr)

Status u RH: gotovo ugrožena vrsta (Šugar, 1994; Nikolić i Topić, 2005)

Optimalni ekološki uvjeti:

- **Svjetlost:** 9 – biljka punog svjetla (potpuno osvjetljena mjesta, relativno osvjetljenje veće od 50%)
- **Temperatura:** 8 – između 7 i 9 (težište na submediteranskim staništima) (Slika 10) (hirc.botanic.hr)



Slika 10. Optimalni ekološki uvjeti za vrstu *G. alypum*

(preuzeto i prilagođeno iz www.tela-botanica.org)

1.1.2. *Globularia cordifolia* L. (*G. cordifolia* subsp. *cordifolia* (L.) Hayek)

Objašnjenje naziva: lat. *cordifolia* – koja ima listove srcolikog oblika (Coombes, 1989)

Narodni nazivi na hrvatskom jeziku: Krška glavulja, Modra glavulja (Radić, 1976), Srcasta loptica (Hasanagić, 1984), Srcolika glavulja, Srdcolistna glavulja (hirc.botanic.hr), Srcolika mračnica (Topić i sur., 2006), Srcolikolisna glavulja (Forenbacher, 1990)

Strani nazivi: engl. *Matted Globularia* (www.tela-botanica.org), *Wedge-leaved Globularia* (Sweet, 1830), fr. *Globulaire à feuilles cordées* (www.tela-botanica.org), *Globulaire à feuilles en coeur* (Tenore, 1824-1829), *Veuve-céleste*, kat. *Lluqueta vera*, niz. *Hartblad Kogelbloem*, *Hartbladige Kogelbloem* (www.tela-botanica.org), njem. *Herzblätterige Kugelblume* (Hegi, 1959), *Herzblättrige Kugelblume* (Willkomm, 1887; Rauh, 1952), slov. *Srčastolistna mračica* (Piskernik, 1941; Martinčić i Sušnik, 1969; Trpin i Vreš, 1995; Praprotnik, 2015), šp. *Globularia menor*, *Globularia nana*, *Yerba negra*, *Yerba prima* (Sales i Hedge, 2001), tal. *Globolaria a foglie cordate* (Tenore, 1824-1829), *Vedovella celeste* (www.tela-botanica.org), *Vedovella a foglie cordate* (luirig.altervista.org), *Vedovella alpina*, *Vedovelle celesti* (Pignatti, 1982; actaplantarum.org)

Slika 11. *G. cordifolia* L. (Mostar)

Životni oblik: hamefit (hirc.botanic.hr)

Broj kromosoma: 2*n* = 32 (Tutin, 1972; Hegi, 1974)

Morfološka i organoleptička obilježja: Patuljasti polugrm s poleglim i puzajućim stabljikama dužine do 30 cm, koje razvijaju korjenčiće u koljencima. Uspravni izdanci koji nose cvatne glavice visoki su 1 do 10 cm, bezlisni su ili s 1 do 3 kopljasta listića. Listovi lopatastog oblika, dužine 23 do 25 mm, a širine 6 do 8 mm, smješteni su u rozeti (ružici) na dnu stabljike i na postranim izdancima. Obično su urezani, ponekad ušiljenog ili izrubljenog vrha, odnosno s tri zubića na vrhu, pri čemu su vanjski zubići duži od središnjeg. Cvatne glavice promjera 1 do 2 cm zaštićene su brojnim ovojnim listovima jajoliko-lancetastog do jajolikog oblika i šiljatog vrha koji se prema gore postepeno sužava. Dužina ovojnih listova je tri do četiri puta veća od njihove širine, a najširi su pri dnu. Čaška je dlakava i dvousnata sa zubićima lancetastog oblika, koji nisu duži od cijevi čaške (Slika 11) (Hegi, 1918; Kušan, 1943; Domac, 1950; Kušan, 1956; Tutin, 1972; Hegi, 1974; Forenbacher, 1990). Vjenčić je (svijetlo) ljubičastomodre boje (Hegi, 1918; Hegi, 1974; Forenbacher, 1990), rijetko ljubičastorozi do bjelkasti (Fiori, 1925-1929; Hegi, 1974), dužine 5 do 10 mm (Hegi, 1974). Biljka nema miris po kumarinima (Schwarz, 1938).

Period cvatnje: III-V (Radić, 1976), IV-VI (Pignatti, 1982); IV-VII (actaplantarum.org), V-VI (Willkomm, 1887; Coste i Flahault, 1906; Piskernik, 1941; Forenbacher, 1990), VI-VII (Hegi, 1974), V-VII (na većim visinama do VIII) (Josifović, 1974)

Tip staništa: prisojni obronci brdskih krajeva, stijene, siromašno i kameno tlo vapnenačkog sastava (Hegi, 1918; Kušan, 1943), pećine, kamenjarski sunčani travnjaci i pretplaninske rudine, od obalnog područja do najviših vrhova (Forenbacher, 1990), kamenite, suhe i sunčane padine i šljunčani tereni (Hegi, 1918; Hegi, 1974), pionirska vrsta na riječnom šljunku (Hegi, 1974), usponi s primorske, a ponešto i sa zagorske strane, planinske visoravni i vrhovi (Radić, 1976), kamenita mjesta (Piskernik, 1941)

Nadmorska visina: 5-1750 m (Forenbacher, 1990), 100-2600 m (luirig.altervista.org), 200-2600 m (Pignatti, 1982), 500-2900 m (Milletti i Strid, 1991)

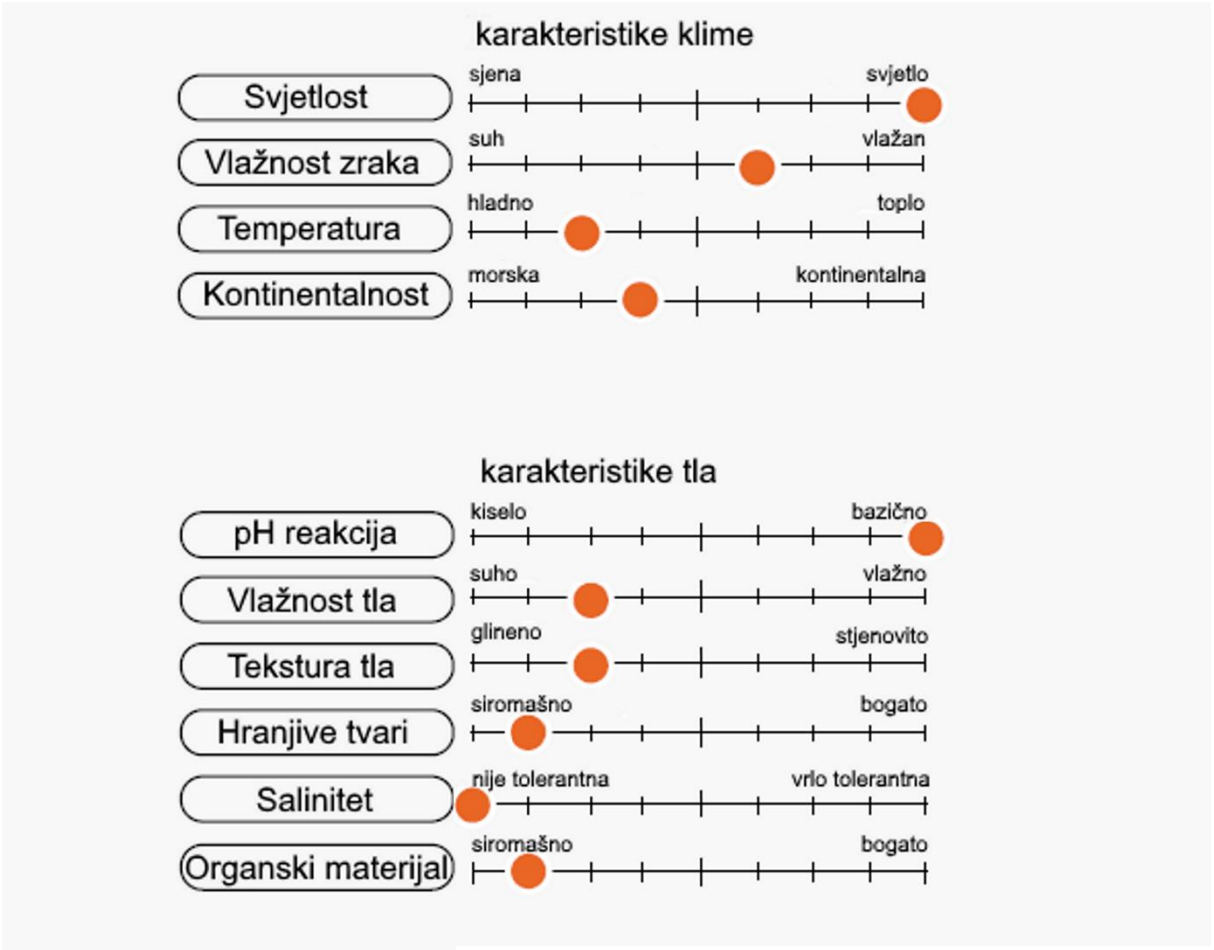
Rasprostranjenost u RH: Biokovo, poluotok Pelješac, Velebit (hirc.botanic.hr)

Status u RH: nije ugrožena vrsta (hirc.botanic.hr)

Optimalni ekološki uvjeti:

- **Svjetlost:** 9 – biljka punog svjetla (potpuno osvjetljena mjesta, relativno osvjetljenje veće od 50%)
- **Temperatura:** 3 – prohladno (pretežno subalpska staništa)
- **Kiselost:** 9 – bazična tla i tla bogata kalcijem (isključivo)

- **Vlaga:** 3 – suha tla (češće dolazi na suhim nego na svježim tlima, nema je na vlažnim tlima)
- **Tekstura tla:** 1 – stijene, blokovi i zidovi
- **Dušik:** 1 – staništa najsiromašnija dušikom
- **Salinitet:** 0 – ne podnosi zaslanjenje
- **Humus:** 2 – mineralna tla (uglavnom rasprostranjena na tlima s malim humusnim pokrovom, ne dolazi na cretovima i na prhlini) (Slika 12) (hirc.botanic.hr)



Slika 12. Optimalni ekološki uvjeti za vrstu *G. cordifolia*
(preuzeto i prilagođeno iz www.tela-botanica.org)

1.1.3. *Globularia meridionalis* (Podp.) O. Schwarz (*G. cordifolia* subsp. *bellidifolia* (Ten.) Wettst.)

Objašnjenje naziva: lat. *meridionalis* – koja cvate u podne (Coombes, 1989), južna (actaplantarum.org); lat. *bellidifolia* – koja ima listove poput tratinčice (*Bellis* sp.)

Narodni nazivi na hrvatskom jeziku: Gorska glavulja (Radić, 1976), Modra glavulja (Šoljan i sur., 2009; hirc.botanic.hr)

Strani nazivi: engl. *Daisy-leaved Globularia* (Sweet, 1830), fr. *Globulaire à feuilles de paquerette* (Tenore, 1824-1829), njem. *Südliche Kugelblume* (Hegi, 1974), slov. *Južna mračica*, *Marjetičnolistna mračica* (Piskernik, 1941; Praprotnik, 2015), tal. *Globularia a foglie di bellide* (Tenore, 1824-1829), *Vedovelle appenniniche* (Pignatti, 1982)

Slika 13. *G. meridionalis* (Podp.) O. Schwarz (Grobničko polje)

Životni oblik: hamefit (hirc.botanic.hr)

Broj kromosoma: 2*n* = 16 (Tutin, 1972; Hegi, 1974)

Morfološka i organoleptička obilježja: Patuljasti polugrm sličan vrsti *G. cordifolia*, samo robusniji (Tutin, 1972), visine 6 do 12 cm, s puzajućim stabljikama dužine do 50 cm (Hegi, 1974). Listovi u rozeti su ravni, veličine 20-90 x 2-5 mm, lancetastog do obrnuto lancetastog oblika, na vrhu kratko ušiljeni ili zaobljeni, a rijetko neznatno nazubljeni. Ovojni listovi cvata su jajoliki i gotovo šiljasti, dvostruko su duži nego širi i sužavaju se prema dnu. Zubići čaške su linearno-lancetastog oblika i duži od cijevi čaške (Slika 13) (Hegi, 1918; Kušan, 1943; Domac, 1950; Tutin, 1972; Hegi, 1974; Forenbacher, 1990). Vjenčić je svijetlo nebesko plave (Tenore, 1824-1829) do ljubičastomodre boje, dužine 7 do 12 mm (Hegi, 1974). Biljka nakon sušenja dugo zadržava snažan miris po kumarinima (Schwarz, 1938), odnosno mirisom podsjeća na lazarkinju (*Galium odoratum* (L.) Scop.) (Hermann, 1956),

Period cvatnje: V-VI (Radić, 1976), V-VII (Piskernik, 1941; Pignatti, 1982; Šoljan i sur., 2009)

Tip staništa: slična staništa i isti visinski raspon kao kod vrste *G. cordifolia* (Forenbacher, 1990), otvorene vapnenačke kamenjare i kameniti pašnjaci (Šoljan, 2009), pretplaninske i planinske goleti (Radić, 1976), goli kameniti travnjaci, stijene (Piskernik, 1941)

Nadmorska visina: 200-2700 m (actaplantarum.org), 300-2270 m (Pignatti, 1982)

Rasprostranjenost u RH: Biokovo, Gorski kotar, Grobničko polje, Hrvatsko primorje, Istra, Lička Plješivica, Mosor, Plitvička jezera, područje Knina i Ogulina, područje NP Krka, poluotok Pelješac, Risnjak, Učka, Velebit, Vransko jezero (hirc.botanic.hr)

Status u RH: nije ugrožena vrsta (hirc.botanic.hr)

Optimalni ekološki uvjeti:

- **Svjetlost:** 9 – biljka punog svjetla (potpuno osvjetljena mjesta, relativno osvjetljenje veće od 50%)
- **Temperatura:** 3 – prohladno (pretežno subalpska staništa)
- **Kiselost:** 9 – bazična tla i tla bogata kalcijem (isključivo)
- **Vlaga:** 4 – između 3 i 5 (srednje vlažna tla)
- **Tekstura tla:** 1 – stijene, blokovi i zidovi
- **Dušik:** 2 – između 1 i 3 (staništa siromašna dušikom)
- **Salinitet:** 0 – ne podnosi zaslanjenje
- **Humus:** 2 – mineralna tla (uglavnom rasprostranjena na tlima s malim humusnim pokrovom, ne dolazi na cretovima i na prhlini) (hirc.botanic.hr)

1.1.4. *Globularia punctata* Lapeyr.

Objašnjenje naziva: lat. *punctata* – koja ima točkice, točkasta (Coombes, 1989)

Narodni nazivi na hrvatskom jeziku: Capice mačje, Gumbek, Pulka, Puljka (Šulek, 1879; Haračić, 1905; Šugar, 2008), Mačje capice (Šulek, 1879; Kušan, 1938), Mačje šapice (Tucakov, 1984), Mračica, Mračnica (Šulek, 1879), Obična glavulja (Kušan, 1956; Forenbacher, 1990); Obična mračnica (Horvatić, 1954), Vilkomova glavulja (Topić i sur., 2006; Šoljan i sur., 2009)

Strani nazivi: engl. *Common Globularia* (www.tela-botanica.org), *Flax-leaved Globularia* (Sweet, 1830), fr. *Globulaire allongée*, *Globulaire ponctuée* (www.tela-botanica.org), *Marguerite bleue* (Hegi, 1918; Hegi, 1974), niz. *Kogelbloem*, njem. *Echte Kugelblume*, *Gemeine Kugelblume*, *Gewöhnlicher Kugelblume* (Hegi, 1918; www.tela-botanica.org), *Flachsblättrige Kugelblume* (Dietrich, 1804), *Rundblättrige Kugelblume* (www.tela-botanica.org), slov. *Navadna mračica* (Piskernik, 1941; Martinčić i Sušnik, 1969; Trpin i Vreš, 1995; Praprotnik, 2007), tal. *Morine*, *Vedovelle dei prati* (Pignatti, 1982; www.tela-botanica.org), *Vedovina allungata dei campi*, *Vedovina dei campi* (luirig.altervista.org)

Slika 14. *G. punctata* Lapeyr. (Slapnica)

Životni oblik: hemikriptofit (hirc.botanic.hr)

Broj kromosoma: 2*n* = 16 (Tutin, 1972; Hegi, 1974)

Morfološka i organoleptička obilježja: Zeljasta višegodišnja biljka s drvenastom bazom i jednom ili više nerazgranatih stabljika visine do 30 cm (do 40 cm potkraj vegetacijskog razdoblja), koje nose brojne sjedeće listove lancetastog do duguljastog oblika te završavaju svaka s po jednom cvatnom glavicom s mnogo cvjetova. U rozeti na dnu stabljike smješteni su vazdazeleni vodoravno položeni obrnuto jajoliki do lopatasti listovi dugih peteljki, čiji rub je okruglast, blago urezan ili s 1 do 3 zubića na vrhu. S gornje strane listova dobro su vidljive bočne žile. Cvatne glavice promjera 1 do 1,5 cm zaštićene su brojnim ovojnim listovima koji su lancetasti i šiljasti. Zubići čaške su linearno-lancetasti i približno iste dužine kao cijev čaške. Vjenčić je ljubičastomodre boje, a rijetko bjelkast ili ružičast, dužine 6 do 12 mm (Slika 14) (Hegi, 1918; Fiori, 1925-1929; Domac, 1950; Pignatti, 1972; Tutin, 1972; Forenbacher, 1990; Milletti i Strid, 1991). Čitava biljka je gorkog okusa (Kušan, 1956). Listovi kod sušenja lagano pocrne (Geiger, 1829).

Period cvatnje: III-V (Coste i Flahault, 1906; Pignatti, 1982), III-VI (actaplantarum.org), IV-VI (Hegi, 1974); V-VI (Hegi, 1918; Forenbacher, 1990; Šoljan, 2009)

Tip staništa: suhe i sunčane livade i travnjaci (Kušan, 1943), tople, sunčane, travnate i kamenite padine, šljunčani tereni, rubovi šuma, svijetle borove šume (Hegi, 1918; Hegi, 1974), od obalnog do višeg gorskog područja (Forenbacher, 1990), posebno vapnenačko tlo nižeg brdskog područja (Kušan, 1943)

Nadmorska visina: 5-1200 m (Forenbacher, 1990), 0-1500 m (Pignatti, 1982), 300-1800 m (Milletti i Strid, 1991)

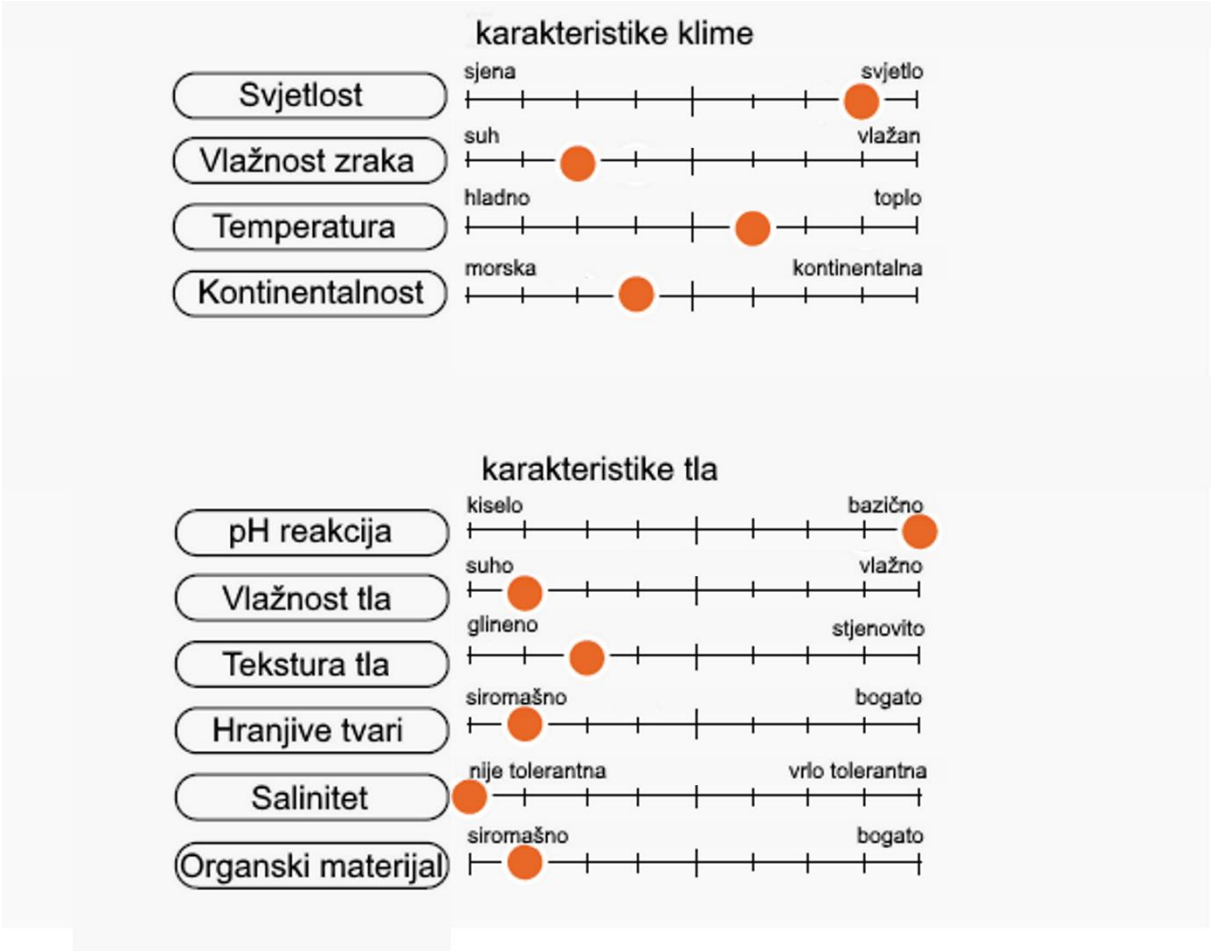
Rasprostranjenost u RH: Dinara, Gorski kotar, Hrvatsko primorje, Istra, Lika, Mala Kapela, Medvednica, Plitvička jezera, područje Generalskog Stola, Lepoglave i Radoboja, područje NP Krka, Risnjak, Totovec (Međimurje), Velebit, Žumberak-Samoborsko gorje (hirc.botanic.hr)

Status u RH : nije ugrožena vrsta (hirc.botanic.hr)

Optimalni ekološki uvjeti:

- **Svjetlost:** 8 – biljka svjetla (samo iznimno kod manje od 40% relativnog osvjetljenja)
- **Temperatura:** 6 – između 5 i 7 (dolinska do brdska staništa)
- **Kiselost:** 7 – slabo kisela do slabo bazična tla (nikada na jako kiselim tlima)
- **Vlaga:** 2 – između 1 i 3 (srednje vlažna tla)

- **Tekstura tla:** 3 – biljka propusnih, skeletom bogatih ili pjeskovitih, dobro prozračenih tala (srednji promjer čestica u rizosferi 0,05 – 2 mm)
- **Dušik:** 1 – staništa najsiromašnija dušikom
- **Salinitet:** 0 – svojta ne podnosi zaslanjenje
- **Humus:** 3 – tla s osrednjom količinom humusa (uglavnom na prhlini, rijetko na tlima bez humusa i na cretovima) (Slika 15) (hirc.botanic.hr)



Slika 15. Optimalni ekološki uvjeti za vrstu *G. punctata*
(preuzeto i prilagođeno iz www.tela-botanica.org)

1.2. Pregled dosadašnjih botaničkih istraživanja vrsta roda *Globularia* L.

Vrste roda *Globularia* ranije su bile poznate pod raznim nazivima: *Alypum*, *Aphyllanthes*, *Bellis*, *Empetron*, *Hippoglossum*, *Scabiosa* i *Thymelaea* (Linné, 1753; Planchon, 1859), a pod zajedničkim nazivom objedinio ih je Tournefort 1719. godine. Porodicu Globulariaceae, koja je uz rod *Globularia* sadržavala još pet rodova, predložio je Lamarck 1786. godine, dok ju je De Candolle ograničio samo na rod *Globularia* (Lamarck i De Candolle, 1815; Planchon, 1859; Heckel, 1894; Wagenitz, 2004). Među najvažnije monografije roda *Globularia* ubrajaju se one sljedećih autora: Cambessèdes (1826), Willkomm (1850), Heckel (1894), Wettstein (1895a, 1895b), Schwarz (1938, 1963), Milletti (1987), Holländer i Jäger (1994). U Hrvatskoj ih je istraživao i opisao Kušan (1943).

Granice roda *Globularia* prvi je postavio Linné (Cambessèdes, 1826), koji je poznavao sedam vrsta glavulja: *G. alypum*, *G. bisnagarica* (= *G. punctata*), *G. cordifolia*, *G. nudicaulis*, *G. orientalis*, *G. spinosa* i *G. vulgaris* (Linné, 1753). Cambessèdes je u svojoj monografiji roda glavulja opisao morfološku građu osam vrsta, uključujući vrste *G. incanescens* i *G. salicina*, dok *G. punctata* nije bila uključena kao posebna vrsta (Cambessèdes, 1826). Willkomm je opisao 11 vrsta i naveo granice njihove rasprostranjenosti. Pri tome je vrstu *G. punctata* označio pod nazivom *G. vulgaris*, dok je vrstu *G. incanescens* izdvojio kao pripadnicu posebnog roda (*Carradoria incanescens*) (Willkomm, 1850). Heckelova monografija uključivala je također 11 vrsta glavulja, a između ostalog vrste *G. alypum*, *G. cordifolia* (var. *intermedia*, *bellidifolia* i *nana*) i *G. vulgaris*. *G. willkommii* (= *G. punctata*) bila je uključena u monografiju kao varijetet vrste *G. vulgaris* (Heckel, 1894). Wettstein (1895a) je u rod *Globularia* ubrojio 17 vrsta, dok je dvije vrste naveo kao predstavnice posebnog roda *Lytanthus* (*L. salicinus* = *G. salicina* i *L. amygdalifolius* = *G. amygdalifolia*). Ovaj autor, kao odvojene, između ostalih, navodi vrste *G. alypum*, *G. cordifolia*, *G. bellidifolia* i *G. willkommii* (= *G. punctata*) (Wettstein, 1895a). Schwarz (1938, 1963) je opisao 22 do 24 vrste roda *Globularia*, pri čemu je u navedeni rod uključio i dva pripadnika Wettsteinovog roda *Lytanthus* (Wettstein, 1895a). Vrstu *G. punctata* navodi pod nazivom *G. aphyllanthes*, a u ostale, od njega izdvojene vrste, ubrajaju se i *G. alypum*, *G. cordifolia* te *G. meridionalis* (Schwarz, 1938; Schwarz, 1963).

Holländer i Jäger (1994) posljednji su dali pregled ovog roda, u koji su ubrojili 24 vrste glavulja podijeljene u osam sekcija. Pri tome su uključili jednu novu vrstu (*G. ascanii*), dok su svojtama *G. meridionalis* i *G. neapolitana* dali status podvrsta vrste *G. cordifolia*. Vrstu *G. punctata* navode kao posebnu vrstu (Holländer i Jäger, 1994).

1.2.1. Anatomska istraživanja

Dosadašnja anatomska istraživanja glavulja uglavnom su se temeljila na svjetlosnoj mikroskopiji, a jedno od najopsežnijih istraživanja proveo je Heckel na listovima i stabljikama 11 vrsta glavulja (Heckel, 1894). Pri tome je, između ostalih, obuhvatio i vrste *G. alypum, G. cordifolia* (var. *intermedia, bellidifolia* i *nana*) i *G. vulgaris* (uključujući *G. punctata* kao njezin varijetet). U nedavno izdanom atlasu koji prikazuje anatomsku građu stabljike cvjetnjača dvosupnica, obuhvaćeno je sedam vrsta glavulja, uključujući vrste *G. alypum, G. bisnagarica* (= *G. punctata*), *G. cordifolia* i *G. meridionalis* (Schweingruber i sur., 2013). Anatomsku građu lista i stabljike vrste *G. cordifolia* s.l. proučavao je i Ravnik (1965). Novije istraživanje provedeno na listovima vrste *G. alypum* uključivalo je i različite histokemijske reakcije (Mamoucha i Christodoulakis, 2014).

Anatomska karakteristika glavulja su žljezdaste dlake građene od kratkog jednostaničnog drška i dvostanične glavice, koje su kod pojedinih vrsta prekrivene naslagama kalcijevog karbonata (npr. *G. alypum, G. incanescens, G. orientalis, G. spinosa*). U epidermi listova i stabljike mogu se kod nekih vrsta glavulja (npr. *G. alypum* i *G. arabica*) povremeno naći i štapićasti ili prizmatični kristali kalcijevog oksalata (Heckel, 1894; Will, 1942), dok se u epidermi ovojnih listova cvata i lapova mogu naći i kod drugih vrsta (Heckel, 1894). Listovi grmaste glavulje ističu se još poligonalnim epidermskim stanicama odebljalih vanjskih stijenki i izraženijom kutikulom (Kušan, 1943; Holländer i Jäger, 1994), dok mezofil vrste *G. orientalis* karakteriziraju razgranate sklereide (Wettstein, 1895a; Hegnauer, 1966; Wagenitz, 2004). Sklerenhimski idioblasti nađeni su i u stabljici i korijenu srodnih vrsta, primjerice vrsta *G. cordifolia* i *G. willkommii* (= *G. punctata*) (Luhan, 1954).

Anatomski, listovi mogu biti dorziventralne ili izolateralne građe, a mezofil lista mogu činiti palisadne ili izodijametrične stanice (Wagenitz, 2004). Vrsta *G. alypum* ima listove izolateralne građe s tri do četiri sloja palisadnih stanica s lica i tri sloja palisadnih stanica s naličja (Holländer i Jäger, 1994), pri čemu slojevi vanjskog višeslojnog palisadnog parenhima jedva primjetno prelaze u srednji sloj stanica (Kušan, 1943). Listovi vrsta *G. cordifolia* i *G. punctata* predstavljaju prijelazni oblik između listova dorziventralne i izolateralne građe (Holländer i Jäger, 1994). Puči su prisutne s obje strane lista (amfistomatski listovi) i najčešće su anomocitične građe, iako mogu biti i paracitične ili dijacitične (Heckel, 1894; Watson i Dallwitz, 1992; Holländer i Jäger, 1994; Wagenitz, 2004). Vrsta *G. alypum* ima udubljene puči s predvorjem nepravilno četverouglastih stijenki (Kušan, 1943). Kod vrsta *G. cordifolia* i *G. punctata* s gornje strane listova smješteno je 44,4%, odnosno 45,0% puči. Pri tome, vrsta *G. punctata* ima približno dvostruko veći broj puči po mm^2 od vrste *G. cordifolia* (Holländer i

Jäger, 1994). Glavne žile kod nekih su vrsta povezane slojem kolenhimskih stanica za epidermu (npr. *G. punctata*), dok su kod drugih okružene mezofilom (npr. *G. alypum*, *G. cordifolia*) (Heckel, 1894).

Pretražnom elektronskom mikroskopijom (engl. *Scanning electron microscopy*, SEM) ili njezinom kombinacijom sa svjetlosnom mikroskopijom do sada su uglavnom provedena palinološka istraživanja, a između ostalih, istražena je građa peludnih zrnaca vrsta *G. alypum*, *G. cordifolia* i *G. punctata* (Praglowski i Gyllander, 1970; Punt i Marks, 1991; Argue, 1993; Oran i sur., 1999; Danişman, 2015; Özkan, 2015). Sjemenke i/ili listovi vrste *G. alypum* također su istraženi pomoću ove tehnike (Oran i sur., 1999; Mamoucha i Christodoulakis, 2014). Na površini listova uočene su s obje strane guste igličaste voštane nakupine (Oran i sur., 1999), odnosno velik broj žljezdastih dlaka i udubljenih puči (Mamoucha i Christodoulakis, 2014).

1.2.2. Citološka istraživanja

Najvažnija citološka istraživanja glavulja proveli su Larsen (1957), Schwarz (1963), Contandriopoulos (1978) te Milletti i Mori (1988). Vrste ovog roda imaju vrlo male kromosome, veličine 0,8 do 3,0 μm. Bazni broj kromosoma je x = 8, a najveći diploidni broj je 64 (oktaploid, 2*n* = 8x = 64), pri čemu nema vidljive povezanosti poliploidije sa životnim oblikom (Schwarz, 1963), ali je moguće utvrditi vezu sa širinom areala ili uvjetima staništa. Lokalni endemi uglavnom imaju diploidan broj kromosoma (2*n* = 16), dok bolje rasprostranjene vrste mogu biti diploidne (2*n* = 16), tetraploidne (2*n* = 4x = 32) ili oktaploidne (2*n* = 8x = 64). Mogućnost poliploidije uočena je unutar kompleksa *G. alypum* s.l., *G. cordifolia* s.l. i *G. vulgaris* s.l. (Larsen, 1957; Schwarz, 1963; Van Loon i sur., 1971; Contandriopoulos, 1978). Njome je vjerojatno omogućena prilagodba pojedinih vrsta ekstremnijim životnim uvjetima njihovih staništa (Contandriopoulos, 1978).

Uzorci vrste *G. alypum* iz Alžira i *G. punctata* iz Alžira, Austrije, Francuske, Grčke, Italije, Mađarske i Švedske imaju dvostruki broj kromosoma, dok uzorci njima blisko srodnih vrsta *G. arabica* iz Alžira, odnosno *G. vulgaris* iz Francuske, Španjolske i Švedske te *G. valentina* iz Španjolske imaju četverostruki (Löve i Löve, 1944; Larsen, 1957; Schwarz, 1963; Kliphuis i Wieffering, 1972; Contandriopoulos, 1978; Milletti i Mori, 1988; Milletti i Strid, 1991; Kamari i sur., 1995; Ramdani i sur., 2014), a *G. cambessedesii* iz Španjolske četverostruki (Cardona i Contandriopoulos, 1980) ili osmerostruki broj kromosoma (Schwarz, 1963). Iznimno je osmerostruki broj kromosoma zabilježen i za vrstu *G. aphyllanthes* (= *G. punctata*) iz Francuske (Van Loon i sur., 1971).

Četverostruki broj kromosoma utvrđen je i kod uzoraka vrste *G. cordifolia* (*G. cordifolia* subsp. *cordifolia*) iz Austrije, Bugarske, Francuske, Grčke, Italije, Njemačke, Slovačke, Španjolske i Švicarske (Larsen, 1957; Schwarz, 1963; Contandriopoulos, 1978; Milletti i Mori, 1988; Kuzmanov, 1993; http://ccdb.tau.ac.il). Iznimno su uočeni uzorci s dvostrukim (2*n* = 16) (u Francuskoj) (Kliphuis i Wieffering, 1972), trostrukim (2*n* = 3x = 24) (nepoznato podrijetlo biljnog materijala) i peterostrukim brojem kromosoma (2*n* = 5x = 40) (u Njemačkoj) (Schwarz, 1963), odnosno 2*n* = 20 (nepoznato podrijetlo biljnog materijala) (Sugiura, 1937), što ide u prilog opažanjima da je u prošlosti bazni broj kromosoma kod vrsta ovoga roda bio x = 4 (Schwarz, 1963). Dvostruki broj kromosoma (2*n* = 16) utvrđen je na jednoj populaciji *G. cordifolia* subsp. *bellidifolia* nepoznatog podrijetla (Larsen, 1957), što je kasnije potvrđeno na biljnom materijalu iz Albanije, Bugarske i Francuske (Schwarz, 1963; Milletti i Strid, 1991). Schwarz (1938), koji je ovu svojtu proglasio odvojenom vrstom pod nazivom *G. meridionalis*, zabilježio je i pojavu tetraploidije kod kultivirane vrste nepoznatog podrijetla (Schwarz, 1963).

Na postojanje tetraploidnih populacija vrste *G. meridionalis* upućuje i 2C-vrijednosti uzoraka iz Hrvatske od 1,61 pg (Siljak-Yakovlev i sur., 2010), ako se uzme u obzir da su utvrđene 2C-vrijednosti uzoraka srodnih diploidnih vrsta *G. alypum* i *G. salicina* iz Španjolske redom iznosile 0,78-0,80 pg (Pellicer i sur., 2010) i 0,84 pg (Suda i sur., 2005). Sve navedene 2C-vrijednosti dobivene su protočnom citometrijom uz bojanje etidijevim bromidom (Suda i sur., 2005; Pellicer i sur., 2010; Siljak-Yakovlev i sur., 2010).

1.2.3. Molekularna istraživanja

Na temelju analize sljedova plastidnih gena *atp*B i *rbc*L utvrđena je pripadnost vrsta roda *Globularia* (*G. cordifolia, G. salicina*) redu Lamiales (Savolainen i sur., 2000). Na temelju analize četiri sljeda DNA, jednog jezgrinog (ITS, engl. *Internal transcribed spacer*) i tri plastidna sljeda (područje *trn*L-F, intron *rps*16, intron *mat*K-*trn*K), nedavno je potvrđena pripadnost roda *Globularia* (*G. repens, G. salicina*) porodici Plantaginaceae. Analiza je pokazala sestrinski odnos između rodova *Globularia* i *Poskea* (tribus Globularieae, ranije porodica Globulariaceae) i roda *Campylanthus*, kao i bliski odnos sa skupinom Digitalideae-Veroniceae (Albach i sur., 2005).

ITS je jedno od najčešće sekvenciranih područja genomske biljne DNA, a *trn*L-*trn*F jedno od najčešće sekvenciranih područja plastidne DNA, koja se koriste u procjeni odnosa između i unutar rodova u molekularnoj sistematici biljaka. Oba područja pokazala su se kao korisni biljezi porodice Plantaginaceae (Bräuchler i sur., 2004; Albach i sur., 2005).

Bliski odnos roda *Globularia* (*G. cordifolia, G. nudicaulis*) s rodovima *Poskea* i *Campylanthus* te njihovo uključivanje u monofiletsku skupinu Plantaginaceae (Veronicaceae sensu Olmstead) (Olmstead i sur., 2001), zajedno s rodovima *Plantago, Veronica* i *Digitalis*, utvrđen je i na temelju analize sljedova plastidne DNA *ndh*F, *trn*L-F i *rps*16, koji su informativni za red Lamiales (Oxelman i sur., 2005). Također, analiza sljedova *rbc*L i *ndh*F u kombinaciji s morfološkim podacima ukazala je na sestrinski odnos roda *Globularia* (*G. cordifolia*) s rodom *Plantago* (Bremer i sur., 2001), kao i na bliski odnos s rodovima *Plantago, Veronica* i *Digitalis*, s kojima je svrstana u odvojenu monofiletsku skupinu porodice Scrophulariaceae s.l. nazvanu Veronicaceae (ranije „Scroph II“) (Oxelman i sur., 1999; Olmstead i sur., 2001). Sestrinski odnos s rodom *Plantago* pokazala je i analiza tri kodirajuća (*rbc*L, *ndh*F i *mat*K) i tri nekodirajuća sljeda kloroplastne DNA, koja je provedena na pripadnicama 132 roda iz podrazreda Asteridae (Bremer i sur., 2002).

Na temelju parsimonijske analize ITS sljedova jezgrine DNA 21 vrste roda *Globularia*, pretpostavljeno je da je diferencijacija ovih vrsta započela u razdoblju kasnog tercijara (pliocena) (Comes i Kadereit, 2003), na što su ukazivali i raniji autori (Schwarz, 1938; Scharfetter, 1953; Schwarz, 1963). Uključivala je gotovo istovremeni i nezavisni razvoj dvije mediteranske grane (od kojih jedna uključuje endeme Makaronezije) i tri grane europskih planina (zapadnu, centralnu i istočnu), koje su najvjerojatnije nastale iz zajedničkog mediteranskog pretka. Prva planinska grana obuhvaća vrste s područja Pireneja (*G. gracilis* i *G. nudicaulis*), druga vrste s područja južnih Apenina i Balkana (G. *neapolitana, G. stygia, G. cordifolia* i *G. repens*), a treća vrste s područja Male Azije (*G. trichosantha* i *G. punctata*). Dok se predstavnice različitih planinskih grana razlikuju ekološki, svojim životnim oblikom i/ili brojem kromosoma, pripadnice unutar grana (sestrinske vrste) su ekološki i morfološki vrlo slične i rijetko se razlikuju brojem kromosoma. Razlike između njihovih ITS sljedova bile su manje of 1,9%. Pretpostavka je da su razlike u morfološkim karakteristikama sestrinskih vrsta posljedica njihove geografske izolacije, a njihov nastanak bio je potpomognut klimatskim promjenama, odnosno učestalim glacijacijama (zaleđivanjima) tijekom pleistocena (Comes i Kadereit, 2001; Comes i Kadereit, 2003). Isti autori utvrdili su na temelju dosad neobjavljenih ITS sljedova 28 uzoraka, koji uključuju 22 vrste glavulja, konstantnu brzinu njihove diverzifikacije (Kadereit i sur., 2004).

Populacijskom molekularnom metodom analize polimorfizma dužine amplificiranih fragmenata (engl. *Amplified Fragment Length Polymorphism*, AFLP) 473 jedinke iz 27 belgijskih populacija vrste *G. punctata* (*G. bisnagarica*) utvrđena je iznadprosječna genetska diferencijacija između populacija i smanjena genetska raznolikost unutar populacija

(posebno onih izoliranih), koja bi se mogla objasniti većom stopom samooprašivanja. Smanjena genetska raznolikost unutar populacija nije pokazala povezanost s njihovom veličinom kao ni s lokalnim okolišnim uvjetima (Honnay i sur., 2007). U nedavno objavljenom istraživanju uočena je i genetička varijabilnost nekoliko različitih populacija vrste *G. amygdalifolia* s područja Zelenortskih otoka na razini ITS područja (659 pb), pri čemu su se sjeverne populacije razlikovale od južnih populacija. Istovremeno nije uočena genetička varijabilnost na razini plastidnih biljega (*mat*K, *psb*A-*trn*H, *rbc*L, *trn*L-F) (Romeiras i sur., 2015).

1.2.4. Srodstveni odnosi između vrsta roda *Globularia* L.

Iako se rod *Globularia* danas uključuje u porodicu Plantaginaceae, red Lamiales (www.theplantlist.org), ranije klasifikacije svrstavale su ga u porodice Globulariaceae i Scrophulariaceae, red Scrophulariales (Cronquist, 1981; Sambamurty, 2005). Porodica Globulariaceae bila je prema Wettsteinu (1895a) i Engleru (Sambamurty, 2005) svrstana u red Tubiflorae zajedno s porodicama Lamiaceae, Phrymaceae, Myoporaceae i Plantaginaceae. Wettstein navodi da vrste ove porodice imaju sličan habitus s vrstama porodice Plantaginaceae, kao i da je ova porodica, koju je podijelio na rodove *Lytanthus* i *Globularia*, blisko srodna s porodicom Scrophulariaceae (Wettstein, 1895a).

Rod *Globularia* Wettstein je podijelio na dvije sekcije, sekciju *Carradoria*, koja je uključivala vrstu *G. incanescens*, i sekciju *Euglobularia*, koja je uključivala preostale vrste glavulja (ukupno njih 16), a između ostalih vrstu *G. willkommii* (= *G. punctata*), koju stavlja u istu skupinu (skupina A) s blisko srodnim vrstama *G. cordifolia* i *G. bellidifolia*, te vrstu *G. alypum* (skupina B) (Wettstein, 1895a). Nadalje, isti je autor na temelju morfoloških karakteristika predložio blisko srodstvo i zajedničko podrijetlo sljedećih vrsta glavulja: 1) *G. valentina*, *G. linnaei*, *G. willkommii*, *G. trichosantha* i *G. tenella*; 2) *G. cordifolia*, *G. bellidifolia*, *G. repens* i *G. stygia*; 3) *G. orientalis* i *G. sintenisii*; 4) *G. alypum*, *G. arabica* i *G. eriocephala*. Kao morfološki izolirane odvojio je vrste *G. spinosa*, koja pokazuje sličnost s prvom skupinom, *G. incanescens*, koja pokazuje sličnost s drugom skupinom, te *G. nudicaulis*, koja je prema njemu najsličnija vrstama roda *Lytanthus*, *L. salicinus* i *L. amygdalifolius* (Wettstein, 1895b), što je bilo u skladu s ranijom podjelom ovih vrsta (Nyman, 1878-1882).

Heckel (1894) je smatrao da su se sve vrste glavulja razvile iz široko rasprostranjene vrste *G. vulgaris* (= *G. willkommii*), danas poznatije pod nazivom *G. punctata* (www.theplantlist.org), te je predložio njihovu podjelu na dvije skupine: *Vulgaris*

(*G. vulgaris*, *G. tenella*, *G. vulgaris* var. *coriacea*, *G. trichosantha*, *G. ilicifolia*, *G. incanescens*, *G. orientalis*, *G. stygia*) i *Cordifolia* (*G. cordifolia*, *G. cordifolia* var. *bellidifolia*, *G. nudicaulis*, *G. cordifolia* var. *intermedia*, *G. alypum*, *G. alypum* var. *arabica*). Predloženu podjelu temeljio je na anatomskim obilježjima njihovih listova i stabljika (Heckel, 1894).

Prema Schwarzu (1963), rod *Globularia* dijeli se u dva podroda: podrod *Jasionopsis*, koji obuhvaća sekcije *Lytanthus* (Makaronezija), *Polycephalium* (zapadna Azija), *Carradoria* (sjeverna Italija), *Hellenion* (jugozapadna Anatolija i Peloponez) i *Aphyllanthes* (središnja i zapadna Europa), i podrod *Abolaria*, koji obuhvaća sekcije *Alypum*, *Battandiera* (sjeverozapadna Afrika), *Empetron* (Pireneji, Alpe, Apenini i Balkanski poluotok) te *Gymnocladium* (sjeverozapadna Afrika, Pireneji, Alpe). Pri tome je u sekciju *Alypum*, kojoj pripadaju sklerofilni šibasti grmovi malih listova, uključena vrsta *G. alypum* (uz vrstu *G. arabica*), u sekciju *Empetron*, kojoj pripadaju prilegnuti puzajući grmovi s rozetom, vrste *G. cordifolia* i *G. meridionalis* (uz vrste *G. repens* i *G. neapolitana*), dok je *G. aphyllanthes* (= *G. punctata*) dio sekcije *Aphyllanthes* (zajedno s vrstama *G. trichosantha*, *G. vulgaris*, *G. cambessedesii* i *G. spinosa*), a kojoj pripadaju vazdazelene rozetaste trajnice.

Podrod *Jasionopsis* kasnije je preimenovan u *Globularia*, iako su autori smatrali da ovakva podjela roda nije prirodna (Holländer i Jäger, 1994). Povezanost između navedene podjele i oblika peludnih zrnaca nije našao ni Argue (1993). Moguće je, također, primijetiti da se predložena podjela roda *Globularia* na sekcije istog autora s vremenom mijenjala (Schwarz, 1938; Schwarz, 1963). Tako su vrste sekcije *Hellenion* (*G. dumulosa*, *G. stygia*) u ranijoj podjeli roda bile uključene u sekciju *Empetron*, odnosno u podrod *Abolaria*, dok je sekcija *Alypum* bila podijeljena na podsekcije *Turbith* (*G. alypum*, *G. arabica*) i *Battandiera* (*G. nainii*) (Schwarz, 1938).

1.2.5. Taksonomska problematika kompleksa *G. cordifolia* s.l.

Predložene podjele vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*

Sekcija *Empetron*, kojoj pripadaju po habitusu vrlo slične vrste (Schwarz, 1938), uključujući predstavnike kompleksa *G. cordifolia* s.l., sistematičarima je oduvijek zadavala probleme (Schwarz, 1963). Iako su *G. cordifolia* i *G. bellidifolia* uz *G. nana* ranije bile prepoznate kao odvojene vrste (Tenore, 1824-1829), u svojoj monografiji roda *Globularia* Cambessèdes ih je opisao kao dva različita varijeteta vrste *G. cordifolia*: var. *α* ili *cordifolia* (= *G. cordifolia* L. = *G. minima* Vill.), koji ima okruglaste listove s tri zubića na vrhu i gotovo trodjelnu donju usnu vjenčića, i tip *β* ili *nana* (= *G. nana* Lam. = *G. bellidifolia* Ten.), koji

ima duguljaste listove cjelovitog vrha i trozubu donju usnu vjenčića (Cambessèdes, 1826). Willkomm (1850) je smatrao da vrsta *G. cordifolia* prelazi kroz niz prijelaznih oblika u oblik *G. cordifolia* var. *nana*, kod kojeg su svi dijelovi manji nego kod normalne forme, listovi su suženo lopatasti s kraćom peteljkom, obično cjeloviti i ušiljeni, a donja usna vjenčića ima manje usječene režnjeve. U skladu s ovom podjelom, Nyman (1878-1882) je u općem pregledu europske flore kao vrste izdvojio *G. cordifolia* (= *G. minima*) i *G. nana* (= *G. repens*), koje su i prethodno bile poznate kao odvojene vrste (Lamarck i De Candolle, 1815), dok svojtu *G. bellidifolia* navodi kao podvrstu vrste *G. cordifolia*. Rouy (1882) sve tri svojte navodi kao varijetete vrste *G. cordifolia*, pri čemu je *G. cordifolia* var. *intermedia* prijelazni oblik između druga dva varijeteta. Svojim tepihastim rastom, listovima i kratkim stabljikama sliči svojti *G. cordifolia* var. *nana,* iako su njezini cvatovi na stabljikama koje su barem dvostruko duže od listova. Po uzoru na ranije predloženu podjelu (Rouy, 1882), Heckel (1894) u svojoj monografiji roda *Globularia* navodi tri varijeteta vrste *G. cordifolia*: var. *intermedia*, var. *bellidifolia* i var. *nana*, dok su nešto kasnije u flori Francuske ponovno navedene samo vrste *G. cordifolia* i *G. nana* (Coste i Flahault, 1906). S druge strane, Wettstein (1895a, 1895b) kao zasebne vrste ponovno navodi *G. cordifolia*, *G. bellidifolia* i *G. nana*, ali je prema njemu vrsta *G. bellidifolia* prijelazni oblik između drugih dviju vrsta. Pojavu podvrste *G. cordifolia* subsp. *meridionalis* na području Rodopa u Bugarskoj, koja je imala manje cvatne glavice (promjera 10 mm) od tipične vrste *G. cordifolia* (promjera 12 do 20 mm), zabilježio je Podpěra (1902).

U skladu s prethodnim otkrićima, u flori srednjeeuropskog područja, kod opisa vrste *G. cordifolia* navodi se i mogućnost podjele na podvrste *cordifolia* i *bellidifolia* (Hegi, 1918), u flori Balkanskog poluotoka navedene su tri podvrste vrste *G. cordfolia*: *bellidifolia, cordifolia* i *meridionalis* (Hayek, 1927), a u flori Bugarske svojte *G. cordifolia* var. *meridionalis* i *G. cordifolia* var. *bellidifolia* (Stojanov i Stefanov, 1948). Flora Srbije uz podvrstu *G. cordifolia* subsp. *bellidifolia* navodi dva varijeteta podvrste *G. cordifolia* subsp. *cordifolia*: var. *cordifolia* i var. *serbica* (Josifović, 1974). Istovremeno, flora Europe (Tutin, 1972) i novije izdanje flore srednjeeuropskog područja (Hegi, 1974) navode podjelu na odvojene vrste, *G. cordifolia* i *G. meridionalis* te *G. nana*, što je u skladu s podjelom u vjerojatno dosad najopsežnijoj monografiji roda *Globularia* (Schwarz, 1938). U navedenoj je monografiji Tenoreova vrsta *G. bellidifolia* iz talijanske pokrajine Abruzzo, koja je prema autoru bila veća od vrste *G. cordifolia* i s listovima bez usjeka (Tenore, 1824-1829), poistovjećena s Podpěrinom svojtom *G. cordifolia* subsp. *meridionalis* iz Rodopa (1902) sljedećim riječima „Eindeutig identisch mit der Abruzzenpflanze, die ich selbst reichlich am

locus classicus zu sehen Gelegenheit hatte, ist die Balkanpflanze, auf die Podpera seine *G. cordifolia* ssp. *meridionalis* begründete;“ te imenovana kao vrsta *G. meridionalis* (Podp.) O. Schwarz. comb. nov. (Schwarz, 1938).

Valja istaknuti da opis nove vrste ne odgovara opisu koji je naveo Podpěra, što je primijetila i Milletti (1987). Populaciju iz Rodopa karakterizirali su listovi slični onima vrste *G. cordifolia* uz habitus sličan onome vrste *G. nana* (manje cvatne glavice te uži i kraći listovi nego kod tipične vrste), zbog čega je, prema Podpěri, moguće da je ova južna podvrsta prijelazni oblik sjevernije rasprostranjene vrste *G. cordifolia* prema prostorno odvojenoj vrsti *G. nana* (Podpěra, 1902). Sličnu mogućnost prethodno je napomenuo Wettstein (1892) za vrstu *G. bellidifolia*. Suprotno ovome, Schwarz (1938) navodi da su cvatne glavice od njega izdvojene nove vrste često veće od onih vrste *G. cordifolia*, odnosno da se vrsta *G. cordifolia* veličinom nalazi između vrsta *G. nana* i *G. meridionalis* te je moguće da je kao tetraploidna vrsta nastala križanjem ovih dviju diploidnih vrsta (Schwarz, 1963).

Iako su svojte *G. cordifolia* i *G. meridionalis* prema mnogim autorima bile smatrane podvrstama ili tek varijetetima iste vrste (Cambessèdes, 1828; Hegi, 1918; Fiori, 1925-1929; Degen, 1938; Piskernik, 1941; Domac, 1950; Rauh, 1952; Hermann, 1956; Josifović, 1974), nakon 1938. godine u literaturi se često može susresti njihova podjela na odvojene vrste (Hegi, 1959; Tutin, 1972; Hegi, 1974; Pignatti, 1982; Edmondson, 2004; Šoljan i sur., 2009; Tundis i sur., 2012a; Tundis i sur., 2012b; Schweingruber i sur., 2013; www.theplantlist.org). S druge strane, u hrvatskoj se literaturi ove svojte i danas u pravilu navode kao podvrste, *G. cordifolia* subsp. *cordifolia* (L.) Hayek i *G. cordifolia* subsp. *bellidifolia* (Ten.) Wettst. (hirc.botanic.hr), čemu idu u prilog rezultati istraživanja koja su nakon Schwarzove podjele na vrste (1938) proveli istraživači iz nama susjednih država, Slovenije (Ravnik, 1962; Ravnik, 1965) i Italije (Millettti, 1987).

Rasprostranjenost vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*

Još je ranije bilo poznato da je *G. cordifolia* vrlo raširena vrsta glavulja, prisutna na području Pireneja i Alpi, pa preko Mađarske, Hrvatske, Srbije, Bosne i Hercegovine te Crne Gore sve do Albanije, Makedonije, Grčke i Bugarske, dok je prisutnost njezine podvrste *G. cordifolia* subsp. *bellidifolia* bila zabilježena na području južne Italije, Hercegovine i Crne Gore (Nyman, 1878-1882). Kasniji zapisi govore o tome da se G. *cordifolia* subsp. *cordifolia* najčešće može pronaći na alpskom području, s odvojenim manjim populacijama na području francuskog Središnjeg masiva, na području Alpi sve do Ligurskih Apenina, kao i na području Velebita, Karpata, Albanije i Rodopa, dok je *G. cordifolia* subsp. *bellidifolia*

rasprostranjena na području jugoistočnih Apeninskih Alpi i Balkanskog poluotoka sve do Grčke i Bugarske, s disjunkcijama u južnom Tirolu te na središnjim i južnim Apeninima (Slika 16) (Schwarz, 1938; Ravnik, 1965). Istraživanja koja je proveo Rossi (1915) ukazuju na prisutnost obiju vrsta, tada nazvanih *G. cordifolia* i *G. bellidifolia*, uz vrstu *G. willkommii* (= *G. punctata*), na kamenitim pašnjacima planina jugoistočne Hrvatske, dok stara flora Italije kao stanište obiju svojti navodi područje Istre (Fiori, 1925-1929). Hegi (1959) navodi da na području Ligurskih Apenina vrsta *G. meridionalis* zamjenjuje vrstu *G. cordifolia* te navodi njezinu rasprostranjenost na području Istre i Dalmacije. U literaturi koju je prikupio Schwarz (1938), kao staništa vrste *G. cordifolia* navode se, između ostalih, Sveto brdo (Velebit) i Mostar, dok se kao staništa vrste *G. meridionalis*, između ostalih, navode Grobničko polje, područje Makarske, planina Klek kod Ogulina, Mostar i Sarajevo. Isti je autor zabilježio da postoji određena varijabilnost između populacija vrste *G. cordifolia*, primjerice da su južne populacije na nižim nadmorskim visinama jače odrvenjele i imaju duže listove, dok su populacije na višim nadmorskim visinama niže i imaju manje listove (Schwarz, 1938). Prema Schwarzu područje na kojemu je moguće naći prijelazne oblike između vrste *G. cordifolia*, koja je u pravilu tetraploidna, i njoj blisko srodnih vrsta *G. meridionalis* i *G. repens*, koje bi u pravilu trebale biti diploidne, uključuje područje zapadnih i južnih Alpi te ilirskih i sjevernoalbanskih planina. Na ovim je mjestima stoga moguće očekivati triploidne, a možda čak i heksaploidne populacije (Schwarz, 1963).

Slika 16. Rasprostranjenost vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* - skica prema Schwarzu (Ravnik, 1965)

Degen (1938) i Forenbacher (1990) navode da obje svojte rastu na sličnim mjestima i u sličnom visinskom rasponu. Prema prvom autoru one često rastu i pomiješane na istim staništima zbog čega se više ne mogu razlikovati čak ni kao varijeteti (Degen, 1938).

Ova pojava primijećena je na području Sjevernog i Središnjeg Velebita (npr. Alan, Alančić, Jablanac, Karlobag, Ljubičko brdo, Oštarije, Zavratnica), odnosno Južnog Velebita (npr. Badanj, Mala Paklenica, Ravni dabar, Sveto brdo, Vaganski vrh, Velika Paklenica), a istu je za područje Baških Oštarija zabilježio i Ravnik (1965). Pojava obje svojte zajedno sa svojtom *G. punctata* zabilježena je i u novijim popisima hrvatske flore, primjerice na području NP Sjeverni Velebit (Ljubičić i sur., 2010). Vrsta *G. cordifolia* može se prema Forenbacheru naći, primjerice, u okolici Alančića, Dundović-poda, Zečjaka, Šatorine, Badnja i Svetog brda, dok je *G. bellidifolia* (*G. cordifolia* subsp. *bellidifolia*) zastupljena u okolici Senjskog bila, Ravnog dabra, Oštarija, Vaganskog vrha i drugih područja (Forenbacher, 1990).

Razlikovne osobine vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*

Razlikovanje ovih dviju vrsta temelji se na njihovom habitusu, obliku i izrubljenosti listova te obliku ovojnih listova cvata, čaške i vjenčića. Razlikovne osobine prikazane su u Tablici III, pri čemu je moguće primijetiti nepodudaranja između različitih literaturnih izvora, uključujući ponekad i izvore istih autora, odnosno svojevrsna preklapanja između morfoloških značajki obiju vrsta. Pojedini autori navode i razlike u broju kromosoma (Larsen, 1957; Schwarz, 1963; Tutin i sur., 1972; Hegi, 1974), a vrste bi se mogle razlikovati i mirisom, pri čemu je za vrstu *G. meridionalis* karakterističan miris na kumarine (Schwarz, 1938).

Vrsta *G. cordifolia* prema nekim je autorima manjeg rasta od vrste *G. meridionalis* (Tutin i sur., 1972; Hegi, 1974; Pignatti, 1982), dok je prema drugima obrnuto (Podpěra, 1902; Fiori, 1925-1929). Listovi prve svojte češće se opisuju kao obrnuto jajoliki, a druge kao lopatasti (Domac, 1950; Forenbacher, 1990; Hegi, 1974; Wettstein, 1892), iako postoje i suprotni zapisi (Larsen, 1957; Tutin i sur., 1972; Pignatti, 1982).

Listove prve svojte karakterizira manje ili više izrubljen vrh, kao i moguća prisutnost tri zubića na vrhu, koju bilježi većina autora, dok drugu svojtu karakteriziraju u pravilu listovi ušiljenog ili zaobljenog vrha (Tablica III). Prema nekim autorima, kod nje je također moguća prisutnost listova neznatno nazubljenog vrha (Schwarz, 1938; Kušan, 1943; Tutin i sur., 1972; Josifović, 1974), dok pojedini autori napominju da njezini listovi nisu izrubljeni (Forenbacher, 1990). Oprečna opažanja navode, primjerice, Tenore (1824-1829) za vrstu *G. bellidifolia* (vrlo rijetko prisutni listovi s tri međusobno jednaka zubića na vrhu) i Pignatti (1982) za vrstu *G. meridionalis* (rijetko prisutni listovi zarezanog vrha, ali nikad s tri zubića). Prema dijelu autora, kod obje vrste moguća je pojava pojedinačnih listova karakterističnih za drugu vrstu (Tenore, 1824-1829; Wettstein, 1895b; Hegi, 1974), dok prema nekima uopće ne postoje razlike u obliku i izrubljenosti listova (Fiori, 1925-1929). Istraživanje koje je proveo

Heckel (1894) pokazalo je da su u anatomskoj građi listova različitih varijeteta vrste *G. cordifolia* prisutni jednaki elementi.

Vanjski ovojni listovi cvata (brakteje) kod druge su vrste dugačko ušiljeni i gusto dlakavi sa stražnje strane (Schwarz, 1938; Hermann, 1956; Hegi, 1974), odnosno kratko ušiljeni (dvostruko duži od svoje širine) i suženi pri dnu (Hegi, 1918; Fritsch, 1922; Hayek, 1927; Domac, 1950), dok su kod vrste *G. cordifolia* najširi pri dnu te tri do četiri puta duži od svoje širine (Hayek, 1927; Domac, 1950). Prema Wettsteinu (1895b), *G. meridionalis*, odnosno *G. bellidifolia*, ima šire vanjske, a duže unutarnje brakteje.

Zubići čaške kod prve su svojte dugi koliko i cijev čaške ili kraći od nje, dok su kod druge svojte duži (Wettstein, 1892; Podpěra, 1902; Schwarz, 1938; Hegi, 1974), približne dužine kao i cijev (Pignatti, 1982) ili duži od nje (Podpěra, 1902; Hermann, 1956; Hegi, 1974), a čaška je uža (Wettstein, 1892; Schwarz, 1938). S druge strane, Flora Balkanskog poluotoka navodi da su kod sve tri svojte zubići čaške duži od njezine cijevi (Hayek, 1927). Slično opažanje za talijanske populacije navodi i Milletti (1987). Također, prema Podpěri (1902), čaška vrste *G. cordifolia* je dvousnata, a njezini zubići su lancetasti, dok je kod vrste *G. meridionalis* aktinomorfna s linearno-lancetastim zubićima.

Prema pojedinim autorima vrste se razlikuju prema građi donje usne vjenčića, koja je gotovo trodjela kod *G. cordifolia*, a kraća i manje usječena kod vrste *G. meridionalis* (Cambessèdes, 1826; Wettstein, 1895b) te sa širim zubićima (Wettstein, 1895b), odnosno prema građi gornje usne, koja kod druge vrste ima šire i/ili kraće zubiće (Wettstein, 1892; Fiori, 1925-1929), dok su zubići prve vrste manje usječeni, a cijev vjenčića se širi odozdo prema gore (Hegi, 1974). Neki navode i razlike u boji vjenčića, primjerice, vjenčić vrste *G. cordifolia* može biti ljubičastomodre, a rjeđe ljubičastoroze do bijele boje, dok je kod vrste *G. meridionals* ljubičastomodri (Hegi, 1974) ili svijetlo nebesko plavi (Tenore, 1824-1829).

Iako se morfološki ove dvije svojte djelomično preklapaju, zbog razlike u broju kromosoma, koja bi trebala biti prepreka za njihovo međusobno križanje, *G. meridionalis* ne može se smatrati podvrstom *G. cordifolia* (Schwarz, 1963; Hegi, 1974). Unatoč tome, Schwarz je zabilježio postojanje tetraploidne populacije vrste *G. meridionalis*, što je uobičajena značajka vrste *G. cordifolia* (Schwarz, 1963). Isti autor objasnio je moguću pojavu savijanja listova (karakteristika vrste *G. repens*) i urezivanja lisne plojke kod vrste *G. meridionalis*, koja u pravilu ima ravne listove, kao prilagodbu na suha i sunčana staništa (Schwarz, 1938). S druge strane, Flora Pirenejskog poluotoka uz vrstu *G. repens* poznaje i vrstu *G. cordifolia* (bez podvrsta), u čijem su opisu također navedeni različiti oblici lisne plojke (obrnuto jajolik, lopatasti ili gotovo zaobljeni) i vrha lista (zaokružen, malo urezan ili s

tri zubića), koji mogu biti istovremeno prisutni kod iste jedinke. Sličan polimorfizam listova primijećen je i kod vrsta *G. punctata* (Sales i Hedge, 2001) i *G. alypum* (Tutin, 1972).

Kušan također navodi prisutnost „dvije podvrste (ili samostalne vrste)“ na našem području, koje se uglavnom morfološki razlikuju prema obliku lista. *G. cordfolia* subsp. *cordifolia* ima obrnuto jajoliki i na vrhu zarezan ili nazubljen list (s tri zubića), dok *G. cordifolia* subsp. *bellidifolia* ima više zaokružene i lopataste listove, koji su na vrhu čitava ruba ili neznatno nazubljeni (Kušan, 1943). Ravnik je upozorio da oblik i izrubljenost listova ovisi o njihovoj starosti. Listovi oba tipa u početku su ušiljenog vrha, a zubići/usjeci se razvijaju tek kasnije te će se prvo uočiti u starijim vanjskim dijelovima rozeta. U skladu s tim svaka pojedina jedinka može, ali i ne mora imati sve ili većinu listova istog oblika, koji se mogu razlikovati ovisno o vegetacijskoj sezoni. Ravnik je svoja istraživanja proveo na populacijama *G. cordfiolia* s.l. iz Slovenije (Julijske Alpe, Karavanke, Kamniške Alpe, Primorska Slovenija), Hrvatske (Velebit-Bačić kosa, Ljubičko brdo, Oštarije, Oštro-Siaset), Bosne (Vranica planina), Srbije (Prokletije) i Makedonije (Šar planina, Solunska glava, Jakupica, Karadžica) (Ravnik, 1965). Istraživane populacije međusobno su se razlikovale po veličini i obliku lisne plojke, izrubljenosti lista te obliku cvjetnog vjenčića i čaške, kao i ovojnih listova, ali se nikada nisu razlikovale po svim morfološkim karakteristikama, odnosno pojedina jedinka imala bi istovremeno značajke koje su po definiciji karakteristične za jednu ili drugu svojtu. Na temelju ovakvih rezultata zaključeno je da je ova pojava posljedica polimorfizma te da istraživane populacije nije moguće razlikovati drugačije nego kao različite oblike svojte *G. cordifolia* (Ravnik, 1962; Ravnik, 1965).

Istraživanje talijanskih populacija koje pripadaju kompleksu *G. cordifolia* s.l. također je pokazalo prisutnost samo jedne vrlo polimorfne vrste na istraživanom području, što je u skladu sa zaključcima koje su prethodno donijeli Willkomm (1850) i Ravnik (1962; 1965). Naime, kod vrste *G. cordifolia* uočena je velika morfološka varijabilnost, ali unatoč tome nije ustanovljena povezanost između uočenih karakteristika listova i cvjetova. S druge strane, njihovi citološki i kemijski podaci bili su jednolični (Milletti, 1987). S obzirom na njihovo geografsko preklapanje i neznatne morfološke razlike, sve prethodno spomenute svojte (*G. bellidifolia*, *G. meridionalis*, *G. cordifolia* var. *bellidifolia* i *G. cordifolia* var. *meridionalis*) u planinskoj su flori Grčke navedene kao sinonimi za vrstu *G. cordifolia* (Milletti i Strid, 1991), dok se u ranijim popisima grčke flore navodila prisutnost vrste *G. meridionalis* (Karagiannakidou i Kokkini, 1987). Uzevši u obzir rezultate istraživanja Ravnik (1962; 1965) i Milletti (1987), posljednja klasifikacija vrsta roda *Globularia*, svojtu *G. meridionalis* navodi kao podvrstu vrste *G. cordifolia* s.l. (Holländer i Jäger, 1994).

Tablica III. Podjela i razlikovne osobine vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* prema različitim literaturnim izvorima

***G. cordifolia* L.**	***G. meridionalis* (Podp.) O. Schwarz**	**Literatura**
***G. cordifolia* var. *cordifolia* Camb.**	***G. cordifolia* var. *nana* Camb.**	Cambessèdes, 1826
Listovi: okruglasti, s tri zubića na vrhu	**Listovi:** izduženi, gotovo cjelovitog vrha	
Vjenčić: donja usna gotovo trodjelna	**Vjenčić:** donja usna s tri zubića	
***G. cordifolia* subsp. *cordifolia* L.**	***G. cordifolia* subsp. *bellidifolia* Ten.**	Domac, 1950
Listovi: obrnuto jajoliki, na vrhu izrubljeni ili s tri zubića	**Listovi:** lopatasti, kratko ušiljenog vrha ili zaobljeni	
Ovojni listovi cvata: 3-4 puta duži nego širi, najširi prema dnu (vanjski)	**Ovojni listovi cvata:** dvostruko duži nego širi, suženi prema dnu (vanjski)	
***G. cordifolia* var. *typica* Fiori**	***G. cordifolia* var. *bellidifolia* (Ten.) Fiori**	Fiori, 1925-1929
Habitus: visina 10-30 cm, vrlo dobro razvijena biljka	**Habitus:** visina 10-30 cm, srednje razvijena biljka	
Listovi: obrnuto jajoliki do klinasti, srcoliko urezanog ili nazubljenog vrha	**Listovi:** obrnuto jajoliki do klinasti, srcoliko urezanog ili nazubljenog vrha	
Ovojni listovi cvata: duguljasti, šire se prema dnu, pa zatim neznatno smanjuju	**Ovojni listovi cvata:** ovalno ušiljeni, šire se prema sredini	
Vjenčić: zubići gornje usne podjednake dužine kao zubići donje usne	**Vjenčić:** zubići gornje usne širi i kraći nego kod prethodne podvrste	
***G. cordifolia* L.**	***G. bellidifolia* Ten.**	Forenbacher, 1990
Listovi: obrnuto jajoliki, izrubljenog vrha ili s tri zubića na vrhu, postepeno se suzuju u dugu peteljku	**Listovi:** lopatasti, zaobljenog ili kratko ušiljenog vrha, nisu izrubljeni	
***G. cordifolia* L.**	***G. bellidifolia* Ten.**	Fritsch, 1922
Listovi: klinasto do obrnuto jajoliki, izrubljeni	**Listovi:** lopatasti, kratko ušiljeni ili rijetko zaobljeni	
Ovojni listovi cvata: s dugim ušiljenim vrhom, najširi pri dnu (vanjski)	**Ovojni listovi cvata:** s kratko ušiljenim vrhom, širi nego kod prethodne vrste, jako suženi pri dnu (vanjski)	
***G. cordifolia* subsp. *cordifolia* (L.) Hayek**	***G. cordifolia* subsp. *bellidifolia* (Ten.) Hayek**	Hayek, 1927
Listovi: lopatasti, suženi u peteljku, jako urezanog ili nazubljenog vrha	**Listovi:** lopatasti, suženi u peteljku, zaobljenog ili kratko ušiljenog vrha	
Ovojni listovi cvata: 3-4 puta duži nego širi (vanjski)	**Ovojni listovi cvata:** dvostruko duži nego širi (vanjski)	
***G. cordifolia* subsp. *cordifolia* (L.) Hayek**	***G. cordifolia* subsp. *bellidifolia* (Ten.) Hayek**	Hegi, 1918
Listovi: obrnuto jajoliki, zarezanog vrha ili s tri zubića na vrhu	**Listovi:** lopatasti, kratko zašiljenog ili zaobljenog vrha	
Ovojni listovi cvata: s dugim ušiljenim vrhom, najširi pri dnu (vanjski)	**Ovojni listovi cvata:** s kratko ušiljenim vrhom, suženi pri dnu (vanjski)	

***G. cordifolia* L.**	***G. meridionalis* (Podp.) O. Schwarz**	Hegi, 1974
Habitus: visina 4-8 cm, puzajući izdanci do 30 cm, plojka veličine 4-8 mm x 3-6 mm, peteljka dužine 1-2 cm	**Habitus:** visina 6-12 cm, puzajući izdanci do 50 cm, plojka veličine 6-12 mm x 1-10 mm, peteljka dužine 2-5 cm	
Listovi: lopatasti, srcoliko zarezanog do jasno trozubog vrha, samo pojedini zaobljenog ili kratko ušiljenog vrha	**Listovi:** obrnuto jajoliki do lancetasti, zašiljenog ili zaobljenog vrha, samo pojedini povremeno srcoliko zarezani	
Ovojni listovi cvata: s kratko ušiljenim vrhom, široki pri dnu, dlakavog ruba i gotovo gole poleđine	**Ovojni listovi cvata:** s dugim ušiljenim vrhom, najuži pri dnu, dlakavog ruba i fino dlakave poleđine	
Čaška: široko lancetasti zubići, kratko ušiljeni, najveće dužine kao i cijev	**Čaška:** gusto dlakava, lancetasti zubići duži od cijevi	
Vjenčić: ljubičastomodri, rjeđe ljubičastorozi do bijeli, dužine 1-10 mm, podjednake širine, gornja usna usječena u cijev	**Vjenčić:** ljubičastomodri, dužine 7-12 mm, sužen pri dnu, gornja usna manje usječena nego kod prethodne vrste	
Broj kromosoma: 2*n* = 32	**Broj kromosoma:** 2*n* = 16	
***G. cordifolia* subsp. *cordifolia* (L.) Hayek**	***G. cordifolia* subsp. *bellidifolia* (Ten.) Hayek**	Hermann. 1956
Listovi: obrnuto jajoliki do gotovo okrugli ili lopatasti, suženi u peteljku, izrubljenog ili trozubog vrha	**Listovi:** svi ili pretežito šiljasti	
Ovojni listovi cvata: postepeno ušiljeni, bez bodlje na vrhu, kratko dlakavog ruba	**Ovojni listovi cvata:** dugo ušiljeni, na poleđini obično gusto dlakavi	
Čaška: zubići nisu duži od cijevi	**Čaška:** zubići duži od cijevi	
***G. cordifolia* subsp. *cordifolia* (L.) Hayek**	***G. cordifolia* subsp. *bellidifolia* (Ten.) Wettst.**	Josifović, 1974
Listovi: klinasto do obrnuto jajoliki, duboko usječenog ili trozubog vrha	**Listovi:** lopatasti, kratko zašiljenog ili zaobljenog vrha, nisu usječeni, cjelovitog ruba ili plitko nazubljeni	
Ovojni listovi cvata: izduženo zašiljeni, širi prema dnu, zubići duži od cijevi (var. *cordifolia*) ili jedva duži od cijevi (var. *serbica* – snažnija biljka većih glavica)	**Ovojni listovi cvata:** -	
***G. cordifolia* subsp. *cordifolia* (L.) Hayek**	***G. cordifolia* subsp. *bellidifolia* (Ten.) Hayek**	Kušan, 1943
Listovi: obrnuto jajoliki, zarezanog ili nazubljenog vrha (s tri zubića)	**Listovi:** lopatasti, zaobljeni, čitavog ili neznatno nazubljenog vrha	
***G. cordifolia* subsp. *cordifolia* (L.) Hayek**	***G. cordifolia* subsp. *bellidifolia* (Ten.) Hayek**	Larsen, 1957
Listovi: lopatasti, izrubljenog ili trozubog vrha	**Listovi:** lopatasto izduženi, kratko ušiljenog ili zaobljenog vrha	
Broj kromosoma: 2*n* = 32	**Broj kromosoma:** 2*n* = 16	

***G. cordifolia* L.**	***G. meridionalis* (Podp.) O. Schwarz**	Pignatti, 1982
Habitus: visina 3-12 cm, plojka veličine 4-7 x 10-20 mm	**Habitus:** visina 5-15 cm, plojka veličine 3-6 x 8-20 mm	
Listovi: lopatasti, zarezanog vrha ili s tri zubića na vrhu	**Listovi:** obrnuto jajoliki, ušiljenog ili zaobljenog vrha, rijetko zarezanog vrha, ali nikad trozubi	
Ovojni listovi cvata: lancetasti, veličine 1,2-1,5 x 3,5-4,5 mm	**Ovojni listovi cvata:** veličine 2,2 x 4,5 mm	
Čaška: zubići najveće dužine kao i cijev	**Čaška:** zubići približne dužine kao i cijev	
Vjenčić: modroljubičast, dužine 8-11 mm	**Vjenčić:** -	
***G. cordifolia* L.**	***G. bellidifolia* Ten.**	Piskernik, 1941
Listovi: klinasti, na širem kraju izrubljeni ili trozubi	**Listovi:** lopatasti, kratko ušiljeni, rijetko zaokruženi	
***G. cordifolia* L.**	***G. cordifolia* subsp. *meridionalis* Podp.**	Podpěra, 1902
Habitus: veće cvatne glavice (1,2 x 2 cm) s više cvjetova nego kod podvrste *G. cordifolia* subsp. *meridionalis*	**Habitus:** manje cvatne glavice (0,7 x 1 cm), manji i uži listovi (habitus vrste *G. nana*)	
Listovi: -	**Listovi:** sličnog oblika kao kod vrste *G. cordifolia*	
Ovojni listovi cvata: -	**Ovojni listovi cvata:** rigidni i ušiljeni	
Čaška: dvousnata, zubići kraći od cijevi, lancetasti, ušiljeni	**Čaška:** aktinomorfna (peteročlana), zubići duži od cijevi, linearno-lancetasti, ušiljeni, gotovo jednaki	
***G. cordifolia* ssp. *cordifolia* (L.) Hayek**	***G. cordifolia* ssp. *bellidifolia* (Ten.) Hayek**	Rauh, 1952
Listovi: lopatasti, dugih peteljki, izrubljenog vrha ili s tri zubića na vrhu	**Listovi:** lopatasti, dugih peteljki, kratko ušiljeni ili zaobljeni, nisu izrubljeni	
Ovojni listovi cvata: dugo ušiljeni (vanjski)	**Ovojni listovi cvata:** kratko ušiljeni (vanjski)	
***G. cordifolia* L.**	***G. meridionalis* (Podp.) O. Schwarz**	Schwarz, 1938
Habitus: južnije populacije na nižim nadmorskim visinama jače odrvenjele i s dužim klinastim listovima, visokoalpske obično vrlo niske s vrlo malim listovima i gotovo sjedećim glavicama, nadzemne puzajuće stabljike	**Habitus:** kseromorfnija vrsta od prethodne, tanjih i dužih stabljiki te često većih glavica nego prethodna vrsta, jače odrvenjela, podzemne puzajuće stabljike	
Listovi: tanki, široko obrnuto jajoliki ili lopatasto klinasti, naglo suženi u peteljku, tupog, tupo ušiljenog, zaobljenog ili jako izrubljenog vrha, zbog kojeg list izgleda srcoliko ili trozubo	**Listovi:** deblji i duži nego kod prethodne vrste (2-9 cm), lancetasti ili obrnuto jajoliko lancetasti, ravne plojke, ušiljenog vrha, rijetko zaobljeni, samo pojedini povremeno slabo izrubljeni, sekundarno uvijenog i urezanog ruba lista	
Ovojni listovi cvata: postepeno ušiljeni, ali nikad šiljasti	**Ovojni listovi cvata:** tupi ili postepeno ušiljeni, lagano do gusto dlakavi sa stražnje strane	
Vjenčić: donja usna građena od tri duboko usječena zubića	**Vjenčić:** donja usna građena od tri duboko usječena zubića	
Čaška: dvousnata, kratki zubići, nikad duži od cijevi	**Čaška:** dvousnata, uža s dugim ušiljenim linearno lancetastim zubićima koji su podjednake dužine kao i cijev	

***G. cordifolia* L.**	***G. bellidifolia* Ten.**	Tenore, 1824-1829
Habitus: cvatuće stabljike gotovo gole, puno duže od listova, puzajuće stabljike ne razvijaju korjenčiće u koljencima	**Habitus:** cvatuće stabljike potpuno gole, više od 5,5 cm, često ljubičasto obojene, puzajuće stabljike razvijaju korjenčiće u koljencima	
Listovi: tamnozeleni, klinasto produženi u peteljku, zaobljeni ili srcoliko nazubljeni, često s malim udubljenim vrhom u sredini, povremeno ušiljeni	**Listovi:** svjetlozeleni, obrnuto jajoliki do klinasti, produženi u dugu peteljku, manje ili više narovašenog vrha, pa golim okom ponekad izgledaju cjelovito, vrlo rijetko s tri međusobno jednaka zubića	
Vjenčić: modri	**Vjenčić:** svijetlo nebesko plavi	
***G. cordifolia* L.**	***G. meridionalis* (Podp.) O. Schwarz**	Tutin i sur., 1972
Habitus: visina 1-10 cm, puzajuće stabljike razvijaju korjenčiće u koljencima, listovi veličine do 25 x 8 mm	**Habitus:** kao prethodna vrsta, samo robusnija, listovi veličine 20-90 x 2-5 mm	
Listovi: lopatasti, obično izrubljeni, ponekad ušiljeni ili s tri zubića na vrhu	**Listovi:** lancetasti do obrnuto lancetasti, ušiljeni, vrlo rijetko lagano izrubljeni	
Ovojni listovi cvata: jajoliko lancetasti do jajoliki, prema gore se postepeno sužavaju, zubići lancetasti i zašiljeni	**Ovojni listovi cvata:** jajoliki, gotovo šiljati, zubići linearno lancetasti	
Broj kromosoma: 2*n* = 32	**Broj kromosoma:** 2*n* = 16	
***G. cordifolia* L.**	***G. bellidifolia* Ten.**	Wettstein, 1892
Listovi: obrnuto jajoliki, izrubljeni	**Listovi:** lopatasti, kratko ušiljeni, rijetko zaokruženi, na vrhu rijetko izrubljeni ili nisu izrubljeni	
Ovojni listovi cvata: dugo ušiljeni, najširi pri dnu (vanjski)	**Ovojni listovi cvata:** jajoliki, kratko ušiljeni, jako suženi pri dnu (vanjski)	
Čaška: široka, s relativno kratkim zubićima	**Čaška:** uža, s produženim zubićima	
Vjenčić: gornja usna duboko usječena	**Vjenčić:** gornja usna manje duboko usječena	
***G. cordifolia* L.**	***G. bellidifolia* Ten.**	Wettstein, 1895b
Listovi: obrnuto jajoliki, izrubljeni ili s tri zubića na vrhu, pojedini povremeno slični onima vrste *G. bellidifolia*	**Listovi:** lopatasti, kratko ušiljeni, rijetko zaokruženi	
Ovojni listovi cvata: -	**Ovojni listovi cvata:** širi (vanjski) i duži (unutarnji) od onih vrste *G. cordifolia*	
Vjenčić: -	**Vjenčić:** zubići donje usne širi i kraći od onih vrste *G. cordifolia*	

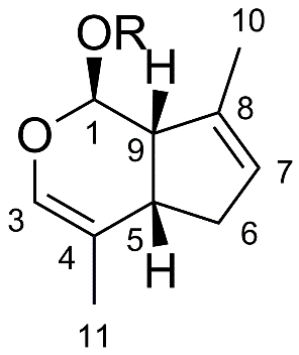
- – nije navedeno

1.3. Fitokemijski profil vrsta roda *Globularia* L.

U karakteristične sekundarne metabolite glavulja ubrajaju se iridoidi, feniletanoidi i flavonoidi (Hegnauer, 1989; Kirmizibekmez i sur., 2003b; Kirmizibekmez i sur., 2008; Kirmizibekmez i sur., 2009; Tundis i sur., 2012b; Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a).

1.3.1. Iridoidi

Iridoidi spadaju u skupinu ciklopentan[*c*]piranskih monoterpenoida, koji u osnovnoj strukturi sadrže deset, devet ili rijetko osam C atoma, pri čemu im skupina u položaju *C*-11 češće nedostaje od one u položaju *C*-10 (Slika 17). Do danas je otkriveno preko 2500 različitih iridoida, a razlikuju se uglavnom po broju i vrsti supstituenata (Sampaio-Santos i Kaplan, 2001). Dijele se na iridoidne glikozide (najčešće je riječ o *C*-1-glukozidima), sekoiridoidne glukozide i neglikozilirane iridoide, dok šira podjela uključuje i pseudoalkaloide te alkaloide indolskog i izokinolinskog tipa (Tundis i sur., 2008). Njihove hidroksilne skupine često su esterificirane s octenom kiselinom, kao i s benzojevom ili cimetnom kiselinom, odnosno s njihovim derivatima (Hegnauer i Kooiman, 1978). Iridoidi se javljaju samo kod dvosupnica, a karakteristični su, primjerice, za redove Cornales, Ericales, Gentianales i Lamiales (Jensen, 1991). Jedan od najpoznatijih i najrasprostranjenijih iridoida je aukubin, koji se posebno često pojavljuje u porodicama Scrophulariaceae i Plantaginaceae (Andrzejewska-Golec, 1995).

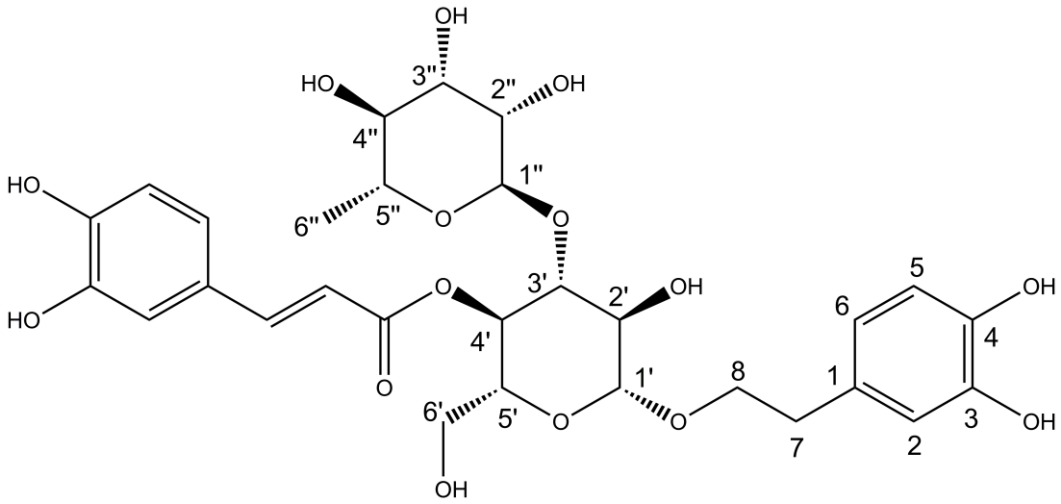


Slika 17. Osnovna struktura iridoida

1.3.2. Feniletanoidi

Feniletanoidi su polifenolni spojevi čiju osnovnu strukturu čine hidroksifeniletilna skupina povezana glikozidnom vezom s glukozom (ili rjeđe nekim drugim šećerom). Na središnju glukozu su često vezane aromatske kiseline i/ili različiti šećeri (npr. ramnoza, ksiloza, apioza, arabinoza). Zbog prisutnosti fenilpropilne skupine koja dolazi od aromatskih kiselina, kao što su cimetna, kavena i ferulinska kiselina, često se nazivaju i fenilpropanoidima. Uobičajena je supstitucija ovih spojeva u položaju *C*-3', najčešće s ramnozom, dok su u položaju *C*-4' obično vezane fenolne kiseline, kao što je to slučaj kod verbaskozida (Slika 18) (Fu i sur., 2008). Verbaskozid (akteozid, kusaginin) je ujedno i jedan od najbolje rasprostranjenih disaharidnih estera kavene kiseline (Alipieva i sur., 2014).

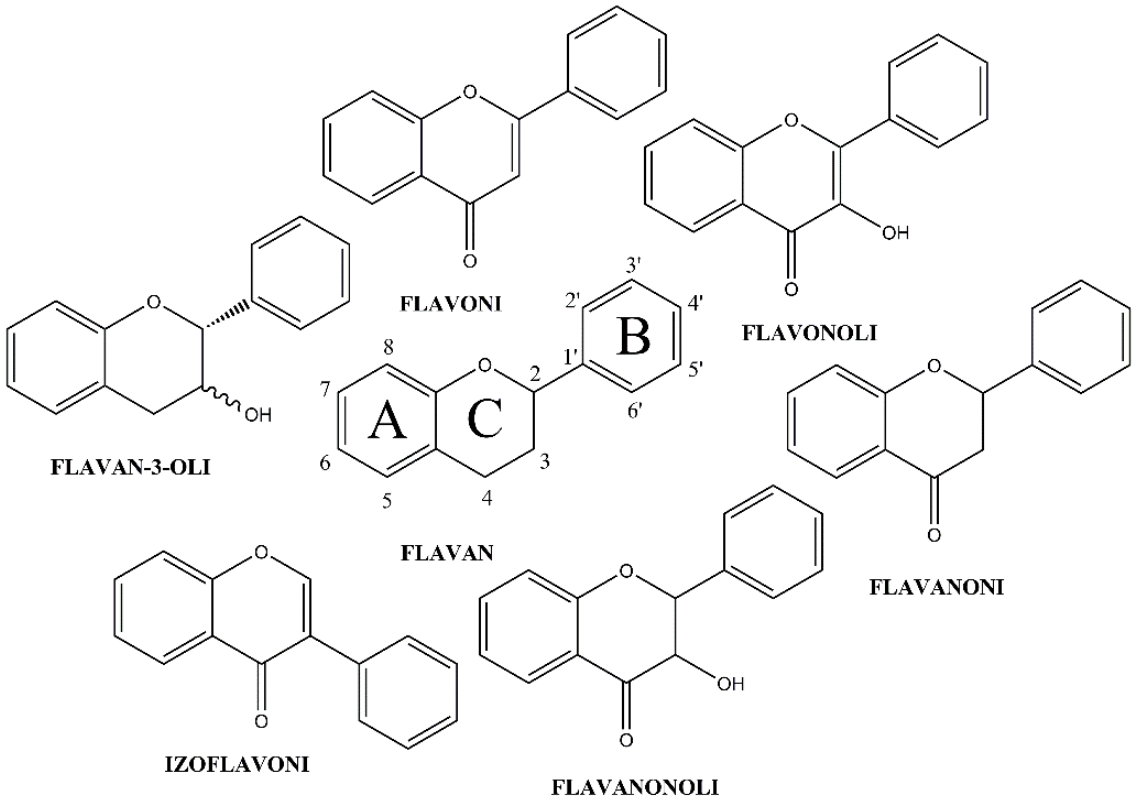
Fenolne kiseline su široko rasprostranjena skupina polifenolnih spojeva, a dijele se na derivate benzojeve i cimetne kiseline. Češći su derivati cimetne kiseline, a među njima se posebno ističu *p*-kumarinska, kavena, ferulinska i sinapinska kiselina (Pandey i Rizvi, 2009). Iste fenolne kiseline često se mogu naći i u sastavu feniletanoida (Fu i sur., 2008). Osim u obliku glikozida, mogu biti prisutne u obliku estera s drugim kiselinama, sterolima ili alkoholima, a važne su za rast, razmnožavanje i zaštitu biljaka od okolišnih čimbenika (Ghasemzadeh i Ghasemzadeh, 2011).



Slika 18. Struktura verbaskozida

1.3.3. Flavonoidi

Flavonoidi su u biljkama najčešće prisutni polifenolni spojevi, derivati benzo-γ-pirona, koji se često javljaju u svim biljnim dijelovima, a posebno u onima koji su fotosintetski aktivni. Važni su za rast, razvoj i obranu biljaka od ultraljubičastog zračenja ili patogena. Jedni su od glavnih biljnih pigmenata, zaslužni primjerice za boju i okus voća i povrća. U svojoj osnovnoj strukturi imaju dva benzenska prstena (A i B) međusobno povezana preko piranskog prstena (prsten C), a mogu biti prisutni kao aglikoni, glikozidi i/ili kao metilirani derivati. Do danas je otkriveno preko 4000 različitih struktura flavonoida, a dijele se u šest osnovnih skupina: flavoni (npr. apigenin, luteolin), flavonoli (npr. kvercetin, kempferol), flavanoni (npr. naringenin), flavanonoli (npr. taksifolin), izoflavoni (npr. genistein) i flavan-3-oli (npr. katehin) (Slika 19). Najčešće prisutni flavonoidi su flavoni, posebno apigenin, i flavonoli, posebno kvercetin, kempferol, miricetin i krizin (Di Carlo i sur., 1999; Kumar i Pandey, 2013).



Slika 19. Osnovna struktura flavonoida prema skupinama

1.3.4. Biološki učinci iridoida, feniletanoida i flavonoida

Biljke bogate iridoidima koriste se kao sedativi, hipotenzivi, antipiretici, kod kašlja, rana i kožnih poremećaja. Ovi spojevi posjeduju neuroprotektivni, antitumorski, protuupalni, antioksidativni, kardiovaskularni, hepatoprotektivni, koleretični, hipoglikemijski, hipolipidemijski, spazmolitički, antivirusni, antimikrobni, imunomodulatorni, antialergijski, antilišmanicidni i moluskocidni učinak. U uvjetima *in vivo* iridoidni glikozidi se djelovanjem bakterijskih enzima prevode u aglikone te je za navedene biološke učinke najvjerojatnije odgovoran aglikonski dio molekule (Tundis i sur., 2008).

Mnogi od ovih učinaka zabilježeni su za aukubin, kojemu se pripisuje i hemodinamsko, antinociceptivno, zacjeljujuće te fotoprotektivno djelovanje (Shim i sur., 2007). Protuupalni učinak pokazali su i 6-*O*-esteri katalpola, dok iridoidi karboksilirani u položaju *C*-4 inhibiraju oksidaciju LDL kolesterola. Katalpol, melampirozid i verminozid posjeduju i negativni inotropni učinak na srce (Tundis i sur., 2008). Globularin, glavni iridoid iz listova vrste *G. alypum*, pokazao je hipoglikemijsko i hipolipidemijsko djelovanje u uvjetima *in vivo* (Merghache i sur., 2013). Globularifolin, glavni iridoid izoliran iz nadzemnog dijela vrste *G. cordifolia*, pokazao je imunomodulatorno i proliferativno djelovanje u uvjetima *in vitro* (Sipahi i sur., 2014). Istraživanje na miševima pokazalo je da oralna primjena iridoida može izazvati purgativni učinak (Inouye i sur., 1974).

Biološki učinci feniletanoida su sljedeći: antivirusni, antibakterijski, antiprotozoalni, antitumorski, protuupalni, neuroprotektivni, kardioprotektivni i antihipertenzivni, antioksidativni, hepatoprotektivni, analgetski i imunomodulatorni. Za antioksidativni učinak važne su fenolne hidroksilne skupine, pri čemu su esteri kavene kiseline aktivniji od estera *p*-kumarinske kiseline. Za citotoksični učinak posebno je važna prisutnost kafeoilne i ramnozilne skupine, kao i mjesto njihovog vezanja. Učinak je veći ukoliko je kavena kiselina vezana na položaju *C*-4' (verbaskozid), umjesto položaja *C*-6' (izoverbaskozid) (He i sur., 2011). Od ostalih učinaka, zabilježeno je i antigerminacijsko djelovanje na neke vrste dvosupnica (npr. *Lactuca sativa* i *Raphanus sativus*) (Fu i sur., 2008).

Mnogi prethodno navedeni učinci feniletanoida pripisuju se verbaskozidu (Fu i sur., 2008). Biljke koje sadrže velike količine ovog spoja u narodnoj medicini često se koriste u liječenju upale i mikrobnih infekcija. Verbaskozid posjeduje i antiandrogeni učinak te se zbog svega navedenog pokazao kao potencijalno koristan u liječenju akni vulgaris. Protuupalno djelovanje ovog spoja povezano je s inhibicijom fosfolipaze A2, inhibicijom ekspresije i aktivnosti inducibilne sintaze dušikovog(II) oksida (engl. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS), kao i inhibicijom bakterijskim lipopolisaharidima potaknutog otpuštanja NO iz

makrofaga te smanjenom aktivacijom transkripcijskih faktora NF-κB i AP-1, koji su važni modulatori upalnog procesa. Pri tome AP-1 modulira upalni proces kod kroničnih bolesti, kao što su reumatoidni i psorijatični artritis, psorijaza i Chronova bolest. Isti spoj posjeduje i gastroprotektivno, zacjeljujuće, antinociceptivno, neuroprotektivno i antioksidativno djelovanje, zaštitni učinak od ultraljubičastog zračenja (Alipieva i sur., 2014) te nastanka nefritisa i benigne hiperplazije prostate, odnosno citotoksični, hepatoprotektivni, antivirusni i antibakterijski učinak. Također, primijećeno je da može poboljšati seksualnu funkciju u muških štakora te smanjiti razinu mokraćne kiseline inhibicijom ksantin oksidaze (He i sur., 2011). Nedavno je kod verbaskozida, koji je bio izoliran iz vrste *G. dumulosa* kao jedan od njezinih glavnih sekundarnih metabolita, uočeno i citotoksično djelovanje na stimulirane i nestimulirane periferne krvne mononuklearne stanice kao i njegovo protuupalno te imunomodulatorno djelovanje (smanjeni raspad triptofana i smanjena proizvodnja neopterina u stimuliranim stanicama) (Sipahi i sur., 2016). Neki od navedenih učinaka mogu se pripisati prisustvu kavene kiseline u strukturi verbaskozida. Fenolne kiseline posjeduju protuupalni, antioksidativni, antimikrobni (npr. na *S. aureus*) i citotoksični učinak te mogu povećati otpuštanje žuči i smanjiti razinu kolesterola i lipida u krvi (Ghasemzadeh i Ghasemzadeh, 2011).

Najbolje opisano djelovanje flavonoida je njihovo antioksidativno djelovanje (npr. zaštita od ultraljubičastog zračenja i lipidne peroksidacije), a njegovi mehanizmi su sljedeći: inhibicija prooksidativnih enzima ili keliranje metala (Fe, Cu), hvatanje slobodnih radikala i inhibicija njihovog nastanka te indukcija ili zaštita antioksidativnih mehanizama obrane. Strukturne značajke flavonoida koje su značajne za zaštitu od lipidne peroksidacije uključuju 3',4'-kateholsku skupinu u prstenu B te nezasićenu vezu *C*-2-*C*-3 u prstenu C koja je konjugirana s 4-okso skupinom. Antioksidativnu aktivnost povećava i prisutnost 3-OH skupine. Dok aglikoni pokazuju veću antioksidativnu aktivnost od glikozida, glikozilacija flavonoida može povećati njihovu bioraspoloživost (Kumar i Pandey, 2013).

Flavonoidi mogu djelovati i antiaterosklerotski (antiagregacijski) i smanjiti rizik od koronarne bolesti srca, hepatoprotektivno, protuupalno, analgetski (npr. inhibicijom iNOS, ciklooksigenaze i lipooksigenaze) i antitumorski. Također, mogu imati zaštitni učinak od bakterijskih i virusnih infekcija (Kumar i Pandey, 2013), djelovati antiosteoporotski, antialergijski, antidijabetski (npr. inhibicijom aldoza reduktaze mogu pružati zaštitu od retinopatije kao sekundarne komplikacije šećerne bolesti), antiulkusno, antispazmotično te mogu smanjiti pokretljivost i lučenje crijeva i na taj način spriječiti nastanak proljeva (Di Carlo i sur., 1999).

1.4. Pregled dosadašnjih istraživanja fitokemijskog profila vrsta roda *Globularia* L.

1.4.1. Kvalitativna fitokemijska istraživanja

Kvalitativna fitokemijska istraživanja vrste *G. alypum* pokazala su da njezini eterski ekstrakti sadrže sterole i steroide (list, stabljika), kumarine (list, stabljika, sjemenke, korijen) i masne kiseline (list, korijen) (Meriah, 2007). Etil acetatni i metanolni ekstrakti listova, stabljike i korijena *G. alypum* dali su pozitivnu reakciju na fenole, flavonoide, trjeslovine, terpenoide, kumarine i kardiotonične glikozide, a bili su negativni na alkaloide, antracenske derivate, slobodne kinone, aminokiseline i proteine (Djellouli i sur., 2014-2015; Taghzouti i sur., 2016). Metanolni ekstrakti dali su također pozitivnu reakciju na saponine (Taghzouti i sur., 2016). Prisutnost sterola i male količine flavonoida detektirana je i u etil acetatnim i petroleterskim ekstraktima listova, dok su metanolni i vodeni ekstrakti sadržavali veću količinu trjeslovina i flavonoida (Harzallah i sur., 2010).

U etanolnim ekstraktima detektirani su flavonoidi, antocijanozidi, reducirajući spojevi (svi biljni dijelovi), trjeslovine, steroli (svi biljni dijelovi osim sjemenki) te kumarini (grančice i sjemenke) i antracenozidi (stabljike i korijen). Trjeslovine, reducirajući spojevi i saponozidi detektirani su u vodenim ekstraktima svih biljnih dijelova, a flavonoidi samo u vodenim ekstraktima listova i korijena (Meriah, 2007). U vodenom ekstraktu korijena ove vrste nađeni su, uz flavonoide, kardiotonični glikozidi, saponini, hidroksikumarini i lignani (Zeghada, 2008-2009). Prema jednom starijem istraživanju listovi vrste *G. alypum* sadrže glikozide i bogati su kondenziranim trjeslovinama (8,70%), dok ne sadrže alkaloide, antrakinone i saponine (Peyer, 1942). Prema drugom istraživanju vrsta *G. alypum* sadrži i alkaloide, dok ih vrsta *G. nana* ne sadrži (Viladomat i sur., 1986).

Listovi vrste *G. vulgaris* dali su pozitivnu reakciju na flavonoide, terpene i alkaloide, a bili su negativni na antrakinone, kumarine i saponine. Prisutnost trjeslovina bila je pozitivna u testu sa željezovim kloridom, dok je u testu sa želatinom bila negativna (Awen i sur., 2010).

1.4.2. Sadržaj sekundarnih metabolita

Istraživanja sadržaja sekundarnih metabolita pokazala su da je u usporedbi s drugim biljnim vrstama koje se primjenjuju u narodnoj medicini vrsta *G. alypum* vrlo bogata polifenolnim spojevima (Djeridane i sur., 2006; Djeridane i sur., 2010; Rached i sur., 2010; Athmouni i sur, 2016), među kojima prevladavaju derivati hidroksicimetne kiseline (Stocker i sur., 2004; Djeridane i sur., 2007). Količine ukupnih polifenola i flavonoida najčešće su bile

procijenjene spektrofotometrijskim metodama s Folin-Ciocalteuovim reagensom i aluminijevim kloridom na maceratima listova ili nadzemnih dijelova i u pravilu su bile najveće u metanolnim, odnosno etanolnim ekstraktima (Tablica IV). U pojedinim istraživanjima spektrofotometrijski je određen i sadržaj kondenziranih trjeslovina (proantocijanidina), pri čemu je najčešće korištena vanilinska metoda, te sadržaj antocijana, određen pomoću pH diferencijalne metode (Tablica V). Maceracijom je ekstrahirano više flavonoida i antocijana, dok je veći sadržaj ukupnih polifenola i kondenziranih trjeslovina određen kod ektrakata pripremljenih Soxhlet ekstrakcijom (Touaibia i Chaouch, 2016).

Pokazalo se da je polifenolima posebno bogat ekstrakt korijena vrste *G. alypum* (131,48-210,79 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog ekstrakta) (Rached i sur., 2010; Taghzouti i sur., 2016). Ekstrakti cvjetova i listova imali su ponekad usporedive (Rached i sur., 2010; Chograni i sur., 2012), a ponekad i vrlo različite količine polifenola i flavonoida (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014b). Također, primjenom spektrofotometrijske metode s aluminijevim kloridom i standardom rutina utvrđeno je da listovi sadrže veću količinu flavonoida (0,33%) od stabljike (0,15%) i korijena (0,08%) (Ben Hassine i sur., 1982b). Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz detekciju pri UV 280 nm utvrđeno je i da listovi vrste *G. alypum* sadrže više fenolnih kiselina (0,4% slobodnih i 0,5% vezanih) od stabljike (0,03%, 0,05%) i korijena (0,01%, 0,02%), a najzastupljenije su kavena, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina, koje čine više od 60% ukupnih fenolnih kiselina (Ben Hassine i sur., 1982a). Količine kondenziranih trjeslovina (14,07-14,18 mg ekvivalenta katehina/g suhog ekstrakta), ukupnih trjeslovina (7,46-9,39 mg ekvivalenta taninske kiseline/ g suhog ekstrakta) i flavonola (3,12-3,26 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog ekstrakta) u cvjetovima i listovima bile su usporedive (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014b).

U usporedbi s drugim istraživanim vrstama *G. alypum* sadržavala je više vitamina D (7,41 μg/g) i ergosterola (3,45 μg/g). Također, većim se pokazao i sadržaj njezinih primarnih metabolita, točnije proteina. Sadržaj ugljikohidrata bio je prosječan, a prevladavale su glukoza (451,54 μg/g), fruktoza (304,34 μg/g) i saharoza (267,07 μg/g) (Athmouni i sur, 2016). Također, pokazalo se da ova vrsta sadrži visok omjer Ca i P (Gasmi-Boubaker i sur., 2008).

Polifenolnim spojevima bogati su i nadzemni dijelovi te korijen vrste *G. meridionalis*. Ekstrakt korijena bio je posebno bogat flavonoidima (125,0 mg ekvivalenta kvercetina/ g suhog ekstrakta), dok je sadržaj iridoida aukubinskog tipa, određen spektrofotometrijskom metodom s Trim-Hill reagensom, bio veći u ekstraktu nadzemnih dijelova (90,3 mg ekvivalenta aukubina/g suhog ekstrakta) (Tundis i sur., 2012a). Prisutnost male količine fitoekdisteroida dokazana je kod vrsta *G. punctata* i *G. vulgaris* (Dinan i sur., 2001).

Tablica IV. Sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida vrsta roda *Globularia*

Dio biljke	Otapalo	Način pripreme*	Ukupni polifenoli (mg EGK/g SE)**	Flavonoidi (mg EKV/g SE)**	Literatura
G. alypum					
L/C	M	1 g u 10 mL, maceracija, sT, 24 sata	102,29/156,97	16,59/1,35	Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014b
L	M	20 g u 250 mL, maceracija, sT, 24 sata	8,04	0,67	Athmouni i sur., 2016
L/S/K	E	-	n.i.	3,3/1,5/0,8[b]	Ben Hassine i sur., 1982b
N	M/H/KL/EA/V	sT, preko noći	140,24/n.i./81,01/157,74/100,86	2,64/n.i./1,12/8,56/2,20	Boussoualim i sur., 2016a/2016b
L/C	M (80%)	2 g u 50 mL, maceracija, sT, 24 sata	22,30/15,50[a]	4,72/3,63[b]	Chograni i sur., 2012
N	E (70%)	1 g u 50 mL, maceracija, sT, 24 sata	21,54[a]	4,54[b]	Djeridane i sur., 2006
N	E (80%)	10 g u 100 mL, 3x maceracija, sT, 1 sat	46[a]	3	Djeridane i sur., 2007
N	M (80%)	2 g u 100 mL, 2 g u 50 mL, 2x maceracija, sT, 48 sati, 24 sata	29,75[a]	29,50[b]	Djeridane i sur., 2010
N	M (80%)	0,05 g u 1 mL, ultrazvučna ekstrakcija, 20 min	22,36[a]	51,25[b] ($AlCl_3$) 66,28 (Neuov reagens)	El Guiche i sur., 2015
L	M (80%)	200 g u 2000 mL, maceracija, sT, 48 sati	47,57[a]	36,56[c]	Feriani i sur., 2017
L	H/DM/M/V	22,5 g, uzastopna Soxhlet ekstrakcija otapalima rastuće polarnosti	150,3/147,1/142,3/140,1	15,6/14,3/13,2/12,3	Khantouche i sur., 2015
L + S	M (60%)	100 g u 500 mL, maceracija, 25 °C, 48 sati	120[d]	n.i.	Khlifi i sur., 2005
L	M (75%), P/DM/A/M (75%)/V	50 g u 500 mL, Soxhlet ekstrakcija, 65 °C, 48 sati, uzastopna Soxhlet ekstrakcija otapalima rastuće polarnosti, 40 °C, 6 sati/40 °C, 6 sati/56 °C, 6 sati/65 °C, 6 sati/100 °C, 6 sati	116,89, 8,50/41,19/109,46/139,95/55,10	18,20, 0,31/0,34/17,08/19,29/1,33	Khlifi i sur., 2011
L	M (70%)	1 g u 10 mL, 3x maceracija, sT, 48 sati	25,38	3,76	Krimat i sur., 2014
L	E (80%)	100 g, maceracija, sT, preko noći	247,24	78,82	Mansour i sur., 2012
C/K/L; L	V; M	1 g u 10 mL, 3x ekstrakcija kuhanjem u refluksnim uvjetima, 30 min	103,75/210,79/112,01; 147,16	40,87/66,82/42,31; 99,64[e]	Rached i sur., 2010
N	E (80%)	10 g u 100 mL, 3x maceracija, sT, 1 sat	19,15	n.i.	Stocker i sur., 2004
L/S/K	H, EA, M	100 g u 1000 mL, uzastopna maceracija	50,99/51,42/83,70	8,96/18,75/13,85	Taghzouti i sur., 2016

		otapalima rastuće polarnosti, sT, 24 sata	(EA) 67,55/94,83/131,48 (M)	(EA) 25,90/39,14/14,48 (M)	
L	E	50 g u 500 mL, Soxhlet ekstrakcija, 50-60 °C, 6 sati/maceracija, sT, 72 sata	198/ 139	10,20/ 19,26	Touaibia i Chaouch, 2016
G. meridionalis					
N/ K	M	440 g u 5000 mL/200 g u 5000 mL, 3x maceracija, sT, 48 sati/72 sata	410,3/ 292,0[f]	72,7/ 125,0	Tundis i sur., 2012a

C – cvijet, K – korijen, L – list, N – nadzemni, S – stabljika; A – aceton, DM – diklormetan, E – etanol, EA – etil acetat, H – heksan, KL – kloroform, M – metanol, P – petroleter, V – voda; sT – sobna temperatura; EGK – ekvivalent galne kiseline, EKV – ekvivalent kvercetina, SE – suhi ekstrakt; * – uključuje masu biljnog materijala i količinu otapala, metodu, temperaturu i vrijeme ekstrakcije, ukoliko je poznato; ** – ukoliko nije eksponentom drugačije naznačeno; [a] – sadržaj izražen kao mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala, [b] – sadržaj izražen kao mg ekvivalenta rutina/g suhog biljnog materijala, [c] - sadržaj izražen kao mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala, [d] - sadržaj izražen kao mg ekvivalenta fenola/g suhog ekstrakta, [e] – sadržaj izražen kao mg katehina/g suhog ekstrakta, [f] – sadržaj izražen kao mg ekvivalenta klorogenske kiseline/g suhog ekstrakta; n.i. – nije ispitano

Tablica V. Sadržaj kondenziranih trjeslovina (proantocijanidina) i antocijana vrste *G. alypum*

Dio biljke	Otapalo	Način pripreme*	Kondenzirane trjeslovine (mg EKT/g SE)**	Antocijani (mg EC/g SE)**	Literatura
L/ C	M	1 g u 10 mL, maceracija, sT, 24 sata	14,18/ 14,07	n.i.	Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014b
L	M	20 g u 250 mL, maceracija, sT, 24 sata	11,08	n.i.	Athmouni i sur., 2016
L	M (75%), P/DM/A/ M (75%)/ V	50 g u 500 mL, Soxhlet ekstrakcija, 65 °C, 48 sati, uzastopna Soxhlet ekstrakcija otapalima rastuće polarnosti, 40 °C, 6 sati/40 °C, 6 sati/ 56 °C, 6 sati/65 °C, 6 sati/100 °C, 6 sati	1,40, 5,73/18,65/2,79/ 2,33	0,00817, -/-/0,07069/ 0,0365/ 0,02849	Khlifi i sur., 2011
L	E (80%)	100 g, maceracija, sT, preko noći	n.i.	0,53	Mansour i sur., 2012
L	E	50 g u 500 mL, Soxhlet ekstrakcija, 50-60 °C, 6 sati/maceracija, sT, 72 sata	30,65/ 5,64[a]	13,45/ 35,10[b]	Touaibia i Chaouch, 2016

C – cvijet, L – list; A – aceton, DM – diklormetan, E – etanol, M – metanol, P – petroleter, V – voda; sT – sobna temperatura; EC – ekvivalent cijanidin 3-*O*-glukozida, EKT – ekvivalent katehina, SE – suhi ekstrakt; * – uključuje masu biljnog materijala i količinu otapala, metodu, temperaturu i vrijeme ekstrakcije, ukoliko je poznato; ** – ukoliko nije eksponentom drugačije naznačeno; [a] – sadržaj izražen kao mg ekvivalenta taninske kiseline/g suhog ekstrakta, [b] – sadržaj izražen kao mg ekvivalenta cijanidina/g suhog ekstrakta; n.i. – nije ispitano, - – nije detektirano

1.4.3. Sastavnice ekstrakata

Glavne sastavnice ekstrakata glavulja čine glikozilirani iridoidi, flavonoidi i feniletanoidi te šećerni alkohol manitol (Tablica VI). Iz pojedinih vrsta izolirani su i acetofenonski glikozid picein (Çaliş i sur., 2002b), lignanski glikozid liriodendrin (Chaudhuri i Sticher, 1981) i šećerni ester globularitol (Çaliş i sur., 2002b). Vodeni i etanolni ekstrakti listova *G. alypum* sadrže visok udio globularina (23,30% i 30,08%) (Fehri i sur., 1996). Navedeni spoj je, pod nazivom alipin ili globularin, prvi izolirao Walz 1857. godine (Walz, 1857). Koncentracija globularina u listovima veća je kod sušenja mikrovalovima (14,8%) nego kod sušenja na sobnoj temperaturi (10,9%), moguće zbog hidrolize esterske veze između katalpola i cimetne kiseline (Louis i sur., 1999). Osim listova (3,4%), globularin sadrže i grančice (1,45%), sjemenke (2,07%) te korijen vrste *G. alypum* (0,15%). Isti dijelovi biljke bogati su i manitolom (0,85% u listu, 2,33% u grančicama, 0,24% u sjemenkama i 0,31% u korijenu) (Meriah, 2007). U kiselim hidrolizatima (6 N HCl) vodenih ekstrakata nadzemnih dijelova vrste *G. alypum* detektirane su velike količine ugljikohidrata (od kojih 21% glukoze), šećernih alkohola (17%), malo fenolnih spojeva (5%) te aminokiseline alanin, glicin, lizin, asparaginska i glutaminska kiselina. Ramnoza, arabinoza, galaktoza i uronske kiseline bile su prisutne u manjem postotku (1-2%), a derivati heksozamina nađeni su u tragovima (Caldes i sur., 1975). Heksanski ekstrakti listova bogati su α-tokoferolom (Chevolleau i sur., 1993; Sağlam i sur., 2004), što je primijećeno i kod vrste *G. meridionalis* (Tundis i sur., 2012a).

Identifikacija sastavnica glavulja najčešće se temeljila na njihovoj prethodnoj izolaciji i određivanju strukture primjenom uobičajenih spektroskopskih tehnika (UV/Vis spektroskopija, infracrvena spektroskopija, ^{1}H i ^{13}C nuklearna magnetska rezonancija, masena spektrometrija) (Chaudhuri i Sticher, 1980; Klimek, 1988; Kirmizibekmez i sur., 2008; Tundis i sur., 2012b) (Tablica VI). Glavne sastavnice metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova vrste *G. alypum* dobivenih maceracijom analizirane su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti spregnutom s fotodiodnom detekcijom (HPLC-DAD) (Es-Safi i sur., 2007c). Istraženi su i mogući putevi fragmentacije pojedinih spojeva kod primjene tandemske masene spektrometrije (MS^n) uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI) u pozitivnom i negativnom načinu rada i uz sudarom-potpomognutu disocijaciju (CID) te se pokazalo da navedena tehnika može pomoći u njihovoj identifikaciji (Es-Safi i sur., 2005a; Es-Safi i sur., 2005b; Es-Safi i sur., 2006; Es-Safi i sur., 2007a; Es-Safi i sur., 2007b). Nedavno su pomoću tehnike HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS istraženi i maceracijom dobiveni metanolni ekstrakti listova *G. alypum*, pri čemu su okvirno identificirane njihove glavne fenolne i/ili iridoidne i druge sastavnice (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a; Feriani i sur., 2017) (Tablica VI).

Tablica VI. Pregled sastavnica koje su izolirane* iz ekstrakata vrsta roda *Globularia*

Dio biljke	Sastavnice ekstrakata	Literatura
G. alypum		
L	***Iridoidi:*** acetilbarlerin (2 izomera), alpinozid, deacetilasperulozid, dekumbezid D (2 izomera), gardozid, genciopikrozid, genipozidinska kiselina (i izomer), globularin (ili globularicizin), globularinin (ili globularimin), globulariozid (ili baldakiozid), katalpol, kumaroilgenipozidinska kiselina, musaenozidinska kiselina, (*epi*)loganinska kiselina, metilni ester asperulozidinske kiseline, minekozid, seratozid A, spekiozid, šanzizid, 6-*O*-veratroilkatalpol, verminozid ***Feniletanoidi:*** (-)-6'-*O*-(E)-cinamoilverbaskozid, dekafeoilverbaskozid, galipumozid A, galipumozid B, izoverbaskozid, kalceolariozid A, kalceolariozid B, martinozid, neosiringalid (2 izomera), rozikazid A, verbaskozid ***Flavonoidi:*** amurenzin, eriodiktiol 7-*O*-disaharid, felamurin, (*epi*)galokatehin, 6-hidroksiluteolin 7-*O*-laminaribiozid, kvercetin glukozid, luteolin disaharid (2 izomera), luteolin 7-*O*-glukozid, nepitrin ***Ostali polarni spojevi:*** gentizol heksozid, globularitol, hebitol II, ikarizid F2, kafeoilheksoza (2 izomera), kina kiselina, kolumbianin, kornozid, *p*-kumarinska kiselina, *p*-kumaroilheksoza (2 izomera), manitol, neohankozid C, saharoza, sinapoilheksoza, tuberoilheksoza	Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a[a]
L	***Flavonoidi:*** kvercetin, miricetin, naringenin, rutin ***Ostali polarni spojevi:*** arabinoza, fruktoza, glukoza, maltoza, saharoza ***Ostali nepolarni spojevi:*** ergosterol, retinol, β-sitosterol, stigmasterol, α-tokoferol, vitamin D, vitamin K	Athmouni i sur, 2016[b]
L	***Ostali nepolarni spojevi:*** amfetamin oksim acetat, cetan, dehidrojonon, eugenol, izoeugenol, α-kadinol, kamfor, ksilen, oktil ftalat, viridiflorol	Barhouchi i sur., 2014
L, S, K	***Ostali polarni spojevi:*** ferulinska kiselina, *p*-hidroksibenzojeva kiselina, kavena kiselina, *p*-kumarinska kiselina, protokatehinska kiselina, β-rezorcinolna kiselina, salicilna kiselina, sinapinska kiselina, siringinska kiselina, vanilinska kiselina	Ben Hassine i sur., 1982a[c,d]
L, S, K	***Iridoidi:*** aukubin, globularin ***Flavonoidi:*** apigenin 7-*O*-glukozid, 4',7-dihidroksiflavon, kvercetin, luteolin 7-*O*-glukozid, rutin (L), 8-*C*-glukozil-4',7-dihidroksiflavon (= bajin) (K) ***Ostali polarni spojevi:*** arabinoza, fenolne kiseline, glukoza, manitol, ramnoza, siringin ***Ostali nepolarni spojevi:*** β-amirin	Ben Hassine i sur., 1982b[c]
C	***Ostali polarni spojevi:*** cijanidin, peonidin	Ben Hassine i sur., 1982b[c]
L	***Iridoidi:*** globularin, katalpol ***Ostali polarni spojevi:*** siringin (= alipozid)	Bernard i sur., 1974a[c]
L	***Flavonoidi:*** luteolin 7-*O*-glukozid ***Ostali polarni spojevi:*** cimetna kiselina, ferulinska kiselina, kavena kiselina, klorogenska kiselina,	Bernard i sur., 1974b[c]

	p-kumarinska kiselina	
N	***Flavonoidi:*** apigenin, luteolin ***Ostali polarni spojevi:*** cimetna kiselina, *p*-kumarinska kiselina	Boutiti i sur., 2008
N	***Ostali polarni spojevi:*** aminokiseline, arabinoza, derivati heksozamina, fenoli, glukoza, galaktoza, ramnoza, šećerni alkoholi, uronske kiseline	Caldes i sur., 1975[c]
CB	***Iridoidi:*** globularicizin, globularidin, globularimin, globularin, globularinin, katalpol ***Ostali polarni spojevi:*** liriodendrin, siringin, šećeri	Chaudhuri i Sticher, 1981
L	***Ostali nepolarni spojevi:*** α-tokoferol	Chevolleau i sur., 1993
L	***Iridoidi:*** globularin, katalpol	Di Maio i Panizzi, 1966
N	***Feniletanoidi:*** forzitiazid, izoverbaskozid, neosiringalid, verbaskozid ***Flavonoidi:*** 6-hidroksiluteolin 7-*O*-glukozid, 6-hidroksiluteolin 7-*O*-laminaribiozid, luteolin 7-*O*-soforozid, eriodiktiol 7-*O*-soforozid ***Ostali polarni spojevi:*** siringin	Es-Safi i sur., 2005c
N	***Iridoidi:*** globularicizin, globularidin, globularimin, globularin, globularinin, globulariozid	Es-Safi i sur., 2006
N	***Iridoidi:*** globularicizin, globularidin, globularimin, globularin, globularinin, globulariozid ***Feniletanoidi:*** forzitiazid, izoverbaskozid, neosiringalid, verbaskozid ***Flavonoidi:*** 6-hidroksiluteolin 7-*O*-glukozid, 6-hidroksiluteolin 7-*O*-laminaribiozid, luteolin 7-*O*-soforozid, eriodiktiol 7-*O*-soforozid ***Ostali polarni spojevi:*** siringin	Es-Safi i sur., 2007c
-	***Iridoidi:*** globularin	Faure i sur., 1987
L	***Iridoidi:*** dihidroverminozid, globularicizin, globularidin, globularimin, globularin, globularinin, globulariozid, 6'-*O*-kafeoilkatalpol, spekiozid ***Feniletanoidi:*** dekafeoilverbaskozid, dihidroksifeniletil kumaroil heksozid, dihidroksifeniletil metilkafeoil heksozid, galipumozid A, galipumozid B, galipumozid C, hidroksifeniletil kafeoil heksozid, hidroksifeniletil metilkafeoil heksozid, 6'-*O*-kafeoilverbaskozid, kalceolariozid A, kalceolariozid B, martinozid, nepoznati feruloil derivat, rozikazid A, verbaskozid izomer 1, verbaskozid izomer 2 ***Flavonoidi:*** 6-hidroksiluteolin 7-*O*-glukozid, 6-hidroksiluteolin 7-*O*-laminaribiozid, luteolin diheksozid, luteolin 7-*O*-glukozid, 6-metoksiluteolin, 6-metoksiluteolin 7-*O*-glukozid ***Ostali polarni spojevi:*** globularitol, hebitol II, kafeoil heksozid 1, kafeoil heksozid 2, kafeoil heksozid 3, kafeoil heksozid derivat, kumaroil heksozil glucitol, siringin	Feriani i sur., 2017[a]
L	***Ostali polarni spojevi:*** cimetna kiselina (izomer 1), cimetna kiselina (izomer 2), 2-(3,4-dihidroksifenil)-etanol, D-fruktoza, glicerol, 4-hidroksifeniletanol, taloza ***Ostali nepolarni spojevi:*** 3,5-diciklopentil-6-metil-3,4-heptadien-2-on, 1-(3',5'-diklorofenil)-5-okso-4,4-difenil-2-imidazolin-2-il) gvanidin, 2-metil-9-(prop-1-en-3-ol-2-il)-biciklo[4.4.0]dek-2-en-4-ol, [(3,7,11,15-tetrametil-2-heksadecenil)oksil] silan, linolenska kiselina, oleinska kiselina, palmitinska kiselina, stearinska	Ghlissi i sur., 2016[b]

	kiselina	
L	***Flavonoidi:*** 6-hidroksiluteolin	Harborne i Williams, 1971[c]
L, S	***Iridoidi:*** globularin (nakon kisele hidrolize: globularetin) ***Ostali polarni spojevi:*** cimetna kiselina, glukoza, kalijev cinamat, manitol, natrijev cinamat, tanin ***Ostali nepolarni spojevi:*** eterično ulje (moguće cinamaldehid), klorofil, lipidi, obojene tvari, vosak	Heckel i Schlagdenhauffen, 1883; Heckel, 1894
L	***Ostali nepolarni spojevi:*** cerilni alkohol, masne kiseline (npr. cerotinska, linolna, palmitinska) zasićeni ugljikovodik $C_{30}H_{62}$ (moguće triakontan)	Jacini, 1947
L	***Iridoidi:*** alpinozid, globularicizin, globularidin, globularin, globularimin, globularinin, katalpol, litantosalin ***Feniletanoidi:*** galipumozid A, galipumozid B, galipumozid C, kalceolariozid A, verbaskozid ***Flavonoidi:*** 6-hidroksiluteolin 7-*O*-soforozid ***Ostali polarni spojevi:*** siringarezinol 4'-*O*-glukozid, siringin	Kirmizibekmez i sur., 2008
L	***Iridoidi:*** globularin	Louis i sur., 1999
L	***Ostali polarni spojevi:*** galna kiselina, taninska kiselina	Martius, 1857
L, S, SJ, K	***Iridoidi:*** globularin	Merghache i sur., 2013;
L	***Ostali polarni spojevi:*** krotonska kiselina, manitol	Meriah, 2007
L	***Iridoidi:*** globularin (= globularozid) ***Flavonoidi:*** flavonski glikozidi ***Ostali polarni spojevi:*** gorke tvari	Paris, 1946
L	***Ostali nepolarni spojevi:*** α-tokoferol	Sağlam i sur., 2004
L	***Flavonoidi:*** rutin (= globulariacitrin) ***Ostali polarni spojevi:*** globularinska kiselina, pikroglobularin ***Ostali nepolarni spojevi:*** kolin	Tiemann, 1903
-	***Ostali polarni spojevi:*** cimetna kiselina, protokatehinska kiselina	Vasquez Sanchez, 1933
L	***Iridoidi:*** globularin (= alipin) ***Ostali polarni spojevi:*** biljne kiseline ***Ostali nepolarni spojevi:*** eterično ulje, gume, klorofil, obojene tvari	Walz, 1857
L	***Iridoidi:*** asperulozid (malo), aukubin (puno), katalpol, katalpozid, monotropein (malo)	Wieffering, 1966[c]
L	***Flavonoidi:*** rutin (= globulariacitrin) ***Ostali polarni spojevi:*** cimetna kiselina, protokatehinska kiselina	Wunderlich, 1908
G. arabica		
N	***Iridoidi:*** globularidin, globularin ***Ostali polarni spojevi:*** manitol	Amer i El-Masry, 1988
G. cordifolia		
-	***Iridoidi:*** aukubin	Chaslot, 1955[c]
N	***Iridoidi:*** asperulozid, aukubin, globularifolin, melampirozid, monomelitozid	Chaudhuri i Sticher, 1980

L	***Flavonoidi:*** demetoksicentaureidin 7-*O*-glukozid, 6-hidroksiluteolin 7-*O*-diglukozid, 6-hidroksiluteolin 7-*O*-glukozid, nepetin 7-*O*-ramnozilglukozid, pektolinarigenin, skutelarein 7-*O*-glukozid	Harborne i Williams, 1971[c]
L	***Iridoidi:*** asperulozid, esteri aukubina (moguće agnuzid i litantosalin)	Kinzel i Stummerer-Schmid, 1970[c]
P	***Iridoidi:*** alpinozid, asperulozid, aukubin, globularifolin, globulozid C, 5-hidroksidaviziozid, melampirozid, monomelitozid	Kirmizibekmez i sur., 2003b
P	***Feniletanoidi:*** izoverbaskozid, leukoskeptozid A, martinozid, rozikazid A, verbaskozid ***Flavonoidi:*** krizoeriol 7-*O*-alozil-(1→2)-glukozid, stahispinozid ***Ostali polarni spojevi:*** dehidrodikoniferil alkohol 9-*O*-glukozid, dehidrodikoniferil alkohol 9-*O*-soforozid	Kirmizibekmez i sur., 2004b
G. davisiana		
N	***Iridoidi:*** agnuzid, alpinozid, asperulozid, 10-*O*-benzoilkatalpol, daviziozid, genipozid, globularicizin, globularin, litantosalin, melampirozid ***Feniletanoidi:*** izoverbaskozid, leukoskeptozid, verbaskozid	Çaliş i sur., 2002a
G. dumulosa		
N	***Iridoidi:*** alpinozid, aukubin, 10-*O*-benzoilglobularigenin, 10-*O*-benzoilkatalpol, daviziozid, deacetilalpinozid, dumulozid, katalpol, melampirozid ***Feniletanoidi:*** dekafeoilverbaskozid, leukoskeptozid A, verbaskozid ***Flavonoidi:*** demetoksicentaureidin 7-*O*-glukozid, nepetin 7-*O*- glukozid, pektolinarigenin 7-*O*-glukozid	Kirmizibekmez i sur., 2003a
G. incanescens		
L	***Flavonoidi:*** 6-hidroksiluteolin, kvercetin, luteolin	Harborne i Williams, 1971[c]
G. meridionalis		
L	***Flavonoidi:*** 6-hidroksilirani flavoni	Tomás-Barberán i sur., 1988[c]
N	***Feniletanoidi:*** izoverbaskozid, verbaskozid ***Flavonoidi:*** apigenin 7-*O*-glukozid ***Ostali nepolarni spojevi:*** α-amirin, metil linoleat, metil linolenat, metil palmitat, metil stearat, β-sitosterol, γ-terpinen, vitamin E	Tundis i sur., 2012a[b]
K	***Feniletanoidi:*** izoverbaskozid, verbaskozid ***Flavonoidi:*** apigenin 7-*O*-glukozid, luteolin, pektolinarigenin 7-*O*-glukozid ***Ostali polarni spojevi:*** benzojeva kiselina ***Ostali nepolarni spojevi:*** α-amirin, β-amirin, ciklotetrakozan, metil arahidat, metil behenat, metil benzoat, metil linoleat, metil linolenat, metil miristat, metil palmitat, metil stearat, metilni ester 14-metilheksadekanske kiseline, neofitadien, 1-nonadecen, 1-oktadecen, β-sitosterol, stigmasterol, (24R)-4-stigmasten-3-on, stigmast-6-en-3,β-ol, γ-terpinen, tetradekanal, 9-trikozen, 6,10,14-trimetil-2-pentadekanon, vitamin E	Tundis i sur., 2012a[b]
N	***Iridoidi:*** asperulozid, genipozid, globularifolin, globulozid A, globulozid B, melampirozid	Tundis i sur., 2012b

P	***Iridoidi:*** globulozid A, globulozid B	Tundis i sur., 2012b
G. nana		
N	***Iridoidi:*** asperulozid, aukubin, globularin, katalpol, litantosalin	Chaudhuri i sur., 1981
L	***Flavonoidi:*** 6-hidroksiluteolin	Harborne i Williams, 1971[c]
G. nudicaulis		
-	***Iridoidi:*** asperulozid	Chaslot, 1955[c]
N	***Iridoidi:*** asperulozid, aukubin, melampirozid ***Ostali polarni spojevi:*** glukozid A, glukozid B	Chaudhuri i sur., 1981
L	***Flavonoidi:*** 6-hidroksiluteolin, luteolin	Harborne i Williams, 1971[c]
L	***Iridoidi:*** asperulozid (malo), aukubin, monotropein	Wieffering, 1966[c]
L	***Iridoidi:*** aukubin ***Ostali polarni spojevi:*** benzojeva kiselina, kondenzirane trjeslovine, manitol ***Ostali nepolarni spojevi:*** cerilni alkohol, kolin, lecitin, masne i smolne kiseline, sterol	Zellner, 1934
G. orientalis		
N	***Iridoidi:*** alpinozid, asperulozid, aukubin, 10-*O*-benzoilkatalpol, genipozidinska kiselina, globularin, katalpol, melampirozid ***Feniletanoidi:*** kalceolariozid A, leukoskeptozid A, verbaskozid ***Ostali polarni spojevi:*** picein	Çaliş i sur., 2002b
P	***Iridoidi:*** 10-*O*-benzoilkatalpol, genipozid ***Ostali polarni spojevi:*** 6-*O*-feruloil-fruktozil-(2→1)-glukozid, globularitol, 6-*O*-kafeoil-fruktozil-(2→1)-glukozid	Çaliş i sur., 2002b
L	***Flavonoidi:*** 6-hidroksiluteolin, luteolin, skutelarein	Harborne i Williams, 1971[c]
G. punctata		
L	***Flavonoidi:*** 6-hidroksiluteolin	Harborne i Williams, 1971[c]
N	***Iridoidi:*** alpinozid, asperulozid, asperulozidinska kiselina, aukubin, baldakiozid, besperulozid, 10-*O*-benzoilkatalpol, dafilozid, globularin, katalpol, skandozid ***Feniletanoidi:*** rozikazid A, trihosantozid A, verbaskozid ***Flavonoidi:*** afilantozid, 6-hidroksiluteolin 7-*O*-6'''-kafeoilsoforozid, izokvercitrin	Kirmizibekmez i sur., 2009**
N	***Flavonoidi:*** apigenin, 6-hidroksiluteolin, 6-hidroksiluteolin 7-*O*-6'''-kafeoilsoforozid, 6-hidroksiluteolin 7-*O*-6'''-*p*-kumaroilsoforozid, 6-hidroksiluteolin 7-*O*-soforozid, luteolin	Klimek, 1988
-	***Iridoidi:*** asperulozid, aukubin, deacetilasperulozidinska kiselina (= galium glukozid), katalpol	Kooiman, 1971[c]
L	***Iridoidi:*** asperulozid (s razgradnim produktom), aukubin (malo), katalpol, katalpozid (tragovi), monotropein	Wieffering, 1966[c]
G. repens		
L	***Flavonoidi:*** 6-hidroksilirani flavoni, kempferol, kvercetin	Tomás-Barberán i sur., 1988[c]

G. salicina		
L	***Iridoidi:*** aukubin, globularin, katalpol, litantosalin ***Ostali polarni spojevi:*** manitol	Fikenscher i sur., 1969
L	***Flavonoidi:*** 6-hidroksiluteolin, skutelarein	Harborne i Williams, 1971[c]
G. sintenisii		
P	***Iridoidi:*** globularin, katalpol, litantosalin, sintenozid ***Feniletanoidi:*** globusintenozid, izokrenatozid, izoverbaskozid, leukoskeptozid A, martinozid, 3'''-*O*-metilkrenatozid, plantainozid C, verbaskozid	Kirmizibekmez i sur., 2004a
G. spinosa		
L	***Flavonoidi:*** 6-hidroksiluteolin, skutelarein	Harborne i Williams, 1971[c]
G. trichosantha		
N	***Feniletanoidi:*** krenatozid, rozikazid A, trihosantozid A, trihosantozid B, verbaskozid	Çaliş i sur., 1999
N	***Iridoidi:*** alpinozid, asperulozid, asperulozidinska kiselina, aukubin, 10-*O*-benzoilkatalpol, deacetilalpinozid, deacetilasperulozid, genipozidinska kiselina, katalpol, skandozid	Çaliş i sur., 2001
P	***Iridoidi:*** globularidin, globulozid A, globulozid B ***Feniletanoidi:*** arenariozid, izokrenatozid, izoverbaskozid, krenatozid, trihosantozid A, trihosantozid B, verbaskozid ***Ostali polarni spojevi:*** liriodendrin	Çaliş i sur., 2001
L	***Flavonoidi:*** 6-hidroksiluteolin	Harborne i Williams, 1971[c]
G. vulgaris		
L	***Ostali polarni spojevi:*** ferulinska kiselina, kavena kiselina, sinapinska kiselina	Bate-Smith, 1962[c]
-	***Iridoidi:*** asperulozid, aukubin	Chaslot, 1955[c]
L	***Flavonoidi:*** 6-hidroksiluteolin	Harborne i Williams, 1971[c]
L	***Iridoidi:*** globularin ***Ostali polarni spojevi:*** cimetna kiselina, manitol, tanin ***Ostali nepolarni spojevi:*** eterično ulje, smola	Heckel i Schlagdenhauffen, 1883
-	***Iridoidi:*** asperulozid, aukubin, 10-*O*-benzoilkatalpol, besperulozid, gardozid, genipozidinska kiselina, globularin, katalpol, musaenozidinska kiselina ***Ostali polarni spojevi:*** manitol	Taskova i sur., 2006

* – ukoliko nije eksponentom drugačije naznačeno; C – cvijet, CB – cijela biljka, K – korijen, L – list, N – nadzemni, P – podzemni, S – stabljika, SJ – sjemenka; [a] – identifikacija temeljena na analizi pomoću tehnike HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS, [b] – identifikacija temeljena na analizi pomoću tehnike GC-MS, [c] – identifikacija temeljena na rezultatima plošne (papirne ili tankoslojne) kromatografije, [d] – identifikacija temeljena na analizi pomoću tehnike HPLC-DAD, ** – vrsta je navedena kao *G. aphyllanthes* (sin. *G. vulgaris*) (Kirmizibekmez i sur., 2009) (naziv se najvjerojatnije odnosi na vrstu *G. punctata*); - – nije navedeno

1.4.4. Kemotaksonomski značaj izoliranih spojeva

Prisutnost velike količine iridoida, manitola i estera kavene kiseline, prevladavanje flavonoida flavonskog tipa te nedostatak trjeslovina idu u prilog uključivanju roda *Globularia* u porodicu Scrophulariaceae, odnosno Plantaginaceae (Hegnauer, 1973; Albach i sur., 2005).

Prema Hegnaueru i Kooimanu (1978), iridoidi imaju taksonomsku važnost na taksonomskim jedinicama koje su iznad vrste, primjerice za blisko srodne vrste i rodove. Karakteristični iridoidi kod vrsta roda *Globularia* su aukubin, katalpol i njihovi esteri. Isti iridoidi primijećeni su i kod nekih drugih rodova (npr. *Campylanthus*, *Picrorhiza*, *Veronica*, *Wulfenia*, tribus Veroniceae), koji su ranije zajedno s rodom *Globularia* bili svrstani u porodicu Scrophulariaceae (Hegnauer i Kooiman, 1978). Kemotaksonomska važnost ovih spojeva za rod *Globularia* istaknuta je i na primjeru iridoida hidroksiliranih u položaju *C*-5 (npr. monomelitozid), izoliranih iz vrste *G. meridionalis* (Tundis i sur., 2012b), a koji su nađeni i kod vrste *G. cordifolia* (Chaudhuri i Sticher, 1980; Kirmizibekmez i sur., 2003b). Također, globularifolin (10-*O*-benzoilmonomelitozid) je prepoznat kao kemotaksonomski biljeg za porodicu Plantaginaceae, a melampirozid za red Lamiales (Tundis i sur., 2012b).

Zbog ograničene prisutnosti feniletanoida u određenim redovima i porodicama (npr. red Lamiales, porodice Scrophulariaceae, Oleaceae, Plantaginaceae, Lamiaceae, Orobanchaceae), pokazalo se da i ova skupina spojeva može imati kemotaksonomski značaj (Fu i sur., 2008). Kemotaksonomska važnost iridoida i feniletanoida potvrđena je i na primjeru drugih pripadnika porodice Plantaginaceae, kao što su rodovi *Plantago* (Rønsted i sur., 2000; Taskova i sur., 2002; Rønsted i sur., 2003), *Veronica* (Jensen i sur., 2005) i *Campylathus* (Rønsted i sur., 2002). Iridoidi aukubin i katalpol te feniletanoid verbaskozid tipični su spojevi za velik broj vrsta roda *Plantago* (Rønsted i sur., 2000), pri čemu je aukubin univerzalno prisutan (Taskova i sur., 2002; Rønsted i sur., 2003). Pojedine vrste sadrže i *C*-5-hidroksilirane ili *C*-8-*C*-9 nezasićene iridoide (Rønsted i sur., 2000; Rønsted i sur., 2003). Kemotaksonomska važnost iridoida uočena je na razini sekcija, podrodova i roda *Plantago*, dok na razini podvrsta nije uočena (Taskova i sur., 2002). Vrste roda *Veronica* karakteriziraju aukubin, katalpol i 6-*O*-esteri katalpola, a primijećena je još i prisutnost karboksiliranih iridoida te *C*-8-*C*-9 nezasićenih iridoida, dok u pojedinim vrstama koje su sadržavale feniletanoid kornozid iridoidi nisu nađeni (Jensen i sur., 2005). Vrste roda *Campylathus*, koje na temelju analize sljedova DNA imaju sestrinski odnos s rodom *Globularia* (Albach i sur., 2005), također sadrže iridoide kao što su aukubin, gardozid i monomelitozid, a uz manitol, karakterističan za rod *Globularia*, mogu sadržavati i veće količine sorbitola, koji je karakterističan za rod *Plantago* (Rønsted i sur., 2002; Taskova i sur., 2006).

Prisutnost flavona apigenina, luteolina i krizoeriola u prirodi je relativno česta, a karakteristična je za porodice Lamiaceae, Scrophulariaceae i Plantaginaceae. U listovima osam vrsta glavulja nađeni su 6-hidroksiluteolin i 6-hidroksiapigenin, a ponekad i njihovi metilirani eteri. 6-hidroksiluteolin prisutan je u svim vrstama ovog roda (Harborne i Williams, 1971; Tomás-Barberán i sur., 1988). Kod pojedinih vrsta uočena je i prisutnost flavonola kvercetina (Harborne i Williams, 1971; Tomás-Barberán i sur., 1988; Kirmizibekmez i sur., 2009; Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a) i kempferola (Tomás-Barberán i sur., 1988).

1.4.5. Lakohlapljive sastavnice vrste *G. alypum*

Vrsta *G. alypum* uz ostale kemijske sastavnice može sadržavati i malu količinu eteričnog ulja (manje od 0,1%) (Walz, 1857; Heckel i Schlagdenhauffen, 1883; Ramdani i sur., 2014). Najveća emisija terpena za ovu vrstu primijećena je pri 25-30 °C, pri čemu su kao glavni lakohlapljivi spojevi cvjetova utvrđeni 1R-α-pinen, kamfen, 3-karen i D-limonen. Glavni spoj pri nižim temperaturama bio je D-limonen, dok ga je pri višim temperaturama djelomično zamijenio 1R-α-pinen (Farré Armengol, 2014). U ranijem istraživanju kao glavni lakohlapljivi spojevi listova vrste *G. alypum* istaknuli su se 1-okten-3-ol i eugenol (0,003 mg/g suhog materijala) (Llusià i sur., 2006). Visoka količina eugenola (10,56%) uočena je i u petroleterskom ekstraktu eteričnog ulja dobivenog hidrodestilacijom listova, ali je utvrđeno da ona može značajno varirati između populacija (Barhouchi i sur., 2014).

Detaljnija analiza kemijskog sastava eteričnog ulja nadzemnih dijelova biljke u cvatu provedena je dosad samo na dvije alžirske populacije vrste *G. alypum*. Identificirano je 39 spojeva koji su činili 89,7-98,9% sastavnica eteričnog ulja. Najzastupljeniji spojevi bili su: heksadekanska (palmitinska) kiselina, fitol izomer, (Z,Z)-6,9,-*cis*-3,4-epoksi-nonadekadi, *bis*-1,2-benzen dikarboksilna kiselina, L-linalool i heptadekan. Kemijski sastav značajno se razlikovao između populacija; kod jedne su karakteristični spojevi bili 1-okten-3-ol, L-kamfor, α-terpineol, cis-3-heksenil tiglat, dokozan, E-nerolidol, *cis*-3-heksenil benzoat i α-bisabolol, a kod druge 6,10,14-trimetil-2-pentadekanon, germakren B, metilni ester 8-oktadekanske kiseline, nonadekan i β-kariofilen. Ostali detektirani spojevi bili su: kamfen, *cis*-3-heksenil α-metilbutirat, geraniol, 4-vinil-2-metoksi-fenol, eugenol, β-damascen, geranil aceton, *trans*-β-farnezen, β-jononheksilni ester benzojeve kiseline, 5-metilen-6-hepten-3-ol, epizonaren, zerumbon, tetradekanska kiselina, metilni ester heksadekanske kiseline, *dibu*-1,2-benzendikarboksilna kiselina, tetrakozan, heksakozan, eikozan i nonakozan (Ramdani i sur., 2014). Palmitinska kiselina detektirana je primjernom GC-MS tehnike kao jedna od glavnih sastavnica metanolnih ekstrakata listova uz različite fenolne spojeve (Ghlissi i sur., 2016).

1.5. Primjena vrsta roda *Globularia* L. u liječenju i samoliječenju

U brojnoj medicinskoj, farmaceutskoj i botaničkoj literaturi 19. i 20. st. zabilježena je ljekovita primjena vrste *G. alypum* (Lamarck i De Candolle, 1815; Panckoucke, 1817; Geiger, 1829; Lindley, 1836; Dragendorff, 1898; Coste i Flahault, 1902; Fiori, 1925-1929; Weber, 1942; Steinmetz, 1954; Hoppe, 1975). Listovi ove vrste nekada su bili oficinalna droga u južnoj Europi (Folia Alypi), a koristili su se kao purgativ i emetik (Tiemann, 1903).

Navedenu vrstu poznavali su već i grčki liječnik i botaničar Dioskorid (1. st.), koji je u djelu *De Materia Medica* zabilježio da njezine sjemenke djeluju kao drastičan purgativ (Martius, 1857), te rimski pisac i znanstvenik Plinije Stariji (1. st.). On je u djelu *Naturalis Historia* zabilježio da se ova biljka, koja je vrlo gorkog okusa, uzima kao purgativ s pilećom juhom (Bostock i Riley, 1855). Kao što navodi Martius (1857), ista se biljka zbog purgativnog djelovanja primjenjivala i u srednjem vijeku, a o njezinoj ljekovitoj primjeni svjedoči i *Dynameron*, zbirka recepata iz 13. st. (Valiakos i sur., 2015).

U 16. i 17. st. počinju ju smatrati drastičnim purgativom te dobiva naziv *Herba terribilis* ili *Frutex terribilis* (L'Obel i Pena, 1571; Panckoucke, 1817; Martius, 1857; Planchon, 1859). S druge strane, flamanski liječnik i botaničar Clusius u svojoj flori Pirenejskog poluotoka pod nazivom *Hippoglossum valentinum* spominje njezinu ljekovitu primjenu kod sifilisa (Clusius, 1576; Weber, 1942). U 18. st. pojedini liječnici smatrali su ju blagim purgativom (Martius, 1857), a Ramel također i tonikom te dobrim sredstvom za liječenje malarijske groznice (Panckoucke, 1817; Planchon, 1859; Weber, 1942).

Dio liječnika i farmaceuta početkom 19. st. (De Candolle, Gilbert, Willdenov) ponovno naglašava njezino drastično djelovanje, kao što navode brojni autori (Martius, 1857; Planchon, 1859; Weber, 1942), dok francuski liječnici Loiseleur-Deslongchamps (1819) i Planchon (1859) utvrđuju blago laksativno djelovanje ove vrste, bez mučnine i povraćanja te popratnih grčeva kakvi se javljaju kod primjene sene, odnosno bez povratne konstipacije koju izaziva rabarbara. Primjena 30 g listova prokuhanih u 2 dL vode 10 do 15 minuta, procijeđenih i zaslađenih šećerom ili medom, poticala je pražnjenje crijeva nakon dva sata od primjene i izazivala u prosjeku četiri stolice (Planchon, 1859). Djelovanje slično seni bez neugodnih nuspojava opisao je i Kröber (1942), dok iste godine farmaceut Peyer (1942) ponovno upozorava na moguće neželjene učinke droge Folia alypi na srce i živčani sustav slične kofeinu, kao i na iznimno gorak okus te visok sadržaj trjeslovina, a koje bi mogle prouzročiti zatvor, odnosno imati djelovanje suprotno laksativnom djelovanju, zbog kojeg se koristi navedena droga.

Primjena vrste *G. alypum* u liječenju zabilježena je i u literaturi s područja Hrvatske i susjednih država (Kušan, 1943; Kušan, 1956; Hasanagić, 1984; Tucakov, 1984). Ona djeluje kao blagi purgativ, kolagog i adstringens, a indicirana je kod konstipacije, žutice, artritisa te krvarenja, posebno krvarenja iz želuca (Hasanagić, 1984). Primjenjuje se odjednom u dozi od 25 do 30 g na 250 g vode, nakon 10 minuta kuhanja (Hasanagić, 1984; Tucakov, 1984) ili dva puta dnevno u dozi od 40 g na 1 L vode (Hasanagić, 1984). Zbog ograničene rasprostranjenosti ove vrste na području Hrvatske (Konavoske stijene), njezino ljekovito djelovanje nije bilo poznato u narodu, već se primjenjivala u izradi metli (Kušan, 1943).

Laksativna primjena vrste listova, cvjetova i/ili nadzemnih dijelova u cvatu vrste *G. alypum* zabilježena je u narodnoj medicini zemalja Sjeverne Afrike (Le Floc'h, 1983; Bellakhdar i sur., 1991; Ziyyat i sur., 1997; Merzouki i sur., 2000; Bnouham i sur., 2002; Hammiche i Maiza, 2006; Abouri i sur., 2012; Bouabdeli i sur., 2012; Boukhira i sur., 2013; Bouzabata, 2013; Miara i sur., 2013; Benderradji i sur., 2014), Bliskog Istoka (Baytop, 1984; Heywood, 1999; Jaradat, 2005) i Južne Europe (Fresquet Febrer, 1996; Johnson, 1999; Leporatti i Ghedira, 2009). U narodnoj medicini Alžira zabilježena je i suprotna (antidijaroična) primjena (Benderradji i sur., 2014; Sarri i sur., 2015). U novijoj literaturi ističe se primjena ove vrste kod šećerne bolesti, bolova u zglobovima, povišene temperature, afti, oralne kandidijaze i dermatomikoza (uključujući kožu vlasišta), kao i depurativna primjena (Hammiche i sur., 2013).

Prema starijoj literaturi, djelovanja slična onima vrste *G. alypum* mogu se pripisati i drugim vrstama glavulja (Dragendorff 1898; Schneider, 1974; Hoppe, 1975; Hasanagić, 1984). Dragendorff, između ostalog, navodi laksativnu primjenu vrsta *G. alypum*, *G. punctata* i *G. cordifolia*, kao i njihovu primjenu kod sifilisa, vodene bolesti i povišene temperature (Dragendorff, 1898). Loiseleur-Deslongchamps (1819) navodi da vrsta *G. vulgaris*, uz laksativno djelovanje, posjeduje i svojstva zacjeljivanja i otapanja. U 19. st. ova se vrsta primjenjivala kod bolova, a ranije i kod sifilisa (Geiger, 1829).

U ljekovite svrhe sabire se cijela biljka *G. vulgaris* najkasnije do kraja lipnja (Milovanović, 2005). Primjenu iste vrste (hrv. gumbek, mačje šapice, mračnica, puljka) kod zatvora navodi i Tucakov (1984), pri čemu je najvjerojatnije riječ o pogrešno korištenom nazivu za vrstu *G. punctata* (Hoppe, 1975). Laksativnu primjenu posljednje vrste navodi i Kušan (1938; 1956), dok Hasanagić (1984) navodi da jednako djelovanje i manje-više ista svojstva kao i vrsta *G. alypum* pokazuju vrste *G. vulgaris*, *G. cordifolia* i *G. nana* te da se od svih biljaka upotrebljavaju listovi, prvenstveno zbog njihovog blagog purgativnog djelovanja.

1.5.1. Etnobotanička istraživanja

Ljekovita primjena vrsta roda *Globularia*, ponajprije vrste *G. alypum*, poznata je u narodnoj medicini većine mediteranskih zemalja (Tablica VII). U zemljama Sjeverne Afrike, posebice u Alžiru i Maroku, ova se vrsta ističe kao jedan od najčešće primjenjivanih antidijabetika (Ziyyat i sur., 1997; Merzouki i sur., 2000; Jouad i sur., 2001; Eddouks i sur., 2002; Haddad i sur., 2003; Allali i sur., 2008; Abouri i sur., 2012; Boudjelal i sur., 2013), odnosno kao jedna od najčešće primjenjivanih ljekovitih biljaka (Al-Idrissi i sur., 1996; Mehdioui i Kahouadji, 2007; Mehdioui i sur., 2009; Ouhaddou i sur., 2014; Chermat i Gharzouli, 2015). U Maroku je čak treći po redu antidijabetik izbora (Ziyyat i sur., 1997; Haddad i sur., 2003), dok se kao prvi izbor navodi u 22 do 25% slučajeva (Haddad i sur., 2003), a prema nekima glasi i kao panaceja (lijek za sve bolesti) (Teixidor-Toneu i sur., 2016).

Kod šećerne bolesti najčešće se primjenjuje dekokt listova (Jouad i sur., 2001; Eddouks i sur., 2002; El Rhaffari i Zaid, 2002; Allali i sur., 2008; El Amrani i sur., 2010; El Abbouyi i sur., 2014; Katiri i sur., 2017) i/ili rjeđe infuz ili prašak (Merzouki i sur., 2000; Azzi i sur., 2012; Ghourri i sur., 2013; Benkhnigue i sur., 2014; Fakchich i Elachouri, 2014; Orch i sur., 2015), dok je u manjoj mjeri zabilježena i primjena cvjetova (Bousta i sur., 2014) te nadzemnih dijelova (Hammiche i Maiza, 2006; Boudjelal i sur., 2013; Ghourri i sur., 2013).

U narodnoj medicini sjevernoafričkih zemalja česta je primjena listova vrste *G. alypum* u liječenju povišene tjelesne temperature, glavobolje, grlobolje, reumatizma i gihta. Koncentrirani dekokt listova (i grančica) ili nadzemnih dijelova u cvatu, kao i topli oblozi s medom te posipi ili premazi od usitnjenih listova *G. alypum* primjenjuju se i kod liječenja akni, ekcema, pjega, apcesa, čireva, rana i opeklina (El-Rhaffari i Zaid, 2002; IUCN, 2005; Leporatti i Ghedira, 2009; Abouri i sur., 2012; Boudjelal i sur., 2013; Saadi i sur., 2013; Benderradji i sur., 2014; El Abbouyi i sur., 2014; Messaoudi Moussi i sur., 2015). Zabilježena je i primjena uljnog macerata listova kod liječenja čira na želucu (Leporatti i Ghedira, 2009), moguće djelomično povezana i sa zabilježenim vezanjem želučane kiseline (Hänsel i sur., 1993; Johnson, 1999). Za liječenje rana i opeklina može se, uz prašak listova i cvjetova, primjenjivati i njihovo eterično ulje u bademovom ili maslinovom ulju (Messaoudi Moussi i sur., 2015). Primjena mladih izdanaka vrste *G. aly*pum kod različitih upalnih stanja, kao što su gastritis, metritis, vaginitis, čir, ekcem, psorijaza i dermatitis, posebno se ističe u libijskoj narodnoj medicini. Istovremeno se spominje i njezina primjenu kao abortivnog sredstva, sredstva za stimulaciju jajnika i odgađanje menstruacije (El-Mokasabi, 2014a). U liječenju povišene temperature te zacjeljivanju rana i opeklina primjenjuje se i vrsta *G. arabica* Jaub. &

Spach i to kao cijela biljka (infuz), uključujući i njezin korijen (Vasisht i Kumar, 2004; González-Tejero i sur., 2008; Eissa i sur., 2014).

U narodnoj medicini Maroka, vrsta *G. alypum* poznata je pod nazivom „Berberski čaj" jer se njezini listovi i cvjetovi često dodaju kavi i čaju. Najčešće se primjenjuje kod bolova u trbuhu, glavobolje, reumatskih i menstrualnih bolova (Khabbach i sur., 2012; Montanari, 2012; Boukhira i sur., 2013; Montanari, 2014; Teixidor-Toneu i sur., 2016). Zabilježena je i primjena u čajnim mješavinama za liječenje prostatitisa (IUCN, 2005), a ista se vrsta nalazi u sastavu čajne mješavine pod nazivom „Medbach", koja se priprema u Tunisu. U Alžiru se kombinacija jednakih dijelova vrsta *G. alypum, Rosmarinus officinalis* i *Ajuga iva* primjenjuje u obliku dekokta dva puta dnevno kod bolnih stopala i koljena (Arnold i sur., 1997). U Libiji se dekokt mladih izdanaka vrste *G. alypum* u kombinaciji s vrstom *Seriphidium herba-album* primjenjuje u obliku toplih sjedećih kupki kod problema urogenitalnog sustava, donjeg abdomena i rektuma (El-Mokasabi, 2014a; El-Mokasabi, 2014b), dok se u Maroku dekokt listova primjenjuje kod bolesti mokraćnog mjehura (Saadi i sur., 2013; El Abbouyi i sur., 2014) i ginekoloških bolesti (Teixidor-Toneu i sur., 2016). Primjena kod ginekoloških bolesti zabilježena je i u Alžiru (Ouelbani i sur., 2016). Također, zabilježena je i njezina primjena vrste kao antiseptika/dezinficijensa (Abouri i sur., 2012; Bouabdeli i sur., 2012; Saadi i sur., 2013), odnosno primjena kod bolesti uzrokovanih bakterijama (Helmstädter, 2006), mikobakterijama (Saadi i sur., 2013; El Abbouyi i sur., 2014), gljivicama (Hammiche i Maiza, 2006; Leporatti i Ghedira, 2009; Abouri i sur., 2012; Bouabdeli i sur., 2012; Ouelbani i sur., 2016) i parazitima (Boudjelal i sur., 2013; Miara i sur., 2013).

Česta je i primjena vrste *G. alypum* (ili *G. arabica*) kod različitih probavnih tegoba, primjerice kao stomahika, koleretika, kolagoga, karminativa i antianoreksika (Baytop, 1984; Ziyyat i sur., 1997; Bonet i sur., 1999; Merzouki i sur., 2000; Bnouham i sur., 2002; Vasisht i Kumar, 2004; Jaradat, 2005; Ben Haj Jilani i sur., 2007; Ben Haj Jilani i sur., 2011; Abouri i sur., 2012; Bouabdeli i sur., 2012; Khabbach i sur., 2012; Boukhira i sur., 2013; Miara i sur., 2013; Benderradji i sur., 2014; Eissa i sur., 2014; El Abbouyi i sur., 2014; Sarri i sur., 2015; Benarba, 2016). Slično vrijedi i za antihipertenzivnu primjenu (Fresquet Febrer, 1996; Ben Haj Jilani i sur., 2007; Ben Haj Jilani i sur., 2011; Carrió i Vallès, 2012; Sari i sur., 2012; El-Mokasabi, 2014a), uključujući primjenu kao diuretika, sudorifika ili antiedematoznog sredstva (Baytop, 1984; Ziyyat i sur., 1997; Bnouham i sur., 2002; Leporatti i Ghedira, 2009; Benderradji i sur., 2014; Eissa i sur., 2014; El-Mokasabi i sur., 2014a). Također, spominje se i primjena vrste *G. alypum* kao depurativa (Fresquet Febrer, 1996; Abouri i sur., 2012; Benderradji i sur., 2014), primjerice za pročišćavanje krvi (Ouelbani i sur., 2016).

Na sjeveru Maroka, uz ljekovitu primjenu listova, cvjetova i nadzemnih dijelova, zabilježena je i primjena ove biljne vrste u pčelarstvu (Khabbach i sur., 2011), pri čemu se dobiva med vrlo pikantnog okusa, dok se njezina pelud odvaja i tradicionalno koristi u liječenju jetrenih bolesti (Khabbach i sur, 2013). Primjena *G. alypum* u liječenju žutice i/ili bolesti jetre poznata je i u Alžiru (Chermat i Gharzouli, 2015; Benarba, 2016) i Grčkoj (Vokou i sur., 1993). U nekoliko arapskih zemalja zabilježena je i antikancerogena primjena listova vrsta *G. alypum* i *G. arabica*, primjerice kod tumora kože (Boukef i sur., 1982; El Rhaffari i Zaid, 2002; Afifi-Yazar i sur., 2011; Abouri i sur., 2012; El Youbi i sur., 2016).

Relativno rijetko zabilježena je primjena vrste *G. alypum* kod bolesti živčanog sustava (Ouhaddou i sur., 2014), kao stimulansa i ekscitansa (Abouri i sur., 2012; Bouabdeli i sur., 2012; Ouelbani i sur., 2016) ili kao sedativa (Bouabdeli i sur., 2012) i anksiolitika (Khabbach i sur., 2012; Boukhira i sur., 2013; Chermat i Gharzouli, 2015). Također, u Egiptu se za liječenje nesanice i epileptičkih napadaja koristi infuz cijele biljke *G. arabica* (Eissa i sur., 2014). U ostale primjene vrste *G. alypum* ubrajaju se primjena kod plućnih bolesti (Bouabdeli i sur., 2012; Ouhaddou i sur., 2014; Ouelbani i sur., 2016), primjerice kao antitusika (Cheriti i sur., 1995), te kod bubrežnih kamenaca (Ben Haj Jilani i sur., 2007; Ben Haj Jilani i sur., 2011; Tuttolomondo i sur., 2014; Licata i sur., 2016), anemije (Chermat i Gharzouli, 2015; Benarba, 2016), srčanih bolesti (Ben Haj Jilani i sur., 2007; Ben Haj Jilani i sur., 2011), moždanog udara (El-Mokasabi, 2014a), problema cirkulacije (Ouhaddou i sur., 2014) i alergija (Fakchich i Elachouri, 2014), odnosno primjena kao adstringensa (Benderradji i sur., 2014), oftalmika (Fresquet Febrer, 1996) i tonika (Baytop, 1984).

U Turskoj se za liječenje hemoroida primjenjuju infuz i/ili dekokt listova, zeleni ili cijele biljke *G. trichosantha* (Sezik i sur., 1991; Korkmaz i Alpaslan, 2014), a zabilježena je i antiparazitska primjena infuza listova (Altundag i Ozturk, 2011), odnosno primjena macerata listova kod bolesti oka (Korkmaz i Alpaslan, 2014). Macerat i infuz listova vrste *G. amygdalifolia* Webb primjenjuju se kod zubobolje na području Zelenortskih otoka (port. *Cabo Verde*) (Gomes i sur., 2008). U Španjolskoj se vrsta *G. vulgaris* primjenjuje kao diuretik, laksativ, purgativ, stomahik i sudorifik (Johnson, 1999), a u Libiji kao antireumatik, laksativ i stimulans (Awen i sur., 2010). Ljekovitost ove vrste zabilježena je i u Bugarskoj (Zahariev i sur., 2015), dok je u Švicarskoj zabilježena primjena vrsta *G. vulgaris* (Dal Cero i sur., 2014) i *G. punctata* (Quennoz, 2004). Literatura također bilježi ljekovitu primjenu vrste *G. cordifolia* u Bugarskoj (Tashev i Tsavkov, 2008; Zahariev i sur., 2015) i Mađarskoj (Bernáth i Németh, 2004), vrste *G. nana* kao antihipertenziva u Španjolskoj i vrste *G. nudicaulis* kao diuretika u Turskoj (Johnson, 1999).

Tablica VII. Pregled tradicionalne primjene vrsta roda *Globularia* u narodnoj medicini mediteranskih zemalja

Dio biljke	Način primjene	Indikacije	% ispitanika	Literatura
Alžir (*G. alypum*)				
L	infuz, dekokt (oralno)	hipoglikemik, digestiv, koleretik, laksativ, purgativ, stimulans, depurativ, antiseptik, antimikotik, konstipacija, čir na želucu; zacjeljivanje rana, apcesi, kožni tumori	9,1; 4,0	Abouri i sur., 2012
L	dekokt (oralno), 1x na dan s malo šećera	šećerna bolest	-	Allali i sur., 2008
-	dekokt, u kombinaciji s vrstama *R.officinalis* i *A. iva*, 2x na dan	bolna stopala i koljena	-	Arnold i sur., 1997
L	dekokt, infuz	šećerna bolest	0,62	Azzi i sur., 2012
L	dekokt (oralno)	gastrointestinalni poremećaji (hepatitis, anemija)	-	Benarba, 2016
L	infuz/prašak, tijekom primjene (40 dana) izbjegavati kiselu, slanu i ljutu hranu te kavu	adstringens, kolagog, depurativ, diuretik, laksativ, purgativ, stomahik, sudorifik, želučani problemi, proljev, menstrualni bolovi/ekcem, opekline, rane	-	Benderradji i sur., 2014
L	-	antikolesterol, konstipacija, purgativ, kolagog, stimulans, dezinficijens, mikoze, hipoglikemik, laksativ, sedativ, stomahik, želučano i plućno krvarenje	-	Bouabdeli i sur., 2012
MI (C)	infuz, dekokt	šećerna bolest, probavne tegobe, lišmanijaza, ekcem	29	Boudjelal i sur., 2013
L, C	-	purgativ, hipoglikemik	-	Bouzabata, 2013
L	dekokt (interno); prašak (eksterno)	antitusik; cikatrizant	-	Cheriti i sur., 1995
L, SJ	-	nervoza, žutica, anemija	-	Chermat i Gharzouli, 2015
-	-	probavne tegobe	-	González-Tejero i sur., 2008
N	dekokt (interno), u kombinaciji s drugim biljkama	konstipacija, šećerna bolest, povišena temperatura, mikoze	-	Hammiche i Maiza, 2006
CB, K; C, L	dekokt	sifilis; previjanje rana	-	Helmstädter, 2016
-	-	antidijabetik, laksativ, stomahik, antiparazitik	-	Miara i sur., 2013
-	-	ginekološke bolesti, pročišćavanje krvi, antiseptik, ekscitans, antifungik, rane, bolesti dišnog sustava	32,91	Ouelbani i sur., 2016
N	dekokt	arterijska hipertenzija	3,53	Sari i sur., 2012
L	dekokt	antidijaroik, stomahik, bolovi u leđima	2,94	Sarri i sur., 2015

Egipat (*G. arabica*)				
CB	infuz (interno, eksterno)	nesanica, epileptički napadaji, temperatura, diuretik, gastrointestinalni poremećaji, zacjeljivanje rana	80 (5)*	Eissa i sur., 2014
-	-	probavne tegobe, metaboličke i kožne bolesti	-	González-Tejero i sur., 2008
CB, K	-	opekline, želučani problemi	-	Vasisht i Kumar, 2004
Grčka (*G. alypum*)				
-	-	jetrene bolesti	-	Vokou i sur., 1993
Italija (*G. alypum*)				
L, MI (C), SM	infuz	purgativ, diuretik	-	Leporatti i Ghedira, 2009
L	dekokt	bubrežni kamenci (prehrana)	(1,87)*	Licata i sur., 2016
L, N	izravna primjena, dekokt	bubrežni kamenci	0,51	Tuttolomondo i sur., 2014
Jordan (*G. arabica*)				
L	dekokt	antikancerogen	-	Afifi-Yazar i sur., 2011
Libija (*G. alypum*)				
L + S, N	dekokt	laksativ, intermitentna groznica (malarijska), čirevi na koži, artritis, reumatizam, depurativ, diuretik, hipoglikemik, mikoze, digestiv, kolagog		De Natale i Pollio, 2012
MI	dekokt, infuz	laksativ, diuretik, grčevi, gastritis, metritis, vaginitis, vaginalne bolesti, stimulacija jajnika, odgođena menstruacija, abortiv, čir, ekcem, psorijaza, dermatitis, hemostaza, hipertenzija, moždani udar	-	El-Mokasabi, 2014a
MI	dekokt, s vrstom *S. herba-album* (topla sjedeća kupka)	problemi urogenitalnog sustava, donjeg abdomena i rektuma	-	El-Mokasabi, 2014b
Libija (*G. vulgaris*)				
L	-	antireumatik, laksativ, stimulans	-	Awen i sur., 2010
-	-	diuretik	-	Vasisht i Kumar, 2004
Maroko (*G. alypum*)				
L	-	hipoglikemik, laksativ	-	Bellakhdar i sur., 1991
L	infuz, dekokt	šećerna bolest	1,47	Benkhnigue i sur., 2014
L	infuz, dekokt	hipoglikemik, laksativ, purgativ, kolagog, želučane tegobe, sudorifik, antipiretik	-	Bnouham i sur., 2002
L	dekokt, osušeni i usitnjeni listovi s medom	stomahik, purgativ, karminativ, antireumatik, anksiolitik, antidijabetik, analgetik (menstrualni bolovi)	0,34	Boukhira i sur., 2013
C	dekokt	šećerna bolest	5,22	Bousta i sur., 2014
L	dekokt	šećerna bolest	19,43	Eddouks i sur., 2002

L	dekokt	poticanje apetita, šećerna bolest, bolesti mjehura, zacjeljivanje rana i opeklina, tuberkuloza	-	El Abbouyi i sur., 2014
L	dekokt	šećerna bolest	3,10	El Amrani i sur., 2010
L	dekokt (oralno, eksterno)	konstipacija, šećerna bolest, čir na želucu, cikatrizant kod rana, apcesa i tumora kože	-	El Rhaffari i Zaid, 2002
L	dekokt (oralno, eksterno)	rak kože		El Youbi i sur., 2016
L, CB	dekokt, rjeđe infuz i prašak (oralno, rjeđe inhalacijom i eksterno), ponekad s medom ili aluminij kalij sulfatom	probavne tegobe, rjeđe šećerna bolest, alergije	0,32	Fakchich i Elachouri, 2014
S + L	prašak	šećerna bolest	-	Ghourri i sur., 2013
-	-	šećerna bolest	36-40	Haddad i sur., 2003
L	dekokt	šećerna bolest	9,89	Jouad i sur., 2001
L	dekokt (oralno)	šećerna bolest	1,46	Katiri i sur., 2017
L	dekokt	stomahik, purgativ, karminativ, antireumatik, anksiolitik, antidijabetik, analgetik (menstrualni bolovi)	2,35	Khabbach i sur., 2012
P	-	jetrene bolesti	-	Khabbach i sur., 2013
L, C	prašak ili eterično ulje u bademovom/maslinovom ulju (na kožu), 2x na dan 1-2 tjedna	zacjeljivanje rana, opeklina, antidijabetik	1,49	Messaoudi Moussi i sur., 2015
L, S + L	dekokt, infuz	šećerna bolest	-	Maryama i sur., 2016
L	infuz (oralno)	hipoglikemik, digestiv, kolagog, laksativ	27,2, (6,8)*	Merzouki i sur., 2000
L, C	dodatak u kavi ili čaju, često u kombinaciji s drugim biljkama	bolovi u trbuhu, glavobolja, menstrualni bolovi, šećerna bolest, povraćanje, smirivanje seksualnog nagona	46 (M), 36 (Ž)	Montanari, 2012
L	dekokt, prašak	šećerna bolest	-	Orch i sur., 2015
L, S, CB	infuz, dekokt, prašak, utrljavanje (oralno, eksterno)	problemi dišnog, probavnog, živčanog, mokraćnog sustava, cirkulacije i kože	20,75	Ouhaddou i sur., 2014
L	kataplazma, dekokt, macerat, prašak /eksterno, oralno)	antiseptik, bolesti mjehura, opekline, šećerna bolest, digestiv, kožne bolesti, tuberkuloza, zacjeljivanje rana	-	Saadi i sur., 2013
L	infuz	bol (npr. mišićna, menstrualna, želučana), lijek za sve bolesti (opće zdravlje), ginekološke bolesti	-	Teixidor-Toneu i sur., 2016
L	-	šećerna bolest, laksativ, purgativ, kolagog, stomahik, sudorifik	9,90	Ziyyat i sur., 1997

Palestina (*G. alypum*)				
CB	-	abdominalni grčevi, laksativ	-	Jaradat, 2005
Španjolska (*G. alypum*)				
L	infuz (oralno)	antianoreksik; antiflatulans; digestiv	2,74; 2,74; 1,37	Bonet i sur., 1999
L	infuz (interno)	antihipertenziv	4,76	Carrió i Vallès, 2012
N	-	žučni kamenci, purgativ, laksativ, hipotenziv, antiinflamatorik, oftalmik, sredstvo za detoksifikaciju, antiedematozno sredstvo, antikancerogen, cikatrizant	-	Fresquet Febrer, 1996
-	-	antacid, afrodizijak, purgativ, povišena temperatura	-	Johnson, 1999
Španjolska (*G. nana*)				
-	-	hipertenzija	-	Johnson, 1999
Španjolska (*G. vulgaris*)				
-	-	diuretik, laksativ, purgativ, stomahik, sudorifik	-	Johnson, 1999
Tunis (*G. alypum*)				
L	prašak pomiješan s otopljenim i slanim užeglim maslacem od kravljeg mlijeka; dekokt pomiješan s medom (oralno)	bolesti kože (npr. ekcem); probavne tegobe, uključujući bolove u želucu i crijevima, visoki krvni tlak, srčane bolesti, bubrežni kamenci, šećerna bolest	-	Ben Haj Jilani i sur., 2007, 2011
L	-	rak	-	Boukef i sur., 1982
L	prašak ili dekokt (lokalna primjena); macerat u ulju; koncentrirani dekokt	cikatrizant (akne, ekcemi, pjege, apcesi), gljivične infekcije (*Tinea*); čir na želucu; antimalarik, antireumatik, grlobolja	-	Leporatti i Ghedira, 2009
Turska (*G. alypum*)				
-	-	diuretik, laksativ, karminativ, tonik	-	Baytop, 1984
Turska (*G. nudicaulis*)				
-	-	diuretik	-	Johnson, 1999
Turska (*G. trichosantha*)				
L	infuz (eksterno)	antiparazitik	-	Altundag i Ozturk, 2011
L/Z, CB	macerat/dekokt (eksterno)	bolesti oka/hemoroidi	-	Korkmaz i Alpaslan, 2014
N, CB	dekokt, infuz (interno)	hemoroidi	-	Sezik i sur., 1991
Zelenortski otoci (*G. amygdalifolia*)				
L	infuz, macerat	zubobolja	-	Gomes i sur., 2008

C – cvijet, CB – cijela biljka, K – korijen, L – list, MI (C) – mladi izdanci u cvatu, N – nadzemni, P – pelud, S – stabljika, SJ – sjemenka, SM – smola, Z – zelen; - – nije navedeno; * – vrijednost se odnosi na ispitanike koji navedenu vrstu navode (koriste); M – muškarci, Ž – žene

1.5.2. Primjena gotovih proizvoda dobivenih iz vrsta roda *Globularia* L. nekad i danas

U Francuskoj je nekad bio registriran pripravak pod nazivom Prasoid®, tinktura globularina (0,5) i globularetina (0,7) u 60% (v/v) etanolu (20), koji se primjenjivao dva puta dnevno (osam kapi s postupnim povećanjem do dvadeset kapi) kao diuretik, kod tifusa, gihta, artritisa i kroničnog reumatizma u trajanju od dva do tri mjeseca (Mindes, 1902; Merck, 1921) ili 15 do 20 kapi tri puta dnevno kod akutnih napadaja gihta i reumatizma (Coblentz, 1899). Liječnik Poucel davao je ovaj pripravak pacijentima s gihtom i reumatizmom (više od 200 pacijenata) te u visokoj dozi (40 do 60 kapi) kroz mjesec dana kao visceralni depurativ i kardiovaskularni tonik kod trovanja dušikovim spojevima/nikotinom (Merck, 1921). Primjena globularina s postepenim povećanjem doze od 0,15 do 0,5 g tijekom šest dana mogla je smanjiti tjelesnu temperaturu za 0,3 do 0,5 °C (Merck, 1921), a pripravak je također poticao lučenje žuči i nastanak proljeva (Coblentz, 1899). Globularin u dozama od 0,15 do 0,45 g smanjuje količinu urina i puls (Kušan, 1943), dok u dozama većim od 0,65 g izaziva ubrzano disanje i rad srca, glavobolju, vrtoglavicu, umor, grčeve, proljev i zimicu. Također, izaziva vazokonstrikciju bubrežnih arterija i produženu oliguriju kod dijabetičara. Primjena globularina (0,1 g dnevno) pokazala je potencijalnu korist kod blažih oblika šećerne bolesti te kod dijabetesa insipidusa (0,3 g dnevno). Njegovim cijepanjem nastaje globularetin, koji djeluje diuretično i purgativno u dozama od 0,1 do 0,2 g, a drastično u dozama od 0,25 do 0,4 g (Merck, 1921). Laksativni učinak moguće je, prema Heckelu (1894), djelomično pripisati i cimetnoj kiselini, njezinim solima i manitolu, diuretički eteričnom ulju, a ekscitirajuće djelovanje na srce i živčani sustav, slično kofeinu, globularinu i globularetinu (Heckel, 1894; Hartwich, 1897; Coblentz, 1899).

Danas se na tržištu mogu naći pripravci za njegu osjetljive i upaljene kože i sluznica koji sadrže ekstrakt listova vrste *G. alypum* (www.lactacyd.eu; www.mychelle.com). Njegovo protuupalno djelovanje moglo bi biti povezano s inhibicijom otpuštanja interleukina-8 (IL-8) i prostaglandina E_2 (PGE_2) (www.nutritionaloutlook.com). Djelotvornom se pokazala i neterapeutska kozmetička primjena ekstrakta kulture matičnih stanica listova vrste *G. cordifolia* (Fournial i sur., 2012). Uočeno je da ovaj ekstrakt dovodi do detoksifikacije i regeneracije stanica kože putem hermetičkog odgovora, povećava transparentnost i sjaj tena, sprječava ili smanjuje osjetljivost, reaktivnost i crvenilo kože, sprječava glikaciju proteina, povećava ili održava broj matičnih stanica i makromolekula kože, posebno kolagena i elastina, povećava volumen dermisa i učvršćuje kožu, sprječava nastanak bora i gubitak kose te potiče njezin ponovni rast. Moguća djelovanja su i izbjeljivanje kože, vlaženje, učinak mršavljenja, povećanje volumena epidermisa, liječenje akni i upale.

1.6. Pregled dosadašnjih istraživanja bioloških učinaka vrsta roda *Globularia* L.

1.6.1. Istraživanja antidijabetskog učinka

Hipoglikemijsko djelovanje ekstrakata vrste *G. alypum* potvrđeno je u nekoliko istraživanja u uvjetima *in vivo* na dijabetičkim štakorima (Tablica VIII). Mehanizam uočenog djelovanja mogao bi biti povezan s povećanjem perifernog metabolizma glukoze (Skim i sur., 1999a; Skim i sur., 1999b; Jouad i sur., 2002), sa smanjenom apsorpcijom glukoze iz gastrointestinalnog sustava i njezinom smanjenom reapsorpcijom u bubregu (Zennaki i sur., 2009), povećanim ulaskom glukoze u periferna tkiva, korekcijom inzulinske rezistencije, inhibicijom endogene proizvodnje glukoze te aktivacijom glukoneogeneze poticanjem aktivnosti glikogen sintaze (Jouad i sur., 2002), a kod većih doza ekstrakta moguće i s povećanjem lučenja inzulina iz β-stanica gušterače (Skim i sur., 1999a; Skim i sur., 1999b). Suprotno tome, u štakora na prehrani bogatoj fruktozom primjena ove vrste nije promjenila razinu glukoze i inzulina (Taleb-Dida i sur., 2011).

U većem broju istraživanja zabilježen je također i hipolipidemijski učinak ove vrste (Zennaki i sur., 2009; Taleb-Dida i sur., 2011; Omar i sur., 2013; Djelloulii sur., 2014-2015; Taleb-Dida i sur., 2014) (Tablica VIII). Oralna primjena metanolnog ekstrakta listova *G. alypum* u dozi od 1 g/kg povećala je aktivnost lecitin:kolesterol aciltransferaze i koncentraciju njezinog kofaktora apolipoproteina (apo) A-1, a smanjila koncentraciju apo B, kao i rizik od aterogeneze, odnosno smanjila je koncentracijske omjere VLDL-LDL kolesterola i HDL kolesterola, ukupnog kolesterola i HDL kolesterola te apo B i apo A (Djeloulli i sur., 2014-2015). Uočeno hipoglikemijsko i hipolipidemijsko djelovanje može se, barem djelomično, pripisati iridoidu globularinu. Ispitivanjem akutne toksičnosti utvrđeno je da ovaj spoj nije smrtonosan u dozi od 1 g/kg kod intraperitonealne primjene. Također, doza od 0,3 g/kg nije izazvala očigledne nuspojave, dok je pri većim dozama (0,6 do 1 g/kg) unutar prvog sata nakon primjene primijećena sedacija koju su povremeno prekidali abdominalni grčevi (Meriah, 2007; Merghache i sur., 2013). U jednom su istraživanju zabilježeni i suprotni rezultati. Naime, oralna primjena vodenog ekstrakta listova vrste *G. alypum* u nedijabetičkih muških štakora kroz 30 dana izazvala je hiperglikemiju i hiperkolesterolemiju u dozi od 0,6 g/kg i hiperlipidemiju u dozama od 0,3 g/kg i 0,6 g/kg. Kod ženskih štakora uočena je samo statistički značajna hiperkolesterolemija u obje primijenjene doze (Fehri i sur., 2012).

Uz hipoglikemijski i hipolipidemijski učinak, primijećeni su i drugi potencijalno korisni učinci primjene grmaste glavulje kod šećerne bolesti. Zaštitno djelovanje od

Tablica VIII. Pregled istraživanja hipoglikemijskog i hipolipidemijskog učinka vrste *G. alypum* (globularina*) u uvjetima *in vivo*

Dio biljke	Otapalo	Način pripreme[a]	Životinjski model[b]	Način primjene[c]	Glavni rezultati	Literatura
L	M	50 g u 500 mL, dekokcija, 30 min	muški Wistar štakori s induciranom šećernom bolešću (streptozotocin, 55 mg/kg, i.p.)	1 g/kg, p.o., kontinuirana primjena kroz 28 dana (uz prehranu koja je sadržavala 20% kazeina)	hipoglikemijski učinak, porast plazmatskog inzulina, snižena razina ukupnog kolesterola, triglicerida i fosfolipida u jetri te ukupnog kolesterola, VLDL-LDL kolesterola i triglicerida u serumu, povišena razina HDL kolesterola u serumu	Djellouli i sur., 2014
L	V	10 g u 100 mL, dekokcija, 15 min	muški Wistar štakori s induciranom šećernom bolešću (streptozotocin, 50 mg/kg, i.v.)	20 mg/kg, p.o., jednokratna ili kontinuirana primjena kroz 9 dana	hipoglikemijski učinak u dijabetičkih (ne i normoglikemijskih) štakora 2 do 6 sati nakon jednokratne primjene i nakon kontinuirane primjene, usporediv s PK, plazmatski inzulin nepromijenjen	Jouad i sur., 2002
L	A (40-60%)	100 g u 400 mL, ekstrakcija kuhanjem u refluksnim uvjetima, 3x 9 sati	muški i ženski Wistar štakori s induciranom šećernom bolešću (streptozotocin, 60 mg/kg, i.p.)	100 mg/kg, i.p., jednokratna primjena 1x dnevno ili kontinuirana primjena 2x dnevno kroz 7 dana	hipoglikemijski učinak u normoglikemijskih štakora nakon 2 sata i dijabetičkih štakora nakon 3 sata i nakon 8 sati kod obje skupine, hipoglikemijski učinak kod dijabetičkih štakora nakon prvog, petog i sedmog dana usporediv s PK (nakon petog i sedmog dana), ali nije uspostavljena normoglikemija, snižena razina ukupnog kolesterola i triglicerida u serumu (više nego kod PK)	Merghache i sur., 2013*
N	V	100 g u 250 mL, Soxhlet ekstrakcija, 60-80 °C	muški Wistar štakori na prehrani bogatoj lipidima	0,4 g/kg, i.p., kontinuirana primjena kroz 14 dana	snižena razina ukupnog kolesterola, triglicerida, LDL i HDL kolesterola u serumu, s povoljnijim omjerom LDL i HDL kolesterola (0,25) od PK (0,71), a koji je usporediv s onim kod štakora koji su primali normalnu prehranu (0,246)	Omar i sur., 2013

L	V	7/50 g u 100 mL, infuzija, 30 min	muški Wistar štakori s induciranom šećernom bolešću (aloksan, 150 mg/kg, i.p.)	0,7 g/kg, p.o. ili i.p., jednokratna primjena	hipoglikemijski učinak u normoglikemijskih i dijabetičkih štakora 20 min nakon p.o. i i.p. primjene, usporediv ili veći od PK, najniži 2 sata nakon primjene, porast plazmatskog inzulina kod normoglikemijskih štakora 4 sata i 6 sati nakon i.p. primjene, porast oralne tolerancije na glukozu	Skim i sur., 1999a; Skim i sur., 1999b
L	V	50 g u 500 mL, ekstrakcija kuhanjem u refluksnim uvjetima, 60-80 °C, 30 min	muški Wistar štakori na prehrani bogatoj fruktozom	0,5%, p.o., kontinuirana primjena kroz 14 tjedana	snižena razina triglicerida u plazmi i u VLDL i HDL_2 kolesterolu	Taleb-Dida i sur., 2011
L	V	50 g u 500 mL, ekstrakcija kuhanjem u refluksnim uvjetima, 60-80 °C, 30 min	muški Wistar štakori na prehrani bogatoj fruktozom	0,5%, p.o., kontinuirana primjena kroz 14 tjedana	snižena razina triglicerida u serumu i u VLDL kolesterolu, povoljniji omjer triglicerida i HDL kolesterola (0,38) u odnosu na skupinu koja nije primala biljni ekstrakt (0,72)	Taleb-Dida i sur., 2014
L	M	50 g u 500 mL, ekstrakcija kuhanjem u refluksnim uvjetima, 60-80 °C, 30 min	muški Wistar štakori s induciranom šećernom bolešću (streptozotocin, 50 mg/kg, i.p.)	1 g/kg, p.o., kontinuirana primjena kroz 28 dana	5,2x snižena glikemija i 3,6x snižen glikozilirani hemoglobin (HbA1c) u odnosu na skupinu koja nije primala biljni ekstrakt, snižena razina ukupnog kolesterola i triacilglicerola u plazmi	Zennaki i sur., 2009

* – istraživanje hipoglikemijskog i hipolipidemijskog učinka globularina; [a] – uključuje masu biljnog materijala i količinu otapala, metodu, temperaturu i vrijeme ekstrakcije, ukoliko je poznato; [b] – uključuje vrstu životinje (naziv primijenjenog spoja, njegovu koncentraciju i put primjene); [c] – uključuje koncentraciju i put primjene ekstrakta vrste *G. alypum* (globularina) te način njegove primjene; L – list, N – nadzemni; A – aceton, M – metanol, V – voda; i.p. – intraperitonealno, i.v. – intravenski, p.o. – peroralno; HDL – lipoprotein visoke gustoće, LDL – lipoprotein niske gustoće, PK – pozitivna kontrola, VLDL – lipoprotein vrlo niske gustoće

oksidativnog stresa, posebno na bubreg i jetru, primijećeno je kod dijabetičkih štakora kojima je kroz četiri tjedna oralno primjenjivan metanolni ekstrakt listova ove vrste. Zaštita od lipidne peroksidacije bila je vidljiva kao smanjenje koncentracije reaktivnih spojeva tiobarbiturne kiseline (engl. *Thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS) u plazmi, jetri, srcu, mozgu i bubregu. Uočeno je i smanjenje oksidacije proteina (snižena razina proteinskih karbonila), povećanje koncentracije reduciranog glutationa (GSH) u jetri, mozgu i bubregu, kao i povećana aktivnost antioksidativnih enzima: superoksid dismutaze (SOD) u jetri, mišiću i bubregu, glutation peroksidaze (GPx) u jetri, srcu i bubregu te glutation reduktaze i katalaze (CAT) u jetri i bubregu. Također, snižene su plazmatske vrijednosti uree, kreatinina, alanin aminotransferaze (ALT) i aspartat aminotransferaze (AST) (Zennaki i sur., 2009).

Smanjena lipidna peroksidacija u VLDL-LDL i HDL_3 frakcijama ukupnog kolesterola primijećena je i kod dijabetičkih štakora koji su primali prehranu koja je sadržavala 20% kazeina (Djellouli i sur., 2014-2015). Kod štakora na prehrani bogatoj fruktozom dodatak ekstrakta glavulje smanjio je lipidnu peroksidaciju u mišiću, bubregu (Taleb-Dida i sur., 2011), eritrocitima i frakcijama VLDL, LDL-HDL_1 i HDL_3 (Taleb-Dida i sur., 2014), te pojačao aktivnost antioksidativnih enzima SOD u mišiću i srcu, GPx u bubregu i srcu (Taleb-Dida i sur., 2011) i CAT u eritrocitima. Nadalje, kod štakora koji su imali normalnu prehranu također je smanjena peroksidacija LDL-HDL_1 i povećana eritrocitna CAT aktivnost (Taleb-Dida i sur., 2014). S druge strane, istraživanje na stanicama HeLa pokazalo je da etanolni ekstrakt glavulje (500 i 750 μg/mL) smanjuje aktivnost SOD i CAT (Mansour i sur., 2012).

1.6.2. Istraživanja antioksidativnog učinka

Antioksidativni učinak vrste *G. alypum*, posebno njezinih metanolnih ekstrakata, potvrđen je u brojnim *in vitro* istraživanjima, pri čemu su najčešće korišteni testovi bili DPPH i ABTS test (Tablica IX). Pokazalo se da ova biljka posjeduje i jači antioksidativni učinak od mnogih drugih ljekovitih biljaka (Djeridane i sur., 2006; Djeridane i sur., 2010; Rached i sur., 2010). Metanolni ekstrakti imali su jače antioksidativno djelovanje od vodenih ekstrakata, a antioksidativni kapacitet korijena bio je veći od onog listova i cvjetova (Rached i sur., 2010).

U nekim od ovih istraživanja uočena je visoka pozitivna povezanost između antioksidativne aktivnosti i sadržaja polifenola (Djeridane i sur., 2006; Djeridane i sur., 2007; Rached i sur., 2010; Khlifi i sur., 2011), flavonoida (Djeridane i sur., 2006; Djeridane i sur., 2010; Khlifi i sur., 2011) i derivata fenolnih kiselina (Djeridane i sur., 2007). S druge strane, veći antioksidativni učinak heksanskog ekstrakta vrste *G. alypum* u usporedbi s onim metanolnog ekstrakta u testu koji koristi β-karoten-linolnu kiselinu (Chevolleau i sur., 1992),

Tablica IX. Pregled istraživanja antioksidativnog učinka vrsta roda *Globularia* u uvjetima *in vitro*

Dio biljke	Otapalo	Način pripreme*	IC_{50} (µg/mL)	% antioksidativne aktivnosti (koncentracija ekstrakta)	Literatura
G. alypum					
L/C	M	1 g u 10 mL, maceracija, sT, 24 sata	**DPPH:** 31/4; **BK-LK:** 51/26	**DPPH:** 71,26/84,76 (100 µg/mL); **NO:** n.i./14,41 (500 µg/mL); **BK-KL:** 12,01/4,52 (100 µg/mL); **KA:** 4,30/2,77 (500 µg/mL)	Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014b
L	M	20 g u 250 mL, maceracija, sT, 24 sata	**DPPH:** 112,32; **ABTS:** 18,65 ET/g SE	**DPPH:** 70 (1 mg/mL)	Athmouni i sur., 2016
L	H, M	10 g u 300 mL, perkolacija, sT, preko 2 sata	n.i.	**BK-LK:** 464/7,9 (H)**, 6/2,9 (M)**	Chevolleau i sur., 1992
L/C	M (80%)	2 g u 50 mL, maceracija, sT, 24 sata	n.i.	**DPPH:** 290/235 (µmol TEAC/g); **FRAP:** 24,27/21,81 (µmol Fe^{2+}/mL)	Chograni i sur., 2012
N	E (70%)	1 g u 50 mL, maceracija, sT, 24 sata	**ABTS:** 20,31 µmol/SE	n.i.	Djeridane i sur., 2006
N	E (80%)	10 g u 100 mL, 3x maceracija, sT, 1 sat	**ABTS:** 172 µmol/g SE	n.i.	Djeridane i sur., 2007
N	M (80%)	2 g u 100 mL, 2 g u 50 mL, 2x maceracija, sT, 48 sati, 24 sata	**DPPH:** 8,77	n.i.	Djeridane i sur., 2010
N	M (80%)	0,05 g u 1 mL, ultrazvučna ekstrakcija, 20 min	n.i.	**DPPH:** 88,34	El Guiche i sur., 2015
L	M (80%)	200 g u 2000 mL, maceracija, sT, 48 sati	**DPPH:** 203; **ABTS:** 168,85; **RM:** 15,25 mg/mL	n.i.	Feriani i sur., 2017
L	M	10 g u 100 mL, maceracija, sT, 24 sata	n.i.	**DPPH:** 89,30 (50 µg/mL); **RM:** 1,76 (50 µg/mL)***; **BK-LK:** 83,66 (50 µg/mL)	Ghlissi i sur., 2016
L	P/EA/M; V	100 g, Soxhlet ekstrakcija otapalima rastuće polarnosti; dekokcija, 15-20 min	n.i.	**FRAP:** 1,1/5,8/8,5; 8,9 mM ET; **RM:** 1,3/3,2/4,2; 4,5 mM ET	Harzallah i sur., 2010
L	H/DM/ M/V	22,5 g, uzastopna Soxhlet ekstrakcija otapalima rastuće polarnosti	n.i.	**DPPH:** 74,73/62,3/65,96/67,48 (c_0); 66,62/37,82/76,05/73,82 (1:10 c_0); 49,08/31,18/70,81/63,35 (1:100 c_0); 43,2/25,78/49,6/49,4 (1:1000 c_0)	Khantouche i sur., 2015

L + S	M (60%)	100 g u 500 mL, maceracija, 25 °C, 48 sati	n.i.	**KD:** 23,9 (10 μg/mL), 63,9 (100 μg/mL) (linolenska kiselina); 61,2 (10 μg/mL), 83,1 (100 μg/mL) (LDL); **KK:** 63,4 (10 μg/mL), 84,4 (100 μg/mL)	Khlifi i sur., 2005
L	M (75%); P/DM/A/ M (75%)/ V	50 g u 500 mL, Soxhlet ekstrakcija, 65 °C (48 h); uzastopna Soxhlet ekstrakcija otapalima rastuće polarnosti, 40 °C, 6 sati/40 °C, 6 sati/56 °C, 6 sati/65 °C, 6 sati/100 °C, 6 sati	**DPPH:** 27,54; 285,22/ 512,06/20,33/15,58/164,06; **ABTS:** 20,81; 551,27/ 219,30/24,13/16,36/49,70	n.i.	Khlifi i sur., 2011
L	M (70%)	1 g u 10 mL, 3x maceracija, sT, 48 sati	**DPPH:** 39,30	**BK-KL:** 54,20 (80 μg/mL)	Krimat i sur., 2014
L	E (80%)	100 g, maceracija, sT, preko noći	**DPPH:** 6,45; **ABTS:** 3,02 mM TEAC	n.i.	Mansour i sur., 2012
C/K/ L; L	V; M	1 g u 10 mL, 3x ektrakcija u refluksnim uvjetima, 30 min	**DPPH:** 25,50/19,40/ 24,43; 16,23	n.i.	Rached i sur., 2010
L/S/K	H, EA, M	100 g u 1000 mL, uzastopna maceracija otapalima rastuće polarnosti, sT, 24 sata	**DPPH:** 48,28/33,67/18,85 (EA), 25,65/22,11/10,01 (M)	n.i.	Taghzouti i sur., 2016
L	E	50 g u 500 mL, Soxhlet ekstrakcija, 50-60 °C, 6 sati/maceracija, sT, 72 sata	**DPPH:** 4950/1310	**DPPH:** 52,610/86,798	Touaibia i Chaouch, 2016
G. arabica					
N	P/H/KL/ EA/M	5 g, uzastopna mikrovalna ekstrakcija, 500 W, 10 min, 15 min, 20 min	**DPPH:** 7,65 (M)/74,75 (EA)	n.i.	Alsabri i sur., 2012
G. meridionalis					
N/K	M	440 g u 5000 mL/200 g u 5000 mL, 3x maceracija, sT, 48 sati/72 sata	**DPPH:** 21,0/9,0; **BK-KL:** 2,4 i 3,0 (30 i 60 min)/ 2,3 i 4,3 (30 i 60 min)	n.i.	Tundis i sur., 2012a

* – uključuje masu biljnog materijala i količinu otapala, metodu, temperaturu i vrijeme ekstrakcije, ukoliko je poznato; C – cvijet, K – korijen, L – list, N – nadzemni, S – stabljika; A – aceton, DM – diklormetan, E – etanol, EA – etil acetat, H – heksan, KL – kloroform, M – metanol, P – petroleter, V – voda; sT – sobna temperatura; ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), BK-KL – β-karoten-linolna kiselina, DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, FRAP – antioksidacijska sposobnost redukcije željeza (engl. *Ferric reducing antioxidant power*, FRAP), NO – dušikov oksid, KA – kelirajuća aktivnost, KD – konjugirani dieni, KK – konzumacija kisika, RM – redukcijska moć; ET – ekvivalent troloksa, SE – suhi ekstrakt, TEAC – antioksidativni kapacitet ekvivalenta troloksa (engl. *Trolox equivalent antioxidant capacity*); ** – vrijednost izražena kao koeficijent antioksidativne aktivnosti; *** – vrijednost izražena kao apsorbancija pri 700 nm; n.i. – nije ispitano

mogao bi biti povezan s visokim udjelom α-tokoferola (3,9%). Utvrđeno je da je sadržaj vitamina E u listovima grmaste glavulje (663 ppm) veći od onog u sjemenkama uljane repice (190-528 ppm) ili u suncokretovim sjemenkama (130-415 ppm) (Chevolleau i sur., 1993). Vrsta *G. alypum* pokazala je i značajnu inhibiciju hemolize eritrocita uzrokovane slobodnim radikalima (Djeridane i sur., 2007; Djeridane i sur., 2010; Boussoualim i sur., 2016a), a koja je bila slična inhibiciji koju je pokazala kavena kiselina (Djeridane i sur., 2007).

DPPH testom utvrđeno je da su kod vrste *G. alypum* najbolji hvatači slobodnih radikala flavonoidi i feniletanoidi, čije je djelovanje jače od djelovanja sintetskog antioksidansa butilhidroksitoluena (BHT), dok iridoidi posjeduju umjerenu antioksidativnu aktivnost. Antioksidativna aktivnost flavonoida povezuje se s većim brojem hidroksilnih skupina, posebno s prisutnošću *o*-dihidroksi skupine u prstenu B kao i s prisutnošću dvostruke veze *C*-2-*C*-3 koja je konjugirana s *C*-4-okso skupinom. Iz tog razloga flavanon eriodiktiol 7-*O*-soforozid (IC_{50} = 12,0-12,2 μM) ima slabije antioksidativno djelovanje od flavona luteolin 7-*O*-soforozida (IC_{50} = 7,8-12,0 μM), a koji pak djeluje slabije od 6-hidroksiluteolin 7-*O*-glukozida (IC_{50} = 7,1-11,0 μM) i 6-hidroksiluteolin 7-*O*-laminaribiozida (IC_{50} = 6,6-8,0 μM). Jače antioksidativno djelovanje pokazali su i feniletanoidi i iridoidi s većim brojem hidroksilnih skupina u strukturi. IC_{50} vrijednost verbaskozida (12,1-20,0 μM) bila je usporediva s IC_{50} vrijednostima forzitiazida, izoverbaskozida i neosiringalida. Globularinin (IC_{50} = 28,2 μM) i globularimin (IC_{50} = 29,0 μM) pokazali su jače antioksidativno djelovanje od globularina (IC_{50} = 66,0 μM), a koje je bilo usporedivo ili bolje od djelovanja butilhidroksitoluena (IC_{50} = 30,0-40,0 μM) (Es-Safi i sur., 2005c; Es-Safi i sur., 2007c). Antioksidativni potencijal grmaste glavulje mogao bi se jednim dijelom pripisati i visokom udjelu lakohlapljivih fenolnih sastavnica (76,59%), među kojima su najzastupljenije 2-metil-9-(prop-1-en-3-ol-2-il)-biciklo[4.4.0]dek-2-en-4-ol i cimetna kiselina (Ghlissi i sur., 2016), odnosno prisustvu fenolnih spojeva eugenola i izoeugenola (Barhouchi i sur., 2014).

Antioksidativni učinak vrste *G. alypum* i njezino povoljno djelovanje na redoks status potvrđeni su i u biološkim sustavima, na plazmi i eritrocitima miševa (Boussoualim i sur., 2016a), na stanicama HeLa (Mansour i sur., 2012), kao i na nekoliko životinjskih modela (Zennaki i sur., 2009; Taleb-Dida i sur., 2011; Taleb-Dida i sur., 2014; Kara Ali i sur., 2016). Zaštitni učinak od lipidne peroksidacije procijenjen je određivanjem malondialdehida i konjugiranih diena (Mansour i sur., 2012). Primjena butanolnog ekstrakta nadzemnih dijelova ove vrste (100 mg/kg, p.o.) kod zdravih štakora tretiranih citostatikom adriamicinom smanjila je koncentraciju laktat dehidrogenaze (LDH), kreatin kinaze i AST u serumu, kao i kardiotoksičnost ovog lijeka, što je moguće povezano sa sniženjem lipidne peroksidacije i

povišenjem GSH (Kara Ali i sur., 2016). Primjena metanolnog ekstrakta listova vrste *G. alypum* kod zdravih štakora tretiranih pesticidom deltametrinom (400 mg/kg, p.o.) povećala je razinu SOD, CAT i GPx te GSH i smanjila oksidativna oštećenja staničnih lipida, proteina i DNA, odnosno smanjila nefrotoksičnost primijenjenog spoja (Feriani i sur., 2017).

Antioksidativno djelovanje u uvjetima *in vitro* zabilježeno je i za metanolne ekstrakte vrsta *G. arabica* (IC_{50} = 7,65 μg/mL) (Alsabri i sur., 2012) i *G. meridionalis* (Tundis i sur., 2012a) (Tablica IX). Također, ekstrakt matičnih stanica vrste *G. cordifolia* pokazao je antioksidativni učinak u *in vitro* (DPPH test) i *ex vivo* uvjetima (poticanje sinteze i aktivnosti SOD i CAT te poticanje sinteze GSH) (Fournial i sur., 2012). Istraživanje na TLC pločama pokazalo je da su za antioksidativni učinak glavulja u velikoj mjeri zaslužni feniletanoidi (Çaliş i sur., 1999; Çaliş i sur., 2002a; Çaliş i sur., 2002b). Spojevi prisutni u metanolnim estraktima nadzemnih i podzemnih dijelova vrste *G. orientalis* pokazali su sposobnost hvatanja DPPH slobodnog radikala. Od spojeva izoliranih iz nadzemnih dijelova biljke najveći antioksidativni potencijal pokazali su kalceolariozid A, leukoskeptozid A i verbaskozid (Çaliş i sur., 2002b). Također, značajnu antioksidativnu aktivnost pokazali su rozikazid A, trihosantozid A, trihosantozid B i verbaskozid, feniletanoidi izolirani iz metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova vrste *G. trichosantha* (Çaliş i sur., 1999).

U nedavnom istraživanju, globularifolin, koji je izoliran iz nadzemnog dijela vrste *G. cordifolia* kao jedan od njezinih glavnih iridoida, pokazao je antioksidativno djelovanje u ORAC (engl. *Oxygen radical absorbance capacity*) testu (0,36 μmol ekvivalenta troloksa/μmol) (Sipahi i sur., 2014).

1.6.3. Istraživanja protuupalnog učinka

U reakciji s *N*,*N*,*N'*,*N'*-tetrametil-*p*-fenilendiaminom (TMPD) pokazalo se da metanolni ekstrakti listova i cvjetova vrste *G. alypum* inhibiraju peroksidaznu aktivnost ciklooksigenaze-I (COX-I) (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014b). Protuupalni učinak metanolnog ekstrakta listova *G. alypum* istražen je i na mišjoj monocitno-makrofagnoj staničnoj liniji RAW 264.7. Utvrđeno je 45% (150 μg/mL) do 66% (600 μg/mL) inhibitorno djelovanje na produkciju NO, koje je barem djelomično posredovano regulacijom transkripcije gena iNOS, kao i smanjenje aktivnosti 5-lipoksigenaze (IC_{50} = 79 μg/mL) (Khlifi i sur., 2013).

Protuupalno djelovanje vrste *G. alypum* istraženo je i u uvjetima *in vivo*, pomoću modela karagenanom-izazvane akutne upale na odraslim ženkama Albino miševa. U navedenom testu, ubrizgavanje otopine karagenana u kožu šape dovodi do stvaranja edema

koje je posredovano otpuštanjem histamina i serotonina (početna faza nastanka edema) te otpuštanjem prostaglandina (nakon sat vremena). Intraperitonealna primjena biljnog ekstrakta zeleni vrste *G. alypum* (500 mg/kg) smanjila je edem za 56,2%, što je bilo usporedivo s i.p. primjenom acetilsalicilne kiseline (100 mg/kg), koja je edem smanjila za 54,6% (Elmezogi i sur., 2010). U drugom je istraživanju na istom životinjskom modelu, butanolna frakcija 50% (v/v) etanolnih ekstrakata zeleni vrste *G. alypum* (300 mg/mL) nakon četiri sata smanjila karagenanom-izazvanu upalu za 33%, što je bilo usporedivo s primjenom 2 mg/mL acetilsalicilne kiseline (39,8%) (Boutemak i sur., 2015). Na muškim Wistar štakorima i.p. primjena ekstrakta listova ove vrste (200 mg/kg) značajno je smanjila razinu C-reaktivnog proteina u serumu, broj upalnih stanica i edem izazvan primjenom karagenana, što bi moglo biti povezano s utvrđenim povišenim udjelom derivata cimetne kiseline (Ghlissi i sur., 2016).

Globularifolin, iridoid izoliran iz vrste *G. cordifolia* smanjio je ekspresiju biljega upale NF-κB u stanicama THP-1 koje su bile stimulirane lipopolisaharidima (200 μM), dok je kod nestimuliranih stanica inducirao njegovu ekspresiju (50-200 μM) (Sipahi i sur., 2014).

Kliničkim istraživanjem provedenim na 30 žena utvrđeno je smanjenje vaginalnih simptoma (nadraženosti, svrbeži i peckanja) u 62% do 79% slučajeva kod primjene pripravka za intimnu njegu koji sadrži ekstrakt listova vrste *G. alypum* (www.lactacyd.eu).

1.6.4. Istraživanja antimikrobnog učinka

Najveći broj istraživanja proveden je na vrsti *G. alypum*, pri čemu su najčešće bile korištene metoda difuzije i metoda mikrodilucije (Tablica X). Pokazalo se da ova vrsta posjeduje antibakterijski učinak, posebno na Gram-pozitivne (G(+)) bakterije, kao što su *Staphylococcus aureus* (Debat i sur., 1981; Bogdadi i sur., 2007; Bouabdelli i sur., 2012; Boussoualim i sur., 2014; Taghzouti i sur., 2016), *S. epidermidis* (Bogdadi i sur., 2007), *Bacillus cereus* (Bogdadi i sur., 2007; Boussoualim i sur., 2014; Ramdani i sur., 2014), *B. subtilis* (Taghzouti i sur., 2016) i *Enterococcus faecalis* (Boussoualim i sur., 2014). Pojedina istraživanja navode i djelovanje na Gram-negativne (G(-)) bakterije, kao što su *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* (Bogdadi i sur., 2007; Bouabdelli i sur., 2012; Boussoualim i sur., 2014; Ramdani i sur., 2014). Frakcija etanolnog ekstrakta listova i stabljike vrste *G. alypum* bogata spojevima visoke molekulske mase pokazala je izraženo antibakterijsko djelovanje na uzročnike bruceloze (Debat i sur., 1981), dok su petroleterski i diklormetanski ekstrakti njezinih listova inhibirali rast *Mycobacterium tuberculosis* (IC_{50} = 77 μg/mL, IC_{50} = 98 μg/mL) (Khlifi i sur., 2011). Prema nedavnom istraživanju, vrsta *G. alypum* može inhibirati β-laktamazu *B. cereus* (Boussoualim i sur., 2014).

Tablica X. Pregled istraživanja antimikrobnog učinka vrsta roda *Globularia*

Dio biljke	Otapalo	Način pripreme*	Antimikrobni učinak izražen kao: z.i. u mm (*Metoda difuzije*) i MIK u mg/mL (*Metoda mikrodilucije*)	Literatura
G. alypum				
N	H/KL/M, E (80%)	40 g, Soxhlet ekstrakcija, 72 sata; 15 g u 450 mL, maceracija, sT, 5 dana	***Metoda mikrodilucije:*** **G(+):** *Bc* ATCC 11778: >16 (H)/>16 (KL)/ >16 (M), 8 (E) (1)**, *Bs* ATCC 6633: >16/>16/>16, 16 (2), *Ef* ATCC 29212: >16/>16/>16, 16 (1), *Sa* ATCC 25923: >16/16/4, 4 (1), *Se* ATCC 12228: >16/16/2, 4 (1); **G(-):** *Ec* ATCC 25922: >16/>16/8, 16 (0,03), *Pa* ATCC 27853: >16/>16/8, 16 (0,5); **Kvasci:** *Ca* ATCC 10231: >16/>16/>16, >16 (4)	Bogdadi i sur., 2007
L + C	V	20 g, infuzija 15-20 min/ dekokcija 5-10 min/ maceracija, 24 sata/perkolacija	***Metoda difuzije:*** **G(+):** *Sa* ATCC 25923: 15/10/12/14; **G(-):** *Ec* ATCC 11775: 13/10/12/10, *Pm* ATCC 35659: 12/10,5/10,5/10, *Pa* ATCC 10145: 7/13/10/10	Bouabdelli i sur., 2012
N	M	maceracija, sT, preko noći, uzastopna maceracija otapalima rastuće polarnosti (H/KL/EA/V)	***Metoda difuzije:*** **G(+):** *Bc* ATCC 10876: 8 (M)/11 (KL)/9 (EA)/- (V), *Ef* ATCC 49452: -/9/10/-, *Lm* ATCC 15313: -/0,7/0,9/-, *Sa* ATCC 25923: 16/13/20/12; **G(-):** *Ab* ATCC 19606: 9/12/9/11, *Cf* ATCC 8090: 9/8/8/9, *Ec* ATCC 25922: -/9/10/-, *Kp* ATCC 700603: -/-/-/15, *Pm* ATCC 35659: 10/9/12/-, *Pa* ATCC 27853: 15/9/16/10, *Stm* ATCC 13311: 11/11/12/9	Boussoualim i sur., 2014
L + S	E (85%)	100 g u 4 L, kuhanje u refluksnim uvjetima, 30 min, zatim 3,3 g ekstrakta u 300 mL metanola, maceracija, sT, 3 sata	***Metoda mikrodilucije:*** **G(+):** *Sa*: 1,25-2,5; **G(-):** *Ba* No 19: 0,25, *Ba* No 112: 0,25-0,5, *Ba* No 544: 0,0025-0,0035, *Bm* No 389: 0,1, *Bm* No 595: 0,1-0,25, *Bm* No 605: 0,25, *Bm* No 16M: 0,1, *Bm* No 15: 0,0035-0,004, *Bm* No 418: 0,1-0,25, *Bm* No 473: 0,1-0,25, *Bm* No 546: 0,0072-0,0075	Debat i sur., 1981
L	M	10 g u 100 mL, maceracija, sT, 24 sata	***Metoda difuzije:*** **G(+):** *Lm* ATCC 43251: 15 (15), *Ml* ATCC 4698: 16 (13), *Sa* ATCC 25923: 16 (19); **G(-):** *Ec* ATCC 25922: 19 (17), *Kp* ATCC 13883: 18 (14), *Sen* ATCC 43972: 20 (13)	Ghlissi i sur., 2016
L	M (75%); P/DM/A/ M (75%)/ V	50 g u 500 mL, Soxhlet ekstrakcija, 65 °C, 48 sati; uzastopna Soxhlet ekstrakcija, 40 °C, 6 sati/40 °C, 6 sati/56 °C, 6 sati/65 °C, 6 sati/100 °C, 6 sati	***Metoda mikrodilucije:*** *Mt*: >0,5; 0,25/0,25/>0,5/>0,5/>0,5	Khlifi i sur., 2011
L	M (70%)	1 g u 10 mL, 3x maceracija, sT, 48 sati	***Metoda difuzije:*** **G(+):** *Bs* ATCC 6633: 9,0 (29,0), *Sa* CIP 7625: 8,0 (32,0); **G(-):** *Ec* CIP 54.8: - (29,0), *Pa* CIP A22: - (24,0); **Kvasci:** *Ca* IPA 200: 11,0 (33,0)	Krimat i sur., 2014

L	V	10 g u 25 mL, dekokcija 3-5 min	***Metoda difuzije:*** **G(+):** *Bc*: -; **G(-):** *At*: +, *Ec*: -, *Kp*: -, *Sc*: -, *St*: -; **Kvasci:** *Ca*: -, *Ck*: -	Oran i Raies, 2000
N	V	vodena destilacija u aparaturi za destilaciju po Clevengeru, 3 sata	***Metoda difuzije:*** **G(+):** *Bc* ATCC 10876: 11, 12 (24), *Bs* ATCC 663313: 20, 22 (18), *Ef* ATCC 49452: 23, 25 (19), *Lm* ATCC 15313: 24, 40 (18), *Sa* ATCC 25923: 8, n.i. (14); **G(-):** *Ab* ATCC 19606: 21, 22 (20), *Cf* ATCC 8090: 50, 18 (20), *Ec* ATCC 25922: 28, 37 (18), *Kp* ATCC 700603: 9, 11 (30), *Pm* ATCC 35659: 15, n.i. (20), *Pa* ATCC 2785: 25, 36 (17), *Stm* ATCC 13311: 33, 36 (18)	Ramdani i sur., 2014
L/S/K	H, EA, M	100 g u 1 L + 1 L + 1 L, uzastopna ekstrakcija otapalima rastuće polarnosti, sT, 24 sata	***Metoda difuzije:*** **G(+):** *Bs* ATCC 3366: 10,67/12,00/13,67 (M), 10,67/16,66/17,67 (EA), *Ml* ATCC 10240: - (M), 7,00/10,50/10,00 (EA), *Sa* ATCC 29213: 6,67/8,33/9,00 (M), 7,00/10,83/12,17 (EA); **G(-):** *Ec* ATCC 25922: -, *Pa* ATCC 27853: -; **Kvasci:** *Ca*: - ***Metoda mikrodilucije:*** **G(+):** *Bs* ATCC 3366: 4/4/2 (M), 4/2/0,5 (EA), *Ml* ATCC 10240: n.i., *Sa* ATCC 29213: 2/>16/>16 (M), 4/2/0,5 (EA); **G(-):** *Ec* ATCC 25922: n.i., *Pa* ATCC 27853: n.i.; **Kvasci:** *Ca*: n.i.	Taghzouti i sur., 2016
G. arabica				
L	KL	50 g u 250 mL, 3 sata; reekstrakcija s EA i 50% M; vodena destilacija u aparaturi za destilaciju po Clevengeru, 3 sata	***Metoda difuzije:*** **G(+):** *Sa* (KS): 8 (KL)/30 (EA)/25 (50% M)/16 (et. ulje) (21, 22); **G(-):** *Ec* (KS): -/30/-/25 (25, 15), *Kp* (KS): 8/35/30/12 (20, 22), *Pv* (KS): -/25/-/10 (15, 20), *Pa* (KS): 10/30/25/14 (25, 18) ***Metoda mikrodilucije:*** **G(+):** *Sa* (KS): 200 (KL)/73 (EA)/75 (50% M)/150 (et. ulje)/67 (KL + et. ulje); **G(-):** *Ec* (KS): 250/60/63,5/150/74,2, *Kp* (KS): 250/55,5/62/200/83,6, *Pv* (KS): -/65/-/200/300, *Pa* (KS): -/55/-/250/385	Meddah i sur., 2011
L	V	10 g u 25 mL, kuhanje 3-5 min	***Metoda difuzije:*** **G(+):** *Bc*: -; **G(-):** *At*: +, *Ec*: -, *Kp*: -, *Sc*: -, *St*: -; **Kvasci:** *Ca*: -, *Ck*: -	Oran i Raies, 2000

* – uključuje masu biljnog materijala i količinu otapala, metodu, temperaturu i vrijeme ekstrakcije, ukoliko je poznato; C – cvijet, K – korijen, L – list, N – nadzemni, S – stabljika; A – aceton, DM – diklormetan, E – etanol, EA – etil acetat, H – heksan, KL – kloroform, M – metanol, P – petroleter, V – voda; sT – sobna temperatura; G(+) – Gram-pozitivne bakterije, G(-) – Gram-negativne bakterije, *Ab – Acinetobacter baumanii*, *At – Agrobacterium tumefaciens*, *Ba – Brucella abortus*, *Bc – Bacillus cereus*, *Bm – Brucella melitensis*, *Bs – Bacillus subtilis*, *Ca – Candida albicans*, *Ck – Candida krusei*, *Cf – Citrobacter freundii*, *Ec – Escherichia coli*, *Ef – Enterococcus faecalis*, *Kp – Klebsiella pneumoniae*, *Lm – Lysteria monocytogenes*, *Ml – Micrococcus luteus*, *Mt – Mycobacterium tuberculosis*, *Pa – Pseudomonas aeruginosa*, *Pm – Proteus mirabilis*, *Pv – Proteus vulgaris*, *Sa – Staphylococcus aureus*, *Sc – Salmonella choleraesius*, *Se – Staphylococcus epidermidis*, *Sen – Salmonella enterica*, *St – Salmonella typhi*, *Stm – Salmonella typhimurium*, KS – klinički soj; z.i. – zona inhibicije, ** – vrijednost pozitivne kontrole, - – nije detektirano, n.i. – nije ispitano; MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

S druge strane, vodeni ekstrakt nadzemnih dijelova *G. alypum* nije pokazao djelovanje na *S. aureus*, kao ni na *Streptococcus faecium* te na *Plasmodium berghei* u zaraženim miševima (Caldes i sur., 1975), dok je u drugom istraživanju vodeni ekstrakt listova vrste *G. alypum* djelovao jedino na *Agrobacterium tumefaciens* (Oran i Raies, 2000). Antibakterijsku aktivnost na *S. aureus* nije pokazalo ni eterično ulje vrste *G. alypum*, koje je inhibiralo rast nekih drugih G(+) i G(-) bakterija (Ramdani i sur., 2014).

Vrsta *G. arabica*, koja je blisko srodna s *G. alypum*, pokazala je djelovanje na *A. tumefaciens* (Oran i Raies, 2000), *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* i *P. aeruginosa* (Meddah i sur., 2011). Također, etanolni (80%) ekstrakt nadzemnih dijelova *G. arabica* pokazao je antivirusno djelovanje na uzročnika poliomijelitisa (POLIO) pri netoksičnim dozama (50-100 μg/mL) (Soltan i Zaki, 2009).

1.6.5. Istraživanja antitumorskog učinka

Vodeni ekstrakti vrste *G. alypum* pokazali su značajnu antileukemijsku aktivnost na stanice limfocitne leukemije P 388 kod miševa, dok na neoplastičnu staničnu liniju KB nisu djelovali (Caldes i sur., 1975). Istraživanje u *in vitro* uvjetima na tumorskim staničnim linijama PS, LE i KB pokazalo je da frakcija vodenog ekstrakta vrste *G. alypum* bogata iridoidima, kao ni srodni iridoidi, ne djeluje citotoksično u dozi od 100 μg/mL. Autori su pretpostavili da bi za antileukemijsku aktivnost mogao biti odgovoran lignanski glukozid liriodendrin (Chaudhuri i Sticher, 1981). Prema nedavno objavljenom istraživanju temeljenom na MTT testu etanolni ekstrakt listova *G. alypum* ima slabi citotoksični učinak na humanu staničnu liniju HeLa (epitelne stanice karcinoma vrata maternice) (IC_{50} = 1,53 mg/mL) (Mansour i sur., 2012). Vodeni ekstrakt vrste *G. alypum* inhibirao je nastanak biljnih tumora uzrokovan vrstom *Agrobacterium tumefaciens* (Oran, 1999).

U drugom istraživanju, metanolni ekstrakt vrste *G. arabica* u dozama 1, 10 i 100 μg/mL nije pokazao citotoksično djelovanje na stanice humanog limfoma U-937 GTB (El-Seedi i sur., 2013).

Globularifolin, iridoid izoliran iz nadzemnih dijelova vrste *G. cordifolia*, nije pokazao citotoksično djelovanje na humanu mijelomonocitnu staničnu liniju THP-1 kao ni na humane periferne krvne mononuklearne stanice (engl. *Peripheral blood mononuclear cell*, PBMC) u koncentracijama od 7,81-1000 μM. Suprotno tome, povećao je rast stanica THP-1 u koncentracijama jednakim ili većim od 7,81 μM. Rast stanica PBMC potaknuo je u dozama 6,25 i 12,5 μM, dok je u većim dozama smanjivao proliferativni učinak fitohemaglutinina na ove stanice (Sipahi i sur., 2014).

1.6.6. Istraživanja ostalih bioloških učinaka i toksičnosti

Zacjeljujuće djelovanje ekstrakta listova vrste *G. alypum* nedavno je potvrđeno na muškim Wistar štakorima s izazvanim opeklinama, koje bi moglo biti povezano s prisutnošću masnih kiselina palmitinske (6,07%), oleinske (1,48%), stearinske (0,75%) i linolenske (0,40%), a čiji sadržaj je utvrđen primjenom GC-MS tehnike, odnosno s njihovim proupalnim i antibakterijskim svojstvima, kao i s utvrđenim antioksidativnim učinkom istog ekstrakta (Ghlissi i sur., 2016).

Nedavno je zabilježen i nefroprotektivni učinak ekstrakta listova vrste *G. alypum* (400 mg/kg), primijenjenih p.o. u odraslih muških Wistar štakora koji su p.o. primali deltametrin, a koji bi mogao biti povezan s njegovim pozitivnim učinkom na enzimske i ne-enzimske antioksidanse (Feriani i sur., 2017).

Metanolni i diklormetanski ekstrakti vrste *G. alypum* smanjuju histaminom uzrokovanu kontrakciju ileuma zamorca i serotoninom uzrokovanu kontrakciju maternice štakora (Bello i sur., 2002), dok je metanolni ekstrakt listova pokazao miorelaksirajuće djelovanje na zečji jejunum. Isti je ekstrakt pokazao i spazmolitičko djelovanje kod kontrakcija potaknutih acetilkolinom i kalijevim kloridom, koje je moguće povezano s blokadom voltažnih kalcijevih kanala (Chokri i sur., 2010), te vazodilatacijsko djelovanje, koje je posredovano endotelnim hiperpolarizirajućim faktorom (EDHF) (Chokri i sur., 2012). S druge strane, vodeni ekstrakt listova iste vrste izazvao je kontrakciju ileuma zamorca, koja je bila inducirana acetilkolinom, histaminom i derivatima arahidonske kiseline, povećao crijevnu peristaltiku kod štakora te smanjio oštećenje želučane sluznice uzrokovane indometacinom (Fehri i Aiache, 2010). Oralna primjena vodenog ekstrakta listova *G. alypum* (0,3 g/kg, 0,6 g/kg) dovela je do smanjenja tjelesne težine, koje je bilo bolje izraženo kod ženskih štakora., dok je kod muških štakora primijećena indukcija spermatogeneze pri dozama od 0,1 g/kg, 0,3 g/kg i 0,6 g/kg, moguće povezana s androgenim djelovanjem ovog ekstrakta (Fehri i sur., 2012). Smanjenje tjelesne težine primijećeno je i kod štakora na prehrani bogatoj fruktozom koji su primali ekstrakt glavulje (Taleb-Dida i sur., 2011).

Metanolni ekstrakti vrste *G. alypum* inhibiraju ksantin oksidazu (IC_{50} = 83 μg/mL, etil acetatna frakcija). Ovaj enzim katalizira pretvorbu hipoksantina i ksantina u mokraćnu (uričnu) kiselinu zbog čega se koristi kao terapijska meta u liječenju hiperuricemije i gihta (Boussoualim i sur., 2016a; Boussoualim i sur., 2016b). Zaštita od oksonatom-inducirane hiperuricemije i bubrežne disfunkcije kod miševa također je zabilježena (Boussoualim i sur., 2016b), kao i inhibicija stvaranja kristala kalcijevog oksalata monohidrata, česte sastavnice bubrežnih kamenaca (Beghalia i sur., 2008; Beghalia i sur., 2015). Metanolni ekstrakt listova

ove vrste pokazao je inhibitorno djelovanje na acetilkolinesterazu (IC_{50} = 9,33 μg/mL) (Khlifi i sur., 2013), enzim koji je terapijska meta u liječenju simptoma Alzheimerove bolesti. U drugom je istraživanju najjaču inhibiciju pokazao vodeni ekstrakt korijena iste vrste (IC_{50} = 16,67 μg/mL), pri čemu su TLC bioautografijom detektirane tri aktivne sastavnice (Benamar i sur., 2010). Inhibicija acetilkolinesteraze (IC_{50} = 65,5 μg/mL; IC_{50} = 89,1 μg/mL) i butirilkolinesteraze (IC_{50} = 70,4 μg/mL; IC_{50} = 145,4 μg/mL) utvrđena je i za *n*-heksansku frakciju metanolnih ekstrakata korijena i nadzemnih dijelova vrste *G. meridionalis*. Izolirani flavonoidi bolje su inhibirali navedene enzime od feniletanoida, a najveću inhibiciju pokazao je luteolin (IC_{50} = 25,2 μg/mL za acetilkolinesterazu) (Tundis i sur., 2012a). Vrsta *G. alypum* pokazala je i slabo inhibitorno djelovanje na karboksilnu esterazu (Stocker i sur., 2004).

Vodeni i etanolni ekstrakti listova *G. alypum* djeluju imunosupresivno na limfocite tretirane mitogenima fitohemaglutininom i forbo 12-miristatom (Fehri i sur., 1996). Ista vrsta također smanjuje genotoksično djelovanje nifuroksazida na vrstu *Escherichia coli* PQ37 (Harzallah i sur., 2010). Pokazalo se i da vodeni ekstrakt korijena *G. alypum* smanjuje germinaciju vrste *Lactuca sativa* (Zeghada, 2008-2009).

Većina istraživanja navodi nisku toksičnost ekstrakata grmaste glavulje. Nakon oralne primjene vodenog estrakta listova kod Wistar štakora i Swiss miševa kroz sedam i četrnaest dana LD_{50} bio je veći od 10 g/kg (Skim i sur., 1998; Fehri i sur., 2012), odnosno iznosio je 14,5 g/kg kod miševa (Jouad i sur., 2002), dok je LD_{50} kod intraperitonealne primjene iznosio 2,55 g/kg kod muških i 2,75 g/kg kod ženskih miševa. Kontinuirana oralna primjena vodenog ekstrakta listova u dnevnoj dozi od 0,3 g/kg i 0,6 g/kg kod štakora kroz 30 dana nije izazvala smrt štakora te nije dovela do značajnih histoloških promjena na želucu, crijevima, jetri, bubrezima, mokraćnom mjehuru i ženskom reproduktivnom sustavu. Kod primjene veće doze (0,6 g/kg) uočene su promjene na jednjaku (stanjenje stijenke i atrofija mišića), a kod obje primijenjene doze promjene na plućima koje su upućivale na pojavu plućne hipertenzije, akutnog respiratornog distres sindroma (ARDS) i limfoidne hiperplazije (Fehri i sur., 2012). Kontinuirana oralna primjena infuza listova u dnevnoj dozi od 0,7 g/kg kroz osam tjedana nije dovela do bubrežne ili jetrene toksičnosti, iako je primijećen značajni porast kreatinina (Skim i sur., 1998).

Moguća reproduktivna toksičnost u ženskih štakora manifestirala se kao povećana resorpcija ploda nakon ingestije 800 mg/kg etanolnog ekstrakta listova, odnosno kao smanjenje broja vijabilnih fetusa (Elbetieha i sur., 2000), zbog čega ju Europska agencija za sigurnost hrane navodi kao jednu od biljaka koje bi mogle negativno djelovati na ljudsko zdravlje, ukoliko se uzimaju u hrani ili u dodacima prehrani (EFSA, 2012).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Biljke su se od davnina koristile u ljudskoj prehrani i liječenju, a izolacijom i derivatizacijom njihovih sekundarnih metabolita dobiveni su mnogi djelotvorni lijekovi, čija se farmaceutska primjena zadržala do danas.

Dugogodišnja primjena vrste *G. alypum* (grmasta glavulja) u narodnoj medicini većine mediteranskih zemalja upućuje na njezinu učinkovitost, kao i na sigurnost njezine primjene. Navedena vrsta ujedno je i najbolje istražena predstavnica roda *Globularia*.

Iako je grmasta glavulja dobro rasprostranjena na području Sredozemlja, u Hrvatskoj je samoniklo prisutna jedino na području Konavoskih stijena. S druge strane, njoj srodne vrste *G. cordifolia* (srcolika glavulja), *G. meridionalis* (modra glavulja) i *G. punctata* (Vilkomova glavulja) prisutne su na brojnim lokacijama u Hrvatskoj, ali i u većem broju europskih zemalja.

Budući da su prethodna istraživanja ukazala na moguću sličnost u kemijskom sastavu različitih vrsta glavulja, u okviru ovog rada po prvi je puta sustavno uspoređen fitokemijski profil četiri odabrane vrste: *G. alypum, G. cordifolia, G. meridionalis* i *G. punctata*. Kako bi rezultati usporedbe bili što pouzdaniji, obuhvaćeni su uzorci sabrani iz većeg broja populacija kroz više vegetacijskih razdoblja i dobiveni različitim ekstrakcijskim metodama.

U svrhu procjene biomedicinskog potencijala slabije istraženih vrsta, uz usporedbu njihovog fitokemijskog sastava, provedena su i istraživanja odabranih bioloških učinaka u uvjetima *in vitro*, a koji su prethodno utvrđeni kod grmaste glavulje: antidijabetskog, antioksidativnog, protuupalnog, antimikrobnog i citotoksičnog.

Navedenim istraživanjima prethodila su temeljna botanička istraživanja na ekološkoj, morfološkoj, histološko-anatomskoj, citološkoj i molekularnoj razini, kojima se u kombinaciji s fitokemijskim istraživanjima pokušalo pridonijeti rješavanju taksonomskog spora oko razdvojenosti vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Biljni materijal

Biljni materijal (podzemni i/ili nadzemni dijelovi) korišten u ovom radu sakupljen je u vrijeme cvatnje tijekom pet godina sa 16 različitih lokacija u Hrvatskoj te s jedne lokacije u Bosni i Hercegovini, a činile su ga samonikle populacije (ukupno 19) četiri različite vrste roda *Globularia* L.: *G. alypum* L., *G. cordifolia* L., *G. meridionalis* (Podp.) O. Schwarz i *G. punctata* Lapeyr. Identifikacija biljnog materijala provedena je u usporedbi s odabranom botaničkom literaturom (Schwarz, 1938; Kušan, 1943; Domac 1950; Tutin i sur., 1972; Forenbacher, 1990). Herbarski primjerci pohranjeni su u Herbarskoj zbirci Zavoda za farmaceutsku botaniku Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Popis lokacija s kojih je sakupljen istraživani biljni materijal s opisom staništa, geografskim podacima (nadmorska visina, geografska širina i dužina), datumom sakupljanja, herbarskim brojevima uzoraka i naznačenim brojevima poglavlja koja opisuju istraživanja u kojima je dotični materijal korišten prikazani su u Tablici XI.

Materijal je korišten u svježem i/ili u suhom obliku. Svježi materijal je nakon presađivanja čuvan u klijalištu Farmaceutskog botaničkog vrta „Fran Kušan" te je jednim dijelom naknadno presađen u vrtne kamenjare, potpuno ili djelomično izložene sunčevoj svjetlosti. Sušenje biljnog materijala provedeno je u tankom sloju pri sobnoj temperaturi u dobro prozračenoj prostoriji, zaštićenoj od izravne svjetlosti. Osušeni biljni materijal očišćen je od eventualnih onečišćenja, pri čemu su uklonjeni i smeđi, odnosno crni listovi te je pohranjen u papirnate vrećice koje su čuvane na suhom i mračnom mjestu.

Tablica XI. Lokacije s kojih je sakupljen istraživani biljni materijal, geografski podaci, datum sakupljanja, herbarski brojevi uzoraka i naznačeni brojevi poglavlja koja opisuju metode istraživanja u kojima je korišten

Redni broj	Lokacija (Kratica)	Opis staništa	Nadmorska visina (m)	Geografska širina/dužina	Datum sakupljanja	Herbarski broj	Broj poglavlja
G. alypum							
1.	okolica Dubrovnika, Konavle, Popovići, Konavoske stijene (Konavoske stijene)	vapnenačke stijene uz more	15 42	42°30'50"N/ 18°19'07"E 42°30'42"N/ 18°19'26"E	24. 03. 2013. 07. 03. 2014. 29. 03. 2015.	16 020 16 025_1	3.2.1., 3.2.2., 3.2.4., 3.3.1., 3.3.2., 3.3.3., 3.3.4., 3.4.1., 3.4.2., 3.4.3., 3.4.4., 3.4.5.
G. cordifolia							
2.	Mostar (BiH), obala rijeke Neretve, Skakala (Mostar)	vapnenački konglomerati u koritu rijeke	57	43°21'41"N/ 17°48'20"E	08. 05. 2012. 09. 05. 2015. 07. 05. 2016.	16 030	3.2.1., 3.2.2., 3.2.3., 3.3.1., 3.3.3., 3.3.4., 3.4.2.
3.	Biokovo, okolica Šestanovca/ Zadvarja, iznad odvojka ceste za Slime (Šestanovac)	krški pašnjaci na obronku (kameniti)	304	43°24'23"N/ 16°53'04"E	10. 05. 2015. 07. 05. 2016.	16 035	3.2.1., 3.2.2., 3.2.3., 3.3.1., 3.3.3., 3.3.4.
4.	Biokovo, Biokovska cesta prema vrhu Sv. Jure (Biokovo)	krški pašnjaci na obronku (kameniti)	933	43°15'47"N/ 17°06'09"E	10. 05. 2015.	16 033	3.2.1., 3.3.1., 3.3.3., 3.3.4.
5.	Srednji Velebit, Baške Oštarije, prijevoj Stara vrata, Kubus (Baške Oštarije)	krški pašnjaci na obronku (travnati)	917	44°31'41"N/ 15°08'38"E	02. 06. 2012. 02. 06. 2015. 29. 05. 2016.	16 031	3.2.1., 3.2.2., 3.2.4., 3.3.1., 3.3.3., 3.3.4., 3.4.2., 3.4.5.
6.	Sjeverni Velebit, prijevoj Veliki Alan, okolica planinarske kuće Alan (Alan)	krški pašnjaci (kameniti)	1340	44°43'15"N/ 14°58'05"E	25. 05. 2013. 02. 06. 2015.	16 032 16 035_1	3.2.1., 3.2.2., 3.2.3., 3.2.4., 3.3.1., 3.3.2., 3.3.3., 3.3.4., 3.4.1., 3.4.2., 3.4.3., 3.4.4.
G. meridionalis							
7.	Srednji Velebit, Baške Oštarije, prijevoj Stara vrata, Kubus (Baške Oštarije)	krški pašnjaci na obronku (travnati)	917	44°31'41"N/ 15°08'38"E	02. 06. 2012. 02. 06. 2015. 29. 05. 2016.	16 043	3.2.1., 3.3.1., 3.3.3., 3.3.4., 3.4.2., 3.4.5.
8.	Dinara, planinarski put Glavaš-Sinjal (Dinara)	krški pašnjaci na obronku (travnati)	1533	44°02'48"N/ 16°23'30"E	27. 05. 2012. 31. 05. 2015.	16 042	3.2.1., 3.3.1., 3.3.3., 3.3.4., 3.4.2.
9.	Dinara, početni dio planinarskog puta	krški pašnjaci	607	44°00'44"N/	08. 05. 2016.	16 045	3.2.1., 3.2.2., 3.2.3.,

	prema utvrdi Glavaš (Dinara)	na obronku (travnati)		16°25'05"E			3.3.1., 3.3.3., 3.3.4.
10.	Istra, Učka, naselje Mala Učka (Učka)	vapnenačke stijene	926	45°17'59"N/ 14°11'27"E	27. 05. 2012. 07. 06. 2015. 26. 05. 2016.	16 041	3.2.1., 3.2.2., 3.2.3., 3.3.1., 3.3.3., 3.3.4., 3.4.2.
11.	okolica Rijeke, Grobničko polje (Grobničko polje)	krško polje	308	45°22'39"N/ 14°30'53"E	01. 05. 2012. 04. 05. 2013. 13. 04. 2014. 24. 04. 2015. 30. 04. 2016.	16 040 16 045_1	3.2.1., 3.2.2., 3.2.3., 3.2.4., 3.3.1., 3.3.2., 3.3.3., 3.3.4., 3.4.1., 3.4.2., 3.4.3., 3.4.4.
G. punctata							
12.	okolica Rijeke, Grobničko polje (Grobničko polje)	krško polje	308	45°22'39"N/ 14°30'53"E	01. 05. 2012. 04. 05. 2013. 13. 04. 2014. 24. 04. 2015. 30. 04. 2016.	16 052 16 059_1 16 056	3.2.1., 3.2.2., 3.2.3., 3.2.4., 3.3.1., 3.3.2., 3.3.3., 3.3.4., 3.4.1., 3.4.2., 3.4.3., 3.4.4., 3.4.5.
13.	Dinara, okolica planinarskog doma Brezovac (Dinara)	krški pašnjaci na obronku (travnati)	1050	44°05'45"N/ 16°20'39"E	30. 05. 2015.	16 059	3.2.1., 3.3.1., 3.3.3., 3.3.4.
14.	Dinara, okolica Kijeva (Dinara)	krški pašnjaci (travnati)	396	44°01'44"N/ 16°19'11"E	08. 05. 2016.	16 060	3.2.1., 3.2.2., 3.2.3, 3.3.1., 3.3.3., 3.3.4.
15.	Istra, okolica Oprtlja, naselje Vižintini Vrhi (Vižintini)	livada	386	45°23'36"N/ 13°51'20"E	29. 04. 2012. 04. 05. 2013. 25. 04. 2015. 30. 04. 2016.	16 051	3.2.1., 3.2.3., 3.3.1., 3.3.3., 3.3.4., 3.4.2.
16.	Žumberak, makadamska cesta iznad kanjona Slapnice prema selu Čučići (Slapnica)	šljunčano-pješčani teren uz stijene	325	45°44'29"N/ 15°29'26"E	04. 05. 2013. 26. 04. 2015. 25. 04. 2016.	16 057	3.2.1., 3.3.1., 3.3.3., 3.3.4., 3.4.2.
17.	Žumberak, okolica Krašića, Rude Pribićke (Rude)	livada na obronku	470	45°42'50"N/ 15°30'51"E	26. 04. 2015. 25. 04. 2016.	16 058	3.2.1., 3.3.1., 3.3.3., 3.3.4.
18.	Medvednica, okolica Gornjeg Vugrovca (Vugrovec)	livada na obronku	379	45°54'11"N/ 16°05'05"E	11. 05. 2012. 25. 04. 2015. 16. 04. 2016.	16 053	3.2.1., 3.2.2., 3.3.1., 3.3.3., 3.3.4., 3.4.2.
19.	Srednji Velebit, okolica Jadovnog, put prema vrhu Metla (Velebit)	livada na obronku	1190	44°32'08"N/ 15°12'48"E	22. 05. 2016.	16 061	3.2.1., 3.3.1., 3.3.3., 3.3.4.

3.2. Metode istraživanja botaničkih obilježja

3.2.1. Metode istraživanja morfoloških obilježja

U svrhu identifikacije, proučena su morfološka obilježja na svježem i suhom biljnom materijalu na način kako je navedeno u poglavlju 3.1.

3.2.2. Metode istraživanja histološko-anatomskih obilježja

3.2.2.1. Svjetlosna mikroskopija

Histološko-anatomska obilježja proučena su svjetlosnim mikroskopom (*Motic BA210*, *Olympus BX51*) na privremenim i polutrajnim preparatima poprečnih i površinskih prereza svježih i suhih listova, odnosno na cijelim suhim cvjetovima te na poprečnim prerezima suhih jednogodišnjih i višegodišnjih stabljika, odnosno korijena. Promatrani su neobojeni preparati i preparati obrađeni 10% (w/v) kalijevim hidroksidom (*Kemika*), klorcinkovim jodidom pripremljenim otapanjem 25 g bezvodnog cinkovog klorida (*Aldrich*), 10 g kalijevog jodida (*Merck*) i 1,8 g joda (*Sigma-Aldrich*) u 28 mL vode, safraninom (*Sigma-Aldrich*), pripremljenim otapanjem 1 g safranina u 50 mL 95% (v/v) etanola i 50 mL destilirane vode, 0,5% (w/v) otopinom Sudana III (*Sigma-Aldrich*) u 80% (v/v) etanolu, 0,1% (w/v) otopinom toluidinskog modrila (*Sigma-Aldrich*) (Sass, 1951) te 1% (w/v) otopinom vanilina (*Sigma-Aldrich*) u 6 M klorovodičnoj kiselini (*Carlo Erba*) (Aastrup i sur., 1984). Veličina glavičastih žlijezda vrsta *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. pu*nctata proučena je na svježim listovima, a temeljila se na mjerenju visine (u poprečnom prerezu) te dužine, širine i površine glavice po tri različite žlijezde (u površinskom prerezu) na naličju deset listova jedne jedinke, u triplikatu. Preliminarna usporedba veličine žlijezda provedena je na naličju suhih listova vrsta *G. meridionalis* i *G. punctata* (deset žlijezda mjereno u triplikatu). Fotografije su zabilježene mikroskopskom kamerom (*Moticam 3+*).

3.2.2.2. Atmosferska pretražna elektronska mikroskopija

Analiza površine listova dodatno je proučena atmosferskom pretražnom elektronskom mikroskopijom (engl. *Environmental Scanning Electron Microscopy*, ESEM) (*Quanta FEG-250*) na svježem biljnom materijalu.

3.2.3. Metode istraživanja citoloških obilježja

3.2.3.1. Protočna citometrija

Ploidnost i veličina genoma procijenjene su pomoću protočne citometrije (engl. *flow cytometry*) (*Partec CyFlow Space*) na uzorcima svježih mladih listova glavulja koje su više od šest mjeseci rasle u jednakim uvjetima (vrtni uzgoj), pri čemu su kao unutarnji standard korišteni svježi listovi bijele djeteline (*Trifolium repens* L.), 2*n* = 32 (Vižintin i sur., 2006), 2C-vrijednost = 2,07 pg (Arumuganathan i Earle, 1991).

Relativni sadržaj genomske DNA

Relativni sadržaj genomske DNA procijenjen je nakon bojanja jezgara 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI) prema Ottovom protokolu (1988) izmijenjenom na način koji opisuje Bohanec (2003). Bojanju je prethodilo oslobađanje jezgara istovremenim sjeckanjem biljnog materijala glavulje i djeteline oštrim žiletom u 0,5 mL puferske otopine Otto I koja se sastojala od 0,1 M otopine limunske kiseline monohidrata s 0,5% (v/v) Tween 20 (*Sigma-Aldrich*). Dobivena suspenzija profiltrirana je kroz CellTricks najlonski filter veličine pora 30 μm (*Partec*) te joj je dodan četverostruki volumen puferske otopine Otto II sastavljene od 0,4 M natrijevog hidrogenfosfata dodekahidrata i 4 μg/mL boje DAPI (*Partec*). Mjerenja su provedena u linearnoj skali neposredno nakon bojenja jezgara i njihove ekscitacije pomoću UV LED lasera (365 nm), na jedinkama vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* (tri do četiri jedinke iz tri različite populacije), odnosno vrste *G. punctata* (jedna do dvije jedinke iz tri različite populacije).

Apsolutni sadržaj genomske DNA

Apsolutni sadržaj genomske DNA, odnosno veličina genoma, procijenjena je nakon bojanja jezgara propidijevim jodidom, prema protokolu koji opisuje Bohanec (2003). Oslobađanje jezgara provedeno je na način kao što je prethodno opisano, ali je za ekstrakciju korišten pufer LB01, pH 7,5, koji se sastojao od 15 mM tris(hidroksimetil)aminometana (Tris), 2 mM dinatrijeve soli etilendiaminotetraoctene kiseline (Na_2EDTA), 0,5 mM spermin tetrahidroklorida (*Sigma-Aldrich*), 80 mM kalijevog klorida, 20 mM natrijevog klorida, 0,1% (v/v) Triton X-100 (*Sigma-Aldrich*) i 15 mM β-merkaptoetanola (*Sigma-Aldrich*) (Doležel i sur., 1989). Dobivena suspenzija profiltrirana je kroz CellTricks najlonski filter veličine pora 30 μm (*Partec*) te su joj dodani propidijev jodid (*Sigma-Aldrich*) i ribonukleaza (RNAza) (*Sigma-Aldrich*) u konačnim koncentracijama 50 μg/mL. Mjerenja su provedena u linearnoj skali neposredno nakon bojenja jezgara i njihove ekscitacije pomoću 30 mW

zelenog lasera čvrstog stanja (532 nm), na tri jedinke vrsta *G. cordifolia, G. meridionalis* i *G. punctata*, od kojih je svaka bila sabrana iz različite populacije. Za svaku su jedinku pripremljene četiri nezavisne suspenzije jezgara te je u svakoj izmjereno 7000 jezgara. Optičko poravnanje uređaja temeljilo se na optimiziranom signalu kalibracijskih kuglica Calibration Beads green (*Partec*).

U obje metode, položaj pikova istraživane vrste i unutarnjeg standarda koji odgovaraju jezgrama u fazi G_0/G_1 (2C) staničnog ciklusa određen je pomoću programa Flomax (*Partec*). Relativni (DAPI), odnosno apsolutni (propidijev jodid) sadržaj genomske DNA (2C-vrijednost) u pg procijenjen je na temelju omjera srednje vrijednosti položaja 2C pika uzorka i unutarnjeg standarda na apscisi pomnoženog s 2C-vrijednošću unutarnjeg standarda.

3.2.3.2. Fluorescentna mikroskopija

Analiza broja kromosoma provedena je na meristemskim stanicama korjenovog vrška, pri čemu su korišteni korjenčići biljaka uzgajanih u botaničkom vrtu „Fran Kušan" Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Priprema preparata provedena je prema ranije opisanim postupcima (Carović-Stanko i sur., 2009; Siljak-Yakovlev i sur.; 2010). Korjenčići su tretirani s 0,05% (w/v) kolhicinom (Sigma-Aldrich) 4 sata na sobnoj temperaturi ili 2 mM 8-oksihidroksikinolinom 4 sata na 18 °C. Nakon predtretmana fiksirani su u smjesi etanola i ledene octene kiseline (3:1, *V/V*). Nakon bojanja s 2% (w/v) otopinom karmina u 45% (v/v) ledenoj octenoj kiselini kromosomski preparati pripremljeni su standardnom tehnikom gnječenja i dehidrirani uz pomoć ledenog CO_2. Nakon sušenja preko noći preparati su inkubirani 10 minuta u McIlvaine puferu, pH 7,0, a zatim bojani s 1 μg/mL fluorescentne boje DAPI kroz 10 minuta. Pripremljeni preparati pregledavani su pomoću mikroskopa Olympus BX51, a fotografije su zabilježene pomoću digitalne kamere visoke rezolucije Olympus DP70 (*Olympus*).

3.2.4. Metode molekularne filogenije

3.2.4.1. Izolacija DNA

Ukupna stanična DNA izolirana je iz 100-140 mg suhog, svježeg ili zamrznutog tkiva lista prema protokolu koji su opisali Doyle i Doyle (1990), izmijenjenom na način koji opisuje Hazler Pilepić (2007). Biljni materijal usitnjen je pistilom do praškaste konzistencije uz dodatak tekućeg dušika i pomiješan s 1 mL ekstrakcijskog pufera koji se sastojao od 55 mM alkiltrimetilamonijevog bromida (*Sigma-Aldrich*), 20 mM EDTA, pH = 8,0 (*Sigma-Aldrich*), 100 mM Tris HCl, pH = 8,0 (*Kemika*), 1,4 M natrijevog klorida (*Kemika*),

10 mg topljivog polivinilpirolidona (*Merck*) i 50 mM 1,4-ditiotreitola (*Sigma-Aldrich*). Ekstrakcija je provedena 1 sat na 55 °C (*Eppendorf Thermomixer Compact*). Nakon provedene ekstrakcije dobivena smjesa ohlađena je na ledu 10 minuta, dodano joj je 400 µL diklormetana (*Kemika*) te je centrifugirana 10 minuta na 13 000 okretaja/min (*Heraeus Multifuge 3 S-R*). Dobiveni nadsloj je odvojen te mu je dodano 2/3 volumena hladnog izopropanola (*Kemika*). Nakon hlađenja na -20 °C kroz 24 sata, smjesa je centrifugirana 10 minuta na 13 000 okretaja/min na 4 °C, nadsloj je bačen, a talogu je dodan 1 mL 70% (v/v) etanola (*Kemika*). Nakon ponovljenog centrifugiranja 10 minuta na 13 000 okretaja/min na 4 °C, nadsloj je bačen, talog je osušen i otopljen u 100 µL redestilirane vode te mu je dodan 1 µL RNAze (*Qiagen*), nakon čega je smjesa inkubirana 1 sat na 37 °C. Iznimno, ukupna stanična DNA korištena u analizi restrikcijskim enzimima izolirana je iz 50 mg suhih, odnosno 70 mg svježih listova koristeći komercijalni komplet za izolaciju DNA, DNeasy Plant Mini Kit (*Qiagen*) prema uputama proizvođača.

Uspješnost izolacije DNA provjerena je elektroforezom na 0,7% (w/v) agaroznom gelu (*Invitrogen*), koji je sadržavao 1 µg/mL etidijevog bromida (*Serva Electrophoresis*) u Tris acetatnom EDTA (TAE) puferu sastavljenom od 40 mM Tris (*Kemika*), 20 mM ledene octene kiseline (*Kemika*) i 1 mM EDTA (*Sigma-Aldrich*). Uzorci su naneseni u volumenu 5 µL pomiješani s 2 µL otopine za nanošenje uzoraka sastavljene od brom fenol modrila (*Kemika*) i glicerola (*Kemika*). Elektroforeza je provedena pri naponu od 90 V (*Amersham Pharmacia Biotech EPS-600*) uz biljeg poznatih veličina fragmenata GeneRuler DNA Ladder Mix (*Fermentas Life Sciences*), a trajala je približno 30 minuta. Izolirana DNA detektirana je pod UV svjetlom (*Syngene G:BOX*).

3.2.4.2. Umnažanje ITS područja jezgrine DNA te genskog *rbc*L i međugenskog *trn*L-*trn*F područja kloroplastne DNA

Umnažanje ITS područja jezgrine DNA uz par početnica ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) i ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White i sur., 1990), *rbcL* područja kloroplastne DNA uz par početnica *rbcL* F (ATGTCACCA CAAACAGAGACTAAAGC) i *rbcL* R (GCAGCAGCTAGTTCCGGGCTCCA) (Hasebe i sur., 1994), odnosno *trn*L-*trn*F područja kloroplastne DNA uz par početnica LF F (CGAAATCGGTAGACGCTACG) i LF R (ATTTGAACTGGTGACACGAG) (Taberlet i sur., 1991) provedeno je lančanom reakcijom polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR). Reakcijska smjesa (100 µL) sadržavala je 200 µM svakog deoksinukleotida (*Invitrogen*), 0,5 µM svake od početnica i 0,5 U *Taq* HS polimeraze (*Takara Bio Inc.*).

Postupak umnažanja proveden je u uređaju BioRad MyCycler 1065 (*Bio-Rad Laboratories*), a uključivao je početnu denaturaciju na 93 °C kroz 3 minute i 35 ciklusa reakcija koji su se sastojali od denaturacije na 93 °C (1 min), vezanja početnica na 50 °C (1 min) i elongacije na 72 °C (1 min), nakon kojih je uslijedila konačna elongacija na 72 °C (10 min). Dobiveni produkti dokazani su elektroforezom na 0,7% (w/v) agaroznom gelu.

3.2.4.3. Polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata

Polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) istražen je na način da je u 10 µL PCR produkta dodano 10 µL smjese za digestiju, koja se sastojala od 2 µL 10x puferske otopine REact 2, 1 ili 8 (*Invitrogen*), 7,5 µL vode i 0,5 µL restrikcijske endonukleaze *Hae* III (*Invitrogen*), *Hpa* II (*Invitrogen*) ili *Rsa* I (*Invitrogen*). Digestija je provedena na 37 °C kroz 5 sati (*Eppendorf Thermomixer Compact*). Uspješnost cijepanja fragmenata provjerena je elektroforezom na 1,5% (w/v) agaroznom gelu, na način kako je prethodno opisano. Fotografije gelova zabilježene su pomoću uređaja za vizualizaciju i pohranu elektroforetskih slika (*Syngene G:BOX*).

Enzim:	*Hae* III	*Hpa* II	*Rsa* I
Mjesto cijepanja:	5’-GG↓CC-3’	5’-C↓CG G-3’	5’-GT↓AC-3’
	3’-CC↑GG-5’	3’-G GC↑C-5’	3’-CA↑TG-5’

3.2.4.4. Pročišćavanje i sekvenciranje PCR produkata

Dobiveni PCR produkti pročišćeni su od viška početnica i deoksinukleotida pomoću komercijalnog kompleta za pročišćavanje PCR produkata illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (*GE Healthcare*) u skladu s uputama proizvođača. Kvaliteta pročišćene DNA provjerena je elektroforezom na 0,7% (w/v) agaroznom gelu.

PCR produkti sekvencirani su u servisu za sekvenciranje Macrogen (Seoul, Južna Koreja) pomoću Applied Biosystems 3730xl uređaja za sekvenciranje DNA, koristeći iste početnice koje su bile upotrebljene prilikom njihovog umnažanja. Za najmanje 75% ukupne dužine fragmenata sekvencirana su oba lanca DNA, a dobiveni sljedovi pohranjeni su u bazu podataka GenBank (Benson i sur., 2017).

3.2.4.5. Poravnavanje i usporedba sljedova

Dobiveni sljedovi ručno su uređeni i poravnati pomoću programa ClustalX.2.1 (Larkin i sur., 2007) te su dobiveni podaci o broju konzerviranih i varijabilnih mjesta, pri čemu

posljednja uključuju mjesta na kojima se drugačija baza pojavljuje dva ili više puta (parsimonijski informativna mjesta) i mjesta na kojima se drugačija baza pojavljuje samo jednom (engl. *singleton*). Sljedovi su podvrgnuti filogenetskoj analizi koristeći metodu maksimalne parsimonije pomoću programa MEGA 6 (Tamura i sur., 2013), pri čemu su kao vanjske skupine korišteni sljedovi sljedećih vrsta: *Plantago major* L. (*trn*L-*trn*F, *rbc*L), *P. lanceolata* L. (ITS), *Veronica officinalis* L. (ITS, *trn*L-*trn*F, *rbc*L), *Digitalis lanata* Ehrh. (ITS, *trn*L-*trn*F) i *D. lutea* L. (*rbc*L) preuzete iz baze podataka GenBank.

Filogenetske rekonstrukcije provedene su putem heurističkih pretraživanja pomoću Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) algoritma (Nei i Kumar, 2000) s razinom pretraživanja 1, pri čemu su početna stabla dobivena nasumičnim dodatkom deset sljedova. Praznine i podaci koji nedostaju isključeni su iz skupa podataka. Za procjenu robusnosti dobivenih grana korištena je bootstrap metoda (Felsenstein, 1985).

3.2.5. Statistička obrada rezultata istraživanja botaničkih obilježja

3.2.5.1. Histološko-anatomska istraživanja

Veličina glavičastih žlijezda mjerena je u triplikatu, a dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija rezultata mjerenja trideset različitih žlijezda kod svježih listova, odnosno deset različitih žlijezda kod suhih listova. Statistički značajne razlike između veličine žlijezda kod svježih listova procijenjene su pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA), nakon koje je slijedio Tukeyev *post-hoc* test, a između veličine žlijezda kod suhih listova te između svježih i suhih listova pomoću t-testa.

3.2.5.2. Citološka istraživanja

Relativni sadržaj genomske DNA izražen je kao srednja vrijednost ± standardna devijacija nekoliko uzastopnih mjerenja različitih jedinki svake vrste sakupljenih iz tri različite populacije, dok je apsolutni sadržaj genomske DNA izražen kao srednja vrijednost ± standardna devijacija četiri uzastopna mjerenja iste jedinke, pri čemu je za svaku vrstu analizirana po jedna jedinka iz tri različite populacije. Statistički značajne razlike između vrsta procijenjene su pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA), nakon koje je slijedio Tukeyev *post-hoc* test. Povezanost između rezultata protočne citometrije dobivenih dvjema različitim metodama procijenjena je pomoću Pearsonovog koeficijenta korelacije (*r*).

Razina značajnosti u svim testovima bila je $\alpha = 0,05$. Obrada podataka provedena je pomoću programa GraphPad Prism 6.01 for Windows (*GraphPad Software*).

3.3. Metode istraživanja fitokemijskog profila

3.3.1. Metode pripreme uzoraka

3.3.1.1. Dekokcija (kuhanje u refluksnim uvjetima)

U 0,5 g suhih praškastih nadzemnih dijelova dodano je 10 mL metanola (*T.T.T*). Smjesa je ekstrahirana kuhanjem u refluksnim uvjetima na magnetskoj miješalici s grijanjem (*Witeg*) kroz 45 minuta. Dobiveni ekstrakti filtrirani su kroz filter papir i tanki sloj vate i nadopunjeni metanolom do 10,0 mL te pohranjeni na 4 °C do daljnje upotrebe.

U 2,0 g suhih praškastih nadzemnih dijelova dodano je 20 mL metanola (*Merck*). Smjesa je ekstrahirana kuhanjem u refluksnim uvjetima kroz 45 minuta. Dobiveni ekstrakti filtrirani su kroz filter papir i upareni do suhog pomoću rotacijskog vakuum-uparivača na 30 °C (*Büchi Rotavapor R-210*), nakon čega su ponovno otopljeni u 50% (v/v) metanolu do koncentracije 10 mg/mL. Pripremljena otopina (10 mL) centrifugirana je 15 minuta pri 3000 okretaja/min na 20 °C (*Eppendorf 5810 R*), nakon čega je 1,5 mL supernatanta podvrgnuto analizi sastavnica ekstrakata tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti spregnutom s fotodiodnom detekcijom i tandemskom masenom spektrometrijom.

3.3.1.2. Ultrazvučna ekstrakcija

U 2,5 g odvojenih suhih praškastih biljnih dijelova (list, cvijet, zelena stabljika, drvenasta stabljika, korijen), odnosno 0,5 g ili 1,25 g suhih praškastih nadzemnih dijelova, dodana je deseterostruka količina metanola (*T.T.T*) te je provedena ekstrakcija pod djelovanjem ultrazvuka (*Bandelin Sonorex Super RK 255 H*) kroz 30 minuta. Nakon filtracije dobivenog sadržaj ekstrakcija je ponovljena s deseterostrukom količinom metanola kroz 30 minuta. Dobiveni ekstrakti filtrirani su kroz filter papir i tanki sloj vate i nadopunjeni metanolom do 50,0 mL (10,0 mL ili 25,0 mL) te pohranjeni na 4 °C do daljnje upotrebe.

Dio pripremljenih ekstrakata listova uparen je do suhog pomoću rotacijskog vakuum-uparivača na 50 °C (*Büchi Rotavapor R-200*), nakon čega je čuvan na -20 °C do daljnje upotrebe.

3.3.1.3. Maceracija

U 0,5 g suhih praškastih nadzemnih dijelova dodano je 10 mL metanola (*T.T.T*). Smjesa je ekstrahirana na sobnoj temperaturi kroz 24 sata. Dobiveni ekstrakti filtrirani su kroz filter papir i tanki sloj vate i nadopunjeni metanolom do 10,0 mL te pohranjeni na 4 °C do daljnje upotrebe.

Uzorci za analizu sastavnica ekstrakata tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pripremljeni su na isti način uz izmijenjen omjer biljnog materijala i metanola (2,0 g u 20 mL).

3.3.1.4. Soxhlet ekstrakcija

U 145-280 g suhih praškastih nadzemnih dijelova dodan je metanol (*Merck*) u omjeru 1:5 te je provedena ekstrakcija u Soxhlet aparaturi kroz 8 sati. Dobiveni ekstrakti upareni su do suhog pomoću rotacijskog vakuum-uparivača na 30 °C (*Büchi Rotavapor R-210*), nakon čega su ponovno otopljeni u 50% (v/v) metanolu (100 mL) te tri puta izmućkani s dvostruko manjim volumenom kloroforma (*Merck*). Donji kloroformski sloj je uklonjen, a preostala otapala uklonjena su uparavanjem na 30 °C i liofilizacijom (*Christ Alpha 1-2 LDplus*). Dobiveni liofilizati čuvani su na -20 °C do daljnje upotrebe.

3.3.1.5. Vodena destilacija

Suhi nadzemni dijelovi (20,0 g) podvrgnuti su vodenoj destilaciji kroz 2,5 sata u aparaturi za destilaciju po Clevengeru. Dobiveno eterično ulje je odijeljeno, osušeno pomoću bezvodnog natrijevog sulfata (*Kemika*) i pohranjeno na 4 °C do daljnje upotrebe.

3.3.2. Metode kvalitativnih fitokemijskih istraživanja

Fitokemijskim reakcijama u epruveti na suhim nadzemnim dijelovima i/ili na njihovim metanolnim ekstraktima pripremljenim ultrazvučnom ekstrakcijom istražena je prisutnost flavonoida, trjeslovina, flobatanina, antocijana, iridoida, steroida, triterpena, saponina i antrakinona.

3.3.2.1. Flavonoidi

U 1 mL ekstrakta dodan je 1 mL 10% (w/v) natrijevog hidroksida (*Gram-Mol*). U prisutnosti flavonoida nastaje žuto obojenje (Anyasor i sur., 2010; Okhale i sur., 2012).

3.3.2.2. Trjeslovine

U 0,5 mL ekstrakta dodan je 1 mL destilirane vode i 1 do 2 kapi 10% (w/v) željezovog(III) klorida (*Fluka*). U prisutnosti trjeslovina koje hidroliziraju nastaje plavo, a kondenziranih trjeslovina zelenocrno obojenje (Abbas i sur., 2012; Okhale i sur., 2012).

3.3.2.3. Flobatanini

U 2 mL ekstrakta dodan je 1 mL 1% (v/v) klorovodične kiseline (*Carlo Erba*). Smjesa je kuhana na vodenoj kupelji 5 minuta. U prisutnosti flobatanina nastaje crveni talog (Anyasor i sur., 2010; Okhale i sur., 2012).

3.3.2.4. Antocijani

U 2 mL ekstrakta dodana su 2 mL 2 M klorovodične kiseline (*Carlo Erba*). U prisutnosti antocijana nastaje ružičasto-crveno obojenje koje postepenim dodatkom 10% (w/v) kalijevog hidroksida (*Kemika*) postaje plavoljubičasto (Savithramma i sur., 2011).

3.3.2.5. Iridoidi

U 0,5 g praškastog biljnog materijala dodano je 5 mL 1% (v/v) klorovodične kiseline (*Carlo Erba*). Smjesa je macerirana na sobnoj temperaturi 3 sata, filtrirana kroz filter papir, nakon čega je filtratu dodano 0,5 mL Trim-Hillovog reagensa, koji je pripremljen dodatkom 10 mL ledene octene kiseline (*Alkaloid*) i 0,5 mL koncentrirane klorovodične kiseline (*Carlo Erba*) u 1 mL 0,2 % (w/v) otopine bakrovog(II) sulfata pentahidrata (*Merck*). Nakon kratkog zagrijavanja na vodenoj kupelji, u prisutnosti određenih iridoida, nastaje plavo (asperulozid, aukubin, monotropein) ili crvenoljubičasto obojenje (harpagid) (Harborne, 1998).

3.3.2.6. Steroidi

U 1 mL ekstrakta dodana su 2 mL koncentrirane sumporne kiseline (*Kemika*) i 2 mL acetanhidrida (*Kemika*). U prisutnosti steroida nastaje promjena boje iz ljubičaste u plavozelenu (Abbas i sur., 2012).

3.3.2.7. Triterpeni

U 2,5 mL ekstrakta dodano je 1 mL kloroforma (*Carlo Erba*) i 1,5 mL koncentrirane sumporne kiseline (*Kemika*). U prisutnosti triterpena na granici slojeva nastaje crvenosmeđe obojenje (Abbas i sur., 2012).

3.3.2.8. Saponini

U 0,25 g praškastog biljnog materijala dodano je 2,5 mL destilirane vode te filtrirano. U filtrat je dodano još 1,5 mL destilirane vode. Epruveta je zatvorena i snažno mućkana 30 s. U prisutnosti saponina nastaje pjena koja je prisutna i nakon 10 minuta (Abbas i sur., 2012; Mamta i Jyoti, 2012).

3.3.2.9. Antrakinoni

U 2 mL ekstrakta dodan je 1 mL 10% (v/v) klorovodične kiseline (*Carlo Erba*). Smjesa je kuhana na vodenoj kupelji nekoliko minuta i vruće filtrirana. U filtrat je dodano 3 mL kloroforma (*Carlo Erba*) i nekoliko kapi 10% (w/v) kalijevog hidroksida (*Kemika*) te je sve zajedno ponovno zagrijano. U prisutnosti antrakinona nastaje crvenoružičasto obojenje gornjeg vodenog sloja (Egwaikhide i Gimba, 2007; Okhale i sur., 2012).

3.3.3. Metode istraživanja sadržaja sekundarnih metabolita

3.3.3.1. UV/Vis spektrofotometrija

Sadržaj sekundarnih metabolita u odvojenim biljnim dijelovima uzoraka sakupljenih tijekom 2012. i 2013. godine određen je pomoću Varian Cary 50 Bio UV/Vis spektrofotometra (*Varian Inc.),* dok je za sva ostala mjerenja korišten PG Instruments T70 UV-Vis spektrofotometar (*PG Instruments Limited*).

Ukupni fenoli

Ukupni fenoli određeni su spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteuovim reagensom (Singleton i Rossi, 1965). U 0,5 mL uzorka dodano je 2,5 mL Folin-Ciocalteuovog reagensa (*Kemika*) razrijeđenog u omjeru 1:10 i inkubirano 5 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim su dodana 2 mL otopine 7,5% (w/v) natrijevog karbonata dekahidrata (*Kemika*) te je uslijedila dodatna inkubacija kroz 60 minuta. Apsorbancija je mjerena na 765 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta galne kiseline (*Merck Schuchardt*) (EGK)/g suhog (biljnog) materijala (SM) ili kao mg EGK/g suhog ekstrakta (SE).

Flavonoidi

Flavonoidi su određeni spektrofotometrijskom metodom s aluminijevim kloridom (Arvouet-Grand i sur., 1994). U 1 mL uzorka dodan je 1 mL 2% (w/v) metanolne otopine aluminijevog klorida (*Sigma-Aldrich*). Nakon 15 minuta inkubacije mjerena je apsorbancija na 415 nm uz slijepu probu koja je sadržavala 1 mL uzorka i 1 mL metanola (*T.T.T.*). Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta kvercetina (*Sigma-Aldrich*) (EKV)/g SM ili kao mg EKV/g SE.

Kondenzirane trjeslovine

Sadržaj kondenziranih trjeslovina (proantocijanidina) određen je spektrofotometrijski pomoću vanilinskog testa (Broadhurst i Jones, 1978; Sun i sur., 1998) prema djelomično izmijenjenom postupku koji je opisao Toda (2005). U 1 mL uzorka dodana su 2 mL 1% (w/v) otopine vanilina (*Sigma-Aldrich*) u 7 M sumpornoj kiselini (*Kemika*). Nakon inkubacije od 15 minuta pri temperaturi 30 ± 1 °C na IKA RCT Basic IKAMAG magnetskoj miješalici s grijanjem i ugrađenim temperaturnim senzorom PT 1000 (*IKA*) očitana je apsorbancija na 500 nm uz slijepu probu koja je sadržavala 1 mL uzorka i 2 mL 7 M sumporne kiseline, a bila je inkubirana u istim uvjetima kao i uzorak. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta (+)-katehina (*Fluka*) (EKT)/g SM.

Iridoidi

Sadržaj iridoida određen je spektrofotometrijski pomoću Trim-Hillovog reagensa (Trim i Hill, 1952), na način koji su predložili Tundis i sur. (2012a). U 200 µL uzorka dodana su 2 mL Trim-Hillovog reagensa, pripremljenog na način kako je prethodno opisano. Smjesa je zagrijana 5 minuta u kipućoj vodenoj kupelji (*IKA*). Apsorbancija je očitana na 609 nm uz metanol (*T.T.T.*) kao slijepu probu. Rezultati su prikazani kao mg ekvivalenta aukubina (*Fluka*) (EA)/g SM.

3.3.3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s fotodiodnom detekcijom i masenom spektrometrijom

Razdvajanje i detekcija sastavnica

Sadržaj aukubina i katalpola određen je pomoću analize spregnutim sustavom tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti-fotodiodni detektor-maseni spektrometar (engl. *High-Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection-Electrospray Ionization/Mass Spectrometry,* HPLC-DAD-ESI/MS) (*Agilent 1100 Series LC-MSD Trap*) sastavljenom od sljedećih jedinica: kvaterna gradijentna pumpa G1311A s integriranim degazerom G1379A, automatski uzorkivač G1329A s termostatom G1330B, termostatirana pećnica G1316A, DAD G1315B i maseni spektrometar LC/MSD Trap VL. Razdvajanje je provedeno na Zorbax SB-C_{18} koloni unutarnjeg promjera 250 mm x 4,6 mm i veličine čestica 5 µm (*Agilent Technologies*), u izokratnim uvjetima, koristeći smjesu otapala acetonitril HPLC čistoće (*Merck*)-voda-mravlja kiselina p.a. čistoće (*T.T.T.)* (5:95:0,1, *V/V/V*) kao mobilnu fazu. Brzina protoka pokretne faze bila je 0,5 mL/min, a temperatura kolone 25,0 °C. UV detekcija provedena je pri 210 nm. UV/Vis spektralni podaci snimljeni su u rasponu

190 – 400 nm. Mobilna faza filtrirana je prije upotrebe kroz celuloza nitratni filter veličine pora 0,45 μm (*Sartorius*). Ionizacija elektroraspršenjem (ESI) provedena je u negativnom načinu rada. Dušik je korišten za sušenje i raspršivanje pokretne faze uz brzinu protoka 5,0 L/min i tlak 15,0 psi. Temperatura izvora bila je 325 °C, a napon kapilare 3,5 kV. Maseni spektri snimljeni su u rasponu *m/z* 100 – 500. Prikupljanje i obrada podataka provedeni su pomoću programa ChemStation for LC 3D and LC/MSD Trap v.5.2 (*Agilent Technologies*).

Određivanje sadržaja aukubina i katalpola

Svi su uzorci prije analize dvostruko razrijeđeni s vodom i filtrirani kroz membranski filter Acrodisc GHP veličine pora 0,2 μm (*Gelman*), a injektirani su u triplikatu (10,0 μL) bez razdvajanja protoka (engl. *splitless mode*). Sadržaj aukubina i katalpola procijenjen je usporedbom površina pikova koji su dobiveni primjenom masenog spektrometra s površinama pikova standardnih spojeva poznatih koncentracija i izražen kao mg/g SM. Matične otopine standarada pripremljene su u vodi (0,2 mg/mL) i čuvane u hladnjaku na 4 °C tijekom četiri tjedna, bez promjene. Radne otopine bile su pripremljene neposredno prije mjerenja.

Validacija metode

Primijenjena analitička metoda validirana je u skladu s ICH smjernicama (International Conference on Harmonization, 2005). Određeni su sljedeći validacijski parametri: linearnost, preciznost, točnost, granica dokazivanja (engl. *Limit of Detection*, LOD) i granica određivanja (engl. *Limit of Quantification*, LOQ). Linearnost je procijenjena pomoću linearne regresije metodom najmanjih kvadrata koristeći sedam različitih koncentracija standardnih otopina (10, 25, 50, 75, 100, 150 i 200 μg/mL). LOD i LOQ procijenjeni su pomoću istih razrijeđenja kao i linearnost, a definirani su kao omjeri signala i šuma koji su jednaki 3, odnosno 10. Točnost metode određena je koristeći tri poznate koncentracije (25, 50 i 100 μg/mL) aukubina i katalpola, od kojih je svaka analizirana tri puta. Preciznost u istom danu (ponovljivost) i između različitih dana (srednja preciznost) određena je koristeći standardne otopine aukubina i katalpola u koncentraciji 100 μg/mL. Za procjenu ponovljivosti mjerenja su provedena šest puta unutar jednog dana, dok su za procjenu srednje preciznosti provedena tri mjerenja dnevno u tri uzastopna dana. Relativna standardna devijacija (RSD) vremena zadržavanja i površine pikova, definirane kao postotni omjer standardne devijacije i srednje vrijednosti, uzete su kao mjere preciznosti. Obrada podataka provedena je pomoću programa Microsoft Office Excel 2007 (*Microsoft*).

3.3.4. Metode istraživanja sastavnica ekstrakata

3.3.4.1. Tankoslojna kromatografija

Razdvajanje sastavnica

Razdvajanje sastavnica ekstrakata provedeno je pomoću tankoslojne kromatografije (engl. *Thin Layer Chromatography*, TLC) na staklenim ili aluminijskim (*Macherey-Nagel, Merck*) TLC silikagel pločama s fluorescentnim indikatorom (60 F_{254}), veličine 10 x 20 cm, debljine sloja 0,25 mm (staklene ploče) ili 0,20 mm (aluminijske ploče) koje su služile kao nepokretna faza, uz pokretnu fazu sastavljenu od sljedećih smjesa otapala: etil acetat (*Kemika, Carl Roth*)-metanol-voda (20:2:1, *V*/*V*/*V*) (sustav 1), kloroform (*Carlo Erba, Merck*)-metanol (*T.T.T., Merck*)-voda (61:32:7, *V*/*V*/*V*) (sustav 2), etil acetat-etil metil keton (*Kemika, Carl Roth*)-mravlja kiselina-voda (5:3:1:1, *V*/*V*/*V*/*V*) (sustav 3), etil acetat-mravlja kiselina (*Scharlau, Merck*)-ledena octena kiselina (*Alkaloid, Carl Roth*)-voda (100:11:11:26, *V*/*V*/*V*/*V*) (sustav 4) i toluen (*Carlo Erba, Carl Roth*)-etil format (*Alfa Aesar, Carl Roth*)-mravlja kiselina (5:4:1, *V*/*V*/*V*) (sustav 5). Otopine uzoraka i standarada nanošene su staklenim mikrokapilarama u volumenu 2, 3 i 5 μL (*Hirschmann Ringcaps, Brand Blaubrand*) na startnu liniju udaljenu 1,5 cm, odnosno 2 cm od donjeg ruba ploče (uzorci pripremljeni ultrazvučnom ekstrakcijom). Metanolne otopine uzoraka pripremljenih Soxhlet ekstrakcijom (liofilizata) nanošene su u koncentraciji 50 mg/mL (10 μL). Razvijanje kromatograma provedeno je u staklenim posudama s dvostrukim dnom (*Camag*), a duljina puta mobilne faze bila je 7 cm.

Detekcija sastavnica

Nakon razvijanja kromatograma ploče su prskane pomoću automatskog ili staklenog raspršivača (*Camag*) sljedećim reagensima: vanilin-sumporna kiselina (a - 1% (w/v) etanolna otopina vanilina (*Sigma-Aldrich, Fluka*), b - 5% (v/v) etanolna otopina sumporne kiseline (*Kemika, Merck*)) ili anisaldehid-sumporna kiselina (anisaldehid (*Sigma-Aldrich*)-ledena octena kiselina (*Alkaloid*)-metanol (*T.T.T.*)-koncentrirana sumporna kiselina (*Kemika*) (0,5:10:85:5, *V*/*V*/*V*/*V*)) i zagrijane 5 do 10 minuta na 100 do 105 °C u suhom sterilizatoru (*TMA SE-10*) za detekciju iridoida, odnosno s Natural products-polietilenglikol (NP/PEG) reagensom (a - 1% (w/v) metanolna otopina β-etilamino estera difenilborne kiseline (*Fluka, Carl Roth*), b - 5% (w/v) etanolna otopina polietilenglikola 4000 (*Sigma-Aldrich*)) za detekciju flavonoida i derivata fenolnih kiselina. Detekcija sastavnica provedena je pri dnevnom, odnosno UV svjetlu pri 365 nm i 254 nm (Wagner i Bladt, 1996) koristeći uređaj za vizualizaciju i pohranu kromatograma dobivenih plošnom kromatografijom (*UVP Epi Chemi Darkroom, Camag Reprostar 3*).

Identifikacija sastavnica

Identifikacija sastavnica ekstrakata provedena je na temelju usporedbe položaja i boje detektiranih zona sa zonama standardnih tvari, odnosno usporedbom sa sastavnicama koje su identificirane pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnute s fotodiodnom detekcijom i tandemskom masenom spektrometrijom. U istraživanju su korištene metanolne otopine sljedećih standarada (0,5 mg/mL): apigenin (*Fluka*), apigenin 7-*O*-glukozid (*Carl Roth*), asperulozid (*Carl Roth*), aukubin (*Fluka*), cimetna kiselina (*Schering-Kahlbaum*), ferulinska kiselina (*Carl Roth*), galna kiselina (*Merck Schuchardt*), izoverbaskozid (*ChromaDex*), katalpol (*Sigma-Aldrich*), kavena kiselina, kempferol (*Carl Roth*), klorogenska kiselina (*Carl Roth*), *p*-kumarinska kiselina (*Fluka*), kvercetin (*Carl Roth*), luteolin (*Carl Roth*), luteolin 7-*O*-glukozid (*Carl Roth*), rutin (*Carl Roth*) i verbaskozid (*HWI Analytik*).

Fitokemijski profil ekstrakata nadzemnih dijelova dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom uspoređen je s profilima osam ljekovitih biljnih vrsta, čiji su ekstrakti bili pripremljeni na jednak način kao i ekstrakti istraživanih vrsta roda *Globularia*. Uključene su sljedeće vrste: visoki jaglac (*Primula elatior* L., cvijet) i divizma (*Verbascum* sp., cvijet), koji su sakupljeni 2012. godine u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“, te obični stolisnik (*Achillea millefolium* L., zelen) (*Suban*), aleksandrijska sena (*Cassia senna* L., list) (*Suban*), crni sljez (*Malva sylvestris* L., cvijet) (*Suban*), njemačka kamilica (*Matricaria chamomilla* L., cvijet) (*Suban*), ljekoviti matičnjak (*Melissa officinalis* L., list) (*Suban*) i pasja ruža (*Rosa canina* L., plod) (*Suban*).

3.3.4.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s fotodiodnom detekcijom i tandemskom masenom spektrometrijom

Razdvajanje sastavnica

Analiza sastavnica ekstrakata pomoću spregnutog sustava tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti-fotodiodna detekcija-ionizacija elektroraspršenjem-tandemska masena spektrometrija (engl. *High-Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detection-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry*, HPLC-PDA-ESI-MS^n) provedena je nakon što su istraženi optimalni uvjeti njihovog razdvajanja na Merck-Hitachi HPLC sustavu D-7000 sastavljenom od sljedećih jedinica: sučelje D-7000, kvaterna gradijentna pumpa L-7100, automatski uzorkivač s mogućnošću programiranja L-7250, termostatirana pećnica L-7300 i DAD L-7455 uz UV detekciju pri 210 nm, odnosno

245, 285 i 330 nm. Prikupljanje i obrada podataka provedeni su pomoću programa LaChrom D-7000 HPLC System Manager v.3.1.1. (*Hitachi*).

Optimalno razdvajanje postignuto je na Zorbax SB-C_{18} koloni unutarnjeg promjera 150 mm x 2,1 mm i veličine čestica 3,5 μm (*Agilent Technologies*) u gradijentnim uvjetima koristeći dvojnu pokretnu fazu sastavljenu od 0,1% (v/v) mravlje kiseline LC-MS čistoće (*Fluka*) (otapalo A) i acetonitrila LC-MS čistoće, LiChrosolv (*Merck*) s 0,1% (v/v) mravljom kiselinom (otapalo B). Korišten je sljedeći vremenski program: 0 min, 5% B; 40 min, 30% B; 45 min, 70% B; 46 min, 5% B i 58 min, 5% B. Brzina protoka pokretne faze bila je 0,3 mL/min, a temperatura kolone 50,0 °C. Injekcijski volumen bio je 5,0 μL. Analiza sastavnica ekstrakata provedena je na 50% (v/v) metanolnim otopinama koncentracije 10 mg/mL. Iznimno, tekući metanolni ekstrakti pripremljeni maceracijom analizirani su bez dodatnog razrjeđivanja. Svi uzorci prethodno su centrifugirani 15 minuta pri 3000 okretaja/ min na 20 °C (*Eppendorf 5810 R*).

Detekcija sastavnica

Maseni spektri dobiveni su pomoću LC-PDA-ESI-MS^n analize koristeći linearnu ionsku stupicu LTQ XL povezanu s Dionex UltiMate 3000 tekućinskim kromatografom i fotodiodnim detektorom (*Thermo Fisher Scientific*). UV detekcija provedena je pri 210 nm, odnosno pri 254, 280 i 360 nm. UV/Vis spektralni podaci snimljeni su u rasponu 190 – 450 nm. Ionizacija elektroraspršenjem (ESI) provedena je pri sljedećim uvjetima: protok plina za sušenje (dušika) 8,0 L/min, temperatura kapilare 330 °C, temperatura izvora 250 °C, protok plina omotača 50 arbitrarnih jedinica, protok pomoćnog plina 10 arbitrarnih jedinica, napon izvora 4,2 kV (pozitivan način rada) ili 3 kV (negativan način rada), struja izvora 100 μA i napon kapilare 35 V (pozitivan način rada) ili -45 V (negativan način rada).

Maseni spektri snimljeni su u rasponu *m/z* 50 – 2000. MS^n spektri (MS^2 – MS^4) dobiveni su sudarom potpomognutom disocijacijom (engl. *Collision induced dissociation,* CID) iona najvećeg intenziteta u masenom spektru nižeg reda pri čemu je kao kolizijski plin korišten helij, a normalizirana kolizijska energija bila je 35%. Vrijednost najmanjeg signala bila je 500, širina izolacije prekursorskog iona 2 *m/z,* zadano stanje naboja 2, aktivacijska Q vrijednost 0,25 i aktivacijsko vrijeme 30 ms. Prikupljanje i obrada podataka provedeni su pomoću programa Thermo Xcalibur 2.2 (*Thermo Fisher Scientific*).

Identifikacija sastavnica

Prije fitokemijske analize ekstrakata sastavljena je baza podataka spojeva koji su bili prethodno izolirani iz vrsta roda *Globularia* ili čija prisutnost je zabilježena u vrstama ovog roda, koristeći bazu podataka SciFinder, odnosno dostupne literaturne podatke. Baza podataka sastojala se od sljedećih dijelova: naziv i struktura spoja, molekulska formula, relativna molekulska masa, popis vrsta roda *Globularia* kod kojih je zabilježena prisutnost navedenog spoja zajedno s dostupnim UV i MS spektralnim podacima. Postojanje objavljenih spektralnih podataka provjereno je koristeći baze podataka SciFinder® i Reaxys®.

Kromatografski i spektralni podaci, uključujući podatke o MS^n fragmentacijama (MS^1 – MS^4) zatim su zabilježeni za 29 standarada iridoida, aromatskih/fenolnih kiselina, flavonoida i feniletanoida, koji su bili odabrani za ciljanu analizu s obzirom na rezultate prethodnih istraživanja. U istraživanju su korištene metanolne otopine sljedećih standarada (0,5 mg/mL): apigenin (*Fluka*), apigenin 7-*O*-glukozid (*Carl Roth*), asperulozid (*Carl Roth*), aukubin (*Carl Roth*), benzojeva kiselina (*Fluka*), cijanidinov klorid (*Carl Roth*), cimetna kiselina (*Schering-Kahlbaum*), 5,7-dihidroksi-8-metil-flavanon (*Carl Roth*), eriodiktiol (*Carl Roth*), eriodiktiol 7-*O*-glukozid (*Carl Roth*), ferulinska kiselina (*Carl Roth*), genipozid (*ChromaDex*), izokvercitrin (*Carl Roth*), izoverbaskozid (*ChromaDex*), katalpol (*Carl Roth*), kavena kiselina (*Sigma-Aldrich*), kempferol (*Carl Roth*), klorogenska kiselina (*Fluka*), krizoeriol (*Carl Roth*), *p*-kumarinska kiselina (*Fluka*), kvercetin (*Carl Roth*), luteolin (*Carl Roth*), luteolin 7-*O*-glukozid (*Carl Roth*), protokatehinska kiselina (*Carl Roth*), rutin (*Carl Roth*), salicilna kiselina (*Caesar and Lorentz*), sinapinska kiselina (*Carl Roth*), siringinska kiselina (*Carl Roth*) i verbaskozid (*HWI Analytik*). Na temelju usporedbe njihovog vremena zadržavanja te UV, MS i MS/MS spektara s istim parametrima standardnih tvari provedena je identifikacija manjeg broja sastavnica ekstrakata. Preostale sastavnice identificirane su na temelju usporedbe njihovih kromatografskih i spektralnih svojstava s literaturnim podacima, odnosno na temelju detaljnog pregleda redoslijeda izlaženja iz kolone i uočenih obrazaca fragmentacije u kombinaciji s podacima o spojevima prethodno zabilježenim kod vrsta roda *Globularia* i/ili u usporedbi s drugim identificiranim spojevima prisutnim u ekstraktima.

Relativne količine pojedinih sastavnica početno su procijenjene na temelju usporedbe površine pikova u HPLC-MS kromatogramima baznih pikova u kombinaciji s literaturnim podacima o količinama spojeva koji su prethodno izolirani iz vrsta roda *Globularia*. Relativne količine spojeva čiji su se kromatografski pikovi preklopili bilo je moguće okvirno predvidjeti na temelju visoke relativne zastupljenosti njihovih glavnih prekursorskih iona. Usporedba

masenih spektara drugog reda dobivenih iz prekursorskih iona te popratnih adukata manje relativne zastupljenosti u masenom spektru prvog reda, služile su kao provjera da se ioni velike relativne zastupljenosti mogu pripisati odvojenim spojevima, odnosno da nisu rezultat istovremene visoke relativne zastupljenosti iona koji pripadaju istoj sastavnici (primjerice molekulskog iona i adukta s mravljom kiselinom).

Usporedbi glavnih sastavnica 15 različitih populacija istraživanih vrsta prethodila je priprema podataka pomoću programa MZmine v.2.14.2 (Pluskal i sur., 2010) koja je uključivala sljedeće korake: unos sirovih podataka (Thermo .raw format), detekciju masa iona (centroid način rada: razina šuma 10^4), gradnju kromatograma (najmanji vremenski raspon signala 0,1 min, najmanja visina signala 10^5, tolerancija *m/z* 0,1 ili 5,0 ppm), rastavljanje kromatograma na pojedinačne kromatografske pikove (prekid pri baznoj liniji: najmanja visina signala 10^5, raspon trajanja pika 0,0 – 2,6 min, razina bazne linije 10^4), poravnanje pikova (zajedničko poravnanje: tolerancija *m/z* 0,2 ili 5,0 ppm, težina za *m/z* 1, tolerancija vremena zadržavanja 0,4 min, težina za vrijeme zadržavanja 50, potrebno isto stanje naboja) i popunjavanje praznina (traženje pikova: tolerancija intenziteta 30%, tolerancija *m/z* 0,05 ili 5,0 ppm, tolerancija vremena zadržavanja 0,2 min). U dobivenom popisu poravnatih pikova koji su bili karakterizirani vremenom zadržavanja i omjerom *m/z*, s popunjenim prazninama, ručno su pregledani i uklonjeni izotopi i adukti. Vrijednosti površine pikova prebačene su u .csv format radi provođenja multivarijatne analize podataka. Pikovi apsolutne površine manje od $5x10^4$ smatrani su šumom te su u tabličnom prikazu naznačeni kao odsustvo pojedinih sastavnica, a dobivene apsolutne površine glavnih pikova prikazane su umanjeno 10^5 puta.

3.3.5. Metode istraživanja lakohlapljivih sastavnica

3.3.5.1. Plinska kromatografija spregnuta s plamenoionizacijskom detekcijom i masenom spektrometrijom

Razdvajanje i detekcija sastavnica

Sastav lakohlapljivih spojeva određen je pomoću analize spregnutim sustavom plinski kromatograf s plamenoionizacijskom detekcijom (engl. *Gas Chromatography-Flame Ionization Detection*, GC-FID) 7890A i masenom spektrometrijom (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS) 5975C (*Agilent Technologies*) prema prethodno opisanim metodama (Jerković i Marijanović, 2010; Jerković i sur., 2012). Razdvajanje lakohlapljivih sastavnica provedeno je na HP-5ms (5%-fenil-metilpolisiloksan) koloni dužine 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 mm i debljine sloja 0,25 mm (*Agilent Technologies*). Temperaturni program pećnice uključivao je: zagrijavanje 2 minute

na 70 °C, porast temperature do 200 °C uz brzinu promjene temperature od 38 °C/min te razdvajanje na konačnoj postignutoj temperaturi kroz 15 minuta. Kao plin nositelj korišten je helij uz brzinu protoka 1 mL/min. Temperatura injektora bila je 250 °C, a temperatura plamenoionizacijskog detektora 300 °C. Uzorci su injektirani u volumenu od 1 μL uz omjer razdjeljenja 1:50 (engl. *split mode*). Ionizacija elektronima (engl. *Electron ionization*, EI) u masenom detektoru postignuta je kod 70 eV, a temperatura ionskog izvora bila je 280 °C. Maseni spektri snimljeni su u rasponu *m/z* 30 – 300.

Identifikacija sastavnica

Identifikacija pojedinih sastavnica temeljila se na usporedbi njihovih indeksa zadržavanja, koji su određeni na temelju vremena zadržavanja homolognog niza *n*-alkana (C_9-C_{25}), s literaturnim podacima te usporedbe njihovih masenih spektara s onima standardnih tvari ili spojeva navedenih u bazama masenih spektara NIST 08 i Wiley 275. Udio pojedinih sastavnica (%) procijenjen je normalizacijskom metodom (bez korekcijskih faktora) iz površine pikova koji su dobiveni pomoću plamenoionizacijskog detektora i izražen kao srednja vrijednost dva mjerenja.

3.3.6. Statistička obrada rezultata istraživanja fitokemijskog profila

3.3.6.1. Sadržaj sekundarnih metabolita

Mjerenja sadržaja sekundarnih metabolita, uključujući sadržaj aukubina i katalpola, provedena su u triplikatu, a dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija za svaku populaciju, odnosno vrstu. Statistički značajne razlike između vrsta i biljnih dijelova procijenjene su analizom prosječnih vrijednosti za svaku od vrsta pomoću dvosmjerne analize varijance (ANOVA), nakon koje je slijedio Bonferroni *post-hoc* test. Statistički značajne razlike između vrsta i lokacija, odnosno metoda ekstrakcije procijenjene su pomoću jednosmjerne, odnosno dvosmjerne analize varijance (ANOVA), nakon koje je slijedio Tukeyev *post-hoc* test. Statistički značajna razlika između dobivenih rezultata i literaturnih podataka za vrstu *G. alypum* procijenjena je pomoću t-testa.

Povezanost sadržaja različitih sekundarnih metabolita u pojedinim biljnim dijelovima sa srednjim mjesečnim temperaturama i mjesečnim količinama oborina (prosjek za mjesec u kojem je sakupljen biljni materijal i prethodna tri mjeseca), kao i međusobna povezanost sadržaja sekundarnih metabolita, procijenjena je pomoću Pearsonovog koeficijenta korelacije (*r*).

Razina značajnosti u svim testovima bila je $\alpha = 0,05$. Obrada podataka koji su vezani uz različite biljne dijelove provedena je pomoću programa GraphPad Prism 5.03 for Windows (*GraphPad Software*), dok su ostali podaci obrađeni pomoću novije verzije istog programa (6.01).

3.3.6.2. Sastavnice ekstrakata

U svrhu usporedbe odnosa između različitih vrsta i populacija, 42 glavne sastavnice metanolnih ekstrakata pripremljenih maceracijom nadzemnih dijelova podvrgnute su analizi glavnih komponenti (engl. *Principal component analysis*, PCA) pomoću programa R v.3.2.4 (R Development Core Team, 2014), pri čemu su korišteni paketi ggfortify (Horikoshi i Tang, 2016; Tang i sur., 2016) i cluster (Maechler i sur., 2017). Analiza podataka provedena je koristeći funkcije scale i pam, a rezultati su prikazani pomoću funkcije autoplot. Iste sastavnice podvrgnute su hijerarhijskoj klaster analizi (engl. *Hierarchical cluster analysis*, HCA), koristeći Wardovu metodu, u kojoj je kao mjera različitosti između uzoraka korištena kvadratna euklidska udaljenost, a koja je provedena pomoću programa SPSS Statistics v.23.0 (*IBM*). Za potrebe klaster analize provedena je normalizacija varijabli preslikavanjem u standardizirane *z*-vrijednosti.

3.3.6.3. Lakohlapljive sastavnice

U svrhu usporedbe odnosa između različitih vrsta i populacija, 22 lakohlapljive sastavnice nadzemnih dijelova čiji je sadržaj iznosio najmanje 1,6% u barem jednom od šest istraživanih uzoraka sabranih 2012. godine podvrgnute su analizi glavnih komponenti pomoću programa SPSS Statistics v.22.0 (*IBM*). Isti su rezultati, zajedno s rezultatima dobivenim za uzorak vrste *G. alypum* s područja Konavoskih stijena (2014), odnosno za uzorke dviju alžirskih populacija iste vrste (Ramdani i sur., 2014), podvrgnuti hijerarhijskoj klaster analizi koristeći Wardovu metodu, u kojoj je kao mjera različitosti između uzoraka korištena kvadratna euklidska udaljenost, a koja je provedena pomoću programa SPSS Statistics v.23.0 (*IBM*). Za potrebe klaster analize provedena je normalizacija varijabli preslikavanjem u standardizirane *z*-vrijednosti.

3.4. Metode istraživanja bioloških učinaka

3.4.1. Metode istraživanja antidijabetskog učinka

Istraživanja antidijabetskog učinka provedena su na metanolnim ekstraktima listova vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013), *G. cordifolia* (Alan, 2013), *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013) i *G. punctata* (Grobničko polje, 2013) dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom.

3.4.1.1. Inhibicija aktivnosti α-glukozidaze

Inhibicija aktivnosti α-glukozidaze procijenjena je spektrofotometrijskom metodom s *p*-nitrofenil α-D-glukopiranozidom (Tiwari i sur., 2011), koja je izmijenjena na način kako opisuju Bljajić i sur. (2016). U 100 µL uzorka koncentracije 0,5 mg/mL ili 1,0 mg/mL (otopljeno u 2% (v/v) dimetilsulfoksida, DMSO), dodano je 50 µL α-glukozidaze izolirane iz vrste *Saccharomyces cerevisiae*, tip I (*Sigma-Aldrich*) (1,0 U/mL u 0,1 M PBS, pH 6,8) te predinkubirano 10 minuta pri 37 °C. Reakcija je započeta dodatkom 50 µL supstrata, 5 mM *p*-nitrofenil α-D-glukopiranozida (*Sigma-Aldrich*) u 0,1 M PBS, pH 6,8. Apsorbancija oslobođenog *p*-nitrofenola mjerena je tijekom 5 minuta na 405 nm pomoću čitača mikrotitarskh pločica Victor3 1420 Multilabel Counter (*Perkin Elmer*) uz slijepu probu uzorka, koja je umjesto supstrata sadržavala 50 µL 0,1 M PBS. Rezultati su izraženi kao postotak aktivnosti, pri čemu je kao 100% aktivnost uzeta srednja vrijednost razlike apsorbancija/min negativne kontrole (2% (v/v) DMSO). Kao pozitivna kontrola korištena je akarboza (*Sigma-Aldrich*).

3.4.1.2. Uzgoj i tretman stanica Hep G2 u kulturi

Stanice humanog hepatocelularnog karcinoma Hep G2 (*European Collection of Authenticated Cell Cultures*, ECACC) uzgajane su u kompletnom minimalnom esencijalnom hranjivom mediju (engl. *Minimum Essential Medium*, MEM) (*Gibco*), uz dodatak 10% (v/v) fetalnog goveđeg seruma (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS) (*Biowest*), 20 IU/mL penicilina i 20 µg/mL streptomicina (*Gibco*), u inkubatoru Heracell (*Heraeus*) na 37 °C u struji zraka s 5% CO_2, relativne vlažnosti 95%. Stanice su presađivane dva puta tjedno, nakon postizanja konfluentnosti veće od 80%. Prilikom presađivanja stanicama je vakuum sisaljkom uklonjen hranjivi medij, nakon čega su isprane s fosfatnim puferom (engl. *Phosphate Buffered Saline*, PBS), sastavljenim od 137 mM NaCl (*Merck*), 2,7 mM KCl (*Kemika*), 4,3 mM Na_2HPO_4 x 7 H_2O (*Kemika*) i 1,4 mM KH_2PO_4 (*Kemika*), i 1 mM Na_2EDTA (*Sigma-Aldrich*) u fiziološkoj

otopini te im je dodana 0,05% (w/v) otopina tripsina-EDTA (*Gibco*). Nakon 5 minuta inkubacije na 37 °C (*Heraeus Heracell*), stanice su resuspendirane u 5 mL kompletnog MEM i centrifugirane 10 minuta pri 1200 okretaja/min (*Heraeus Biofuge Stratos*). Nadsloj je odvojen odlijevanjem, a talog ponovno suspendiran i inkubiran u svježem mediju.

Prije obrade biljnim ekstraktima, $1{,}67 \times 10^6$ stanica nasađeno je po bunariću u plastične pločice sa šest bunarića (*BD Falcon*) u medij bez FBS. Stanice su izbrojane pod svjetlosnim mikroskopom (*Leitz Diavert*) pomoću Bürker-Türkove komorice nakon inkubacije 50 μL suspenzije stanica s 50 μL 0,04% (v/v) otopine tripanskog modrila (*Gibco*) kroz 10 minuta. Nakon inkubacije stanica 24 sata u inkubatoru na 37 °C, medij je uklonjen vakuum sisaljkom, a stanice su isprane s PBS. Stanicama su zatim dodana 2 mL 20 mM D-(+)-glukoze (*Kemika*) u MEM, čime su postignuti hiperglikemijski uvjeti (pozitivna kontrola), odnosno 2 mL 20 mM D-(+)-glukoze i ekstrakata glavulja u rasponu koncentracija 0,5 mg/mL i 1,0 mg/mL (otopljenih u mediju MEM). Kao negativna kontrola služile su stanice kojima su dodana 2 mL 5,56 mM D-(+)-glukoze u MEM. Prije upotrebe, sve su otopine filtrirane kroz sterilne filtre Nalgene veličine pora 0,2 μm (*Sigma-Aldrich*) te su stanice tretirane u triplikatu. Nakon tretmana, stanice su inkubirane 24 sata u inkubatoru na 37 °C. Nakon inkubacije medij je odvojen od stanica, a one su isprane s 2 mL PBS te su lizirane u 500 μL 1% (v/v) Tween (*Kemika*) u PBS djelovanjem ultrazvuka snage 4 W (*Cole-Parmer 4710*) kroz 15 sekundi i centrifugirane 20 minuta pri 14 000 okretaja/min na 4 °C. Nadsloj je odvojen i alikvotiran te pohranjen na -80 °C do daljnje upotrebe. Iznimno, za potrebe provođenja MTT testa 2×10^5 stanica nasađeno je po bunariću u plastičnu pločicu s 96 bunarića (*BD Falcon*) te one nakon inkubacije nisu lizirane.

3.4.1.3. Koncentracija ukupnih proteina u lizatu stanica

Koncentracija proteina u lizatima stanica određena je fluorimetrijskom metodom koristeći komercijalni komplet Qubit Protein Assay Kit (*Invitrogen*) prema uputama proizvođača. Vrijednosti fluorescencije očitane su nakon 15 minuta inkubacije pomoću Qubit fluorimetra (*Invitrogen*), koji je prethodno bio baždaren trima različitim koncentracijama standarda goveđeg serumskog albumina (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA). Koncentracija ukupnih proteina u lizatu stanica izražena je u mg/mL.

3.4.1.4. Sadržaj slobodnih tiolnih skupina (–SH skupina) u lizatu stanica

Koncentracija slobodnih tiolnih skupina (–SH) određena je spektrofotometrijski pomoću Ellmanovog reagensa (5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzojeve kiseline), DTNB) (Ellman, 1958). Reakcijska smjesa sadržavala je 100 µL lizata stanica, 150 µL 0,25 M Tris-HCl pufera, pH 8,2, s 20 mM EDTA, 10 µL 10 mM otopine Ellmanovog reagensa (*Sigma-Aldrich*) u apsolutnom metanolu i 740 µL apsolutnog metanola. Apsorbancija je mjerena nakon 20 minuta inkubacije i 10 minuta centrifugiranja pri 3000 okretaja/min na 412 nm (*Cecil Aquarius CE 7200*) uz slijepu probu reagensa (umjesto lizata stanica korištena je destilirana voda) i slijepu probu uzorka (umjesto Ellmanovog reagensa korištena je destilirana voda). Koncentracija slobodnih tiolnih skupina (µmol/L) dobivena je dijeljenjem umnoška apsorbancije i faktora razrjeđenja uzorka s mikromolarnim apsorpcijskim koeficijentom 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline pri 412 nm (0,01415 μmol^{-1} L cm^{-1}). Rezultati su izraženi kao µmol –SH skupina/mg proteina.

3.4.1.5. Sadržaj reduciranog glutationa (GSH) u lizatu stanica

Koncentracija reduciranog glutationa (GSH) određena je spektrofotometrijskom metodom s DTNB (*Sigma-Aldrich*) (Baker i sur., 1990). Određivanju je prethodla deproteinizacija uzorka dodatkom 100 µL 5% (v/v) trikloroctene kiseline (*Sigma-Aldrich*) u 300 µL uzorka te centrifugiranje na 3000 okretaja/min kroz 10 minuta na sobnoj temperaturi. U 100 µL odvojenog nadsloja dodano je 550 µL 0,3 M PBS, pH 7,4, pripremljenog miješanjem 0,3 M Na_2HPO_4 x 12 H_2O i 0,3 M NaH_2PO_4 x 2 H_2O, te 50 µL 1 mM DTNB u 0,3 M PBS, pH 7,4. Nastanak 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline mjeren je na 412 nm (*Cecil Aquarius CE 7200*) uz slijepu probu reagensa. Koncentracija reduciranog glutationa (µmol/L) dobivena je dijeljenjem umnoška apsorbancije i faktora razrjeđenja uzorka s mikromolarnim apsorpcijskim koeficijentom 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline pri 412 nm (0,01415 μmol^{-1} L cm^{-1}). Rezultati su izraženi kao µmol GSH/mg proteina.

3.4.1.6. Aktivnost glutation peroksidaze (GPx) u lizatu stanica

Aktivnost glutation peroksidaze (GPx) određena je spektrofotometrijski pomoću komercijalno dostupnog kompleta Glutathione Peroxidase Activity Colorimetric Assay Kit (*Biovision*) prema uputama proizvođača. GPx reducira kumen hidroperoksid pri čemu dolazi do pretvaranja reduciranog oblika glutationa (GSH) u njegov oksidirani oblik (GSSG). Pod utjecajem glutation reduktaze dobiveni GSSG ponovno se reducira u GSH, uz utrošak reduciranog nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH), čije smanjenje se prati na

340 nm (*Victor3 1420 Multilabel Counter*). Aktivnost GPx (mU/mL) izračunata je pomoću baždarne krivulje standarda NADPH te je izražena kao U/mg proteina.

3.4.1.7. Aktivnost glutation S-transferaze (GST) u lizatu stanica

Aktivnost GST određena je spektrofotometrijskom metodom s 1-kloro-2,4-dinitrobenzenom (CDNB) (Habig i Jakoby, 1981). Reakcijska smjesa sadržavala je 1 mM kosupstrata GSH (*Sigma-Aldrich*) i 1 mM etanolnu otopinu supstrata CDNB (*Sigma-Aldrich*) u 50 mM 4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etansulfonskoj kiselini (HEPES), pH 7,4 (*Sigma-Aldrich*). Stvaranje GSH konjugata s CDNB praćeno je 75 sekundi pri 37 °C na 340 nm na poluautomatskom biokemijskom analizatoru (*Trace 30*) uz slijepu probu reagensa. Aktivnost GST (U/L) dobivena je iz umnoška razlike apsorbancija/min i faktora razrjeđenja uzorka podijeljenog s mikromolarnim apsorpcijskim koeficijentom nastalog GS-DNB konjugata pri 340 nm (0,0096 μmol^{-1} L cm^{-1}) i izražena kao U/mg proteina.

3.4.1.8. Vijabilnost stanica Hep G2

Vijabilnost stanica Hep G2 procijenjena je pomoću dva testa: određivanjem aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH) u mediju iznad stanica, koja se koristi kao pokazatelj oštećenja stanične membrane, te mjerenjem metaboličke aktivnosti stanica pomoću 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijevog bromida (MTT).

LDH test

LDH aktivnost u mediju određena je spektrofotometrijski pomoću reagensa za određivanje LDH (*Dijagnostika*) prema uputama proizvođača. U 15 µL uzorka dodaje se 900 µL reagensa sastavljenog od 100 mM Tris pufera, 7 mM nikotinamid adenin dinukleotida (NAD^+), 50 mM litijevog laktata i 120 mM KCl, pH 9,0 pri 20 °C. U prisutnosti LDH dolazi do oksidacije L-laktata u piruvat pri čemu se NAD^+ reducira u NADH, čija apsorbancija je očitana nakon 30 i 60 s pri 37 °C na 340 nm (*Trace 30*) uz destiliranu vodu kao slijepu probu. Aktivnost LDH (U/L) dobivena je iz umnoška razlike apsorbancija/min i faktora razrjeđenja uzorka podijeljenog s mikromolarnim apsorpcijskim koeficijentom NADH pri 340 nm (0,0063 μmol^{-1} L cm^{-1}). Rezultati su izraženi kao postotak vijabilnosti stanica, pri čemu je kao 100% vrijednost vijabilnosti uzeta srednja vrijednost aktivnosti LDH negativne kontrole.

MTT test

Metabolička aktivnost stanica određena je MTT testom (Yang i sur., 2013). Nakon 24 sata tretmana s prethodno navedenim koncentracijama ekstrakata glavulja, hranjivi medij je uklonjen, stanice su dva puta isprane s puferom PBS i potom inkubirane u hranjivom mediju MEM kojemu je dodana matična otopina MTT (*Sigma-Aldrich*) u PBS koncentracije 5 mg/mL (50 µL matične otopine na 1 mL medija). Otopina MTT prije upotrebe je filtrirana kroz sterilne filtre veličine pora 0,2 µm. Nakon inkubacije od 4 sata na 37 °C, otopina MTT je uklonjena, stanice su dva puta isprane sa 100 µL PBS, a dobiveni kristali formazana otopljeni su u DMSO (*Sigma-Aldrich*). Apsorbancija je mjerena na 595 nm (*Victor3 1420 Multilabel Counter*). Rezultati su izraženi kao postotak vijabilnosti stanica, pri čemu je kao 100% vrijednost vijabilnosti uzeta srednja vrijednost apsorbancija negativne kontrole.

3.4.2. Metode istraživanja antioksidativnog učinka

Istraživanja antioksidativnog učinka provedena su na ultrazvučnom ekstrakcijom dobivenim metanolnim ekstraktima različitih biljnih dijelova uzoraka sakupljenih tijekom 2012. i 2013. godine te ekstraktima nadzemnih dijelova vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013), *G. cordifolia* (Alan, 2013), *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013) i *G. punctata* (Grobničko polje, 2013) dobivenim dekokcijom, ultrazvučnom ekstrakcijom, maceracijom i Soxhlet ekstrakcijom.

3.4.2.1. UV/Vis spektrofotometrija

Antioksidativni učinak procijenjen je određivanjem antiradikalne aktivnosti ekstrakata odvojenih biljnih dijelova uzoraka sakupljenih tijekom 2012. i 2013. godine pomoću Varian Cary 50 Bio UV/Vis spektrofotometra (*Varian Inc*.), odnosno pomoću PG Instruments T70 UV-Vis spektrofotometra (*PG Instruments Limited*) kod ostalih uzoraka.

DPPH test

Antiradikalna aktivnost procijenjena je pomoću Bloisove metode (1958) s otopinom slobodnog radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH) prema djelomično izmijenjenom postupku Thetsrimuang i sur. (2011). Matična otopina DPPH (*Fluka*) u metanolu (0,1 mM) (*T.T.T.*) razrijeđena je metanolom do apsorbancije 0,70 ± 0,02. U 2 mL ove otopine dodano je 10 µL uzorka te je nakon 30 minuta inkubacije u mraku mjerena apsorbancija pri 517 nm uz metanol kao slijepu probu. Rezultati određivanja antiradikalne aktivnosti izraženi su kao mg ekvivalenta galne kiseline (*Merck Schuchardt*) (EGK)/g SM (usporedba između različitih

biljnih dijelova) ili kao mg ekvivalenta troloksa (*Acros Organics*) (ET)/g SM (usporedba između različitih metoda ekstrakcije, osim Soxhlet ekstrakcije), odnosno kao vrijednosti koncentracija ekstrakata koje smanjuju apsorbanciju DPPH radikala za 50% (IC_{50}) (usporedba između Soxhlet ekstrakata).

ABTS test

Hvatanje slobodnog radikala 2,2′-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS) određeno je prema metodi Re i sur. (1999) s nekim izmjenama. Aktivirana otopina $ABTS^{\bullet+}$ radikal kationa pripremljena je miješanjem otopina diamonijeve soli ABTS (*Sigma-Aldrich*) i kalijevog peroksodisulfata (*Kemika*) do konačnih koncentracija 7 mM i 2,45 mM te inkubacijom na sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C) kroz najmanje 16 sati. Radna otopina reagensa dobivena je razrjeđivanjem matične otopine do apsorbancije 0,70 ± 0,02. Pad apsorbancije mjeren je pri 734 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu 1 minutu nakon dodatka 10 µL uzorka u 2 mL otopine aktiviranog radikala. Rezultati određivanja antiradikalne aktivnosti izraženi su kao mg ekvivalenta galne kiseline (*Merck Schuchardt*) (EGK)/g SM (usporedba između različitih biljnih dijelova) ili kao mg ekvivalenta troloksa (*Acros Organics*) (ET)/g SM (usporedba između različitih metoda ekstrakcije).

3.4.2.2. Tankoslojna kromatografija

Razdvajanje sastavnica

Sastavnice metanolnih otopina Soxhlet ekstrakata (20 mg/mL) razdvojene su na staklenim TLC silikagel pločama s fluorescentnim indikatorom (60 F_{254}) (*Merck*), veličine 20 x 20 cm, debljine sloja 0,25 mm, uz pokretnu fazu sastavljenu od smjese otapala etil acetat (*Kemika*)-mravlja kiselina (*Scharlau*)-ledena octena kiselina (*Alkaloid*)-voda (100:11:11:26, *V*/*V*/*V*/*V*) (sustav 4) (Wagner i Bladt, 1996). Otopine uzoraka i standarada nanošene su staklenim mikrokapilarama u volumenu 20 µL (*Brand Blaubrand*) na startnu liniju udaljenu 2,5 cm od donjeg ruba ploče. Razvijanje kromatograma provedeno je u staklenim posudama s dvostrukim dnom (*Camag*), a duljina puta mobilne faze bila je 15 cm.

Detekcija antioksidativnih sastavnica

Nakon razvijanja kromatograma ploče su prskane 0,05% (w/v) metanolnom otopinom DPPH (*Fluka*) (Wang i sur., 2012) nakon čega su sastavnice koje posjeduju antioksidativni učinak detektirane pri dnevnom svjetlu kao bijele do žućkaste zone na svjetloružičastoj pozadini.

Identifikacija antioksidativnih sastavnica

Identifikacija sastavnica koje posjeduju antioksidativni učinak provedena je na temelju usporedbe položaja detektiranih zona sa zonama dobivenim u istom sustavu razdvajanja (sustav 4), a koje su vidljive pri UV svjetlu 365 nm (*UVP Epi Chemi Darkroom*) nakon prskanja NP/PEG reagensom (*Fluka*/*Sigma-Aldrich*) (Wagner i Bladt, 1996), odnosno usporedbom sa sastavnicama koje su prethodno identificirane pomoću tankoslojne kromatografije (sustav 3) i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnute s fotodiodnom detekcijom i tandemskom masenom spektrometrijom, kao i usporedbom sa standardom verbaskozida (*HWI Analytik*).

3.4.3. Metode istraživanja protuupalnog učinka

Istraživanja protuupalnog učinka provedena su na metanolnim ekstraktima nadzemnih dijelova vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013), *G. cordifolia* (Alan, 2013), *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013) i *G. punctata* (Grobničko polje, 2013) dobivenim Soxhlet ekstrakcijom. Matične otopine uzoraka (c = 20 mg/mL) pripremljene su otapanjem u apsolutnom etanolu (*Gram-Mol*) uz pomoć ultrazvuka (UZV) (*Bandelin Sonorex Super RK 255 H*) kroz 15 minuta i razrijeđene u omjeru 1:20 neposredno prije provođenja pokusa.

3.4.3.1. Priprema otopina pufera i reagensa za PGE_2 i TMPD test

Indometacin (*Acros Organics*) je otopljen u apsolutnom etanolu (*Gram-Mol*) pomoću UZV (*Bandelin Sonorex Super RK 255 H*) (15 min) (c = 1,0 mM). Matična otopina indometacina potom je razrijeđena s etanolom u omjeru 1:10 te je iz dobivenog razrjeđenja pripremljeno pet dvostrukih serijskih razrjeđenja.

Adrenalin bitartarat (*Acros Organics*) otopljen je uz vorteksiranje u 0,1 M Tris-HCl puferu, pH 8,0 (*Santa Cruz Biotechnology*) (c = 72 mM).

Enzim ciklooksigenaza-I (COX-I) izoliran iz ovce (*Sigma-Aldrich*) razrijeđen je na ledu u puferskoj smjesi koja se sastojala od 80 mM Tris-HCl pufera, pH 8,0 (*Santa Cruz Biotechnology*), 0,1% (v/v) Tween 20 (*Biolife Italiana*) i 300 μM natrijevog dietilditiokarbamata trihidrata (DDC) (*VWR International*) i alikvotiran u plastične tubice od kojih je svaka sadržavala 12 U/60 μL enzima. Alikvotirani enzim razrijeđen je na ledu sto puta u 0,1 M Tris-HCl puferu, pH 8,0, neposredno prije provođenja PGE_2 testa (c = 2 U/mL). Kod TMPD testa, enzim je razrijeđen na ledu izravno u 0,1 M Tris-HCl puferu, pH 8,0 (c = 200 U/mL).

Matična otopina hematina (*Sigma-Aldrich*) (c = 1 mM) pripremljena je otapanjem u 500 μL 0,01 M NaOH (*Kemika*) uz vorteksiranje i primjenu UZV (30 min) te potom deseterostrukim razrjeđivanjem u 0,1 M Tris-HCl puferu, pH 8,0 (*Santa Cruz Biotechnology*). Pripremljena otopina je prije primjene razrijeđena još deset puta s istim puferom.

Arahidonska kiselina (*Cayman Chemical Company*) (25 mg/100 μL etanola) razrijeđena je na ledu s apsolutnim etanolom (*Gram-Mol*) (c = 2 mM) neposredno prije provođenja pokusa te dodatnih dvadeset puta prije provođenja PGE_2 testa.

Otopina *N*,*N*,*N'*,*N'*-tetrametil-*p*-fenilendiamin (TMPD) (*Aldrich*) pripremljena je otapanjem u DMSO (*Carlo Erba*) uz vorteksiranje i 15-minutno djelovanje UZV, nakon čega je dodatno razrijeđena s DMSO (c = 100 μM).

Mravlja kiselina (*Scharlau*) razrijeđena je s destiliranom vodom u omjeru 1:10.

3.4.3.2. Inhibicija ciklooksigenazne aktivnosti COX-I (PGE_2 test)

Inhibicija ciklooksigenazne aktivnosti COX-I istražena je spektrofotometrijski prema ranije razvijenom protokolu koji koristi kompetitivnu enzim-imunokemijsku (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) metodu za određivanje prostaglandina E_2 (PGE_2) (Fiebich i sur., 2005; Reiniger i Bauer, 2006). Istraživanje se sastojalo od dva koraka: u prvom se odvijala sinteza prostaglandina iz arahidonske kiseline u prisutnosti enzima COX-I, a u drugom kvantifikacija sintetiziranih prostaglandina.

Deset μL uzorka/standarda indometacina/etanola predinkubirano je 5 minuta na sobnoj temperaturi u smjesi koja se sastojala od 20 μL 0,1 M Tris-HCl pufera, pH 8,0, 50 μL 72 mM adrenalin bitartarata, 100 μL 2 U/mL enzima COX-I i 10 μL 100 μM kofaktora enzima hematina. Reakcija je započeta dodatkom 10 μL 100 μM supstrata arahidonske kiseline. Nakon 20 minuta inkubacije na 37 °C na orbitalnoj tresilici-inkubatoru Grant-bio ES-20 (*Grant instruments*) reakcija je zaustavljena dodatkom 10 μL 10% (v/v) mravlje kiseline. Reakcija je provedena u duplikatu za sve uzorke. Određivanje prostaglandina provedeno je pomoću prostaglandin E_2 EIA monoklonskog kompleta (*Cayman Chemical Company*) prema uputama proizvođača. Reakcijske smjese nastale u prvom reakcijskom koraku za sve su uzorke, nakon prethodnog razrjeđivanja u EIA puferu u omjeru 1:20, nanesene u duplikatu na mikrotitarsku pločicu obilježenu IgG-om. Nakon 18 sati inkubacije uzoraka s acetilkolinesterazom obilježenim kozjim poliklonskim anti-mišjim PGE_2 (engl. *PGE_2 tracer*) i PGE_2 monoklonskim protutijelom u EIA puferu na 4 °C, sve jažice su isprane pet puta s 200 μL pufera za ispiranje, pri čemu su pražnjene uz potresanje na staničevini. U ispražnjene je jažice zatim dodano 200 μL svježe pripremljenog Ellmanovog reagensa te je nakon

90 minuta očitana apsorbancija pri 405 nm na automatskom čitaču mikrotitarskih pločica iEMS Reader MF tip 1401 (*Labsystems*), koja je korigirana s obzirom na apsorbanciju pri 620 nm.

Od dobivenih apsorbancija oduzeta je apsorbancija slijepe probe (apsorbancija Ellmanovog reagensa) i apsorbancija nespecifičnog vezanja na mikrotitarsku pločicu obilježenu kozjim poliklonskim anti-mišjim IgG-om (apsorbancija vezanja bez PGE_2 monoklonskog protutijela). Iz apsorbancija očitanih za uzorke/standard indometacin i etanol izračunat je postotak vezanja, koji je bio obrnuto proporcionalan koncentraciji prostaglandina u uzorcima, izračunatoj iz baždarne krivulje standarda prostaglandina E_2. Postotak inhibicije COX-I dobiven je iz omjera razlike koncentracija prostaglandina nastalih u etanolu i u uzorcima te koncentracije prostaglandina u etanolu, pomnoženog sa sto.

3.4.3.3. Inhibicija peroksidazne aktivnosti COX-I (TMPD test)

Inhibicija peroksidazne aktivnosti COX-I istražena je spektrofotometrijski koristeći TMPD metodu Copelanda i suradnika (1994), uz neke izmjene. Deset μL uzorka/standarda indometacina/etanola predinkubirano je 10 minuta na sobnoj temperaturi u smjesi koja se sastojala od 60 μL 0,1 M Tris-HCl pufera, pH 8,0, 100 μL 200 U/mL enzima COX-I, 10 μL 100 μM kofaktora enzima hematina i 10 μL 2 mM kosupstrata TMPD. Reakcija je započeta dodatkom 10 μL 2 mM supstrata arahidonske kiseline te je nakon 20 s izmjerena apsorbancija pri 620 nm na automatskom čitaču mikrotitarskih pločica iEMS Reader MF tip 1401 (*Labsystems*).

Od dobivenih apsorbancija oduzeta je apsorbancija slijepe probe (reakcijska smjesa bez arahidonske kiseline) i nespecifična apsorbancija do koje dolazi zbog autooksidacije TMPD (reakcijska smjesa bez COX-I). Postotak inhibicije COX-I dobiven je iz omjera razlike apsorbancije etanola i uzoraka te apsorbancije etanola, pomnoženog sa sto.

3.4.4. Metode istraživanja antimikrobnog učinka

Istraživanja antimikrobnog učinka provedena su na metanolnim ekstraktima nadzemnih dijelova vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013), *G. cordifolia* (Alan, 2013), *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013) i *G. punctata* (Grobničko polje, 2013) dobivenim Soxhlet ekstrakcijom. Matične otopine uzoraka (c = 50 mg/mL) pripremljene su otapanjem u destiliranoj vodi uz pomoć ultrazvuka (*Bandelin Sonorex Super RK 255 H*) i filtrirane kroz sterilne Chromafil celuloza acetatne filtre veličine pora 0,2 μm (*Macherey-Nagel*).

3.4.4.1. Uzgoj bakterijskih kultura i priprema inokuluma

Istraživanje antimikrobnog učinka provedeno je na sljedećim bakterijskim kulturama: *Bacillus cereus* ATCC (*American Type Culture Collection*) 11778, *B. subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i *S. aureus* ATCC 29213 (Gram-pozitivne bakterije), odnosno *Escherichia coli* ATCC 10536, *Klebsiella pneumoniae* MFBF-10402 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Gram-negativne bakterije), kao i na osam kliničkih izolata vrste *S. aureus*, od kojih su tri bila osjetljiva na meticilin (engl. *methicillin-susceptible Staphyolococcus aureus*, MSSA), *S. aureus* MFBF-505, *S. aureus* MFBF-10661 i *S. aureus* MFBF-10666, a preostale su činili meticilin-rezistentni *S. aureus* (engl. *methicillin-resistant Staphyolococcus aureus*, MRSA), MRSA MFBF-101, MRSA MFBF-124, MRSA MFBF-154, MRSA MFBF-164 i MRSA MFBF-177, iz Zbirke mikroorganizama Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Inokulumi su pripremljeni iz prekonoćnih kultura, koje su bile uzgojene na triptikaza soja agaru (TSA) (*Merck*) u inkubatoru Sanyo (*Sanyo Electric Co*.) na 37 °C, suspendiranjem u sterilnoj fiziološkoj otopini, pri čemu je optička gustoća suspenzija usklađena s gustoćom 0,5 standarda McFarland ($1{,}5 \times 10^8$ kolonija/mL) pomoću denzitometra (*BioMérieux*). Jedan mL ovako pripremljenih suspenzija razrijeđen je u 9 mL fiziološke otopine neposredno prije nasađivanja na krutu, odnosno u tekuću hranjivu podlogu s ekstraktima.

3.4.4.2. Metoda difuzije

Metoda difuzije iz bunarića (engl. *well diffusion method*) provedena je prema smjernicama Europske farmakopeje (Council of Europe, 2006). U Petrijeve zdjelice s ohlađenim Müller-Hintonovim agarom (*Merck*) debljine 4 mm preneseno je 100 μL razrjeđenog inokuluma, koji je zatim ravnomjerno razmazan po površini agara pomoću savijenog staklenog štapića. Kako bi se izbjeglo moguće preklapanje zona inhibicije, na svakoj su ploči izbušena tri bunarića pomoću sterilnih cilindara od nehrđajućeg čelika (d = 6 mm). U dva bunarića naneseno je 50 μL ekstrakata različitih vrsta glavulja (c = 50 mg/mL), a u treći 50 μL norfloksacina (*Krka*) (c = 0,2 mg/mL), koji je služio kao pozitivna kontrola. Za svaki par uzoraka pripremljene su tri ploče po bakterijskoj kulturi. Također, na svih osam ATCC sojeva istraženo je i inhibitorno djelovanje gentamicin sulfata (*Krka*) (c = 0,2 mg/mL). Inkubacija ploča provedena je na 37 °C kroz 18 sati. Zone inhibicije bakterijskog rasta u mm određene su kao promjer prozirnih zona na površini agara oko bunarića s ekstraktima.

3.4.4.3. Metoda mikrodilucije

Metoda mikrodilucije u bujonu (engl. *broth microdilution method*) provedena je u sterilnim mikrotitarskim pločicama s 96 bunarića (*Nuova Aptaca*), u skladu s preporukama CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (2012). Na svakoj je pločici pripremljeno sedam dvostrukih serijskih razrjeđenja ekstrakata u Müller-Hintonovom bujonu (*Merck*) ukupnog volumena 100 μL, kojima je dodano 10 μL razrjeđenog inokuluma te je svaki bunarić u konačnici sadržavao $1{,}5x10^5$ kolonija (engl. *colony-forming unit*, CFU). Po jedna pločica s uzorcima razrjeđenim u triplikatu pripremljena je za svaku bakterijsku kulturu, dok su preostali bunarići sadržavali 100 μL Müller-Hintonovog bujona i 10 μL razrjeđenog inokuluma (kontrola rasta bakterijske kulture). Kao pozitivna kontrola antimikrobnog djelovanja na osam ATTC sojeva primijenjen je gentamicin sulfat (*Krka*): pripremljene su tri pločice s deset dvostrukih serijskih razrjeđenja u Müller-Hintonovom bujonu (100 μL), pri čemu je svaki red bio inokuliran s drugom bakterijskom kulturom (10 μL), dok su preostali bunarići služili kao kontrola rasta bakterijske kulture te sterilnosti medija. Na isti način, u triplikatu, istraženo je antimikrobno djelovanje standarda verbaskozida (*HWI Analytik*).

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK), definirana kao najniža koncentracija ekstrakta/standarda koja sprječava vidljivi rast mikroorganizama u testu mikrodilucije (CLSI, 2012), određena je nakon 18 sati inkubacije na 37 °C. Nakon toga je po 10 μL sadržaja svakog bunarića sterilnom mikrobiološkom ušicom (ezom) preneseno na površinu ohlađenog Müller-Hintonovog agara (*Merck*), koji je bio podijeljen na osam sektora (jedna serija razrjeđenja po ploči), i inkubirano 18 sati na 37 °C. Nakon provedene subkultivacije, bakterijski rast, uočen kao zamućenje sadržaja u bunarićima, potvrđen je dodatkom 20 μL 1% (w/v) 2,3,5-trifeniltetrazolijevog klorida (TTC) (*Sigma-Aldrich*) nakon tri sata inkubacije na 37 °C kao pojava crvenog obojenja/taloga. Minimalna baktericidna koncentracija (MBK), definirana kao najniža koncentracija ekstrakta/standarda koja ubija ≥ 99,9% bakterija, (CLSI, 1999) određena je kao odsutnost kolonija na površini agara nakon provedene subkultivacije.

3.4.5. Metode istraživanja citotoksičnog učinka

Istraživanje citotoksičnog učinka provedeno je na metanolnim ekstraktima listova vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013), *G. cordifolia* (Baške Oštarije, 2012), *G. meridionalis* (Baške Oštarije, 2012) i *G. punctata* (Grobničko polje, 2013) dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom.

3.4.5.1. Uzgoj i tretman stanica MDA-MB-231 i A1235 u kulturi

Stanice ljudskog karcinoma dojke MDA-MB-231 i ljudskog glioblastoma A1235 uzgajane su u Dulbeccovom modificiranom Eaglovom hranjivom mediju (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*, DMEM) (*Sigma-Aldrich*), uz dodatak 10% (v/v) FBS (*Gibco*), u inkubatoru na 37 °C u struji zraka s 5% CO_2, relativne vlažnosti 95%. Stanice MDA-MB-231 dobivene su na dar od dr. Sonje Levanat, dok je stanice A1235 poklonio S. A. Aaronson (Giard i sur., 1973). Prilikom presađivanja stanicama je vakuum sisaljkom uklonjen hranjivi medij, nakon čega su isprane s fiziološkom otopinom te im je dodana 0,25% (w/v) otopina tripsina-EDTA (*Sigma-Aldrich*). Nakon 3 minute inkubacije na 37 °C, djelovanje tripsina prekinuto je dodatkom hranjivog medija, stanice su resuspendirane te prebačene u novu Petrijevu zdjelicu CytoOne (*Starlab*) sa svježim hranjivim medijem.

Prije obrade biljnim ekstraktima, $5x10^3$ stanica nasađeno je po bunariću u plastične pločice s 96 bunarića (*TPP*). Stanice su izbrojane pomoću brojača stanica Z2 Coulter Counter (*Beckman Coulter*). Nakon inkubacije stanica 24 sata u inkubatoru na 37 °C, medij je uklonjen odsisavanjem, stanice su isprane s fiziološkom otopinom i tretirane ekstraktima glavulja u rasponu koncentracija 50, 100, 250 i 500 μg/mL (otopljenih u mediju DMEM). Kao negativna kontrola služile su stanice koje su tretirane metanolom. Prije tretmana, sve su otopine filtrirane kroz sterilne filtre veličine pora 0,22 μm (*Millipore*) te su stanice tretirane u kvadruplikatu. Nakon tretmana, stanice su inkubirane 24 sata u inkubatoru na 37 °C.

3.4.5.2. MTT test

Istraživanje vijabilnosti stanica MTT testom provedeno je prema ranije opisanoj metodi (Mickisch i sur., 1990). Nakon 24 sata tretmana s navedenim koncentracijama ekstrakata glavulja, hranjivi medij je uklonjen, stanice su isprane s puferom PBS i potom inkubirane s otopinom MTT (0,5 mg/mL u mediju DMEM) (*Sigma-Aldrich*). Nakon inkubacije od 4 sata na 37 °C, otopina MTT je uklonjena, a dobiveni kristali formazana otopljeni su u 170 μL dimetilsulfoksida (*Sigma-Aldrich*), potresanjem 10 minuta pri 600 okretaja/min. Apsorbancija je mjerena na 570 nm (*Victor3 1420 Multilabel Counter*) te su vrijednosti normalizirane pomoću slijepe probe koja se sastojala od otopine MTT (i hranjivog medija) bez stanica. Rezultati su izraženi kao postotak vijabilnosti stanica, pri čemu je kao 100% vrijednost vijabilnosti uzeta srednja vrijednost apsorbancija negativne kontrole.

3.4.6. Statistička obrada rezultata istraživanja bioloških učinaka

3.4.6.1. Antidijabetski učinak

Određivanje aktivnosti α-glukozidaze provedeno je u kvadruplikatu, a određivanje vijabilnosti stanica MTT testom u oktuplikatu. Sva ostala mjerenja provedena su u triplikatu, a dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Kod istraživanja inhibicije aktivnosti α-glukozidaze statistički značajne razlike između uzoraka i negativne kontrole, procijenjene su pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA), nakon koje je slijedio Dunnettov *post-hoc* test. Statistički značajne razlike između stanica koje su rasle u hiperglikemijskim uvjetima (pozitivna kontrola) i negativne kontrole, odnosno između pozitivne kontrole i stanica koje su bile obrađene ekstraktima glavulja, procijenjene su pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA), nakon koje je slijedio Dunnettov *post-hoc* test.

3.4.6.2. Antioksidativni učinak

Istraživanja antioksidativnog učinka metanolnih ekstrakata različitih biljnih dijelova dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom, kao i ekstrakata nadzemnih dijelova dobivenih dekokcijom, ultrazvučnom ekstrakcijom i maceracijom, provedena su u triplikatu, a dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija za svaku populaciju, odnosno vrstu. Vrijednosti koncentracija ekstrakata dobivenih Soxhlet ekstrakcijom koje smanjuju apsorbanciju DPPH radikala za 50% (IC_{50}) procijenjene su pomoću linearne regresije.

Statistički značajne razlike između vrsta i biljnih dijelova procijenjene su analizom prosječnih vrijednosti za svaku od vrsta pomoću dvosmjerne analize varijance (ANOVA), nakon koje je slijedio Bonferroni *post-hoc* test. Statistički značajne razlike između vrsta i metoda ekstrakcije procijenjene su pomoću dvosmjerne analize varijance (ANOVA), nakon koje je slijedio Tukeyev *post-hoc* test, dok je statistički značajna razlika između rezultata DPPH i ABTS testa procijenjena pomoću t-testa.

3.4.6.3. Protuupalni učinak

Određivanje inhibicije aktivnosti COX-I provedeno je u kvadruplikatu (PGE_2 test), odnosno triplikatu (TMPD test), a dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Koncentracija PGE_2 u uzorcima dobivena je regresijskom analizom iz 4-parametarske logističke krivulje. Koncentracija indometacina koja smanjuje aktivnost enzima COX-I za 50% (IC_{50}) procijenjena je pomoću logaritamske regresije.

Statistički značajne razlike između rezultata dobivenih dvjema metodama istražene su pomoću t-testa, dok su razlike između vrsta procijenjene pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA), nakon koje je slijedio Tukeyev *post-hoc* test.

3.4.6.4. Antimikrobni učinak

Određivanje antimikrobnog učinka metodom difuzije i metodom mikrodilucije, uključujući mikrodiluciju u bujonu s i bez dodanog TTC te subkultivaciju na agarne ploče, provedeno je u triplikatu, a dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (metoda difuzije), odnosno kao srednja vrijednost (metoda mikrodilucije).

Statistički značajne razlike između antimikrobnog djelovanja uzoraka na sojeve MSSA i MRSA istražene su pomoću t-testa, dok su razlike između vrsta procijenjene pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA), nakon koje je slijedio Tukeyev *post-hoc* test.

3.4.6.5. Citotoksični učinak

Određivanje vijabilnosti stanica MDA-MB-231 i A1235 provedeno je u kvadruplikatu, a dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Vrijednosti koncentracija ekstrakata koje smanjuju vijabilnost stanica za 50% (IC_{50}) procijenjene su pomoću logaritamske regresije.

Statistički značajne razlike između uzoraka i negativne kontrole, procijenjene su pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA), nakon koje je slijedio Dunnettov *post-hoc* test.

Povezanost između vrijednosti dobivenih različitim testovima, uključujući povezanost između istraženih bioloških učinaka i sadržaja sekundarnih metabolita procijenjena je pomoću Pearsonovog koeficijenta korelacije (r).

Razina značajnosti u svim testovima bila je $\alpha = 0,05$. Obrada podataka koji su vezani uz različite biljne dijelove provedena je pomoću programa GraphPad Prism 5.03 for Windows (*GraphPad Software*), dok su ostali podaci obrađeni pomoću novije verzije istog programa (6.01).

4. REZULTATI I RASPRAVA

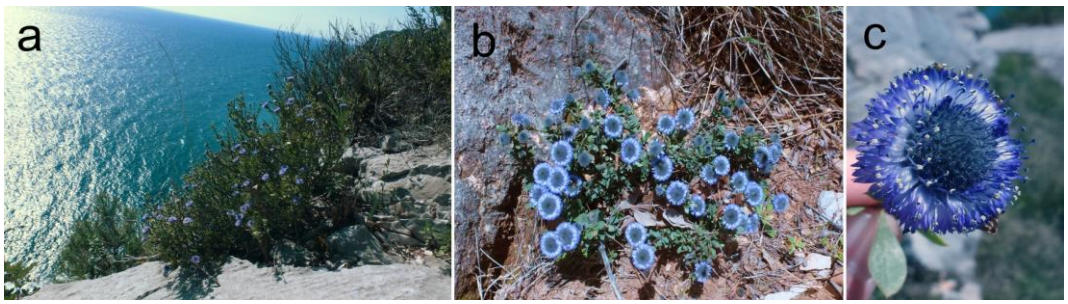
4.1. Botanička obilježja odabranih vrsta roda *Globularia*

4.1.1. Rasprostranjenost i morfološka obilježja

4.1.1.1. Rasprostranjenost i morfološka obilježja vrste *G. alypum*

Nadzemni dijelovi vrste *G. alypum* sakupljeni su u vrijeme cvatnje na području Konavoskih stijena, jedinom poznatom nalazištu ove vrste u Hrvatskoj. Navedena vrsta cvala je ranije od ostalih vrsta (ožujak) te je bila najjužnija i najistočnija populacija istraživanih vrsta roda *Globularia*, kao i populacija koja je sabrana na najnižoj nadmorskoj visini od 15 do 42 m (Tablica XI). Vrsta je rasla na kamenitom i potpuno osunčanom terenu (Slika 20).

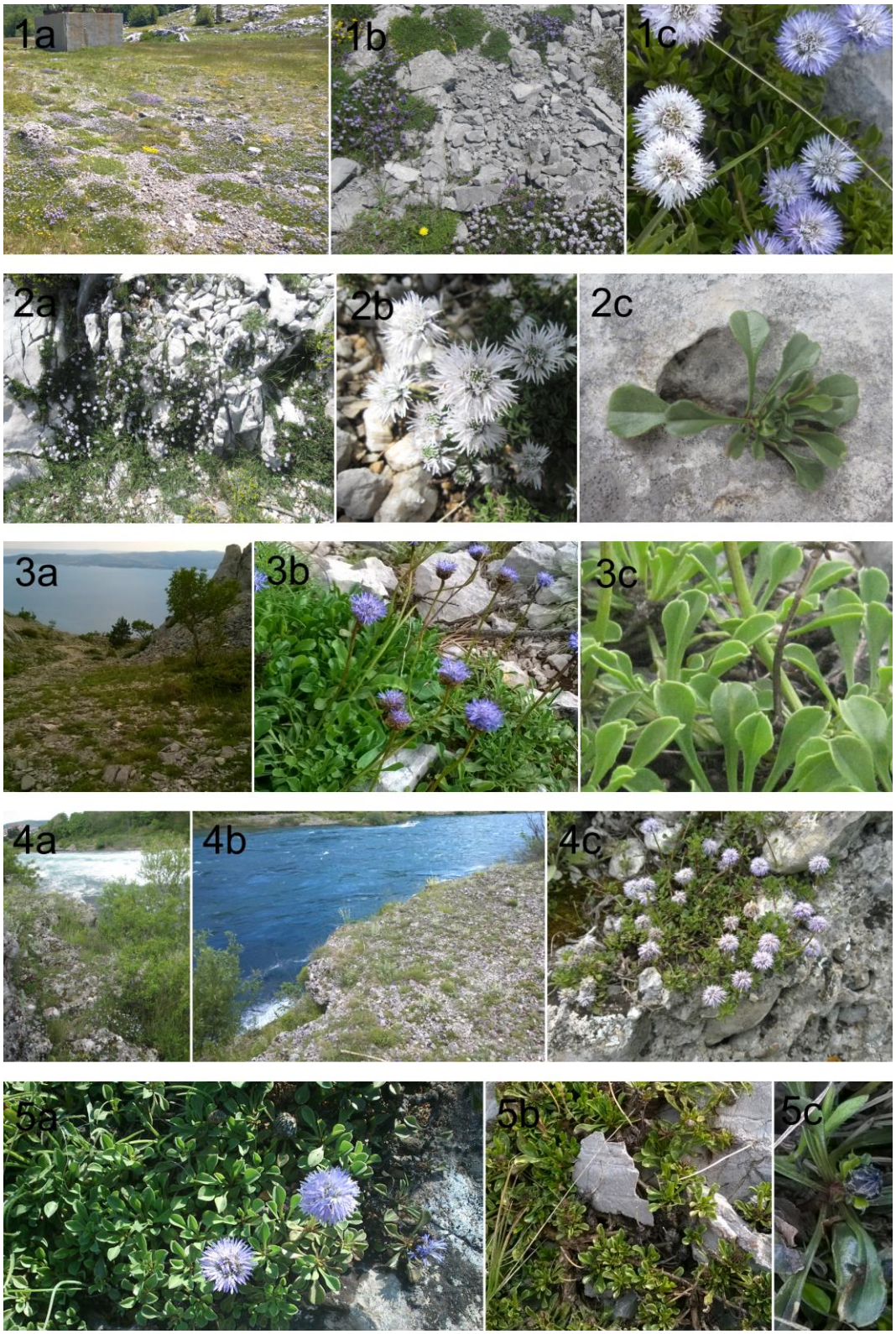
Morfološka obilježja vrste *G. alypum* sakupljene na području Konavoskih stijena ranije je opisao Kušan (1943). Vrsta *G. alypum* bila je značajno veća i robusnija od drugih istraživanih vrsta te je za razliku od njih imala u potpunosti odrvenjelu stabljiku. Navedena vrsta imala je svjetlije čvrste kožaste listove, prekrivene svjetlucavim sekretom, koji su bili lagano ušiljeni ili samo iznimno s tri zubića na vrhu i naizmjenično ili pršljenasto poredani na stabljici. Njezini modroljubičasti terminalni cvatovi bili su veći i mirisniji od cvatova drugih istraživanih vrsta (Slika 20). Povremeno je uočena i prisutnost manjih bočnih cvatova u pazušcima listova, kakve su ranije zabilježili Holländer i Jäger (1994).



Slika 20. *G. alypum* – stanište Konavoske stijene (a), habitus biljke (b) i detalj cvata (c)

4.1.1.2. Rasprostranjenost i morfološka obilježja vrste *G. cordifolia*

Uzorci vrste *G. cordifolia* sakupljeni su u vrijeme cvatnje (svibanj, lipanj) s četiri lokacije u Hrvatskoj (dvije na području Velebita i dvije na području Biokova) te jedne lokacije u Bosni i Hercegovini (Mostar). Vrsta je zabilježena na širokom rasponu nadmorskih visina, točnije od 57 m (Mostar) do 1742 m (Biokovo, okolica vrha Sveti Jure). Najviše smještena populacija ove vrste koja je uključena u istraživanje bila je populacija s područja Sjevernog Velebita (Alan, 1340 m). Ona je ujedno bila i najsjevernija, odnosno najzapadnija populacija vrste *G. cordifolia* koja je bila uključena u ovo istraživanje (Tablica XI).



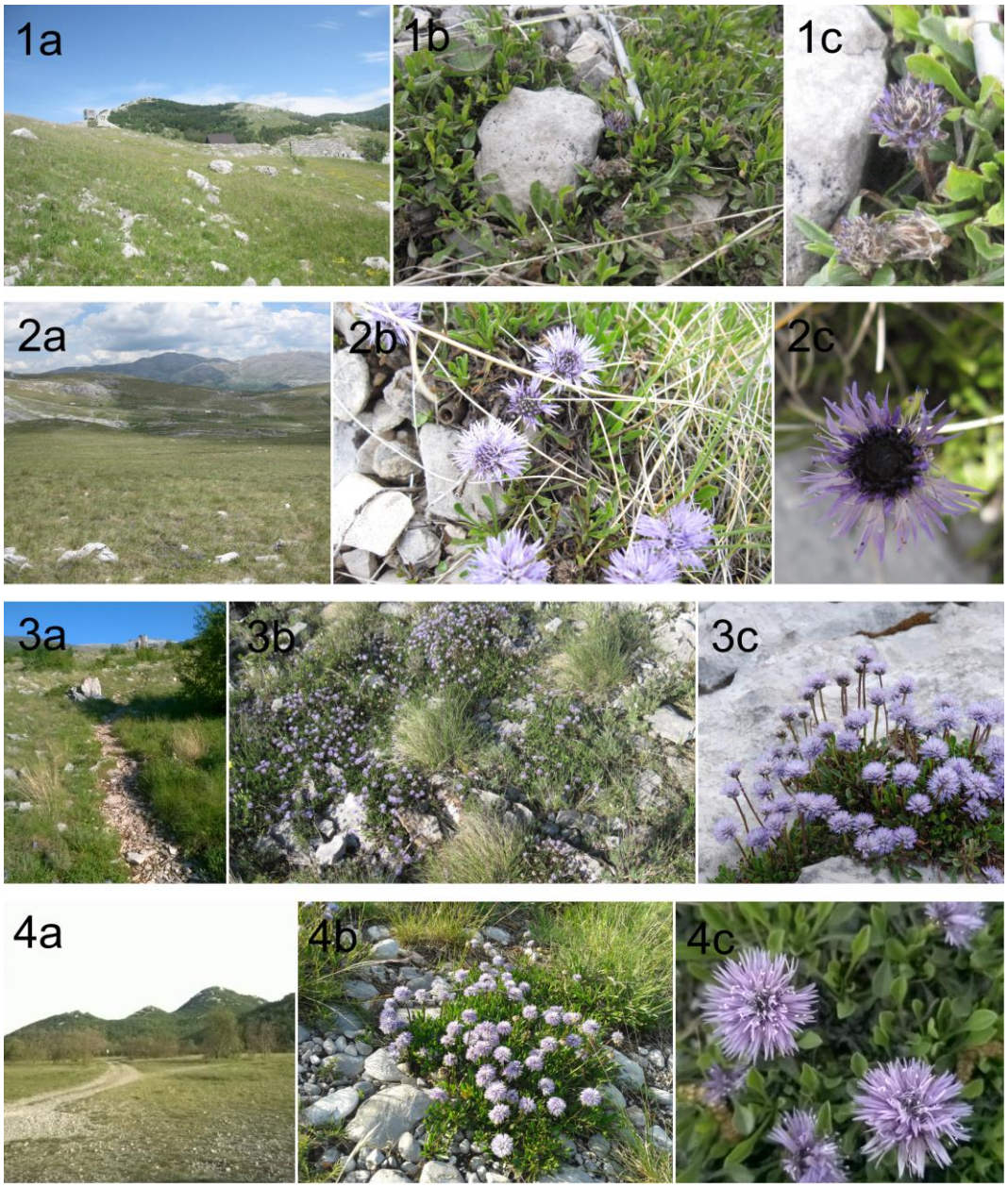
Slika 21. *G. cordifolia* – stanište Alan (1a), rast populacije (1b) i detalj cvatova (1c); rast populacije sa staništa Biokovo (2a), detalj cvatova (2b) i listova (2c); stanište Šestanovac (3a), habitus biljke (3b) i detalj listova (3c); stanište Mostar (4a), obala rijeke Neretve (4b), habitus biljke (4c) i detalj cvatova i listova (5a); habitus biljke sa staništa Baške Oštarije (5b) i detalj ovojnih listova cvata (5c)

Staništa ove vrste bila su pretežito suha i kamenita te u potpunosti izložena suncu. Iznimno, mostarska populacija rasla je na djelomično zasjenjenom području relativno veće vlažnosti, uz rijeku Neretvu, a koje bi moglo biti podložno poplavljivanju uslijed rasta vodostaja rijeke (Slika 21). Ovaj prilegnuti polugrm prekrivao je velike površine, posebno na području Alana i Biokova. Sjajni kožasti listovi lopatastog oblika bili su tamniji i mekši od listova vrste *G. alypum*, s izraženom središnjom žilom i neznatno narovašenim rubom te smješteni u ružicama na dnu crvenkaste, spiralno izbrazdane stabljike, koja je često imala jedan do dva mala lancetasta ili duguljasta listića. Visina stabljike iznosila je u prosjeku 5 cm te se dodatno produživala potkraj perioda cvatnje. Pojedine jedinke s područja Šestanovca (304 m) bile su robusnije u odnosu na jedinke s ostalih lokacija, sa stabljikom čija je visina prelazila 10 cm. S druge strane, mostarska populacija ove vrste, iako smještena na najnižoj nadmorskoj visini, bila je u pravilu niža i imala je sitnije listove. Manji ili veći dio listova svake jedinke bio je usječen, odnosno s tri zubića na vrhu lista, pri čemu su vanjski zubići bili duži, kraći ili jednake dužine kao srednji. Ovakvi listovi su često, iako ne i nužno, bili smješteni u vanjskom dijelu rozeta. Također, listovi ove vrste često su bili savijeni prema unutra što im je davalo izgled ušiljenosti, dok je dio listova stvarno i bio ušiljen (Slika 21). Polimorfizam listova, koji je i prethodno zabilježen (Ravnik, 1965), primijećen je kod svih istraživanih populacija vrste *G. cordifolia*. Pri tome je populacija s Baških Oštarija imala posebno velik broj jedinki kod kojih su prevladavali duguljasti i ušiljeni listovi te su one, s obzirom na literaturne podatke o pojavi dvije svojte na ovom području (Ravnik, 1965), odvojene kao predstavnice vrste *G. meridionalis*. Zelene stabljike nosile su cvatne glavice svijetloljubičaste boje. Povremeno su uočeni primjerci intenzivnije obojenog cvata (Alan, Šestanovac) i bijelog cvata (Alan, Biokovo), a rasli su u neposrednoj blizini ili pomiješano s tipičnim primjercima vrste (Slika 21). Kod pojedinih jedinki (Baške Oštarije, Mostar) uočena je i pojava jednog do dva bočna cvjetića uz terminalno smještene cvatove (Slika 22).

Slika 22. *G. cordifolia* – jedinka sa staništa Baške Oštarije (a), jedinka s bočno smještenim cvijetom (b), jedinka s dva bočno smještena cvijeta (c)

4.1.1.3. Rasprostranjenost i morfološka obilježja vrste *G. meridionalis*

Uzorci vrste *G. meridionalis* sakupljeni su u vrijeme cvatnje s pet lokacija u Hrvatskoj (Učka, Grobničko polje, Baške Oštarije, dvije na području Dinare). Vrsta je zabilježena na manjem rasponu nadmorskih visina od vrste *G. cordifolia* (Tablica XI). Populacija s područja Grobničkog polja (308 m) cvala je već u travnju, dok je najviše smještena i najjužnija populacija (Dinara, 1533 m) cvala krajem svibnja (Tablica XI).



Slika 23. *G. meridionalis* – stanište Baške Oštarije (1a), habitus biljke (1b) i detalj ovojnih listova cvata (1c); stanište Dinara 1 (2a), habitus biljke (2b) i detalj cvata (2c); stanište Dinara (3a) i rast populacije (3b); habitus jedinke sa staništa Učka (3c); stanište Grobničko polje (4a), habitus biljke (4b) i detalj cvatova (4c)

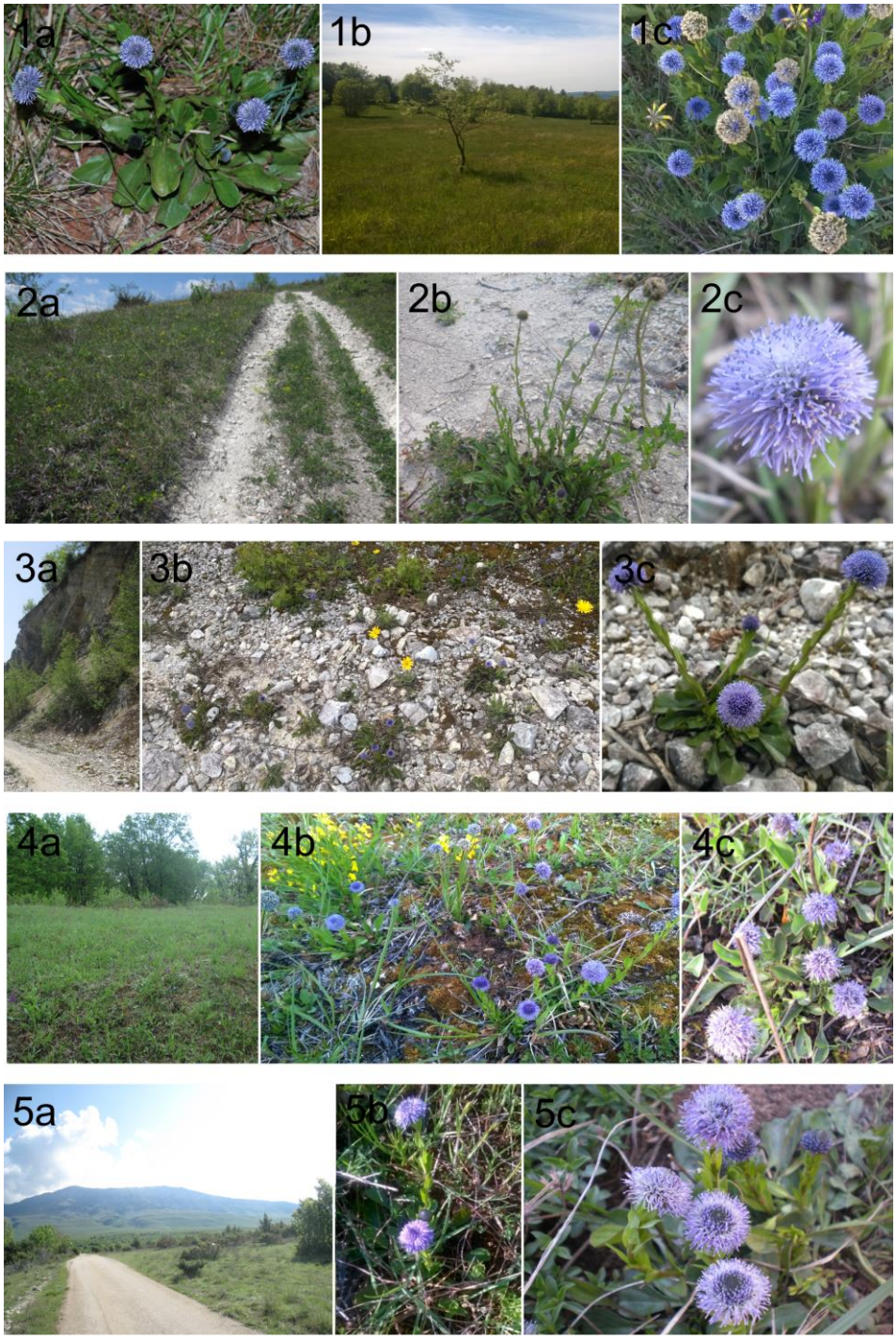
Vrsta *G. meridionalis* najčešće je rasla na otvorenim, suhim i dobro osunčanim, manje ili više travnatim terenima. Iznimno, populacija s područja Učke rasla je na kamenitom terenu i bila nešto robusnija od ostalih populacija uključenih u ovo istraživanje. Osim što je primijećeno da ova vrsta raste pomiješana s vrstom *G. cordifolia* na području Baških Oštarija, nađena je i na istim staništima kao vrsta *G. punctata,* odnosno u njezinoj neposrednoj blizini, na području Grobničkog polja i Dinare (okolica Kijeva), pri čemu druga navedena populacija nije bila uključena u ovo istraživanje.

Populacija vrste *G. meridionalis* s područja Učke bila je nešto robusnija od ostalih istraživanih populacija ove vrste (kameniti teren), odnosno, kao što navodi literatura (Tutin i sur., 1972), od populacija vrste *G. cordifolia,* od kojih je najsitnija bila mostarska populacija. Listovi vrste *G. meridionalis* bili su također sjajni i kožasti s izraženom središnjom žilom i blago narovašenim rubom, kao i listovi vrste *G. cordifolia*, ponekad suženi i duguljasti te s ušiljenim, odnosno zaobljenim vrhom. Poneki listovi bili su i lagano usječeni, odnosno neznatno nazubljeni, a povremeno je uočena i prisutnost usjeka (npr. populacija s područja Učke). Kod svih istraživanih populacija opaženi su terminalni cvatovi svijetloljubičaste boje. Ovojni listovi cvata bili su kod obje vrste ušiljeni i prekriveni finim dlačicama, a njihov oblik razlikovao se ovisno o smještaju: vanjski su bili širi pri dnu i kraći, dok su unutarnji bili uži i duži. Stabljika ove vrste bila je, kao i stabljika vrste *G. cordifolia,* crvenkasta i spiralno izbrazdana te s dva do tri mala listića (Slika 23).

4.1.1.4. Rasprostranjenost i morfološka obilježja vrste *G. punctata*

Vrsta *G. punctata* u Hrvatskoj je, ali i u cijeloj Europi, najšire rasprostranjena vrsta roda *Globularia* (Tutin i sur., 1972; hirc.botanic.hr). Uzorci ove vrste sakupljeni su u vrijeme cvatnje sa osam lokacija u Hrvatskoj, pet na području Jadranske Hrvatske, gdje se njezin areal djelomično preklapa s arealima vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*, i tri na području Sjeverozapadne Hrvatske. Populacija s područja Vugrovca bila je najsjevernija populacija vrste *G. punctata* uključena u ovo istraživanje, iako su u Hrvatskoj zabilježene i njezine sjevernije populacije (hirc.botanic.hr). Ona je ujedno bila i najsjevernija od svih istraživanih populacija roda *Globularia*, dok je od svih istraživanih populacija najzapadnija bila istarska populacija vrste *G. punctata* (Vižintini). Raspon nadmorskih visina na kojima je rasla ova vrsta kretao se između 308 m (Grobničko polje) i 1190 m (Velebit). Period cvatnje (travanj, svibanj) preklapao se s periodom cvatnje zabilježenim za vrste *G. cordifolia* i *G. meridionalis*, s time da je veći broj populacija vrste *G. punctata* cvao već u travnju, što bi se moglo povezati s njihovim smještajem na nižim nadmorskim visinama. Obrnuto, istražene populacije koje

rastu na nadmorskim visinama većim od 1000 m cvale su tek krajem svibnja, početkom lipnja (Tablica XI).



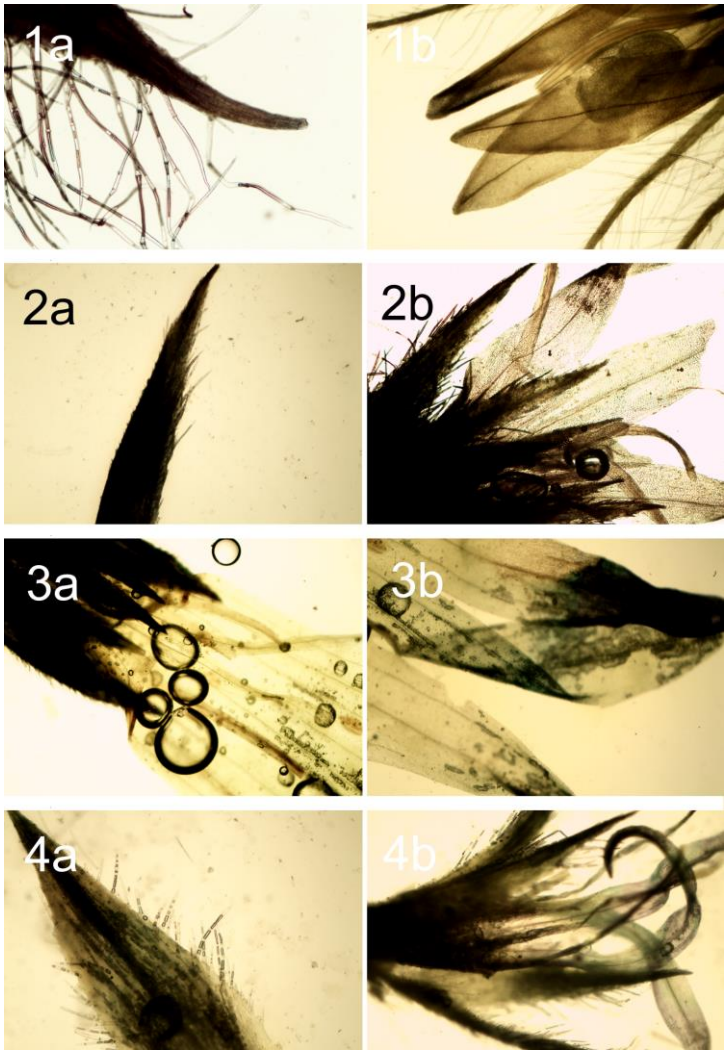
Slika 24. *G. punctata* – habitus biljke sa staništa Grobničko polje (1a); stanište Vižintini (1b) i habitus biljke (1c); stanište Vugrovec (2a), habitus biljke (2b) i detalj cvata (2c); stanište Slapnica (3a), rast populacije (3b) i habitus biljke (3c); stanište Rude (4a) i rast populacije (4b); habitus biljke sa staništa Dinara (4c); stanište Dinara (5a) i habitus biljke (5b); detalj cvatova biljke sa staništa Velebit (5c)

Vrsta je većinom rasla na manje ili više travnatim i suhim terenima, ravnim ili položenim te izloženim punom svjetlu. Iznimno, populacija s područja Slapnice rasla je na izrazito kamenitom terenu, dok su na području Vugrovca uočeni primjerci koji rastu i uz šljunčano-pješčane puteve (Slika 24).

Vrsta *G. punctata* zeljasta je trajnica s drvenastom bazom, veličinom veća od vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*, a manja od vrste *G. alypum*. Vrsta uz velike lopataste listove koji su smješteni u rozeti na dnu stabljike, a koje imaju i vrste *G. cordifolia* i *G. meridionalis*, ima brojne manje lancetaste, manje ili više ušiljene sjedeće listove koji su naizmjenično poredani na stabljici, slično kao kod vrste *G. alypum*. Veliki listovi bili su sjajni i glatki, ali veći i nešto tanji od listova ostalih vrsta. Njihov je rub bio također neznatno narovašen, a uz glavnu žilu na naličju lista isticale su se i dvije do četiri bočne žile. Kod istih su jedinki uočeni listovi čiji je vrh bio gotovo zaobljen, lagano usječen, lagano nazubljen ili s tri zubića, pri čemu je srednji zubić bio manji ili podjednake veličine kao vanjski zubići. Izrazito nazubljeni listovi primijećeni su, primjerice, kod jedinki sakupljenih na području Slapnice. Na listovima je bilo moguće uočiti brojne sitne tamnozelene točkice, koje su bile gotovo pravilno raspoređene, a zahvaljujući kojima je ova vrsta najvjerojatnije dobila naziv „točkasta" glavulja. Sjedeći listovi u pravilu su bili nešto manji od listova vrste *G. alypum*, ali značajno veći od listića koji su se mogli uočiti na tankim stabljikama vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*, a u čijim su se pazušcima povremeno mogli uočiti pojedinačni cvjetići. Stabljika je bila blago spiralno izbrazdana kao kod prethodne dvije vrste, samo duža, deblja i zelenija. Stabljika se potkraj perioda cvatnje dodatno produživala i postajala je drvenasta (Slika 24).

Populacije vrste *G. punctata* morfološki su se i međusobno razlikovale. Jedinke na lokaciji Vižintini, na kojoj je vegetacija bila najbujnija, bile su u prosjeku nešto više od ostalih jedinki, iako su visoke jedinke s velikim rozetama i većim brojem cvatućih stabljiki primijećene i na području Slapnice i Vugrovca (kameniti teren). Primijećeno je da se veličina i gustoća sjedećih listova može razlikovati između, ali i unutar populacija. S druge strane, velik broj jedinki s područja Ruda imao je slabije izražene listove u rozeti. Kod svih populacija vrste *G. punctata* primijećeni su cvatovi svijetloljubičaste boje, koji su potkraj cvatnje poprimali prljavoružičastu boju (Slika 24). Latice ove vrste bile su lagano kovrčave, a zubići donje usne vjenčića bili su uži i jače usječeni nego kod ostalih istraživanih vrsta, dok su lapovi svojom širinom bili između onih vrste *G. alypum* te vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*. Lapovi sve četiri vrste bili su, kao i ovojni listovi cvata, prekriveni

višestaničnim ušiljenim dlakama, koje su bile posebno dugačke kod vrste *G. alypum* (Slika 25), što je u skladu s literaturnim podacima (Sales i Hedge, 2001).



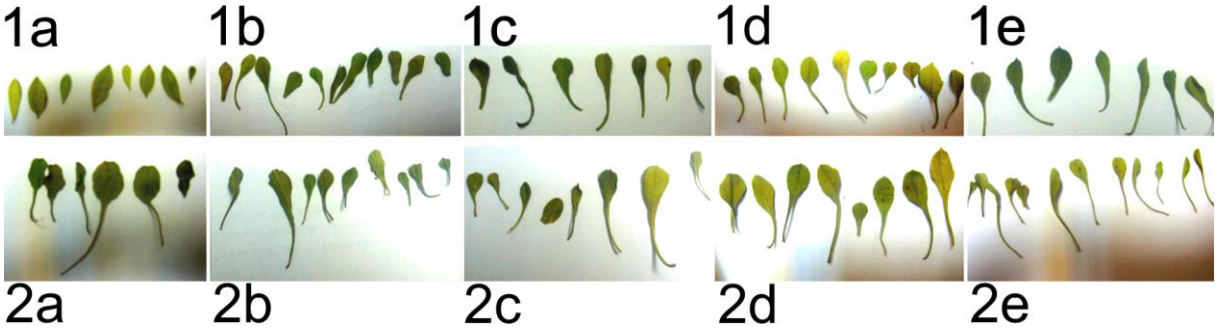
Slika 25. Detalj ovojnih listova cvata i/ili cvijeta vrste *G. alypum* (1a, 1b), *G. cordifolia* (2a, 2b), *G. meridionalis* (3a, 3b) i *G. punctata* (4a, 4b) gledan svjetlosnim mikroskopom – povećanje 40x

Kod vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* nisu uočene karakteristike u građi ovojnih listova cvata, čaške ili vjenčića koje bi jednoznačno ukazivale na jednu ili drugu vrstu (Slika 25), kao što je prethodno primijetio i Ravnik (1962; 1965). Isti je autor uočio i da varijabilnost u obliku, širini i načinu ušiljenosti navedenih biljnih dijelova umnogome ovisi o njihovom položaju s obzirom na cvatnu os. Slična opažanja imala je i Milletti (1987) nakon istraživanja moguće varijabilnosti u morfološkoj građi cvjetova između i unutar različitih talijanskih populacija, kao i unutar pojedinih jedinki istih vrsta.

4.1.1.5. Suhi biljni material

Kod sušenja biljnog materijala istraživanih vrsta, posebno vrste *G. punctata*, ponekad je primijećeno tamnjenje listova, koje je pripisano visokom sadržaju iridoida, odnosno njihovoj razgradnji i polimerizaciji (Hegnauer, 1966). Takvi listovi nisu bili uključeni u provedene analize, kao ni suhi ili smeđi listovi. Također, kod iste je vrste češće primijećen gubitak boje cvatova uslijed sušenja, odnosno poprimanje prljavoružičaste boje, dok je boja cvatova kod ostalih vrsta procesom sušenja često postajala intenzivnije modroljubičasta. I jedni i drugi cvatovi bili su uključeni u sve analize u kojima su se kao početni biljni material koristili nadzemni biljni dijelovi. Manji dio analiza proveden je samo na osušenim listovima.

Na Slici 26 vidljivo je koliko se listovi svake od istraživanih vrsta glavulja mogu razlikovati svojom veličinom i oblikom. Osim prisutnosti usjeka, odnosno zubića na vrhu nekih ili većine listova vrste *G. cordifolia* (nisu vidljivi na slici) te ponekih većih listova kod vrste *G. meridionalis* (najviše izraženo kod uzoraka s Učke), nije bilo značajnih razlika u obliku plojke koje bi ukazivale na jednu ili drugu vrstu, što je ranije pokazao i Ravnik (1962; 1965). On je proveo istraživanje na velikom broju populacija koje su bile sakupljene na širem području Dinarida, uključujući i nekoliko populacija s velebitskog područja.



Slika 26. Osušeni listovi vrste *G. alypum* s lokacije Konavoske stijene (1a); vrste *G. cordifolia* s lokacije Alan (1b), Biokovo (1c), Mostar (1d) i Baške Oštarije (1e); vrste *G. punctata* s lokacije Grobničko polje (2a); vrste *G. meridionalis* s lokacije Baške Oštarije (2b), Dinara (2c), Učka (2d) i Grobničko polje (2e)

Budući da je vrsta *G. cordifolia* dobila naziv prema listovima srcolikog oblika (Coombes, 1989), a za koji je zaslužna trostruka nazubljenost njihovih vrhova, pri čemu je srednji zubić često manji od okolnih zubića, ovo je bilo i glavno svojstvo na temelju kojeg su se njezine populacije raspoznavale od populacija vrste *G. meridionalis*. Još i Kušan (1943) navodi da se, u njegovom slučaju podvrste, *G. cordifolia* subsp. *cordifolia* (L.) Hayek i *G. cordifolia* subsp. *bellidifolia* (Ten.) Hayek morfološki uglavnom razlikuju po obliku lista.

Iako se periodički obnavljaju, listovi obje vrste prisutni su tijekom cijele godine za razliku od cvjetova, odnosno glavičastih cvatova, što ide u prilog davanju ovakve prednosti u identifikaciji. Također, istraživanje koje je nakon odvajanja vrste *G. meridionalis* od vrste *G. cordifolia* kao zasebne (Schwarz, 1938) proveo Ravnik, uključivalo je niz morfometrijskih istraživanja na uzorcima obje svojte, a u kojima nisu uočena karakteristična svojstva u građi cvijeta ili ovojnih listova cvata koja bi jednoznačno ukazivala na jednu ili drugu vrstu, odnosno podvrstu (Ravnik, 1962; Ravnik, 1965), kao što je prethodno spomenuto. Veliku morfološku varijabilnost bez uočene povezanosti između morfoloških karakteristika listova i cvjetova uočila je i Milletti nakon opsežnog istraživanja talijanskih populacija (1987). Zadnje veliko istraživanje na vrstama roda *Globularia*, u kojem se, u skladu s prethodno navedenim rezultatima, ove taksonomski problematične svojte navode kao podvrste, provedeno je 1994. godine (Holländer i Jäger, 1994). Iako su u Hrvatskoj one i danas prema nekim autorima smatrane podvrstama (Ljubičić i sur., 2010; hirc.botanic.hr), drugi ih navode kao odvojene vrste (Vitasović Kosić i Britvec, 2006). Ovo je u skladu s prethodno spomenutom Schwarzovom podjelom (1938, 1963), koju je priznala i *Flora Europea* (Tutin i sur., 1972), odnosno u skladu s podjelom koju navodi baza podataka svih poznatih vaskularnih biljaka, *The Plant List*, a koja je nastala u suradnji renomiranih ustanova koje uključuju Royal Botanic Gardens, Kew, Missouri Botanical Garden i brojne druge (www.theplantlist.org).

Iako bi prema literaturnim podacima vrsta *G. meridionalis* trebala biti robusnija od vrste *G. cordifolia* (Tutin i sur., 1972), u ovom istraživanju uočeno je da veličina populacija vrste *G. cordifolia* može značajno varirati s obzirom na nadmorsku visinu. Slična opažanja zabilježio je i Schwarz (1938). Sitan rast mostarske populacije vrste *G. cordifolia* mogao bi, s druge strane, biti posljedica prilagodbe na manje povoljne životne uvjete, odnosno na okruženje potencijalno veće vlažnosti, koje nije tipično za ovu vrstu (hirc.botanic.hr; www.tela-botanica.org), iako valja spomenuti da je njezina pojava u koritima rijeka kao pionirske vrste i prethodno zabilježena (Hegi, 1974). Također, valja primijetiti da oblik lista i prisutnost zubića koji su uzeti kao temeljno svojstvo raspoznavanja vrste *G. cordifolia* u ovom istraživanju može ovisiti o fazi razvoja lista, kao što je ranije prikazano (Ravnik, 1965). Milletti (1897), također, navodi da se građa listova razlikuje ovisno o vegetacijskom periodu. Navedene razlike mogle bi ovisiti i o dodatnim čimbenicima, kao što su prilagodba na životne uvjete ili starost biljke. Prema Schwarzu (1938), savijanje i zarezivanje lisne plojke moguća je prilagodba vrste *G. meridionalis* na suha i sunčana staništa. U ovom istraživanju, pojedine jedinke vrste *G. punctata* s područja Slapnice imale su izraženo nazubljene listove. Moguće je pretpostaviti da je ovo područje, s obzirom na manjak vegetacije, bilo izraženije suho od

ostalih, u pravilu travnatih područja s kojih su sakupljeni uzorci navedene vrste. Iako su vrste *G. cordifolia* i *G. meridionalis* rasle na sličnim terenima i u sličnom rasponu nadmorskih visina, što odgovara ranijim opažanjima (Forenbacher, 1990), moguće je primijetiti da su u okviru ovog rada uzorci vrste *G. cordifolia* sakupljeni na manje ili više kamenitim terenima, dok je na travnatim terenima prevladavala vrsta *G. meridionalis*. Slični afiniteti zabilježeni su i ranije za svojte *G. cordifolia* i *G. bellidifolia* (Piskernik, 1941). Pretpostavka da je usječenost listova posljedica prilagodbe na suha i sunčana staništa mogla bi objasniti i zabilježen veći visinski raspon na kojem je zabilježena vrsta *G. cordifolia* (luirig.altervista.org), pri čemu su biljke na nižim nadmorskim visinama u pravilu izložene višim prosječnim temperaturama, dok su one na visokim nadmorskim visinama izložene ekstremnijoj suši i osvjetljenju, između ostalog i uslijed manjka ostale vegetacije.

Mogućnost razlika u starosti između pojedinih jedinki, odnosno populacija vrste *G. cordifolia* može biti značajna (do 60 godina) (Schweingruber, 2007). Moguće je stoga da su uzorci odvojeni kao vrsta *G. meridionalis* također pripadnici vrste *G. cordifolia* koji iz nekog od navedenih razloga (još) nisu razvili ili više nemaju karakteristične nazubljene listove. Ovome ide u prilog sličan polimorfizam listova kod vrste *G. punctata* koji je uočen u ovom istraživanju, ali i prethodno zabilježen, kao i polimorfizam listova vrste *G. cordifolia* (Sales i Hedge, 2001), a koji u drugom slučaju, koliko je poznato, nije bio pripisan daljnjoj diferencijaciji ove vrste, odnosno nije prepoznat kao temelj za razlikovanje podvrsta.

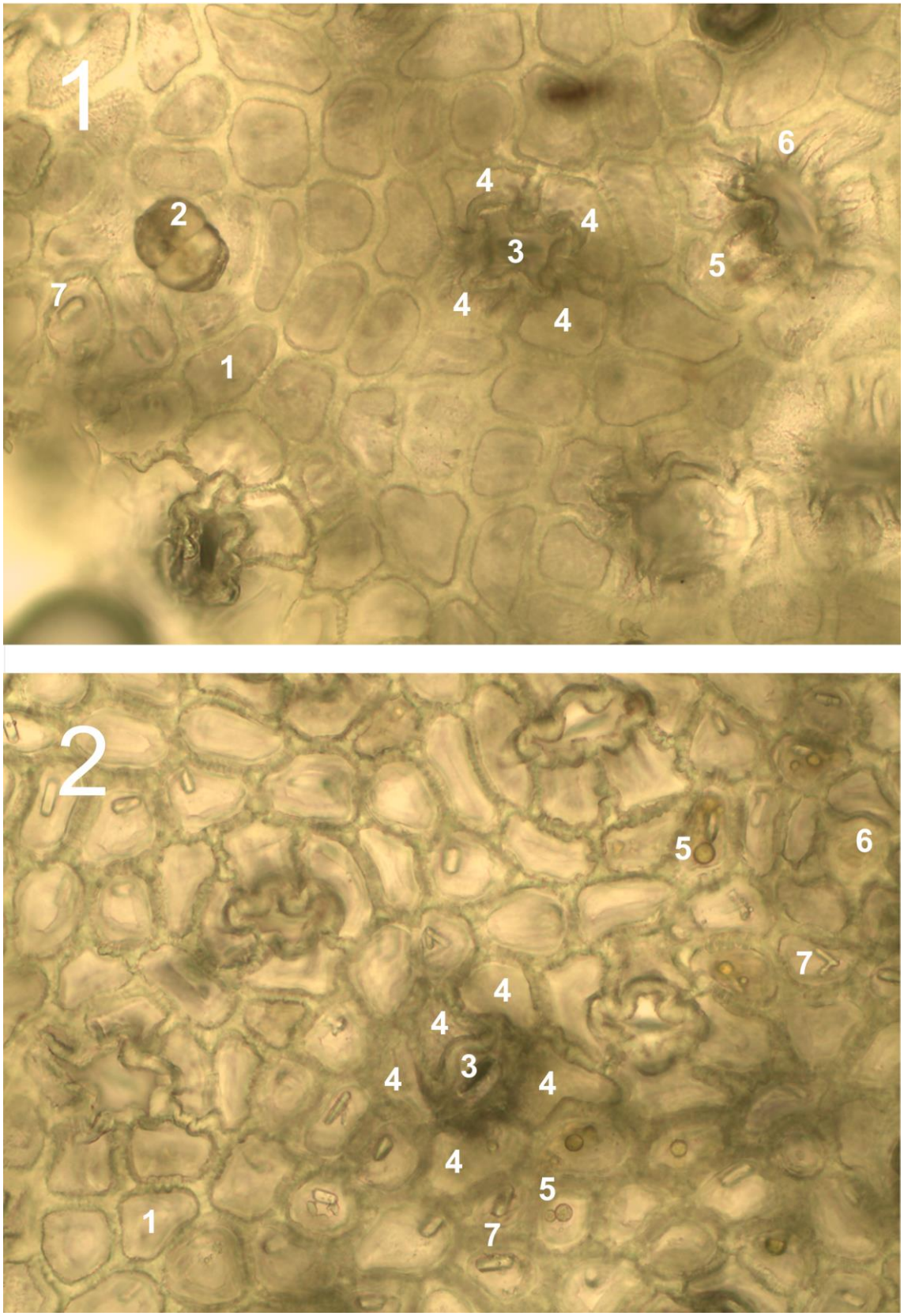
Druga mogućnost koja je razmotrena u ovom istraživanju je ta da jedinke obje vrste/podvrste rastu pomiješane na istim staništima, s obzirom na preklapanje njihovih areala na području Jadranske Hrvatske (Schwarz, 1938). Ovome u prilog ide i činjenica da na istim područjima (Grobničko polje, Dinara) mogu rasti manje srodne vrste kao što su *G. meridionalis* i *G. punctata*. Sam Schwarz naveo je da vrsta *G. meridionalis* raste na području Grobničkog polja (Schwarz, 1938). Degen (1938) je, pak, primijetio da dva varijeteta vrste *G. cordifolia* rastu na sličnim mjestima i u sličnom visinskom rasponu, a često su pomiješani na istim staništima, uključujući područje Alana i Oštarija, što odgovara i našim opažanjima za vrste *G. cordifolia* i *G. meridionalis*. Spomenuti autor naveo je da se zbog navedenih činjenica dvije svojte više ne mogu razlikovati čak ni kao varijeteti (Degen, 1938). U ovom istraživanju vrste *G. cordifolia* i *G. meridionalis* promatrane su kao zasebne vrste unatoč tome što je opravdanost njihove podjele na vrste/podvrste moguće upitna. Istraživanjem se, između ostalog, htjelo provjeriti postoje li anatomske, citološke, molekularne ili kemijske značajke koje bi išle u prilog predloženom razdvajanju na vrste, odnosno koje bi mogle poslužiti kao dodatna pomoć kod njihove identifikacije.

4.1.2. Histološko-anatomska obilježja

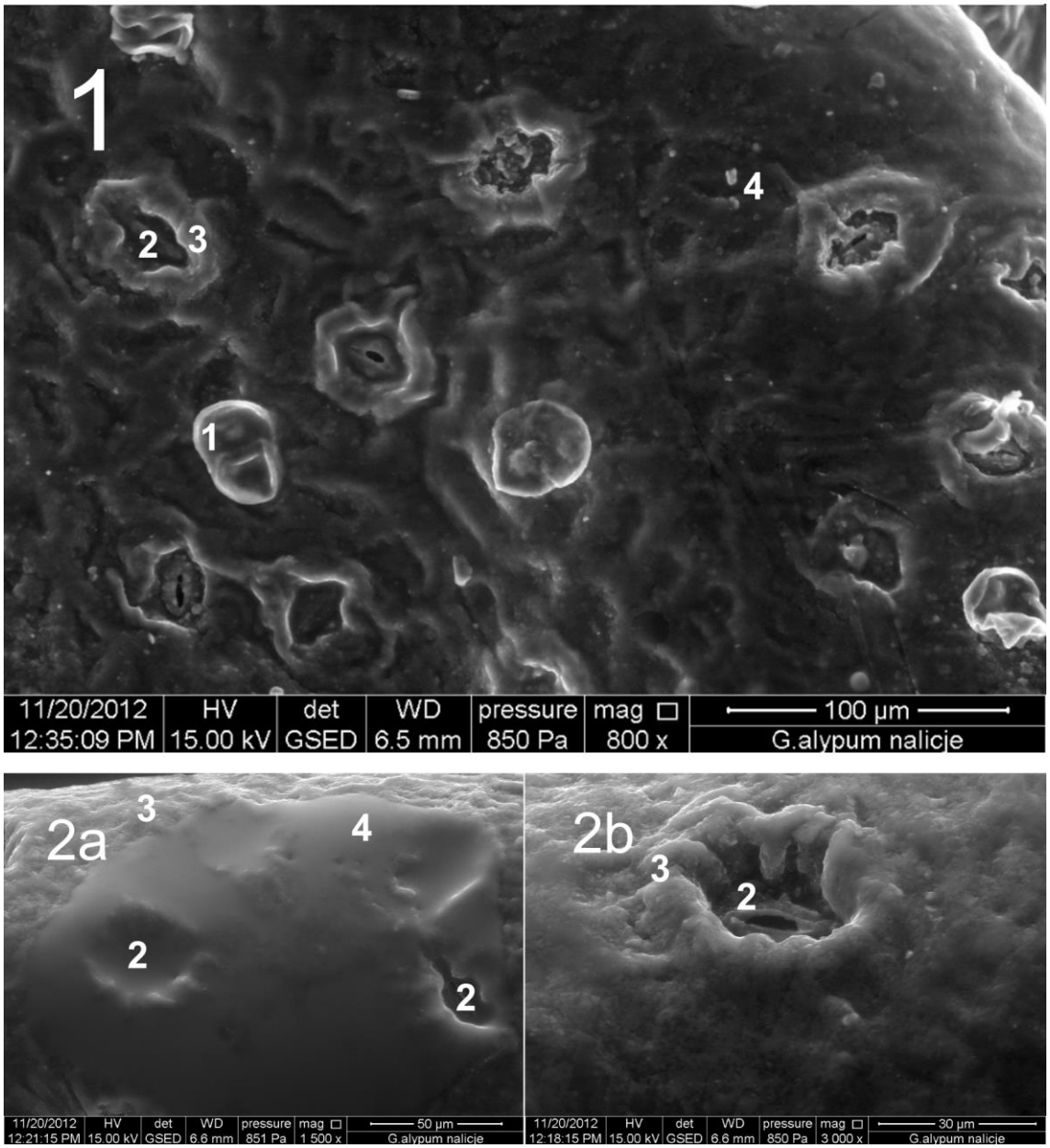
4.1.2.1. Histološko-anatomska obilježja vrste *G. alypum*

Listovi vrste *G. alypum* izolateralne su građe, pri čemu mezofil lista čini 10 do 12 redova kratko izduženih parenhimskih stanica. Stanice epiderme su poligonalnog oblika i debelih lignificiranih staničnih stijenki (boje se intenzivno crveno sa safraninom), posebno s vanjske strane, a prekrivene su debelim slojem kutikule (boji se crvenkasto sa Sudanom III, smeđe s klorcinkovim jodidom i tamnoplavo s toluidinskim modrilom) te mjestimično i vapnenačkim sekretom. Manje su od stanica epiderme ostalih istraživanih vrsta. Puči su velike, brojne i udubljene, a okružene su s četiri do pet stanica susjedica koje se svojom veličinom i oblikom ne razlikuju od ostalih stanica epiderme (anomocitični poredak). Smještene su s obje strane lista, kao i glavičaste žlijezde građene od jednostaničnog drška i dvostanične glavice, koja luči sekret smeđe boje. Žlijezde su pričvršćene za bazalnu stanicu okruženu s pet do šest epidermskih stanica. U stanicama epiderme moguće je uočiti prisutnost manjih i većih žućkastih masnih kapljica te kristala kalcijevog oksalata koji mogu biti veći i prizmatični (najčešće jedan po stanici), odnosno manji i štapićasti (moguće nekoliko po stanici). Masne kapljice prisutne su i u mezofilu lista, a boje se crvenkasto sa Sudanom III. U mezofilu je smještena jedna veća središnja i nekoliko manjih bočnih kolateralnih žila. Parenhimski ovoj središnje žile slabije je izražen nego kod ostalih istraživanih vrsta, a ispod njega se nalaze nakupine sklerenhimskih stanica, koje su izraženije oko floema. Na naličju ispod epiderme, a u ravnini središnje žile, javlja se i jedan red kolenhimskih stanica (Slike 27-30).

Slika 27. Udubljene puči vrste *G. alypum* u poprečnom prerezu lista gledane svjetlosnim mikroskopom neobojene (a) i obojene safraninom (b), Sudanom III (c), klorcinkovim jodidom (d) i toluidinskim modrilom (e) – povećanje 400x; 1 – kutikula, 2 – zadebljala vanjska stijenka epidermske stanice, 3 – lumen stanice susjedice puči, 4 – masne kapljice, 5 – stanica zapornica puči, 6 – odušak



Slika 28. Naličje lista vrste *G. alypum* gledano svjetlosnim mikroskopom – povećanje 400x (1, 2); 1 – stanica epiderme, 2 – glavičasta žlijezda, 3 – udubljena puč, 4 – stanica susjedica, 5 – masne kapljice, 6 – vapnenački sekret, 7 – kristali kalcijevog oksalata

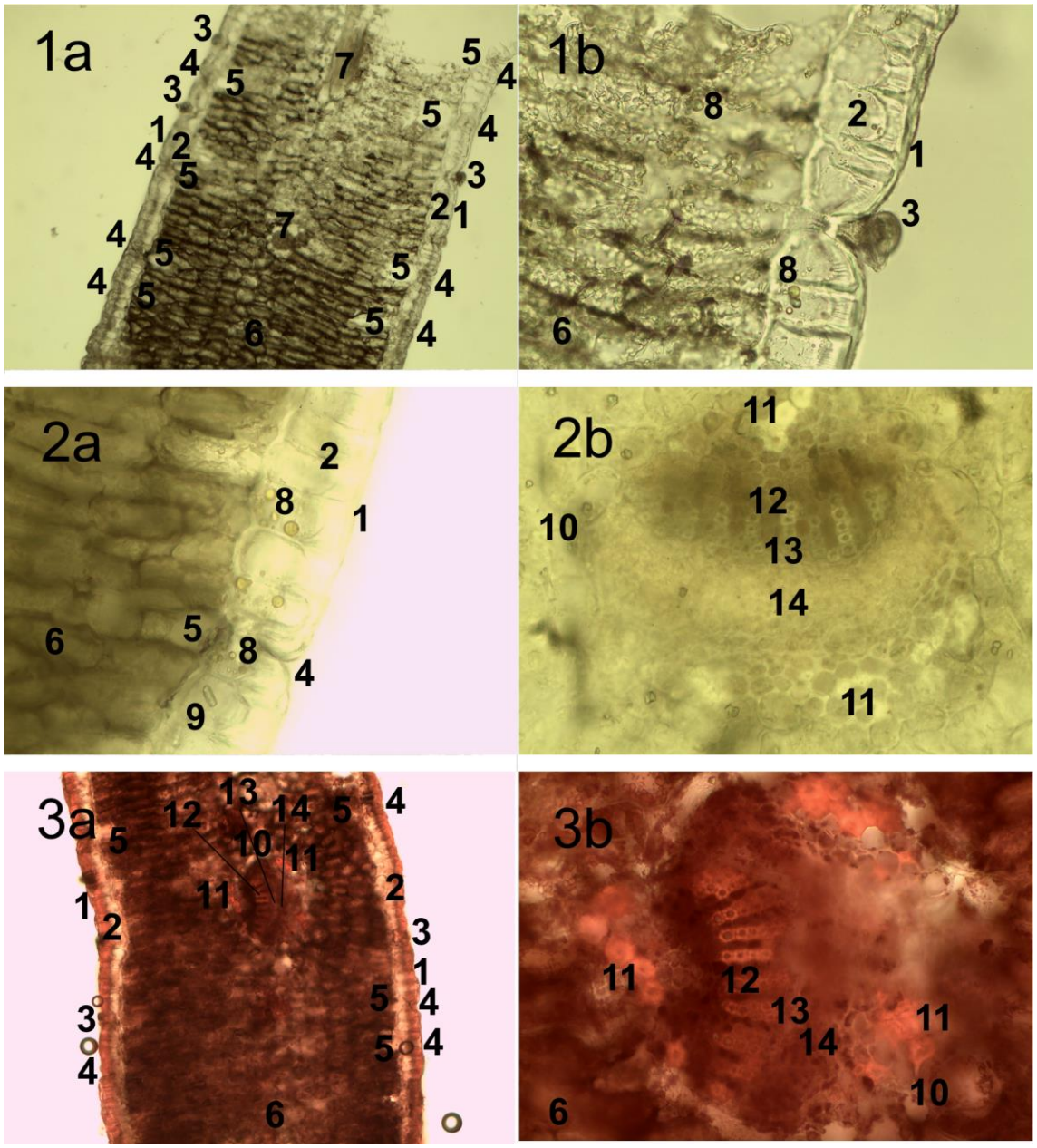


Slika 29. Naličje lista vrste *G. alypum* gledano elektronskim mikroskopom – povećanje 800x (1), 1500x (2a) i 3000x (2b); 1 – glavičasta žlijezda, 2 – udubljena puč, 3 – kutikularni sloj, 4 – vapnenački sekret

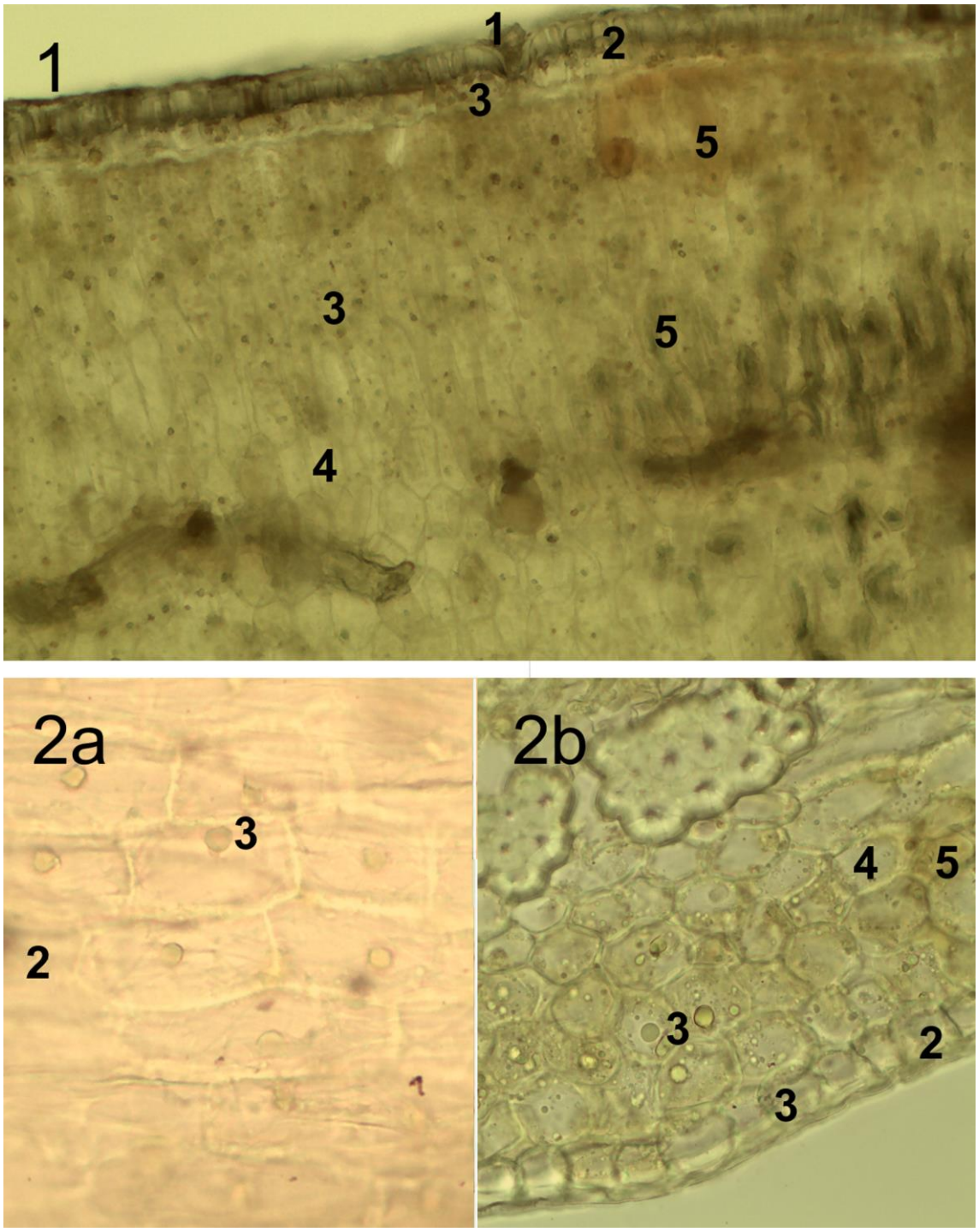
Anatomsku građu listova vrste *G. alypum* s područja Konavoskih stijena prethodno je opisao i Kušan (1943) te su dobiveni rezultati u skladu s njegovim opažanjima. Prema Heckelu (1894), građa listova vrste *G. alypum* je centralna, slabo lakunarna, puči imaju četiri do šest, a ponekad i samo dvije stanice susjedice, žlijezde povremeno luče vapnenački sekret zbog kojeg mogu biti uronjene u epidermu, dok je većina na površini epiderme, a kolenhimsko zadebljanje s donje strane lista nije uvijek prisutno. Heckel je zabilježio i prisutnost dvije bazalne stanice za koju je pričvršćena glavičasta žlijezda (Heckel, 1894), što

je najvjerojatnije rezultat zamjene jedne stanice sa zadebljalom stijenkom. Prisutnost jednog sloja epidermskih stanica zadebljale vanjske stijenke potvrđena je bojanjem sa safraninom (Slika 30). Heckel (1894) je u epidermskim stanicama mladih listova zabilježio pojavu klorofilnih tjelešaca, koje je moguće povezati sa žućkastim masnim kapljicama uočenim u ovom istraživanju. Pojava masnih kapljica u listovima vrste *G. alypum* zabilježena je i nedavno, a pripisana je metabolitima nepoznatog identiteta (Mamoucha i Christodoulakis, 2014). Također, u istom istraživanju zabilježeno je i nakupljanje metabolita u sekretornim stanicama glavičastih žljezdastih dlaka, odnosno fenolnih spojeva u vakuolama epidermskih stanica i stanica mezofila (boje se crvenosmeđe i sivoplavo sa željezovim kloridom) (Mamoucha i Christodoulakis, 2014). U okviru ovog rada, uočeno je da se dodatkom kalijevog hidroksida lumen pojedinih stanica epiderme i mezofila također boji u crvenosmeđu i sivoplavu boju te da ove iste boje mogu poprimiti i opažene masne kapljice (Slika 31). Masne kapljice mogle bi biti rezultat nakupljanja lipofilnih sekundarnih metabolita, kakav je primjerice i iridoid globularin, glavni sekundarni metabolit vrste *G. alypum* (Merghache i sur., 2013). Izolacijom globularina dobiven je smolasti produkt svijetložute boje, što je prvi opisao Walz (1857), a isto je potvrđeno i u okviru našeg istraživanja. Prisutnost globularina prethodno je zabilježena u različitim biljnim organima vrste *G. alypum* (Meriah, 2007), dok je u okviru ovog istraživanja prisutnost žućkastih masnih kapljica, osim u listovima, uočena i u cvjetovima i mladim stabljikama ove vrste (Slika 31), odnosno ostalih istraživanih vrsta.

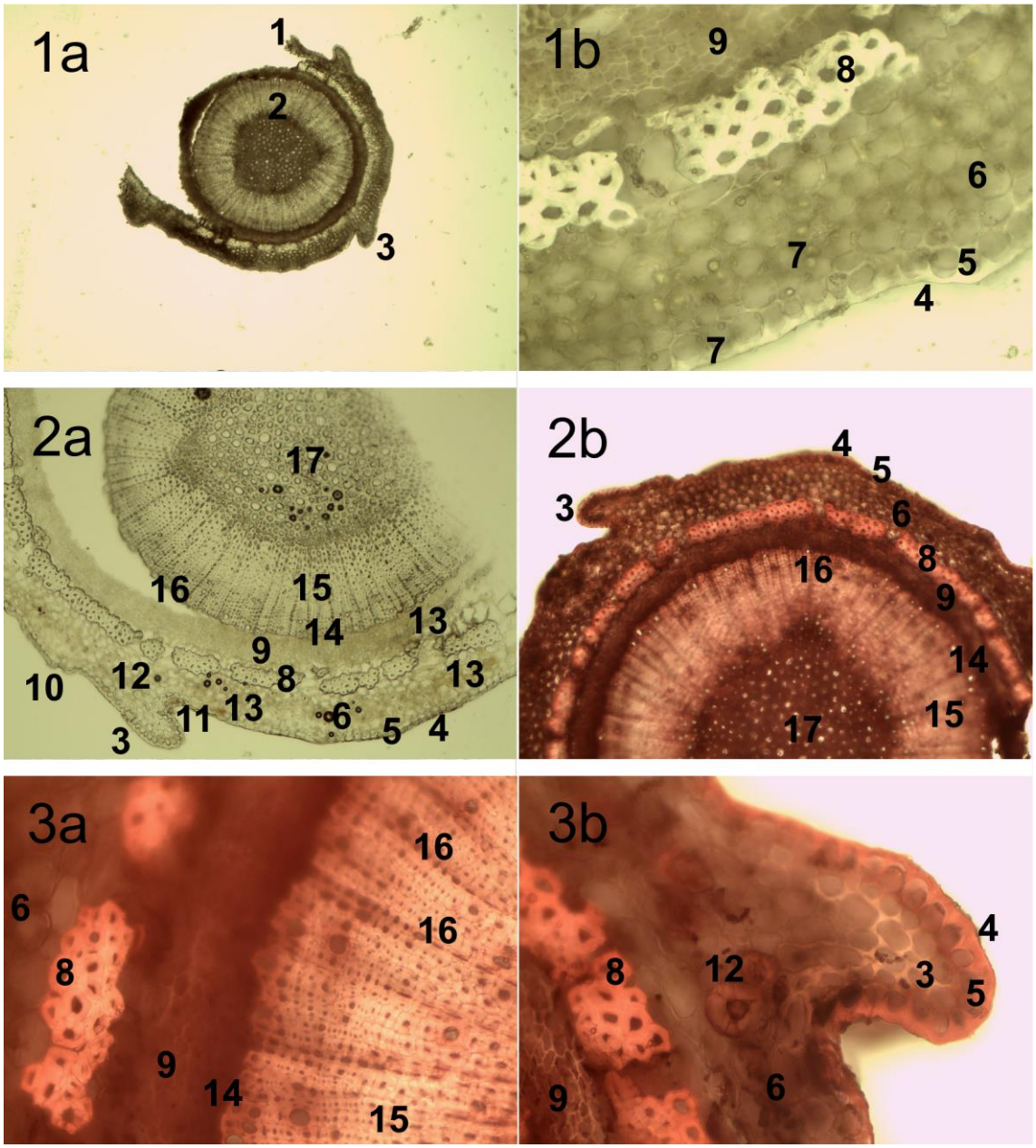
Stabljika vrste *G. alypum* (vršni cvatući dio) građena je od primarne kore i središnjeg valjka. Primarnu koru čini jednoslojna epiderma zadebljale stanične stijenke, presvučena kutikulom, hipoderma građena od tri do četiri reda kolenhimskih stanica koje čine manji broj pravilno raspoređenih trokutastih izbočenja te parenhim primarne kore građen od četiri do pet redova stanica, u kojem može biti prisutan i manji broj sklerenhimskih idioblasta. U epidermi je moguće uočiti pokoju puč i glavičastu žlijezdu, kao i žućkaste masne kapljice, koje su obilno prisutne i u parenhimu primarne kore. Dodatak kalijevog hidroksida otkriva prisutnost spojeva koji se boje smeđe i sivoplavo u vakuolama stanica epiderme, parenhima primarne kore i floema. Središnji valjak čine gotovo kontinuirani sklerenhimski ovoj od tri reda stanica (boji se intenzivno crveno sa safraninom), koji je mjestimično isprekidan zrakama srčike, floem građen od desetak redova malih sitastih stanica sa stanicama pratilicama, uski kambijski prsten, ksilem građen od traheja, odnosno većeg broja traheida i drvenčica, koji svojom veličinom nadmašuje floem te srčika građena od stanica zadebljalih stijenki. Zrake srčike građene su od jednog, a prema površini i od dva reda parenhimskih stanica (Slika 32).



Slika 30. Poprečni prerez lista vrste *G. alypum* gledan svjetlosnim mikroskopom: neobojeni prerez kroz list – povećanje 100x (1a), rub lista – povećanje 400x (1b, 2a) i središnju žilu (2b); safraninom obojeni prerez kroz list – povećanje 100x (3a) i središnju žilu (3b); 1 – kutikula, 2 – epiderma (na naličju u ravnini središnje žile s kolenhimskim zadebljanjem), 3 – glavičasta žlijezda, 4 – udubljena puč, 5 – odušak, 6 – mezofil, 7 – bočna žila, 8 – masne kapljice, 9 – kristali kalcijevog oksalata, 10 – parenhimski ovoj žile, 11 – sklerenhimski ovoj žile, 12 – ksilem, 13 – kambij, 14 – floem



Slika 31. Metaboliti vrste *G. alypum* gledani svjetlosnim mikroskopom u listu, cvijetu i mladoj stabljici: poprečni prerez lista u otopini kalijevog hidroksida – povećanje 100x (1); tangencijalni prikaz latice obojene Sudanom III – povećanje 400x (2a); poprečni prerez stabljike u otopini kalijevog hidroksida – povećanje 400x (2b); 1 – glavičasta žlijezda, 2 – epidermska stanica, 3 – masne kapljice, 4 – parenhimska stanica, 5 – obojena vakuola



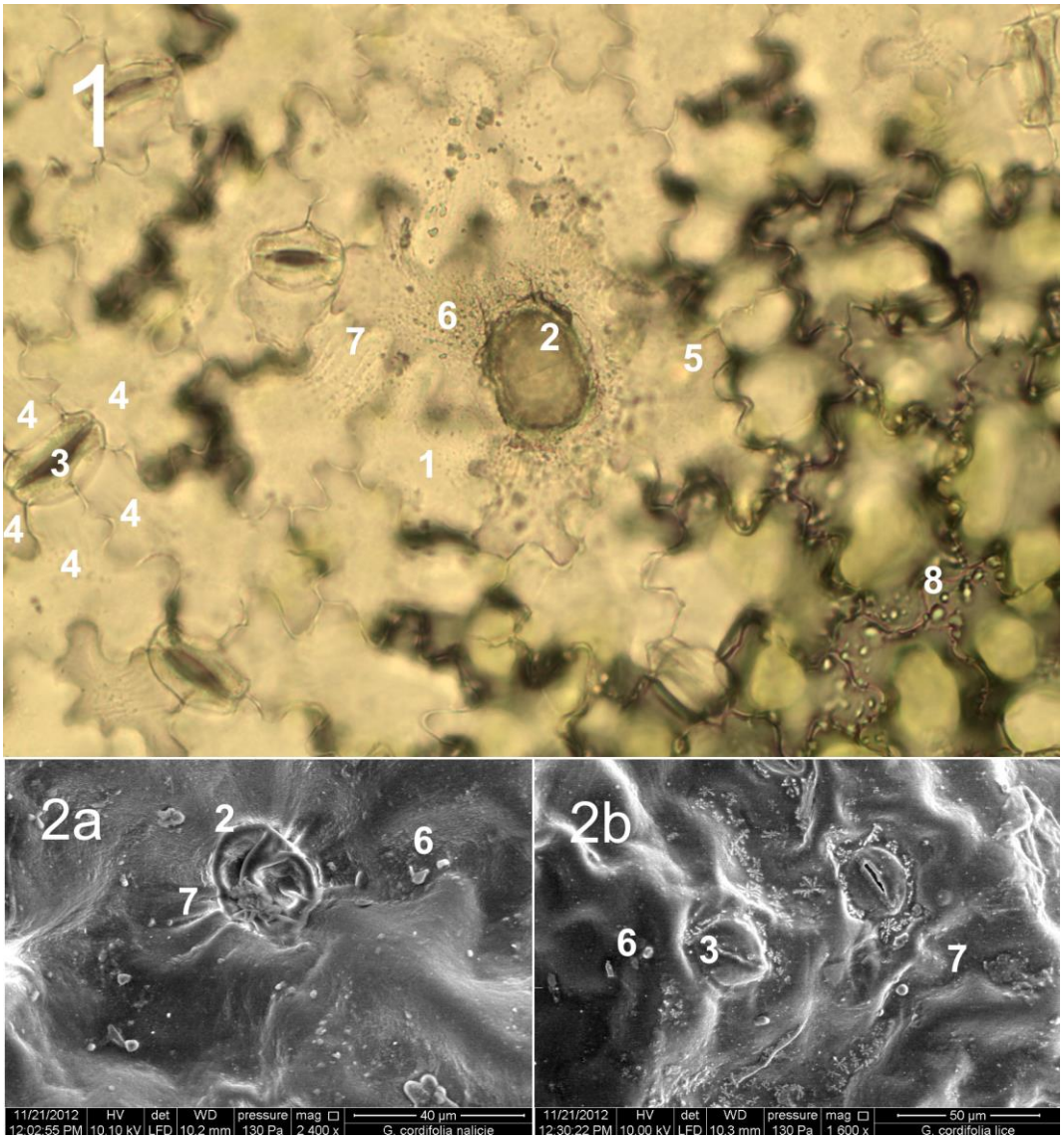
Slika 32. Poprečni prerez vršnog dijela stabljike vrste *G. alypum* gledan svjetlosnim mikroskopom: neobojeni prerez kroz stabljiku – povećanje 40x (1a) i rub stabljike – povećanje 400x (1b); prerez kroz stabljiku u otopini kalijevog hidroksida – povećanje 100x (2a) i obojen safraninom – povećanje 100x (2b); safraninom obojen prerez kroz središnji valjak – povećanje 400x (3a) i rub stabljike – povećanje 400x (3b); 1 – primarna kora, 2 – središnji valjak, 3 – kolenhimsko izbočenje, 4 – kutikula, 5 – epiderma, 6 – parenhim primarne kore, 7 – masne kapljice, 8 – sklerenhimski ovoj, 9 – floem, 10 – puč, 11 – glavičasta žlijezda, 12 – sklerenhimski idioblast, 13 – obojena vakuola, 14 – kambijski prsten, 15 – ksilem, 16 – zraka srčike, 17 – srčika

4.1.2.2. Histološko-anatomska obilježja vrste *G. cordifolia*

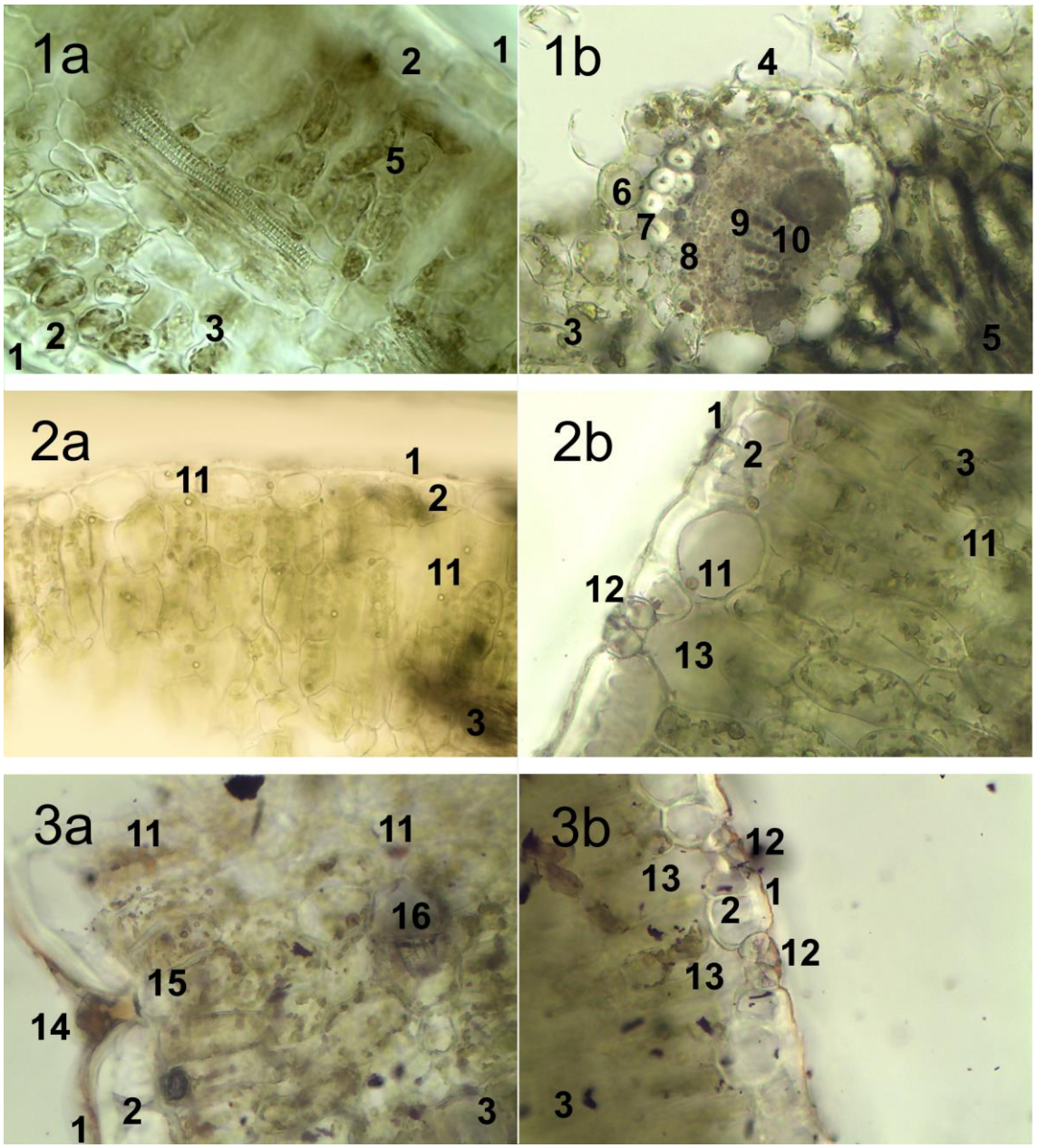
Listovi vrste *G. cordifolia* (pseudo)dorziventralne su građe, pri čemu mezofil lista čine tri do četiri reda gusto pakiranih kratko izduženih stanica sa strane lica (palisadni parenhim) i četiri do šest redova rjeđe pakiranih kratko izduženih stanica s naličja (spužvasti parenhim). Stanice epiderme su velike, manje ili više sinusoidnih stijenki, koje su s vanjske strane jače zadebljale i prekrivene kutikulom (boji se crvenkasto sa Sudanom III). Puči su velike, brojne, okružene uglavnom s četiri (rjeđe tri ili pet) stanica susjedica koje se svojom veličinom i oblikom ne razlikuju od ostalih stanica epiderme i smještene su s obje strane lista. Glavičaste žlijezde građene su od jednostaničnog drška i dvostanične glavice i smještene su s obje strane lista, a luče sadržaj smeđe boje (boji se crvenkasto sa Sudanom III). Povremeno je moguće uočiti i zrnati sekret nepoznatog sastava. Žlijezde su pričvršćene za bazalnu stanicu koja je okružena s pet do šest epidermskih stanica. U mezofilu je smještena jedna veća središnja i nekoliko manjih bočnih kolateralnih žila koje su od okolnih parenhimskih stanica s kloroplastima odvojene slojem većih bezbojnih parenhimskih stanica žilnog ovoja. Iznad floemskog dijela središnje žile, a ispod parenhimskog ovoja žile, prisutan je i manji broj sklerenhimskih vlakana, koja mogu biti smještena pojedinačno ili u nakupinama. U ravnini središnje žile ispod stanica donje epiderme često je prisutan i jedan sloj kolenhimskih stanica (Slike 33-34).

Prema Heckelu (1894), građa mezofila listova svojti *G. cordifolia* L. var. *bellidifolia* Rouy. i *G. cordifolia* L. var. *intermedia* Rouy. je centralna lakunarna. Njihove epidermske stanice su velike i sinusoide te često sadrže klorofil, a puči su okružene s četiri do šest, odnosno četiri do pet stanica susjedica. S druge strane, stanice gornje epiderme svojte *G. cordifolia* L. var. *nana* su poligonalne i vrlo rigidne, bez klorofila, a njihove puči okružuje pet do šest stanica susjedica. Prisutnost kolenhimskog izbočenja (1 sloj stanica) u ravnini središnje žile isti je autor naveo kao karakteristiku svojte *G. cordifolia* var. *bellidifolia* (Heckel, 1894), što nije potvrđeno rezultatima ovog istraživanja, budući da je i kod uzoraka vrste *G. cordifolia* primijećena njegova prisutnost. S druge strane, prethodni je autor na primjeru vrste *G. alypum* naveo da kolenhimsko izbočenje ne mora uvijek biti prisutno (Heckel, 1894). Anatomske razlike koje je za svojte *G. cordifolia* var. *bellidifolia* i *G. cordifolia* var. *intermedia* zabilježio Heckel bi se prema Milletti (1987) mogle pripisati utjecaju okolišnih čimbenika. Prema Ravniku (1965) je, kao i u našem slučaju, u anatomskoj građi listova vrste *G. cordifolia* s.l. moguće razlikovati spužvasti od palisadnog parenhima. Prema Holländeru i Jägeru (1994), građa listova ove vrste prijelazni je tip između izolateralne i dorziventralne. Zabilježena prisutnost klorofila u epidermskim stanicama pojedinih

varijeteta vrste *G. cordifolia* (Heckel, 1894) mogla bi biti posljedica preklapanja sloja parenhimskih stanica sa slojem epidermskih stanica (Slika 33), odnosno prisutnosti veće količine žućkastih i plavičastih masnih kapljica. Prisutnost kuglastih nakupina u epidermskim stanicama vrste *G. cordifolia* s.l. moguće je uočiti i na fotografijama koje je zabilježio Ravnik (1965). Žućkaste masne kapljice moguće je, osim u stanicama epiderme, uočiti i u mezofilu lista, budući da se svojom veličinom, okruglastim oblikom i sjajem razlikuju od okolnih kloroplasta (Slika 34).

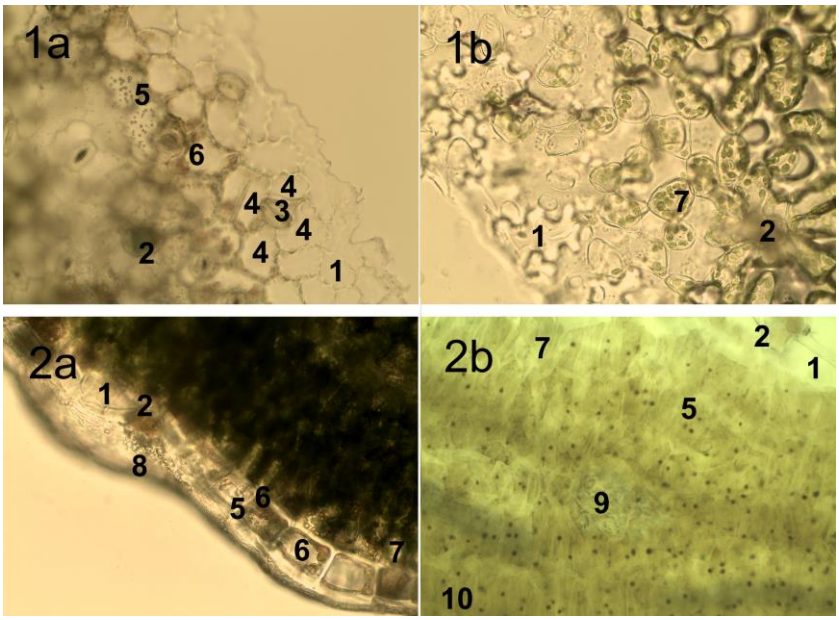


Slika 33. Naličje lista vrste *G. cordifolia* gledano svjetlosnim mikroskopom – povećanje 400x (1); gledano elektronskim mikroskopom – povećanje 2400x (2a); lice lista vrste *G. cordifolia* gledano elektronskim mikroskopom – povećanje 1600x (2b); 1 – stanica epiderme, 2 – glavičasta žlijezda, 3 – puč, 4 – stanica susjedica, 5 – masne kapljice, 6 – zrnati sekret, 7 – nabori epiderme, 8 – kloroplasti u parenhimskim stanicama ispod epiderme



Slika 34. Poprečni prerez lista vrste *G. cordifolia* gledan svjetlosnim mikroskopom: neobojeni prerez kroz list – povećanje 400x (1a) i središnju žilu – povećanje 400x (1b); naličje lista neobojeno – povećanje 400x (2a, 2b) i obojeno Sudanom III – povećanje 400x (3a, 3b); 1 – kutikula, 2 – epiderma, 3 – spužvasti parenhim, 4 – središnja žila, 5 – palisadni parenhim, 6 – parenhimski ovoj žile, 7 – sklerenhimski ovoj žile, 8 – floem, 9 – kambij, 10 – ksilem, 11 – masne kapljice, 12 – puč, 13 – odušak, 14 – glavičasta žlijezda, 15 – bazalna stanica žlijezde, 16 – bočna žila

Masne kapljice boje se crvenkasto sa Sudanom III (Slika 34), odnosno crvenosmeđe i sivoplavo s vanilinom (Slika 35). Bojanje s vanilinom moglo bi ukazivati na njihovu terpensku, odnosno fenilpropanoidnu strukturu (Wagner i Bladt, 1996), imajući na umu da su iridoidi (monoterpeni) i feniletanoidi (fenilpropanoidi) pretpostavljeno i najzastupljeniji sekundarni metaboliti vrste *G. cordifolia* (Kirmizibekmez i sur., 2003b; Kirmizibekmez i sur., 2004b). U pojedinim stanicama epiderme, posebno kod uzoraka vrste *G. cordifolia* koji su bili sakupljeni na području Mostara (uz rijeku Neretvu), prisutne su i smeđe nakupine (Slika 35). One bi mogle biti rezultat polimerizacije sekundarnih metabolita, primjerice asperulozida (Kirmizibekmez i sur., 2003b), koji je podložan hidrolizi u vodenoj sredini (Berkowitz i sur., 1982). Njome nastaje produkt plavog do zelenog obojenja, odnosno smeđecrni talog (polimer) i glukoza (Briggs i Cain, 1954). Miris na kumarine koji se, prema literaturnim podacima, može primijetiti nakon sušenja kod vrste *G. meridionalis*, ali ne i kod *G. cordifolia* (Schwarz, 1938), odnosno miris koji podsjeća na miris lazarkinje (*G. odoratum*) (Hermann, 1956), mogao bi se također povezati s prisutnošću asperulozida (Vizgirdas i Rey-Vizgirdas, 2006).

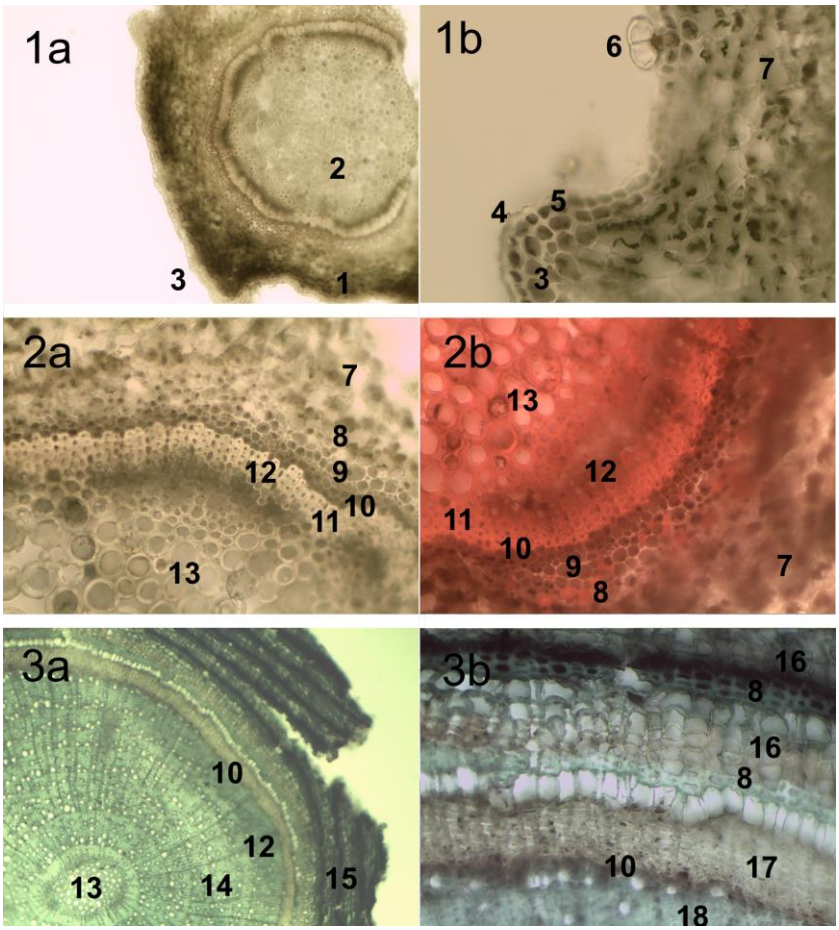


Slika 35. Metaboliti vrste *G. cordifolia* gledani svjetlosnim mikroskopom u listovima: površinski prerez naličja lista – povećanje 400x (1a, 1b); poprečni prerez lista, neobojen – povećanje 400x (2a) i obojen vanilinom – povećanje 400x (2b); 1 – stanica epiderme, 2 – glavičasta žlijezda, 3 – puč, 4 – stanica susjedica, 5 – masne kapljice, 6 – smeđi sekret, 7 – stanica spužvastog parenhima s kloroplastima, 8 – zrnati sekret, 9 – bočna žila, 10 – stanica palisadnog parenhima s kloroplastima

Navedeno bi moglo ukazivati na to da kod vrste *G. cordfiolia* asperulozid nije prisutan, barem ne u većoj količini, kao što je u okviru istraživanja fitokemijskog profila unutar ovog rada utvrđeno kod mostarske populacije *G. cordifolia*. Ipak, ovakvo shvaćanje bilo bi u suprotnosti s rezultatima dosadašnjih fitokemijskih istraživanja vrste *G. cordifolia* (Kinzel i Stummerer-Schmid, 1970; Chaudhuri i Sticher, 1980; Kirmizibekmez i sur., 2003b), uključujući i fitokemijske rezultate dobivene za druge populacije iste vrste, koji su dobiveni u okviru ovog rada.

Mlada (jednogodišnja cvatuća) stabljika vrste *G. cordifolia* građena je od primarne kore i središnjeg valjka. Primarnu koru čini jednoslojna epiderma zadebljale stanične stijenke, presvučena kutikulom, hipoderma građena od jednog do dva reda kolenhimskih stanica koje čine manji broj pravilno raspoređenih trokutastih izbočenja te parenhim primarne kore građen od pet do sedam redova stanica. U epidermi je moguće uočiti pokoju glavičastu žlijezdu i puči. Sadržaj zelenosmeđe do smeđe boje vidljiv je u svim stanicama primarne kore, a moguća je i prisutnost žućkastih masnih kapljica. Središnji valjak čini sloj manjih nakupina sklerenhimskih stanica (uočen kod mostarske populacije), floem građen od dva do tri reda stanica, uski kambijski prsten, ksilem građen od četiri do šest redova stanica i srčika koju čine stanice manje ili više zadebljalih (odrvenjelih) stijenki (posebno kod mostarske populacije), a koje se povećavaju prema središtu stabljike. Zadebljale stijenke nakon bojanja safraninom postaju crvenkaste. Zrake srčike građene su od jednog sloja parenhimskih stanica (Slika 36). Ranije je zabilježeno da su stanice srčike jače zadebljale kod svojte *G. cordifolia* var. *intermedia* u usporedbi s *G. cordifolia* var. *bellidifolia* (Heckel, 1894). Suprotno ovim rezultatima, u Ravnikovom se istraživanju (1965) "*bellidifolia* tip" vrste *G. cordifolia* doima jače sklerificiran od "*cordifolia* tipa", kod kojeg je došlo do pucanja stijenki stanica srčike.

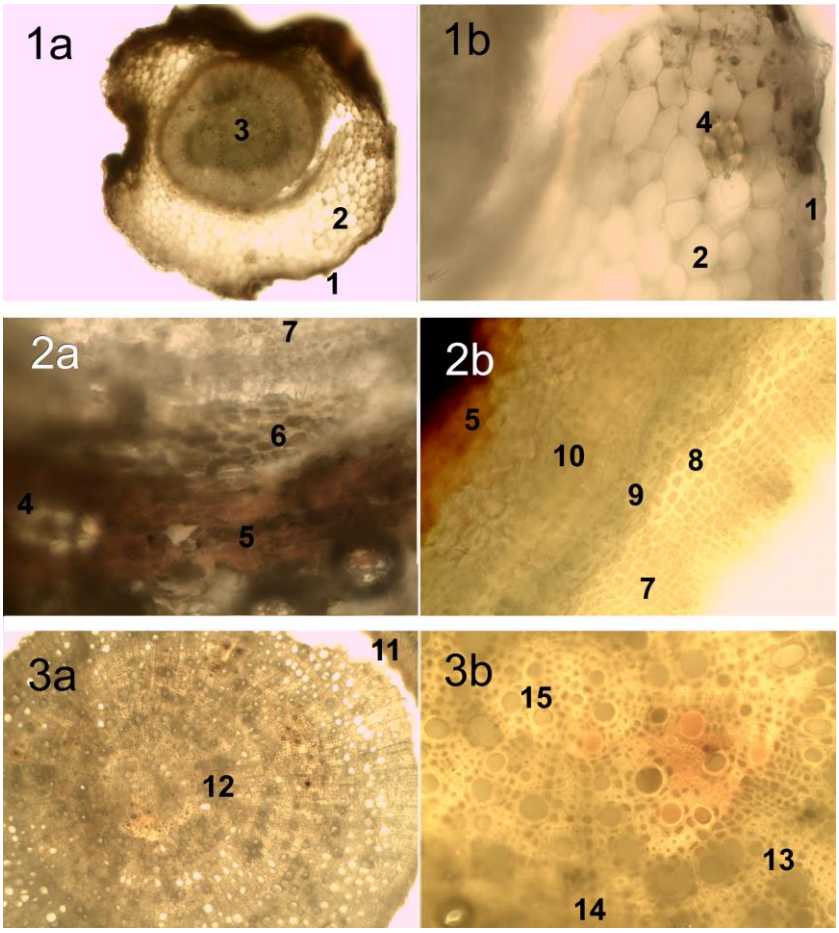
Drvenasta (višegodišnja) stabljika može kao i mlada stabljika imati sklerenhimske idioblaste, a vanjska kora građena je od više naizmjenično poredanih nizova pluta i sklerenhima. U drvu su jasno uočljive granice godova. Kod višegodišnjeg korijena nalaze se u sekundarnom ksilemu mrežaste traheje nepravilnog rasporeda, a granice godova nisu jasne. Schweingruber (2007) je u korijenu ove vrste uočio i pojavu godova nepravilnog klinastog oblika, koja je uobičajena u nepovoljnim uvjetima rasta. Prisutnost sklerenhimskih stanica kod mladih stabljiki mostarske populacije vrste *G. cordifolia* mogla bi se pripisati poodmaklom periodu cvatnje u kojem su uzorci sakupljeni, a s kojim stabljike postaju jače odrvenjele, imajući na umu činjenicu da je sklerenhim kao potporno staničje uočen i u drvenastoj stabljici. Prema Schweingruberu, on je karakterističan za većinu glavulja (Schweingruber i sur., 2013).



Slika 36. Poprečni prerez jednogodišnje stabljike vrste *G. cordifolia* gledan svjetlosnim mikroskopom: neobojeni prerez kroz jednogodišnju stabljiku – povećanje 100x (1a), rub stabljike – povećanje 400x (1b) i središnji valjak – povećanje 400x (2a); safraninom obojen prerez središnjeg valjka – povećanje 400x (2b); toluidinskim modrilom obojen prerez kroz drvenastu stabljiku – povećanje 100x (3a) i dio drva i kore – povećanje 400x (3b); 1 – primarna kora, 2 – središnji valjak, 3 – kolenhimsko izbočenje, 4 – kutikula, 5 – epiderma, 6 – glavičasta žlijezda, 7 – parenhim primarne kore, 8 – sklerenhimski ovoj, 9 – floem, 10 – kambijski prsten, 11 – ksilem, 12 – zraka srčike, 13 – srčika, 14 – drvo, 15 – kora, 16 – pluto, 17 – sekundarni floem, 18 – sekundarni ksilem

Korijen vrste *G. cordifolia* je drvenast. Anatomski se razlikuje mladi korijen primarne građe kod kojeg je prisutan jedan sloj stanica rizoderme nezadebljalih stijenki koje mogu biti ispunjene smeđim sekretom, primarna kora u čijem parenhimu mogu biti prisutni sklerenhimski idioblasti (uočeno kod mostarske populacije) i središnji valjak s provodnim stanicama, odnosno korijen sekundarne građe kod kojeg je moguće razlikovati koru građenu od višeslojne periderme (sa sklerenhimskim idioblastima), pločastog kolenhima, parenhima primarne kore i floema (primarni i sekundarni) sa sklerenhimskim ovojem te drvo građeno od

sklerenhima, primarnog i sekundarnog ksilema, a u kojem je moguće uočiti zrake srčike građene od jednog sloja stanica (Slika 37). Zadebljale stijenke stanica (sklerenhimski idioblasti, pločasti kolenhim, odnosno traheje, traheide i drvenčice u drvu) boje se crveno sa safraninom. Ranije je zabilježeno da je pojava sklerenhimskih idioblasta u stabljikama i korijenu vrsta roda *Globularia* najčešća upravo kod ove vrste (Luhan, 1954). U kori je moguće uočiti i prisutnost masnih kapljica, koje je također primijetila Luhan (1954), dok su u drvu prisutni spojevi koji daju narančasto obojenje s kalijevim hidroksidom (Slika 37).

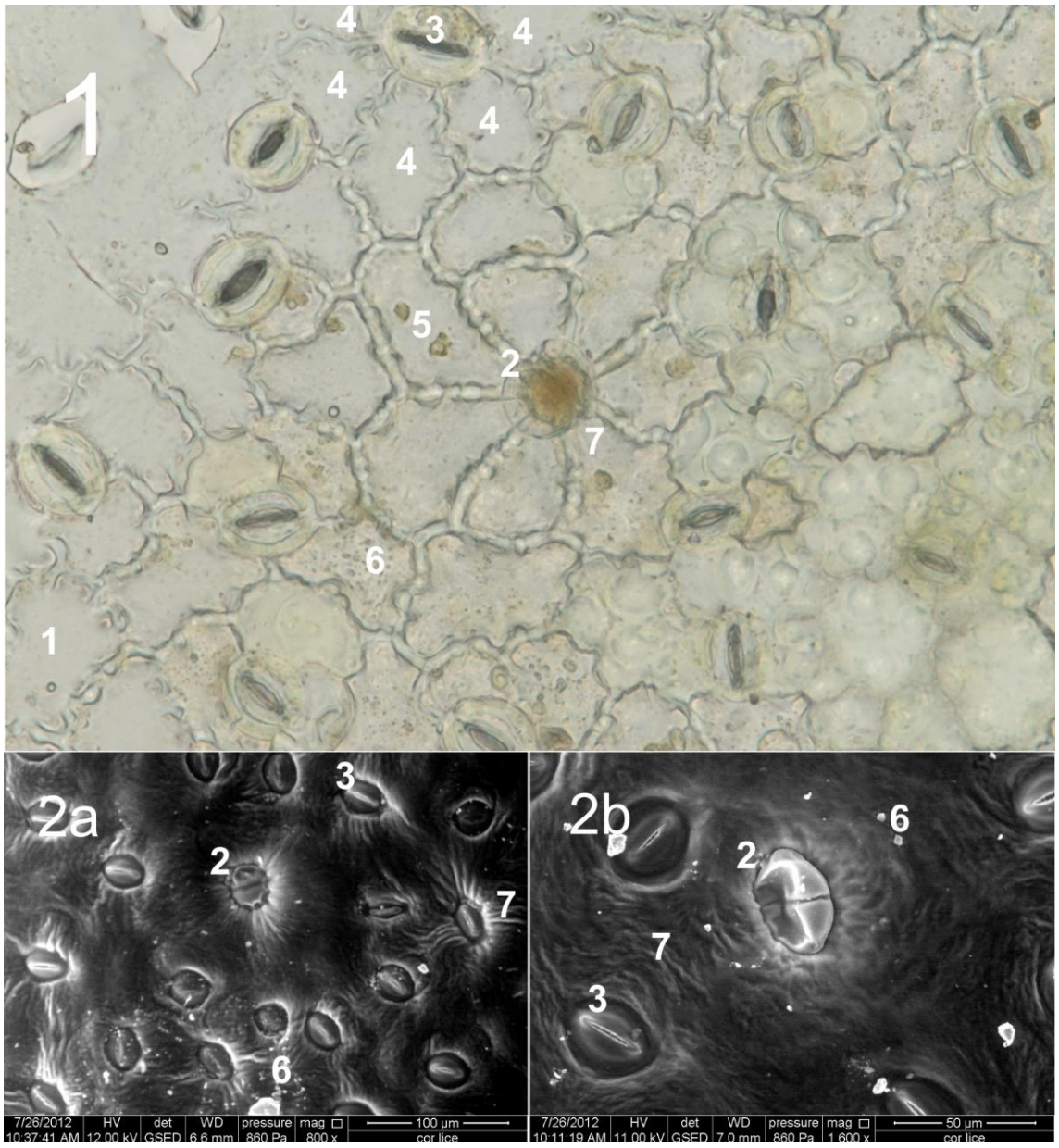


Slika 37. Poprečni prerez korijena vrste *G. cordifolia* gledan svjetlosnim mikroskopom: neobojeni prerez kroz korijen – povećanje 100x (1a) i rub korijena primarne građe – povećanje 400x (1b); rub korijena sekundarne građe neobojen – povećanje 400x (2a) i obojen kalijevim hidroksidom – povećanje 400x (2b); središnji dio korijena sekundarne građe u kalijevom hidroksidu – povećanje 100x (3a) i povećanje 400x (3b); 1 – rizoderma, 2 – primarna kora, 3 – središnji valjak, 4 – sklerenhimski idioblast, 5 – periderma, 6 – pločasti kolenhim, 7 – sekundarni floem, 8 – primarni floem, 9 – sklerenhimski ovoj, 10 – parenhim primarne kore, 11 – kora, 12 – drvo, 13 – sekundarni ksilem, 14 – zraka srčike, 15 – primarni ksilem

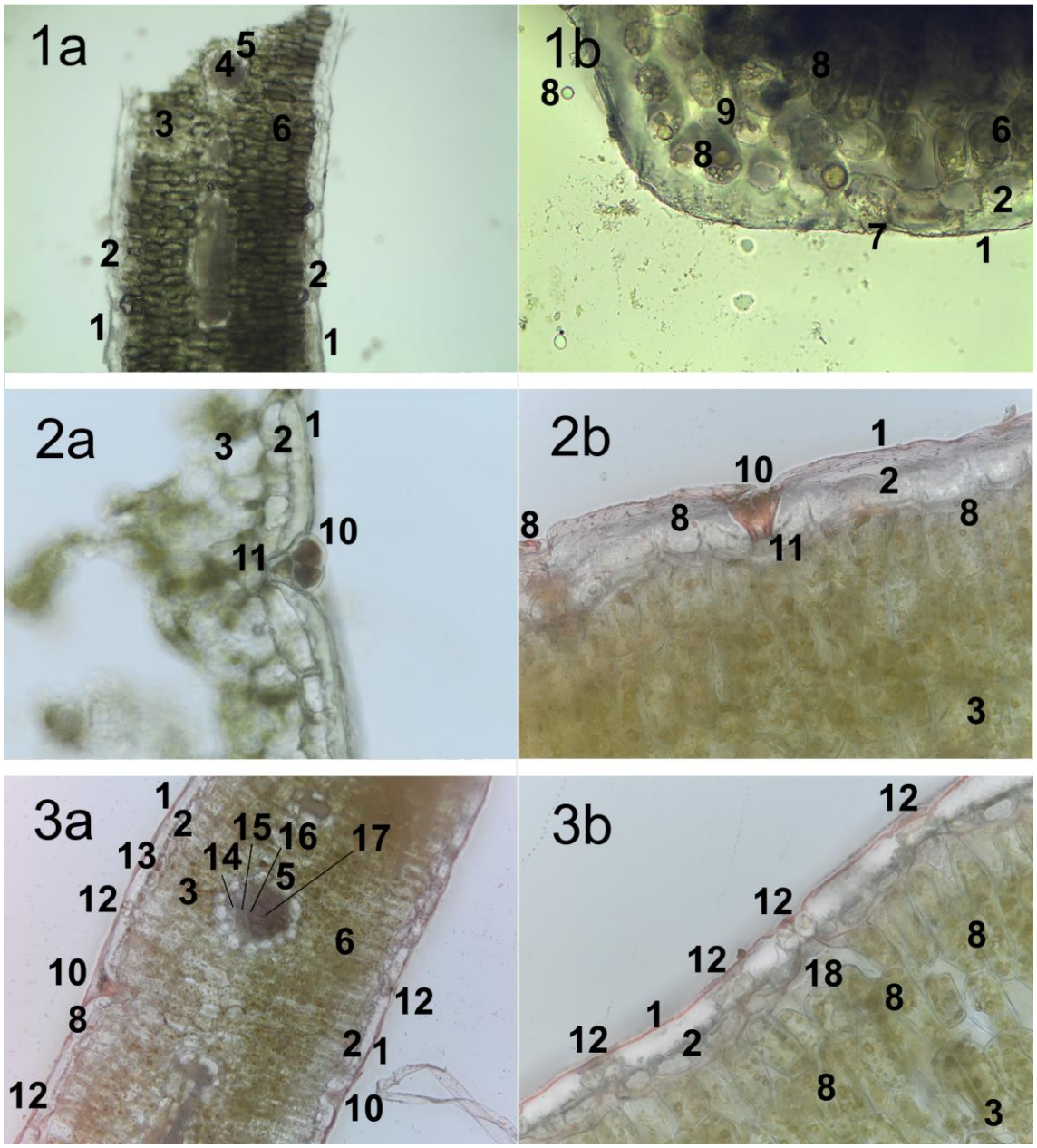
4.1.2.3. Histološko-anatomska obilježja vrste *G. meridionalis*

Listovi vrste *G. meridionalis* (pseudo)dorziventralne su građe, pri čemu mezofil lista čine tri do četiri reda gusto pakiranih kratko izduženih stanica sa strane lica (palisadni parenhim) i šest do sedam redova rjeđe pakiranih kratko izduženih stanica s naličja (spužvasti parenhim). Stanice epiderme su velike, blago sinusoidnih stijenki, koje su s vanjske strane značajno zadebljale i prekrivene kutikulom (boji se crvenkasto sa Sudanom III). Puči su velike, brojne, okružene uglavnom s četiri (rjeđe tri ili pet) stanica susjedica koje se svojom veličinom i oblikom ne razlikuju od ostalih stanica epiderme, a smještene su s obje strane lista. Glavičaste žlijezde također su smještene s obje strane lista, a građene su od jednostaničnog drška i dvostanične glavice koja luči sadržaj smeđe boje (boji se crveno sa Sudanom III). Žlijezde su uz epidermske stanice i puči često prekrivene zrnatim sekretom nepoznatog sastava te su pričvršćene za bazalnu stanicu koja je okružena sa šest do osam epidermskih stanica. U mezofilu je smještena jedna veća središnja i nekoliko manjih bočnih kolateralnih žila koje su od okolnih parenhimskih stanica s kloroplastima odvojene slojem većih bezbojnih parenhimskih stanica. Iznad floemskog dijela središnje žile, a ispod parenhimskog ovoja žile, prisutna je i nakupina sklerenhimskih vlakana (jedan do dva sloja). U ravnini središnje žile ispod stanica donje epiderme prisutan je povremeno i jedan sloj kolenhimskih stanica. U stanicama epiderme i mezofila lista moguće je uočiti veće i manje žućkaste do plavičaste masne kapljice, koje se boje crvenkasto sa Sudanom III. U pojedinim stanicama epiderme mogu biti prisutne i smeđe nakupine (Slike 38-39).

Prema Heckelu (1894), građa mezofila listova svojte *G. cordifolia* L. var. *bellidifolia* Rouy. je centralna lakunarna, a njihove epidermske stanice su velike i sinusoide te često sadrže klorofil, dok su puči okružene s četiri do šest stanica susjedica. Opažanje klorofila vjerojatno je posljedica uočavanja veće količine malih masnih kapljica u epidermskim stanicama. Isti je autor kod ove svojte primijetio prisutnost malih kristala nepoznatog sastava, koji nisu kristali kalcijevog oksalata, ali je naveo i da žlijezde nisu prekrivene vapnenačkim sekretom. Prisutnost kolenhimskog izbočenja (1 sloj stanica) u ravnini središnje žile naveo je kao karakteristiku ove svojte koja se ne javlja kod svojte *G. cordifolia* L. var. *intermedia* Rouy. Anatomske karakteristike listova vrste *G. nudicaulis*, koja prema Heckelu pokazuje najveću anatomsku sličnost sa svojtom *G. cordifolia* var. *bellidifolia*, uključuju žlijezde čija je glavica građena od četiri sekretorne stanice, dorziventralnu građu lista i dvoslojni kolenhim na naličju lista u ravnini središnje žile (Heckel, 1894). Karakteristične žlijezde, kao ni kombinacije navedenih značajki, nisu uočene ni kod jednog od istraživanih uzoraka.



Slika 38. Naličje lista vrste *G. meridionalis* gledano svjetlosnim mikroskopom – povećanje 500x (1); lice lista vrste *G. meridionalis* gledano elektronskim mikroskopom – povećanje 800x (2a) i 1600x (2b); 1 – stanica epiderme, 2 – glavičasta žlijezda, 3 – puč, 4 – stanica susjedica, 5 – masne kapljice, 6 – zrnati sekret, 7 – nabori epiderme

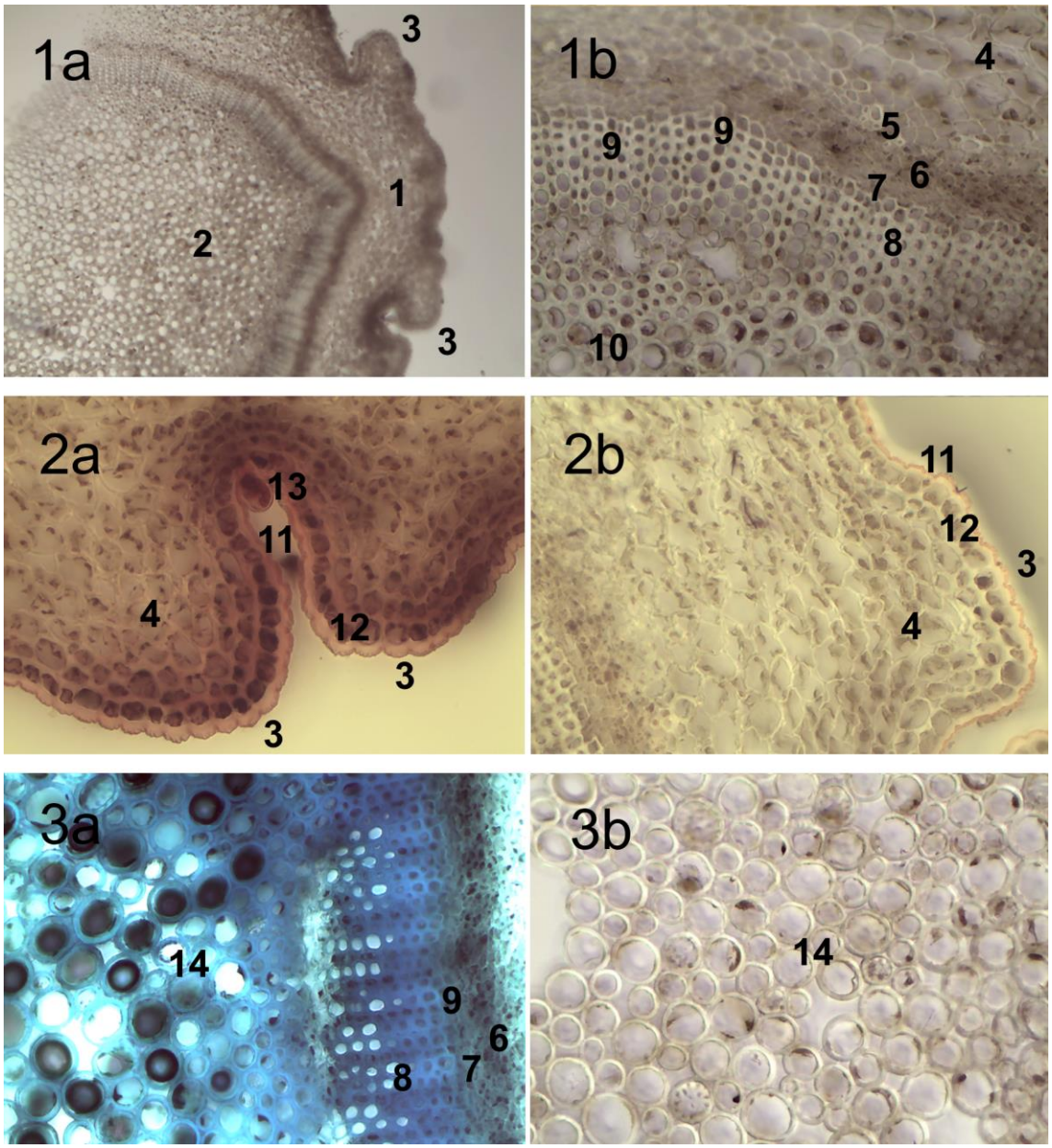


Slika 39. Poprečni prerez lista vrste *G. meridionalis* gledan svjetlosnim mikroskopom: neobojeni prerez kroz list – povećanje 100x (1a) i rub lista – povećanje 400x (1b); naličje lista neobojeno (2a) i obojeno Sudanom III – povećanje 500x (2b); Sudanom III obojeni prerez kroz list – povećanje 100x (3a) i rub lista – povećanje 500x (3b); 1 – kutikula, 2 – epiderma, 3 – spužvasti parenhim, 4 – kolateralna žila, 5 – parenhimski ovoj žile, 6 – palisadni parenhim, 7 – zrnati sekret, 8 – masne kapljice, 9 – kolenhimsko zadebljanje, 10 – glavičasta žlijezda, 11 – bazalna stanica žlijezde, 12 – puč, 13 – smeđi sekret, 14 – sklerenhimski ovoj žile, 15 – floem, 16 – kambij, 17 – ksilem, 18 – odušak

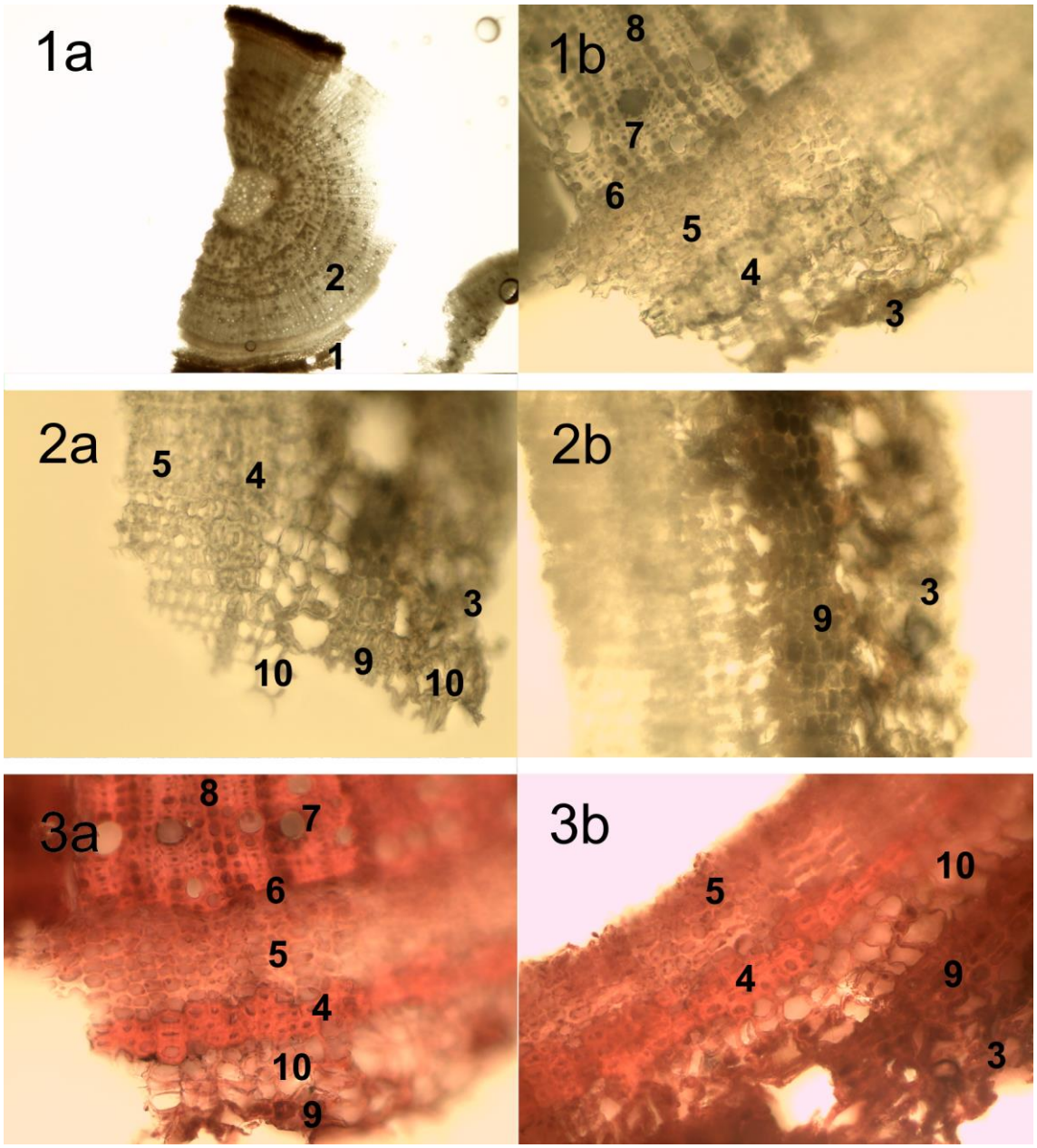
Mlada (jednogodišnja cvatuća) stabljika vrste *G. meridionalis* građena je od primarne kore i središnjeg valjka. Primarnu koru čini jednoslojna epiderma zadebljale stanične stijenke, presvučena kutikulom (boji se crveno sa Sudanom III), hipoderma građena od jednog do dva reda kolenhimskih stanica koje čine manji broj pravilno raspoređenih trokutastih izbočenja te parenhim primarne kore građen od pet do sedam redova stanica. U epidermi je moguće uočiti pokoju glavičastu žlijezdu i puč. Sadržaj zelenosmeđe do smeđe boje vidljiv je u svim stanicama primarne kore, a moguća je i prisutnost žućkastih masnih kapljica. Središnji valjak čini floem građen od tri do četiri reda stanica, uski kambijski prsten, ksilem građen od četiri do pet redova stanica, zrake srčike građene od jednog sloja parenhimskih stanica i srčika koju čine stanice slabije zadebljalih stijenki, odnosno koje su više zadebljale na periferiji (Slika 40), što je usporedivo je s opisom anatomske građe stabljike svojte *G. cordifolia* var. *bellidifolia* (Heckel, 1894).

Kod višegodišnje drvenaste stabljike moguća je prisutnost sklerenhimskog ovoja u obliku gotovo neprekidnog prstena, što je u skladu s literaturnim podacima (Schweingruber i sur., 2013). Uz višeslojnu peridermu prisutan je i višeslojni pločasti kolenhim, čije stijenke se, kao i stijenke sklerenhimskih stanica, boje crveno sa safraninom. Također, kao i u drugim biljnim organima, moguća je prisutnost masnih kapljica u parenhimu primarne kore. Drvo je najvećim dijelom građeno od sekundarnog ksilema kod kojeg su granice godova jasno uočljive (za razliku od višegodišnjeg korijena). Zrake srčike su građene od jednog reda parenhimskih stanica (Slika 41), što je u skladu s literaturnim podacima (Schweingruber i sur., 2013).

Korijen vrste *G. meridionalis* drvenaste je građe kao i kod ostalih istraživanih vrsta. Sekundarno građeni korijen anatomski je sličan višegodišnjoj drvenastoj stabljici te je kod njega moguće razlikovati koru građenu od višeslojne periderme, pločastog kolenhima te primarnog i sekundarnog floema, odnosno drvo građeno od primarnog i sekundarnog ksilema, a u kojem je moguće uočiti zrake srčike građene od jednog sloja stanica i idioblaste s rezervnim tvarima narančaste do crvene boje.



Slika 40. Poprečni prerez jednogodišnje stabljike vrste *G. meridionalis* gledan svjetlosnim mikroskopom: neobojeni prerez kroz stabljiku – povećanje 100x (1a), dio primarne kore i središnjeg valjka – povećanje 400x (1b); prerez kroz rub stabljike obojen safraninom – povećanje 400x (2a) i Sudanom III – povećanje 400x (2b); prerez kroz središnji valjak obojen toluidinskim modrilom – povećanje 400x (3a); neobojeni prerez kroz srčiku – povećanje 400x (3b); 1 – primarna kora, 2 – središnji valjak, 3 – kolenhimsko izbočenje, 4 – parenhim primarne kore, 5 – sklerenhimski ovoj, 6 – floem, 7 – kambijski prsten, 8 – ksilem, 9 – zraka srčike, 10 – srčika, 11 – kutikula, 12 – epiderma, 13 – glavičasta žlijezda, 14 – parenhim srčike zadebljalih stijenki



Slika 41. Poprečni prerez drvenaste stabljike vrste *G. meridionalis* gledan svjetlosnim mikroskopom: neobojeni prerez kroz stabljiku – povećanje 40x (1a) i rub stabljike – povećanje 400x (1b, 2a, 2b); rub stabljike obojen safraninom – povećanje 400x (3a, 3b); 1 – kora, 2 – drvo s jasno uočljivim granicama godova, 3 – periderma, 4 – sklerenhimski ovoj, 5 – sekundarni floem, 6 – kambij, 7 – sekundardni ksilem, 8 – zraka srčike, 9 – pločasti kolenhim, 10 – pluto

4.1.2.4. Histološko-anatomska obilježja vrste *G. punctata*

Listovi vrste *G. punctata* dorziventralne su građe, pri čemu je palisadni parenhim građen od dva do tri reda stanica, a spužvasti od pet do šest redova stanica. Epidermske stanice su velike i sinusoidnih stijenki (posebno na naličju), koje su s vanjske strane jače zadebljale i prekrivene kutikulom (boji se crvenkasto sa Sudanom III). Puči su velike, brojne, okružene s četiri, rjeđe tri ili pet, stanica susjedica anomocitičnog poretka i mogu biti lagano izbočene, a smještene su s obje strane lista, kao i glavičaste žlijezde koje luče sadržaj smeđe boje. Žlijezde su građene od jednostaničnog drška i glavice s dvije sekretorne stanice te smještene u udubljenjima epiderme i povremeno su prekrivene zrnatim sekretom nepoznatog sastava. Pričvršćene su za bazalnu stanicu koja je okružena s četiri do šest epidermskih stanica (Slike 42-43). U mezofilu su smještene brojne kolateralne žile, koje su obavijene žilnim ovojem građenim od parenhimskih stanica. Središnja žila obavijena je i nakupinom sklerenhimskih stanica iznad floemskog dijela središnje žile, na koju se nastavljaju tri do četiri reda kolenhimskih stanica koje ju povezuju s donjom epidermom, što je primijetio i Heckel (1894). U ravnini većih žila prisutna su i dodatna kolenhimska izbočenja s donje strane lista.

U stanicama epiderme moguće je uočiti veće i manje žućkaste do plavičaste masne kapljice, koje su ponekad vidljive i u stanicama mezofila lista, a boje se crvenkasto sa Sudanom III. U pojedinim stanicama epiderme povremeno su prisutne i smeđe nakupine (Slike 42-43). Imajući na umu da su plavičaste kapljice primijećene kod svih istraživanih vrsta osim kod vrste *G. alypum*, kod koje su u pravilu bile uočene samo masne kapljice žute boje, moguće je da je plavičasto obojenje posljedica prisutnosti iridoida asperulozida (Briggs i Cain, 1954). Asperulozid je ranije izoliran iz vrsta *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* (Kirmizibekmez i sur., 2003b; Tundis i sur., 2012b; Kirmizibekmez i sur., 2009), a u ovom istraživanju potvrđeno je da je on jedan od njihovih glavnih sekundarnih metabolita. Populacija vrste *G. cordifolia* koja je rasla uz rijeku Neretvu, u području potencijalno veće vlažnosti, jedina je od svih istraživanih populacija vrsta *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* koja nije sadržavala veću količinu asperulozida, dok su u njezinim epidermskim stanicama uočene veće količine smeđeg sekreta, koji bi mogao biti rezultat hidrolize i posljedične polimerizacije ovog spoja (Briggs i Cain, 1954).

Karakteristične masne kapljice moguće je uočiti i u praškastom biljnom materijalu (list) starom do pet godina, a uz njih je moguće uočiti i druge značajke glavulja, kao što su anomocitični poredak puči, glavičaste žlijezde ispunjene smeđim sadržajem, smeđe obojene

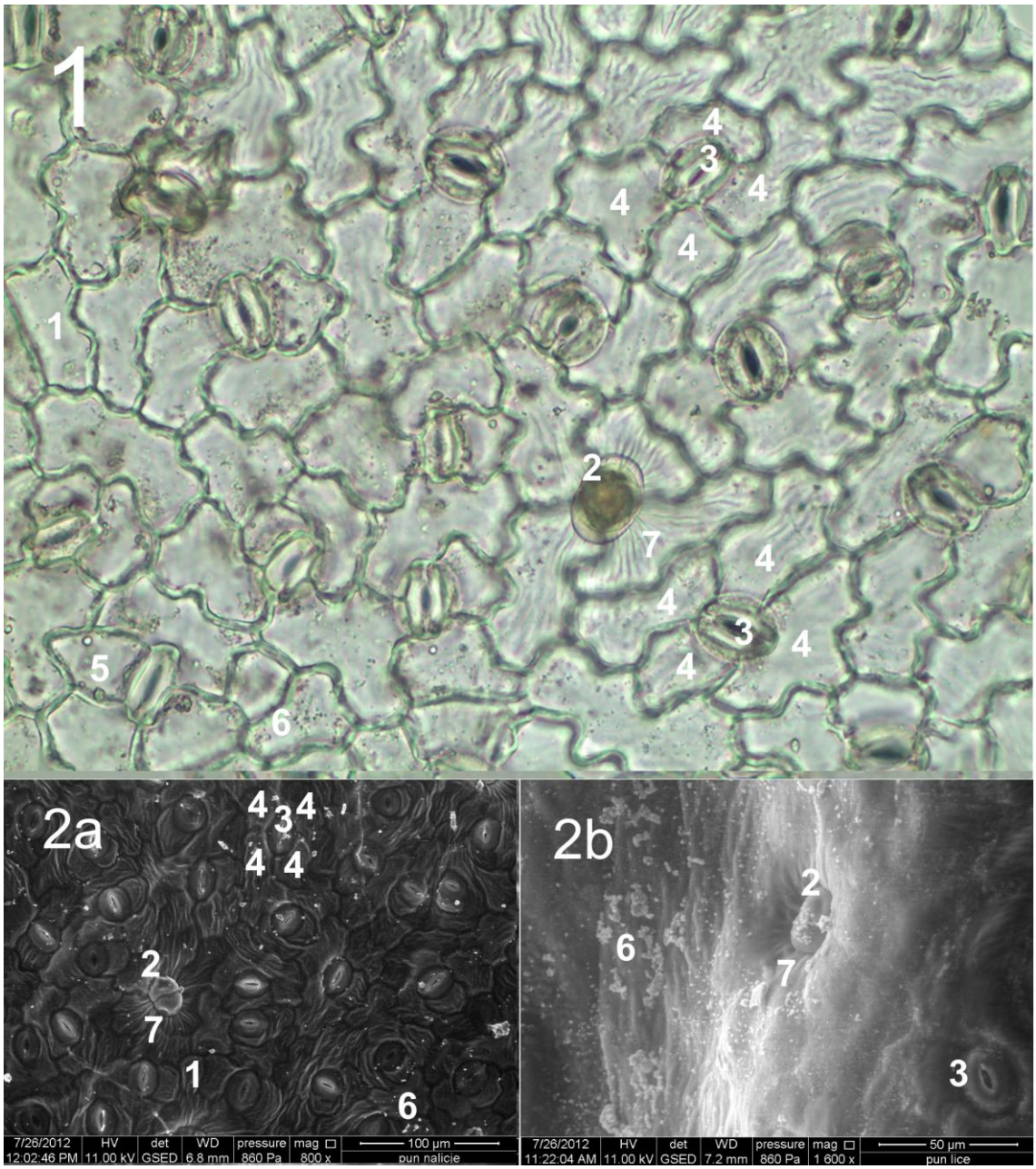
vakuole epidermskih stanica, stanica zapornica puči i stanica mezofila nakon tretiranja kalijevim hidroksidom te kolateralne žile okružene parenhimskim ovojem (Slika 44).

Heckel (1894) je za vrstu *G. punctata*, koju navodi pod nazivom *G. vulgaris* L. (= G. *Willkommii* Nym. = *G. Linnaei* var. *minor* Rouy.), zabilježio prisutnost pet do šest stanica susjedica. Njegovi su uzorci imali veći broj stanica susjedica puči u usporedbi s našima, uz iznimku vrste *G. alypum*, kod koje u okviru ovog istraživanja nije uočena moguća prisutnost dvije stanice susjedice koju navodi Heckel (1894). S druge strane, kod vrste *G. vulgaris* L (= *G. spinosa* Lamk. = *G. Valentina* Willkomm = *G. Linnaei* var. *major* Rouy.), isti autor je zabilježio prisutnost četiri do osam stanica susjedica, ali je uočio i veći broj slojeva stanica mezofila lista te prisutnost udubljenja listova na licu umjesto kolenhimskih izbočenja na naličju (Heckel, 1894), što ju anatomski razlikuje od vrste *G. punctata*, koja je istražena u okviru ovog rada. Obje vrste pripadaju sekciji *Globularia* (Holländer i Jäger, 1994).

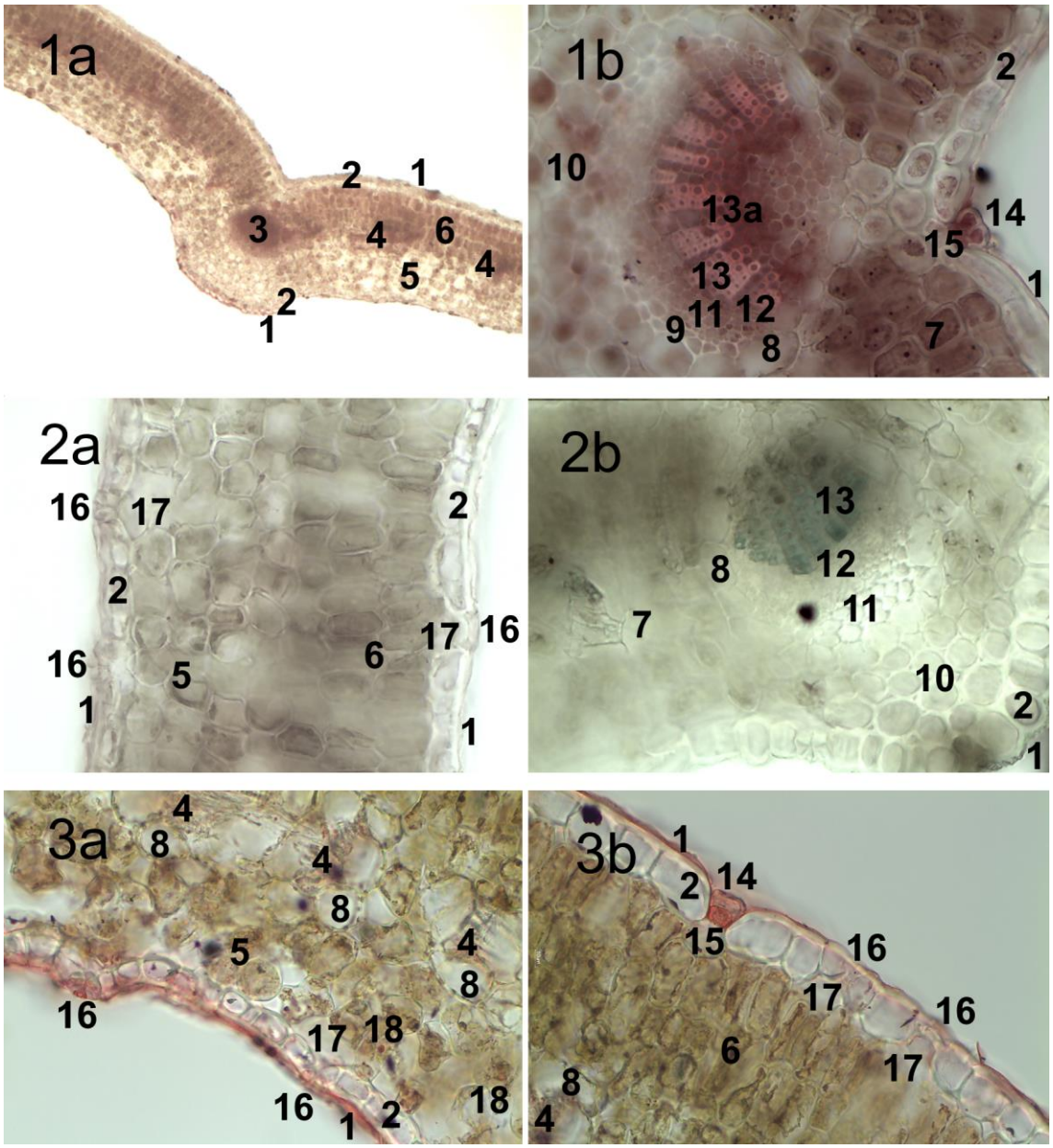
Stabljika vrste *G. punctata* (zelena cvatuća) građena je od primarne kore i središnjeg valjka. Primarnu koru čini jednoslojna epiderma zadebljale stanične stijenke, presvučena kutikulom, hipoderma građena od više redova (desetak) kolenhimskih stanica koje čine veći broj (preko deset) pravilno raspoređenih trokutastih izbočenja, parenhim primarne kore građen od tri do pet redova stanica s kloroplastima, na koje se nastavljaju dva do tri reda bezbojnih stanica u kojima je moguće uočiti žućkaste masne kapljice. U epidermi je moguće uočiti dosta glavičastih žlijezda i puči koje mogu, ali i ne moraju biti istaknute. Središnji valjak čini ovoj manjih nakupina sklerenhimskih stanica, koje se sa safraninom boje intenzivno crveno (uočen kod populacije s Grobničkog polja), floem građen od četiri do pet redova stanica, uski kambijski prsten, ksilem građen od četiri do šest redova stanica i srčika građena od parenhimskih stanica, koja ponekad može biti šuplja uslijed pucanja nezadebljalih staničnih stijenki. Zrake srčike građene su od jednog sloja parenhimskih stanica (Slika 45). Prisutnost nakupina sklerenhimskih stanica moguće je povezati s poodmaklim periodom cvatnje sakupljenih uzoraka, uslijed kojeg dolazi do postupnog odrvenjivanja stabljike, kao što je ranije navedeno na primjeru vrste *G. cordifolia*.

Korijen vrste *G. punctata* drvenaste je građe. Kod mladog korijena moguće je razlikovati jednoslojnu rizodermu, čije stanice mogu biti ispunjene smeđim sekretom, primarnu koru u kojoj je moguća prisutnost masnih kapljica te središnji valjak s radijalnom žilom. Sekundarnu građu korijena karakterizira kora sastavljena od višeslojne periderme te primarnog i sekundarnog floema, odnosno drvo sastavljeno od primarnog (prevladavaju traheje) i sekundarnog ksilema (prevladavaju traheide i drvenčice), u kojem su prisutne primarne i sekundarne zrake srčike, a koje je od kore odvojeno kambijskim prstenom.

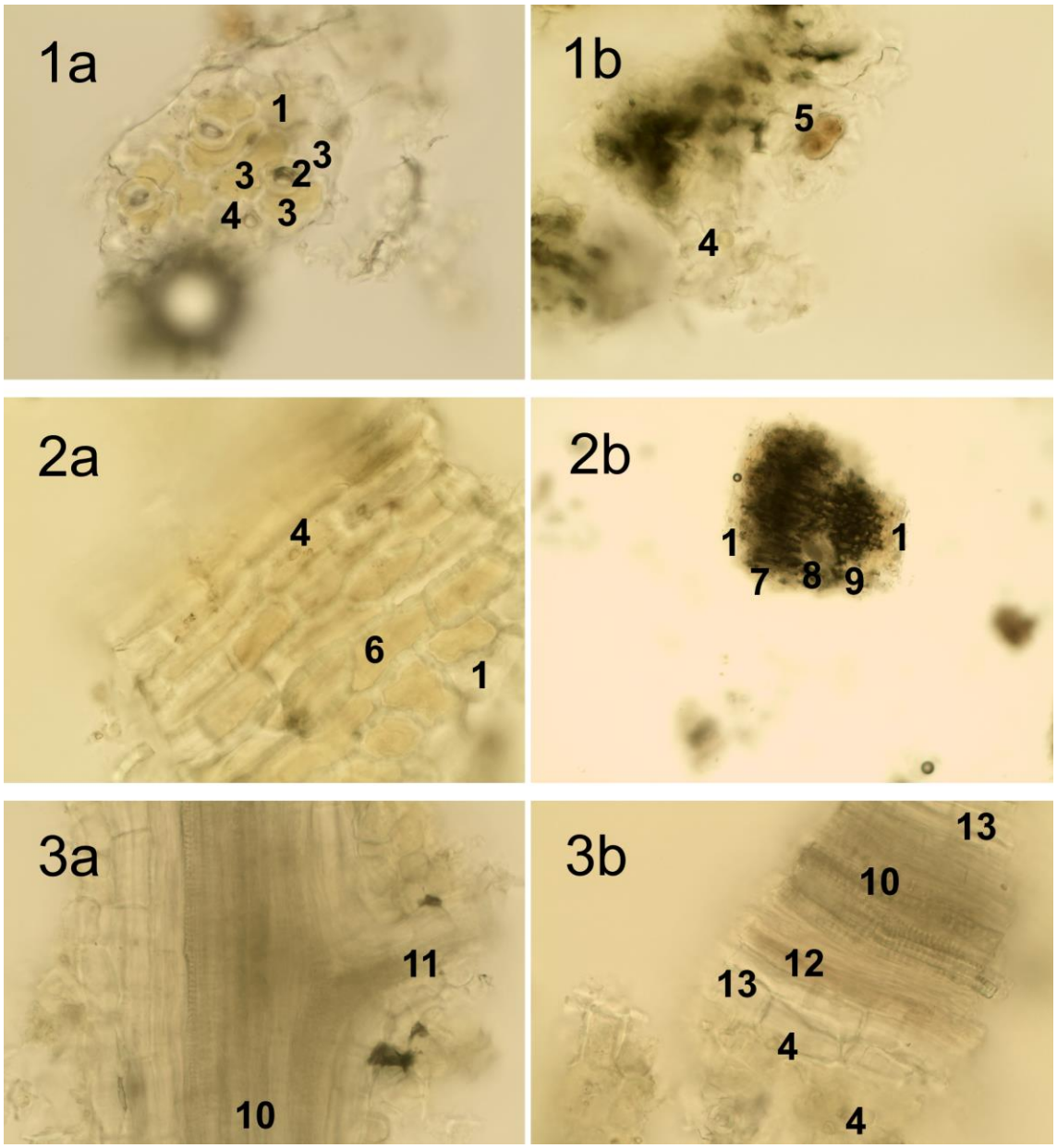
Primarne zrake srčike mogu biti građene od jednog ili dva sloja parenhimskih stanica (Slika 46). Veći broj slojeva parenhimskih stanica ranije je zabilježen u drvu stabljike vrste *G. trichosantha* (Schweingruber i sur., 2013), koja kao i vrsta *G. punctata* pripada sekciji *Globularia* (Holländer i Jäger, 1994).



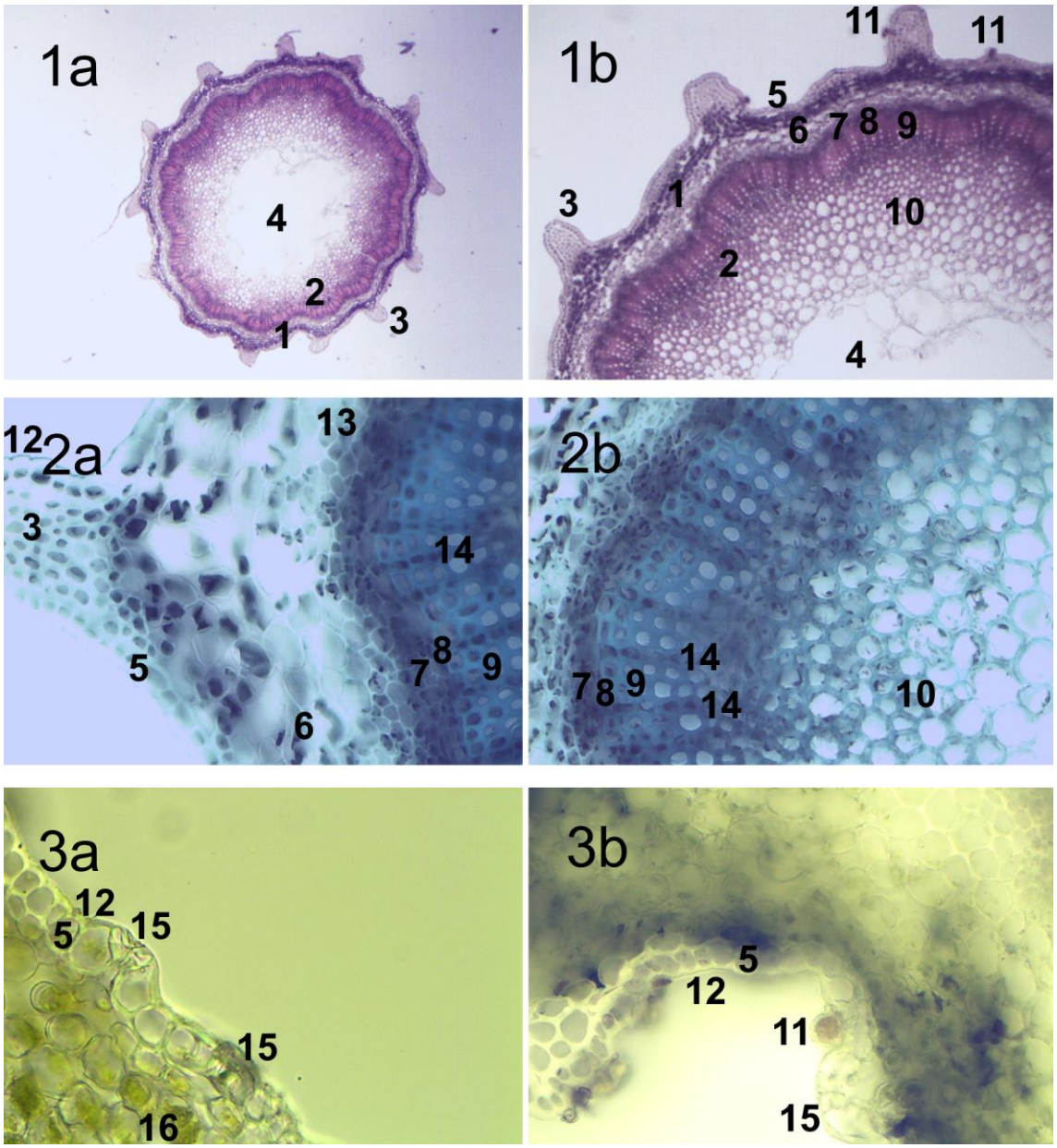
Slika 42. Naličje lista vrste *G. punctata* gledano svjetlosnim mikroskopom – povećanje 400x (1); gledano elektronskim mikroskopom – povećanje 800x (2a); lice lista vrste *G. punctata* gledano elektronskim mikroskopom – povećanje 1600x (2b); 1 – stanica epiderme, 2 – glavičasta žlijezda, 3 – puč, 4 – stanica susjedica, 5 – masne kapljice, 6 – zrnati sekret, 7 – nabori epiderme



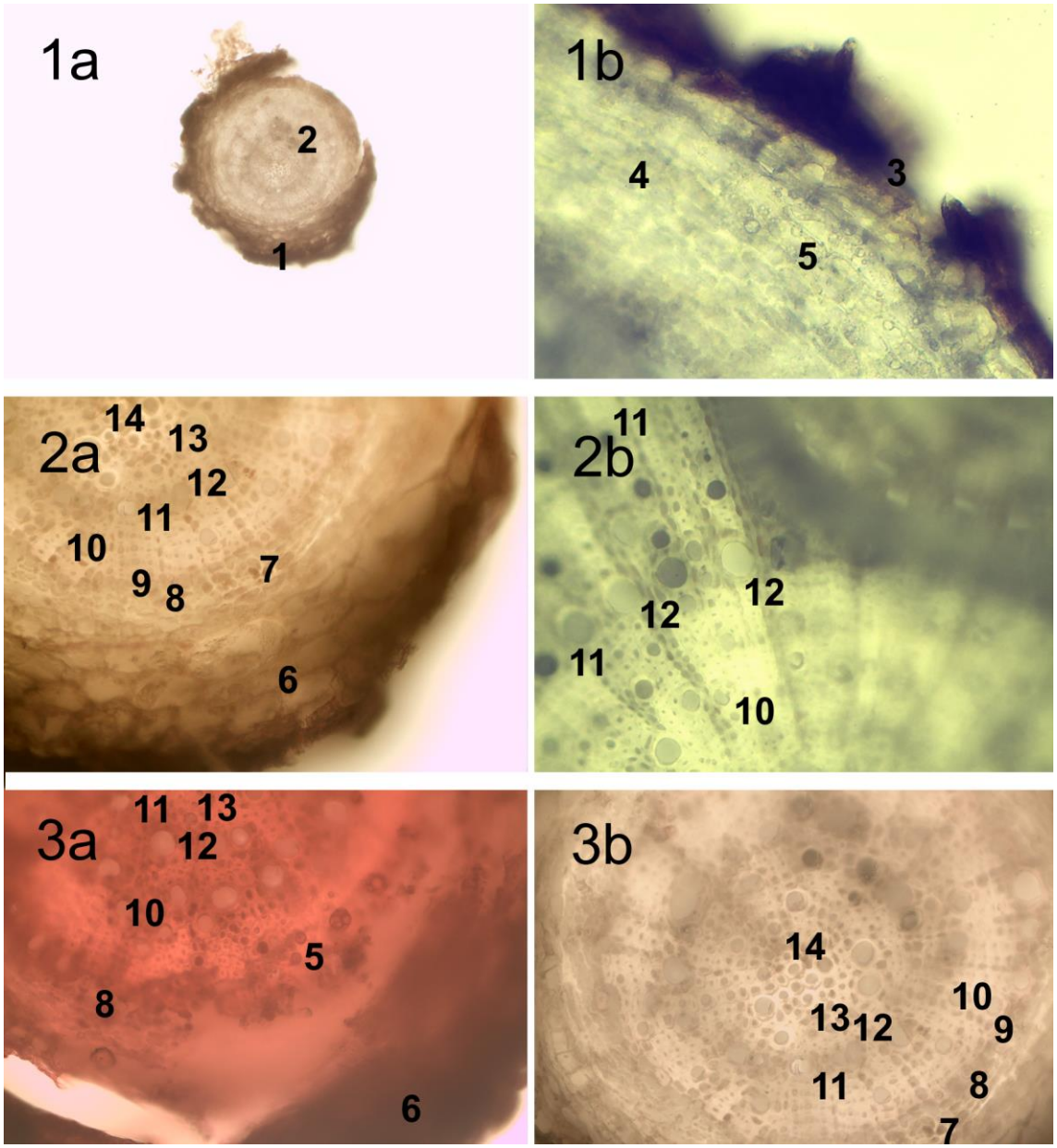
Slika 43. Poprečni prerez lista vrste *G. punctata* gledan svjetlosnim mikroskopom: safraninom obojeni prerez kroz list – povećanje 100x (1a) i središnju žilu – povećanje 400x (1b); neobojeni prerez kroz list – povećanje 400x (2a); toluidinskim modrilom obojeni prerez kroz žilu – povećanje 400x (2b); Sudanom III obojeno naličje – povećanje 400x (3a) i lice lista – povećanje 400x (3b); 1 – kutikula, 2 – epiderma, 3 – središnja žila, 4 – bočna žila, 5 – spužvasti parenhim, 6 – palisadni parenhim, 7 – mezofil, 8 – parenhimski ovoj žile, 9 – sklerenhimski ovoj žile, 10 – kolenhimsko rebro, 11 – floem, 12 – kambij, 13 – ksilem, 13a – primarni ksilem, 14 – glavičasta žlijezda, 15 – bazalna stanica žlijezde, 16 – puč, 17 – odušak, 18 – masne kapljice



Slika 44. Mikroskopski pregled pet godina starog praška dobivenog od listova vrste *G. punctata* (Grobničko polje) u otopini kalijevog hidroksida: anomocitične puči – povećanje 400x (1a); rub lista – povećanje 400x (1b); epidermske stanice – povećanje 400x (2a); dorziventralna građa lista – povećanje 400x (2b); kolateralna žila – povećanje 400x (3a, 3b); 1 – stanica epiderme, 2 – puč, 3 – stanica susjedica, 4 – masne kapljice, 5 – glavičasta žlijezda, 6 – obojena vakuola, 7 – palisadni parenhim, 8 – kolateralna žila, 9 – spužvasti parenhim, 10 – ksilem, 11 – bočna žila, 12 – floem, 13 – parenhimski ovoj žile



Slika 45. Poprečni prerez stabljike vrste *G. punctata* gledan svjetlosnim mikroskopom: safraninom obojeni prerez kroz stabljiku – povećanje 40x (1a) i 100x (1b); toluidinskim modrilom obojeni prerez kroz rub i središnji dio stabljike – povećanje 400x (2a, 2b); neobojeni prerez kroz rub stabljike – povećanje 400x (3a, 3b); 1 – primarna kora, 2 – središnji valjak, 3 – kolenhimsko izbočenje, 4 – reksigeni međustanični prostor, 5 – epiderma, 6 – parenhim primarne kore, 7 – floem, 8 – kambijski prsten, 9 – ksilerm, 10 – srčika, 11 – glavičasta žlijezda, 12 – kutikula, 13 – sklerenhimski ovoj, 14 – zraka srčike, 15 – puč, 16 – masne kapljice



Slika 46. Poprečni prerez korijena vrste *G. punctata* gledan svjetlosnim mikroskopom: neobojeni prerez kroz korijen sekundarne građe – povećanje 100x (1a), rub korijena – povećanje 400x (1b) i središnji dio korijena – povećanje 400x (2a, 2b); središnji dio korijena sekundarne građe obojen safraninom – povećanje 400x (3a) i neobojen – povećanje 400x (3b); 1 – kora, 2 – drvo, 3 – pluto, 4 – primarna kora, 5 – masne kapljice, 6 – periderma, 7 – primarni floem, 8 – sekundarni floem, 9 – kambij, 10 – sekundarni ksilem, 11 – sekundarna zraka srčike, 12 – primarna zraka srčike, 13 – primarni ksilem, 14 – srčika od sklerenhima

Na temelju usporedbe histološko-anatomskih značajki sve četiri istraživane vrste nije uočena značajna razlika u građi listova, cvjetova i stabljike vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*, kao što je to ranije primijetio i Ravnik (1965). Pri ovoj usporedbi u obzir nisu uzete kvantitativne značajke, kao što su broj stanica susjedica puči, broj stanica koje okružuju bazalnu stanicu žlijezde i broj stanica mezofila lista, budući da se njihove vrijednosti kod različitih vrsta mogu međusobno preklapati.

Tablica XII. Usporedba histološko-anatomskih značajki listova vrsta *G. alypum, G. cordifolia, G. meridionalis* i *G. punctata*

Anatomska značajka	*G. alypum*	*G. cordifolia*	*G. meridionalis*	*G. punctata*
Izolateralni list	+	-	-	-
Debela kutikula	+	+	+	+
Jednoslojna epiderma	+	+	+	+
Sinusoidne stijenke epidermskih stanica	-	+	+	+
Izrazito naborana donja epiderma	-	-	-	+
Glavičaste žlijezde s dvostaničnom glavicom	+	+	+	+
Obilan vapnenački sekret	+	-	-	-
Udubljene puči	+	-	-	-
Istaknute puči	-	-	-	+
Kristali kalcijevog oksalata u epidermi	+	-	-	-
Masne kapljice žute boje u epidermi i mezofilu	+	+	+	+
Masne kapljice plave boje u epidermi	-	+	+	+
Smeđi talog u epidermi	-	+	+	+
Izraženi parenhimski ovoj oko središnje žile	-	+	+	+
Sklerenhimski ovoj oko floema središnje žile	+	+	+	+
Sklerenhimski ovoj oko ksilema središnje žile	+	-	-	-
Parenhimski ovoj oko bočnih žila	+	+	+	+
Sloj kolenhimskih stanica između donje epiderme i središnje žile	-	-	-	+
Kolenhimsko zadebljanje na naličju u ravnini središnje žile	+	+	+	+
Kolenhimsko zadebljanje na naličju u ravnini bočnih žila	-	-	-	+

+ – zabilježena, - – nije zabilježena

Uočena je veća sličnost vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* s vrstom *G. punctata*, kao što je prikazano na primjeru usporedbe histološko-anatomskih značajki listova (Tablica XII). Ovo je suprotno ranijim zaključcima, prema kojima je vrsta *G. cordifolia* anatomski sličnija, odnosno srodnija s vrstom *G. alypum* (Heckel, 1894). Također, ovakvo grupiranje nije u skladu s predloženom podjelom na podrodove prema kojoj su vrste *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. alypum* pripadnice zajedničkog podroda *Abolaria* (Schwarz, 1938; Schwarz, 1963). S druge strane, vrste *G. punctata* i *G. cordifolia* prethodno su svrstane u zajedničku skupinu na temelju sličnog uzorka prožiljenosti listova (Holländer i Jäger, 1994).

U cilju pronalaska karakteristične značajke koja bi razlikovala vrstu *G. cordifolia* od vrste *G. meridionalis* izmjerena je veličina njihovih glavičastih žlijezda na naličju svježih listova, pri čemu je vrsta *G. punctata* služila kao kontrolna vrsta. Pokazalo se da je površina dvostanične glavice, kao i visina žlijezda kod vrste *G. meridionalis* značajno veća nego kod vrste *G. cordifolia* ($P < 0,05$) (Tablica XIII). Iako su dobiveni rezultati u skladu s očekivanjima s obzirom na, u pravilu, veću površinu listova vrste *G. meridionalis*, potrebno ih je uzeti s rezervom budući da navedeno istraživanje nije provedeno na većem broju jedinki.

Preliminarna usporedba veličine žlijezda kod osušenih listova vrsta *G. meridionalis* i *G. punctata*, također je pokazala da su žlijezde druge vrste manje od žlijezda prve vrste ($P < 0,05$). Glavice žlijezda vrste *G. meridionalis* bile su manje kod suhih listova u usporedbi sa svježim listovima ($P < 0,05$) (Tablica XIII), što bi moglo biti posljedica gubitka tijekom sušenja, odnosno čuvanja osušenog biljnog materijala.

Tablica XIII. Veličina glavičastih žlijezda vrsta *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* izražena kao srednja vrijednost ± standardna devijacija rezultata mjerenja provedenih na svježim (n = 30) i suhim listovima (n = 10)

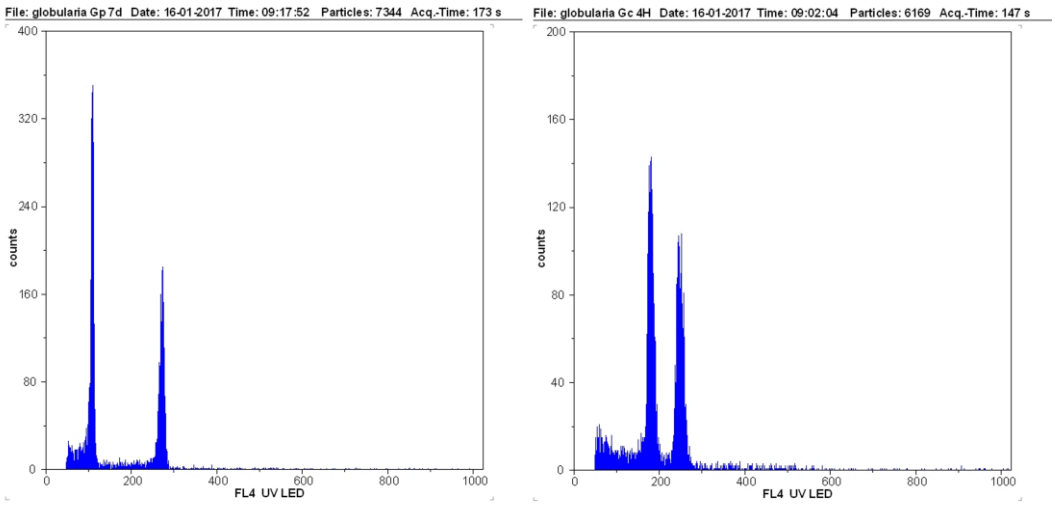
Značajke žlijezde	***G. cordifolia* (Alan)**	***G. meridionalis* (Grobničko polje)**	***G. punctata* (Grobničko polje)**
svježi listovi			
Površina glavice (μm^2)	$658,5 \pm 97,5^{b}$	$778,3 \pm 82,3^{aA}$	$526,2 \pm 94,0^{cA}$
Dužina glavice (μm)	$33,9 \pm 3,2^{a}$	$36,0 \pm 3,2^{aA}$	$31,2 \pm 3,7^{bA}$
Širina glavice (μm)	$23,6 \pm 1,8^{a}$	$25,1 \pm 3,1^{aA}$	$19,9 \pm 2,0^{bB}$
Visina žlijezde (μm)	$25,2 \pm 2,9^{b}$	$31,1 \pm 2,8^{aB}$	$20,1 \pm 2,1^{cA}$
suhi listovi			
Površina glavice (μm^2)	n.i.	$664,6 \pm 22,3^{aB}$	$530,5 \pm 17,8^{bA}$
Dužina glavice (μm)	n.i.	$33,5 \pm 0,6^{aB}$	$29,9 \pm 0,8^{bA}$
Širina glavice (μm)	n.i.	$21,4 \pm 0,5^{aB}$	$22,7 \pm 0,8^{aA}$
Visina žlijezde (μm)	n.i.	$34,5 \pm 0,5^{aA}$	$20,5 \pm 0,7^{bA}$

vrijednosti u eksponentu naznačene različitim malim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju između vrsta ($P < 0,05$): a > b > c; vrijednosti u eksponentu naznačene različitim velikim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju između suhih i svježih listova ($P < 0,05$): A > B; n.i. – nije ispitano

4.1.3. Citološka obilježja

4.1.3.1. Ploidnost i veličina genoma

U cilju provjere citoloških obilježja na temelju kojih bi se prema literaturnim podacima vrsta *G. cordfiolia* trebala razlikovati od vrste *G. meridionalis* (Schwarz, 1963), u tjelesnim stanicama ovih vrsta određen je broj homolognih kromosoma, odnosno njihova ploidnost, primjenom protočne citometrije nakon bojanja jezgara fluorescentnom bojom 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI), pri čemu je vrsta *G. punctata* služila kao kontrolna vrsta. U skladu s dosadašnjim literaturnim navodima (Larsen, 1957; Contandriopoulos, 1978; Schwarz, 1963), sve istraživane jedinke vrste *G. punctata* bile su diploidne, dok su istraživane jedinke vrste *G. cordifolia* bile tetraploidne (Slika 47, Tablica XIV).



Slika 47. Usporedba histograma DNA sadržaja diploidne jedinke vrste *G. punctata* (7D) i tetraploidne jedinke vrste *G. cordifolia* (4H) dobivenih protočnom citometrijom nakon bojanja DAPI bojom; desni pik pripada vrsti *Trifolium repens* L., 2*n* = 32 (Vižintin i sur., 2006), koja je služila kao unutarnji standard

Tetraploidne su također bile i sve istraživane jedinke vrste *G. meridionalis* (Tablica XIV), čime se dobiveni citološki rezultati poklapaju s onima koje su za populacije vrste *G. cordifolia* s.l. s područja Slovenije, Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Makedonije te Italije zabilježili Ravnik (1965) te Milletti (1987). Postojanje tetraploidnih jedinki vrste *G. meridionalis* zabilježio je i Schwarz, autor koji je spomenutu vrstu imenovao i opisao kao diploidnu, a pripisao ih je vjerojatnoj autopoliploidizaciji (Schwarz, 1963). Rezultati dobiveni u ovom istraživanju idu u prilog hipotezi da su svojte naznačene kao *G. cordifolia* i *G. meridionalis* zapravo pripadnice iste vrste (Ravnik, 1965; Milletti, 1987), ali i ukazuju na

to da nije riječ o hibridnoj vrsti koja je nastala kao posljedica preklapanja areala prethodno spomenutih vrsta, a koja bi bila očekivano triploidna ili heksaploidna (Schwarz, 1963).

Tablica XIV. Rezultati istraživanja ploidnosti vrsta *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* dobiveni protočnom citometrijom nakon bojanja DAPI bojom te relativni sadržaj genomske DNA izražen kao srednja vrijednost ± standardna devijacija rezultata mjerenja u pg

Lokacija	Oznaka jedinke	Relativni sadržaj genomske DNA (pg)	Srednja vrijednost ± standardna devijacija (pg)	Procijenjena ploidnost
G. cordifolia				
Alan	14A	1,520065	1,53 ± 0,01^{ab}	tetraploid
	14C	1,526431		tetraploid
	14E	1,538084		tetraploid
Mostar	4E	1,529311	1,52 ± 0,02^{ab}	tetraploid
	4H	1,520678		tetraploid
	4K	1,494147		tetraploid
Šestanovac	3E	1,530456	1,51 ± 0,03^{ab}	tetraploid
	3G	1,508595		tetraploid
	3I	1,476706		tetraploid
G. meridionalis				
Dinara 2	2D	1,493346	1,49 ± 0,01^{b}	tetraploid
	2E	1,485598		tetraploid
	2F	1,485666		tetraploid
	2G	1,501587		tetraploid
Grobničko polje	6F	1,544625	1,55 ± 0,00^{a}	tetraploid
	G3	1,540974		tetraploid
	G4	1,549069		tetraploid
Učka	15B	1,508655	1,53 ± 0,02^{ab}	tetraploid
	U2	1,538999		tetraploid
	U3	1,540636		tetraploid
G. punctata				
Dinara 4	1E	0,841259		diploid
Grobničko polje	5C	0,854133	0,85 ± 0,00^{c}	diploid
	5D	0,853841		diploid
Vižintini	7D	0,851990		diploid

vrijednosti naznačene različitim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$): a > b > c

Rezultati istraživanja ploidnosti vrsta *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* potvrđeni su i protočnom citometrijom nakon bojanja jezgara propidijevim jodidom, pri čemu je za svaku od vrsta bila istražena po jedna jedinka iz tri različite populacije (Tablica XV). Prednosti obiju primijenjenih neizravnih metoda određivanja ploidnosti, u usporedbi s mikroskopijskim određivanjem broja kromosoma, su njihova brzina i veća osjetljivost, odnosno istovremeni uvid u sadržaj jezgrine DNA mnogo većeg broja stanica. Također, njihova dodatna prednost je da se mogu provesti na diferenciranim biljnim organima,

primjerice listovima (Bohanec, 2003), koji su u slučaju vrsta roda *Globularia* lako dostupni kroz cijelu godinu. Neke od prednosti primjene metode koja koristi DAPI kod određivanja ploidnosti u usporedbi s metodom koja koristi propidijev jodid njezina su veća preciznost, brzina bojanja, kao i potrebna manja količina boje. S druge strane, propidijev jodid primjereniji je za procjenu apsolutnog sadržaja genomske DNA od boje DAPI zbog njegovog nespecifičnog vezanja na molekule DNA, dok se boja DAPI specifično veže na bazne parove adeninina i timina (AT) (Bohanec, 2003). Između rezultata dobivenih ovim metodama utvrđena je izvrsna povezanost (r = 0,99, P < 0,001, n = 9), kao i u ranijim istraživanjima (Vižintin i sur., 2006), pri čemu su kod primjene boje DAPI dobivene u pravilu nešto više vrijednosti od onih dobivenih propidijevim jodidom, a što bi moglo ukazivati na veći udio baznih parova AT.

Veličina genoma (2C-vrijednost) određena metodom s propidijevim jodidom kretala se između 1,41 i 1,48 pg za vrstu *G. cordifolia* (prosječno 1,45 ± 0,02 pg), između 1,44 i 1,53 pg za vrstu *G. meridionalis* (prosječno 1,49 ± 0,01 pg), odnosno između 0,82 i 0,87 pg za vrstu *G. punctata* (prosječno 0,84 ± 0,01 pg) (Tablica XV). Veličina genoma, usporediva s onom vrste *G. punctata*, istom je metodom prethodno utvrđena kod vrsta *G. alypum* (0,78-0,80 pg) (Pellicer i sur., 2010) i *G. salicina* (0,84 pg) (Suda i sur., 2005), koje su kao i ona diploidne (Schwarz, 1963). S druge strane, veličina genoma prethodno utvrđena za vrstu *G. meridionalis* sabranu na području Biokova bila je nešto veća (1,61 pg) (Siljak-Yakovlev i sur., 2010) od vrijednosti dobivenih ovim istraživanjem te je kao i u našem slučaju ukazivala na njezinu tetraploidnost.

S obzirom na vrlo malu veličinu genoma istraživanih vrsta, uočene varijacije unutar vrsta (< 3%) u skladu su s očekivanjima (Doležel i sur., 2007). Iako bi one potencijalno mogle biti rezultat stvarnih razlika u veličini genoma, vjerojatnije je da je uočena varijabilnost posljedica različitog sadržaja fenolnih spojeva. Naime, uočeno je da oni mogu smanjiti fluorescenciju jezgara, primjerice ometanjem vezanja propidijevog jodida na molekule DNA (Noirot i sur., 2003). Slabije bojanje jezgara, primjerice Feulgenovom bojom, uočeno je i u tkivima koja su sadržavala veću količinu trjeslovina (Greilhuber, 1988). Manja veličina genoma zabilježena je kod južnijih populacija vrste *G. cordifolia* (Mostar, Šestanovac) (P < 0,05) (Tablica XV). U okviru ovog rada utvrđeno je da su uzorci listova sabrani na navedenim lokacijama bili bogatiji kondenziranim trjeslovinama ili fenolima općenito. S druge strane, sadržaj ukupnih fenola i trjeslovina u uzorcima listova sabranim na području Učke, kod kojih su uočene u prosjeku nešto veće 2C-vrijednosti (P > 0,05), bio je niži u usporedbi s ostalim uzorcima vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*.

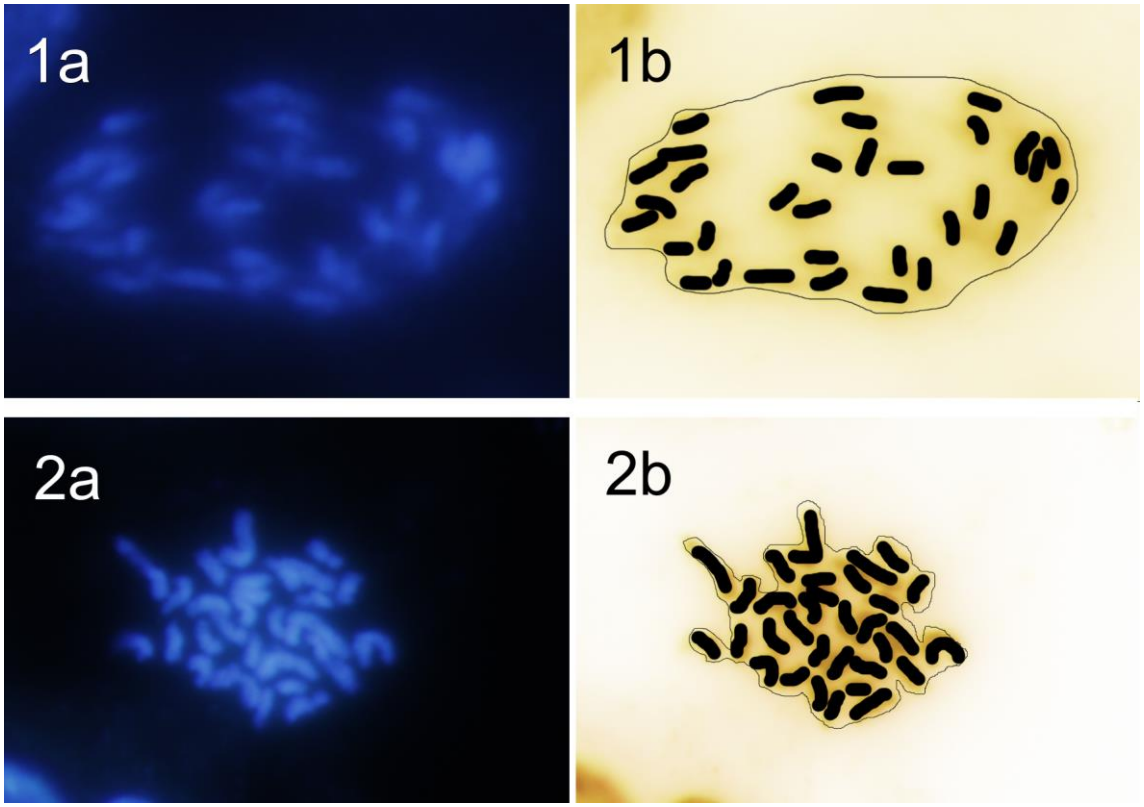
Tablica XV. Rezultati istraživanja ploidnosti vrsta *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* dobiveni protočnom citometrijom nakon bojanja propidijevim jodidom te veličina genoma izražena kao srednja vrijednost ± standardna devijacija rezultata mjerenja u pg

Lokacija s oznakom jedinke	Apsolutni sadržaj genomske DNA (pg)	Veličina genoma (2C-vrijednost) (pg)	Procijenjena ploidnost
G. cordifolia			
Alan (14E)	1,475902 1,475445 1,472433 1,481891	1,48 ± 0,00^{ab}	tetraploid
Mostar (4K)	1,449815 1,451798 1,458571 1,439811	1,45 ± 0,01^{bc}	tetraploid
Šestanovac (3I)	1,454556 1,417467 1,447720 1,408228	1,43 ± 0,02^{c}	tetraploid
G. meridionalis			
Dinara 2 (2F)	1,495284 1,438172 1,515750 1,469771	1,48 ± 0,03^{a}	tetraploid
Grobničko polje (G3)	1,504822 1,497931 1,489578 1,485056	1,49 ± 0,01^{a}	tetraploid
Učka (U3)	1,530384 1,494284 1,500404 1,511317	1,51 ± 0,02^{a}	tetraploid
G. punctata			
Dinara 4 (1E)	0,825007 0,840461 0,853923 0,829060	0,84 ± 0,01^{d}	diploid
Grobničko polje (5D)	0,852457 0,872523 0,846581 0,853708	0,86 ± 0,01^{d}	diploid
Vižintini (7D)	0,820449 0,835412 0,832621 0,823675	0,83 ± 0,01^{d}	diploid

vrijednosti naznačene različitim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$): a > b > c > d

4.1.3.2. Broj kromosoma u tjelesnim stanicama

Budući da je ranijim istraživanjima utvrđeno da je bazni broj kromosoma kod vrsta roda *Globularia* x = 8 (Schwarz, 1963), a s obzirom na ujednačenost rezultata dobivenih protočnom citometrijom, provjera broja kromosoma u tjelesnim stanicama provedena je na manjem broju jedinki. Dobivenim rezultatima utvrđeno je da vrste *G. cordifolia* i *G. meridionalis* obje sadrže 32 kromosoma u svojim tjelesnim stanicama (Slika 48), čime je potvrđeno da je riječ o tetraploidnim vrstama (Schwarz, 1963; Ravnik, 1965; Milletti, 1987). Zaključno, navedene vrste nije moguće razlikovati na temelju istraženih citoloških obilježja.



Slika 48. Fotomikrografija metafaznih kromosoma meristemskih stanica korjenovog vrška vrste *G. cordifolia* s područja Alana (14E) i vrste *G. meridionalis* s područja Grobničkog polja (G7) nakon bojanja bojom DAPI (1a, 2a) i njihov shematski prikaz (1b, 2b); 2*n* = 32

4.1.4. Molekularna filogenija

4.1.4.1. ITS područje jezgrine DNA

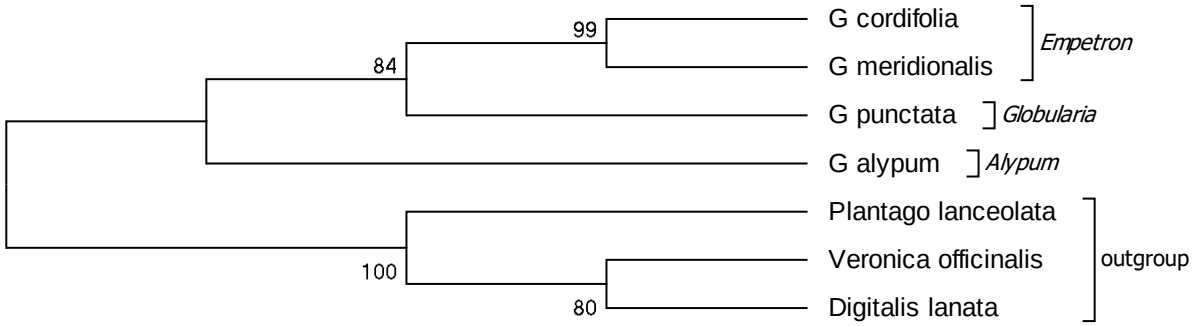
Lančanom reakcijom polimerazom (PCR) umnoženo je ITS područje vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene), *G. cordifolia* (Alan), *G. meridionalis* (Grobničko polje) i *G. punctata* (Grobničko polje). Pročišćenim PCR produktima utvrđen je slijed nukleotida, a svi sljedovi pohranjeni su u bazu podataka GenBank (Tablica XVI). Pokazalo se da ITS područje vrsta roda *Globularia* sadrži 652 do 653 baznih parova, pri čemu dominiraju gvanin i citozin. Udio navedenih dušičnih baza nešto je veći od istog udjela u sljedovima kontrolnih vrsta *Digitalis lanata* Ehrh., *Plantago lanceolata* L. i *Veronica officinalis* L. preuzetim iz baze GenBank. Sastav dušičnih baza bio je podjednak za vrste *G. cordifolia* i *G. meridionalis* (Tablica XVI).

Tablica XVI. Veličina sekvenciranog ITS područja i udio pojedinih dušičnih baza kod istraživanih vrsta s pristupnim brojevima sljedova u bazi podataka GenBank

Vrsta	Veličina slijeda (pb)	Udio T (%)	Udio C (%)	Udio A (%)	Udio G (%)	GenBank pristupni broj
G. alypum	653	19,4	32,5	18,1	30,0	KP278477
G. cordifolia	652	18,4	33,0	18,4	30,2	KP278478
G. meridionalis	652	18,4	33,0	18,4	30,2	KP278479
G. punctata	652	18,3	32,7	18,7	30,4	KP278480
D. lanata	713	25,5	24,0	24,4	26,1	AY591284
P. lanceolata	737	22,4	26,5	22,4	28,8	AY101898
V. officinalis	694	23,2	26,9	21,8	28,1	DQ534900

pb – parovi baza; T – timin, C – citozin, A – adenin, G – gvanin

Poravnati sljedovi sadržavali su ukupno 863 znaka od kojih je 474 bilo konzervirano, a 247 varijabilno. Od varijabilnih mjesta, 95 je bilo parsimonijski informativno, dok su 149 bila varijacije samo jedne dušične baze (engl. *singleton*). Analizom sljedova metodom maksimalne parsimonije (Eck i Dayhoff, 1966) dobiveno je koncenzusno filogenetsko stablo dužine 325 baznih parova, čiji je konzistencijski indeks iznosio 0,808511, retencijski indeks 0,778689, a složeni indeks 0,713997 za sva mjesta, odnosno 0,629578 za parsimonijski informativna mjesta (Slika 49). Na stablu se uz 99% podržanosti izdvojila skupina koju čine vrste *G. cordifolia* i *G. meridionalis*, što ide u prilog njihovom svrstavanju u zajedničku sekciju *Empetron* (Holländer i Jäger, 1994), a koje se temelji na sličnim morfološkim karakteristikama (Schwarz, 1938). S njima se uz 84% podržanosti grupirala vrsta *G. punctata*, koja pripada sekciji *Globularia* (Holländer i Jäger, 1994), dok se vrsta *G. alypum*, kao pripadnica sekcije *Alypum* (Holländer i Jäger, 1994), s navedenim vrstama nije grupirala.



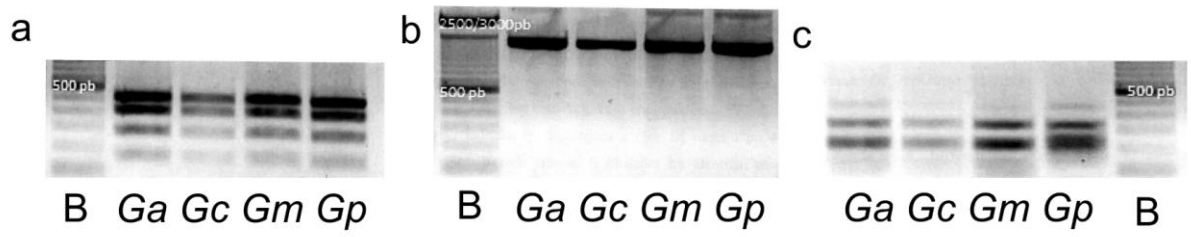
Slika 49. Filogenetsko stablo istraživanih vrsta temeljeno na varijacijama ITS područja; brojevi na granama ukazuju na vjerojatnost (%) kojom se podupire položaj svake grane; nazivi naznačeni s desne strane ukazuju na pripadnost vrste pojedinoj sekciji roda *Globularia* (*Empetron, Globularia, Alypum*), odnosno porodici Plantaginaceae (vanjska skupina, engl. *outgroup*)

4.1.4.2. Gensko *rbc*L i međugensko *trn*L-*trn*F područje kloroplastne DNA

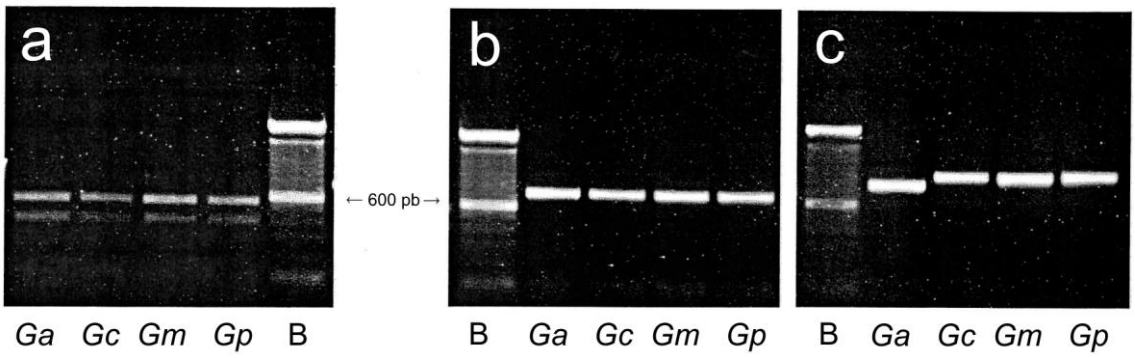
Područja *rbc*L i *trn*L-*trn*F vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene), *G. cordifolia* (Baške Oštarije), *G. meridionalis* (Grobničko polje) i *G. punctata* (Grobničko polje) umnožena su lančanom reakcijom polimerazom (PCR). Restrikcijskom analizom pomoću enzima *Hae* III, *Hpa* II i *Rsa* I preliminarno je istražen stupanj varijabilnosti navedenih područja, a u svrhu provjere prikladnosti njihove primjene u filogenetskoj analizi vrsta roda *Globularia*.

Digestijom *rbc*L područja restrikcijskom endonukleazom *Hae* III kod svih su istraživanih vrsta dobivena četiri fragmenta DNA procijenjene veličine 135, 250, 360 i 460 baznih parova, dok primjena restrikcijske endonukleaze *Hp*a II nije rezultirala cijepanjem *rbc*L područja kloroplastne DNA. Restrikcijska endonukleaza *Rsa* I pocijepala je uzorke vrste *G. punctata* na četiri mjesta pri čemu su nastali fragmenti procijenjene veličine 125, 200, 300, 320 i 460 baznih parova. Uzorci svih ostalih vrsta imali su dodatno restrikcijsko mjesto te su umjesto fragmenta procijenjene veličine 300 baznih parova sadržavali fragmente procijenjene veličine 80 i 220 baznih parova (Slika 50).

Digestija *trn*L-*trn*F područja restrikcijskim endonukleazama *Hae* III i *Hpa* II rezultirala je identičnim restrikcijskim profilom svih istraživanih vrsta, točnije dvama fragmentima procijenjene veličine 430 i 550 baznih parova, odnosno 110 i 750 baznih parova. Restrikcijska endonukleaza *Rsa* I pocijepala je jedino uzorak vrste *G. alypum*, pri čemu su dobiveni fragmenti procijenjene veličine 100 i 800 baznih parova (Slika 51).



Slika 50. Fragmenti DNA dobiveni digestijom *rbc*L sljedova istraživanih vrsta roda *Globularia* pomoću restrikcijske endonukleaze *Hae* III (a), *Hpa* II (b) i *Rsa* I (c) nakon 30-minutnog elektroforetskog razdvajanja u 1,5% (w/v) agaroznom gelu pri naponu od 90 V, gledani pod UV svjetlom nakon bojanja etidijevim bromidom (prikaz negativa); B – biljeg poznatih veličina fragmenata, *Ga – G. alypum, Gc – G. cordifolia, Gm – G. meridionalis, Gp – G. punctata,* pb – parovi baza



Slika 51. Fragmenti DNA dobiveni digestijom *trn*L-*trn*F sljedova istraživanih vrsta roda *Globularia* pomoću restrikcijske endonukleaze *Hae* III (a), *Hpa* II (b) i *Rsa* I (c) nakon 30-minutnog elektroforetskog razdvajanja u 1,5% (w/v) agaroznom gelu pri naponu od 90 V, gledani pod UV svjetlom nakon bojanja etidijevim bromidom; B – biljeg poznatih veličina fragmenata, *Ga – G. alypum, Gc – G. cordifolia, Gm – G. meridionalis, Gp – G. punctata,* pb – parovi baza

Dobiveni rezultati ukazali su na mogućnost postojanja varijabilnosti unutar područja *rbc*L i *trn*L-*trn*F istraživanih vrsta roda *Globularia*, odnosno na mogućnost njihove primjene kao biljega kod utvrđivanja razvojnih odnosa između vrsta roda *Globularia*. Pročišćenim umnoženim PCR produktima vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene), *G. cordifolia* (Alan), *G. meridionalis* (Grobničko polje) i *G. punctata* (Grobničko polje) utvrđeni su sljedovi nukleotida, koji su pohranjeni u bazu podataka GenBank (Tablica XVII). Veličina istraživanih područja kloroplastne DNA kod vrsta roda *Globularia* kretala se između 2095 i

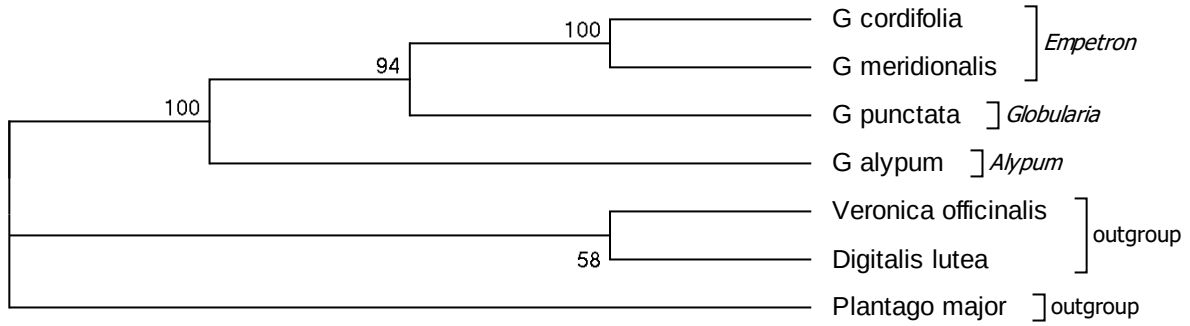
2109 baznih parova, što je bilo više nego u sljedovima kontrolnih vrsta *Digitalis lutea* L., *Plantago major* L. i *Veronica officinalis* L. preuzetim iz baze GenBank. Sastav dušičnih baza bio je gotovo podjednak za sve istraživane vrste roda *Globularia*, a prevladavale su dušične baze timin i adenin (Tablica XVII).

Tablica XVII. Veličina sekvenciranih *rbc*L i *trn*L-*trn*F područja i udio pojedinih dušičnih baza kod istraživanih vrsta s pristupnim brojevima sljedova u bazi podataka GenBank

Vrsta	Veličina slijeda (pb)	Udio T (%)	Udio C (%)	Udio A (%)	Udio G (%)	GenBank pristupni broj
G. alypum	2108	29,1	19,3	30,3	21,3	KT853061[a] KT853048[b]
G. cordifolia	2107	29,3	19,3	30,4	21,1	KT853063[a] KT853050[b]
G. meridionalis	2095	29,4	19,3	30,4	21,0	KT853067[a] KT853054[b]
G. punctata	2109	29,1	19,4	30,3	21,1	KT853069[a] KT853056[b]
D. lutea	1358	30,3	18,0	34,0	17,7	FM207428[a] AY591318[b*]
P. major	1641	29,6	21,0	27,4	22,1	KF602240[a] FJ490807[b]
V. officinalis	1499	28,2	19,1	32,0	20,6	HQ590322[a] AF486391[b]

pb – parovi baza; T – timin, C – citozin, A – adenin, G – gvanin; [a] – slijed *rbc*L, [b] – *trn*L-*trn*F, * – *D. lanata*

Poravnati sljedovi sadržavali su ukupno 2217 znakova od kojih je 1684 bilo konzervirano, a 476 varijabilno. Od varijabilnih mjesta, 70 je bilo parsimonijski informativno, dok su 390 bila varijacije samo jedne dušične baze (engl. *singleton*). Analizom sljedova metodom maksimalne parsimonije (Eck i Dayhoff, 1966) dobiveno je koncenzusno filogenetsko stablo dužine 511 baznih parova, čiji je konzistencijski indeks iznosio 0,860215, retencijski indeks 0,850575, a složeni indeks 0,828936 za sva mjesta, odnosno 0,731677 za parsimonijski informativna mjesta (Slika 52). Na stablu su, uz 100% podržanosti, u zajedničku skupinu svrstane vrste *G. cordifolia* i *G. meridionalis*, pripadnice sekcije *Empetron* (Holländer i Jäger, 1994). Vrsta *G. punctata*, pripadnica sekcije *Globularia* (Holländer i Jäger, 1994), s ovim se vrstama grupirala uz 94% podržanosti. Grupiranje vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* s vrstom *G. punctata*, doduše, pod drugim nazivima (*G. cordifolia*, *G. bellidifolia* i *G. willkommii*), predložio je i Wettstein (1895a). Također, moguće je uočiti grupiranje vrste *G. alypum* s ostalim istraživanim vrstama roda *Globularia* uz 100% podržanosti.



Slika 52. Filogenetsko stablo istraživanih vrsta temeljeno na varijacijama *rbc*L i *trn*L-*trn*F područja; brojevi na granama ukazuju na vjerojatnost (%) kojom se podupire položaj svake grane; nazivi naznačeni s desne strane ukazuju na pripadnost vrste pojedinoj sekciji roda *Globularia* (*Empetron*, *Globularia*, *Alypum*), odnosno porodici Plantaginaceae (vanjska skupina, engl. *outgroup*)

Rezultati molekularnih analiza potvrđuju blisku srodnost između vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* te kao i histološko-anatomske značajke ukazuju na bližu srodnost ovih vrsta s vrstom *G. punctata*. Ovo je suprotno očekivanjima s obzirom na predloženu podjelu roda *Globularia* na podrodove, prema kojoj vrste *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. alypum* pripadaju zajedničkom podrodu *Abolaria* (Schwarz, 1938; Schwarz, 1963). Dobiveni rezultati idu u prilog opažanjima Holländera i Jägera (1994), prema kojima predložena podjela roda *Globularia* na podrodove nije u skladu s njihovim stvarnim međusobnim srodstvenim odnosima. Oni su također predložili grupiranje vrste *G. cordifolia* s vrstom *G. punctata* (Holländer i Jäger, 1994). Usporedivi rezultati dobiveni na temelju analize sljedova ITS područja, odnosno sljedova *rbc*L i *trn*L-*trn*F područja, ukazuju na mogućnost primjene navedenih molekularnih biljega u procjeni srodstvenih odnosa unutar roda *Globularia*.

Iako dobiveni rezultati upućuju na zajednički postanak vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*, oni nisu dovoljni za procjenu opravdanosti njihove podjele na odvojene vrste, odnosno podvrste te ih valja uzeti kao preliminarne. U svrhu detekcije genetske raznolikosti između navedenih svojti bilo bi potrebno u istraživanje uključiti veći broj uzoraka iz različitih populacija (Romeiras i sur., 2015), odnosno dodatne molekularne biljege, kao što su AFLP i RAPD (engl. *Random amplified polymorphic DNA*) (Honnay i sur., 2007; Costa i sur., 2016).*

* – poglavlje sadrži objavljene rezultate (Hazler Pilepić i sur., 2016) – vidi pod 7. Prilozi

4.2. Fitokemijski profil odabranih vrsta roda *Globularia*

4.2.1. Kvalitativna fitokemijska istraživanja

Preliminarna fitokemijska istraživanja provedena su na suhim nadzemnim dijelovima i/ili na metanolnim ekstraktima pripremljenim ultrazvučnom ekstrakcijom sljedećih populacija vrsta roda *Globularia*: *G. alypum* (Konavoske stijene), *G. cordifolia* (Alan), *G. meridionalis* (Grobničko polje) i *G. punctata* (Grobničko polje) (Tablica XVIII).

Tablica XVIII. Rezultati fitokemijskih reakcija u epruveti za metanolne* ekstrakte nadzemnih dijelova odabranih populacija istraživanih vrsta roda *Globularia*

Skupina sekundarnih metabolita	*G. alypum* (Konavoske stijene, 2013)	*G. cordifolia* (Alan, 2013)	*G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013)	*G. punctata* (Grobničko polje, 2013)
Flavonoidi	+++	+++	+++	+++
Trjeslovine	+++	+++	+++	+++
Flobatanini	-	-	-	-
Antocijani	+	+/-	+/-	+/-
Iridoidi[a]	+	+++	+++	+++
Steroidi	-	-	-	-
Triterpeni	+++	+++	+++	+++
Saponini[b]	+	+/-	+/-	+
Antrakinoni	-	-	-	-

* – ukoliko nije eksponentom drugačije naznačeno; - – negativna reakcija, +/- – pozitivna reakcija vrlo slabog intenziteta, + – pozitivna reakcija slabog intenziteta, ++ – pozitivna reakcija umjerenog intenziteta, +++ – pozitivna reakcija jakog intenziteta; [a] – ekstrakcija s 1% (v/v) klorovodičnom kiselinom; [b] – ekstrakcija s vodom

Istraživane vrste dale su pozitivne reakcije na flavonoide (žutosmeđe obojenje), trjeslovine (zelenosmeđe obojenje), antocijane (crveno obojenje kod vrste *G. alypum*, žutonarančasto kod ostalih istraživanih vrsta), iridoide (ružičasto obojenje kod vrste *G. alypum*, tamnoplavo obojenje kod ostalih istraživanih vrsta), triterpene (crvenosmeđi prsten) i saponine (tanki sloj pjene koji je kod vrsta *G. alypum* i *G. punctata* ostao prisutan duže od 10 minuta). Prisutnost flobatanina, steroida i antrakinona u metanolnim ekstraktima istraživanih vrsta nije zabilježena. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima prijašnjih autora koji su istraživali fitokemijska obilježja metanolnih ekstrakata vrste *G. alypum* (Harzallah i sur., 2010; Djellouli i sur., 2014; Taghzouti i sur., 2016).

Flavonoidi i drugi fenolni spojevi, kao i iridoidi, prethodno su izolirani iz svih istraživanih vrsta: *G. alypum* (Kirmizibekmez i sur., 2008), *G. cordifolia* (Kirmizibekmez i sur., 2003b; Kirmizibekmez i sur., 2004b), *G. meridionalis* (Tundis i sur., 2012a; Tundis i sur., 2012b) i *G. punctata* (Klimek, 1988; Kirmizibekmez i sur., 2009). Prisutnost trjeslovina ranije je zabilježena kod vrsta *G. alypum* i *G. vulgaris* (Heckel i Schlagdenhauffen, 1883).

Prema Peyeru (1942), listovi *G. alypum* bogati su trjeslovinama. S druge strane, kod vrste *G. vulgaris*, pozitivna reakcija na trjeslovine dobivena je samo u testu sa željezovim(III) kloridom, ali ne i sa želatinom (Awen i sur., 2010), pa je moguće da ona ukazuje na prisutnost spojeva koji nisu nužno trjeslovine (Mamta i Jyoti, 2012). Prisutnost antocijana cijanidina i peonidina ranije je zabilježena u cvjetovima vrste *G. alypum* (Ben Hassine i sur., 1982b).

Razlike u dobivenoj boji i intenzitetu reakcije s Trim-Hillovim reagensom ukazuju na razlike u strukturi glavnih iridoidnih sastavnica vrste *G. alypum* i ostalih istraživanih vrsta. Naime, ovaj reagens pogodan je za dokazivanje aukubina, asperulozida i monotropeina s kojima daje plavo obojenje (Trim i Hill, 1952), odnosno harpagida s kojim daje crvenoljubičasto obojenje, dok njime nije moguće dokazati prisutnost iridoida kao što su katalpol i loganin (Harborne, 1998). Imajući na umu da su katalpol i njegovi derivati karakteristični iridoidi za vrstu *G. alypum* (Chaudhuri i Sticher, 1981; Es-Safi i sur., 2006; Kirmizibekmez i sur., 2008), moguće je objasniti zašto je dobivena pozitivna reakcija za ovu vrstu bila slabijeg intenziteta. S druge strane, aukubin i/ili asperulozid prethodno su izolirani iz vrsta *G. cordifolia* (Chaudhuri i Sticher, 1980), *G. meridionalis* (Tundis i sur., 2012b) i *G. punctata* (Kirmizibekmez i sur., 2009). Pojava tamnoplavog obojenja u ekstraktima prethodno spomenutih vrsta mogla bi se barem djelomično objasniti prisutnošću ovih spojeva.

Prisutnost steroidnih spojeva dosad je zabilježena u etanolnim i eterskim (Meriah, 2007), odnosno etil acetatnim i petroleterskim ekstraktima vrste *G. alypum* (Harzallah i sur., 2010). Također, utvrđeno je da uzorak listova vrste *G. alypum* dobiven ekstrakcijom s *n*-heksanom i izopropanolom (3:2, *V/V*) sadrži β-sitosterol, stigmasterol i ergosterol (Athmouni i sur., 2016), dok je *n*-heksanska frakcija metanolnih ekstrakata vrste *G. meridionalis* uz β-sitosterol i stigmasterol sadržavala još i stigmast-6-en-3,β-ol te (24R)-4-stigmasten-3-on (Tundis i sur., 2012a). Triterpeni α-amirin i/ili β-amirin zabilježeni su dosad kod vrste *G. meridionalis* (Tundis i sur., 2012a), odnosno vrste *G. alypum* (Ben Hassine i sur., 1982b). Saponini prisutni u vodenim ekstraktima nadzemnih dijelova vrste *G. alypum*, čija prisutnost je i ranije zabilježena (Meriah, 2007), najvjerojatnije pripadaju skupini triterpenoidnih saponina, s obzirom na negativan test na steroide, koji bi upućivao na eventualnu prisutnost steroidnih saponina (Vincken i sur., 2007). Prisutnost flavona i terpena zabilježena je i u listovima vrste *G. vulgaris* (Awen i sur., 2010). U jednom istraživanju kod vrste *G. alypum* zabilježena je i prisutnost antracenskih glikozida (Meriah, 2007), dok prema drugim autorima ova skupina spojeva u vrstama roda *Globularia* nije prisutna (Awen i sur., 2010; Djellouli i sur., 2014).

4.2.2. Sadržaj sekundarnih metabolita

Sadržaj sekundarnih metabolita (ukupnih fenola, flavonoida, kondenziranih trjeslovina i iridoida) određen je na metanolnim ekstraktima vrsta *G. alypum*, *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata*, pri čemu su osim samih vrsta uspoređene i njihove različite populacije i biljni dijelovi, odnosno razlike između sezona cvatnje i metoda pripreme ekstrakata. Određivanje sadržaja provedeno je u skladu s ranije opisanim protokolima koji su poslužili u procjeni sadržaja istih skupina spojeva kod vrste *G. alypum* ili srodnih vrsta (Djeridane i sur., 2006; Khlifi i sur., 2011; Tundis i sur., 2012a; Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014b; Taghzouti i sur., 2016; Touaibia i Chaouch, 2016), a u svrhu što pouzdanije usporedbe dobivenih rezultata s literaturnim podacima.

4.2.2.1. Usporedba između različitih biljnih dijelova

Ukupni fenoli

Istraživanje metanolnih ekstrakata različitih biljnih dijelova uzoraka glavulja sakupljenih tijekom razdoblja cvatnje u 2012. i 2013. godini pokazalo je da su sve četiri istraživane vrste bogate fenolnim spojevima. Sadržaj ukupnih fenola kretao se između 10,13 mg EGK/g SM (cvjetovi vrste *G. punctata*, Slapnica) i 50,04 mg EGK/g SM (drvenaste stabljike vrste *G. punctata*, Vugrovec) (Tablica XIX). Visoke količine polifenola primijećene su u listovima sve četiri istraživane vrste, pri čemu nisu primijećene značajne razlike između vrste *G. alypum* i srodnih vrsta. Cvjetovi ove vrste bili su, uz listove, biljni dijelovi najbogatiji polifenolnim spojevima. S druge strane, primijećeno je da veliku količinu fenolnih spojeva sadrže i drvenaste stabljike te korijen vrste *G. punctata* ($P < 0,05$). Sadržaj fenolnih spojeva u svim biljnim dijelovima vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* nije se međusobno statistički značajno razlikovao ($P > 0,05$).

Primijenjenom metodom s Folin-Ciocalteuovim reagensom moguće je odrediti brojne strukturno različite fenolne spojeve (Singleton i Rossi, 1965). Fenolni spojevi koji mogu biti prisutni kod vrste *G. alypum* (Martius, 1857; Wunderlich, 1908; Bernard i sur., 1974b; Ben Hassine i sur., 1982a; Ben Hassine i sur., 1982b; Es-Safi i sur., 2005c; Boutiti i sur., 2008; Kirmizibekmez i sur., 2008; Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a; Feriani i sur., 2017), ali i kod ostalih istraživanih vrsta (Harborne i Williams, 1971; Klimek, 1988; Kirmizibekmez i sur., 2004b; Kirmizibekmez i sur., 2009; Tundis i sur., 2012a), uključuju brojne feniletanoide, iridoide i bisiridoide esterificirane s fenolnim kiselinama, odnosno slobodne i glikozilirane fenolne kiseline te flavonoide. Oksidacija pojedinih nefenolnih spojeva s Folin-Ciocalteuovim reagensom također je moguća (Singleton i sur., 1999).

Tablica XIX. Sadržaj sekundarnih metabolita u različitim biljnim dijelovima uzoraka odabranih vrsta roda *Globularia* sakupljenih tijekom 2012. i 2013. godine izražen kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 3)

Vrsta	Dio biljke	Ukupni fenoli[a]	Flavonoidi[b]	Kondenzirane trjeslovine[c]	Iridoidi[d]
Ga	L	37,58 ± 0,85^{aA}	9,23 ± 0,39^{bA}	0,76 ± 0,03^{bA}	9,38 ± 0,55^{cA}
	C	35,39 ± 0,78^{aA}	5,46 ± 0,04^{aB}	0,77 ± 0,01^{aA}	6,18 ± 0,08^{aA}
	S = DS*	21,16 ± 0,72^{bB}	4,74 ± 0,04^{cB}	0,34 ± 0,03^{bA}	5,06 ± 0,04^{bA}
	K	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Gc1	L	33,33 ± 0,96	9,50 ± 0,27	8,01 ± 0,17	98,25 ± 2,47
	C	18,88 ± 0,28	3,73 ± 0,09	4,53 ± 0,04	40,56 ± 0,98
	S	23,66 ± 0,52	7,59 ± 0,07	9,77 ± 0,20	100,51 ± 1,31
	DS	13,61 ± 0,56	0,84 ± 0,01	0,75 ± 0,01	10,51 ± 0,04
	K	20,37 ± 0,72	1,45 ± 0,02	0,66 ± 0,01	9,95 ± 0,25
Gc2	L	34,42 ± 0,94	9,24 ± 0,15	1,92 ± 0,02	132,43 ± 1,18
	C	20,06 ± 0,45	4,55 ± 0,02	1,40 ± 0,05	28,74 ± 3,16
	S	33,31 ± 0,32	6,73 ± 0,09	3,24 ± 0,08	51,04 ± 0,63
	DS	14,55 ± 0,10	0,93 ± 0,01	0,33 ± 0,00	6,64 ± 0,01
	K	16,54 ± 0,90	1,36 ± 0,13	0,26 ± 0,01	4,92 ± 0,47
Gc3	L	27,67 ± 0,82	9,08 ± 0,36	2,55 ± 0,07	77,34 ± 1,54
	C	25,68 ± 0,70	7,12 ± 0,08	2,30 ± 0,10	24,67 ± 0,81
	S	44,90 ± 1,18	9,56 ± 0,15	4,17 ± 0,07	57,56 ± 2,25
	DS	22,22 ± 0,51	2,00 ± 0,01	0,28 ± 0,01	8,37 ± 0,48
	K	22,15 ± 1,03	1,96 ± 0,07	0,21 ± 0,00	6,03 ± 0,14
Gc (prosjek vrste)	L	31,81 ± 3,62^{aAB}	9,27 ± 0,21^{bA}	4,16 ± 3,35^{aAB}	102,70 ± 27,81^{bA}
	C	21,54 ± 3,63^{bAC}	5,13 ± 1,77^{aB}	2,72 ± 1,57^{aBC}	31,32 ± 8,25^{aB}
	S	33,96 ± 10,63^{aA}	7,96 ± 1,45^{bA}	5,73 ± 3,53^{aA}	69,70 ± 26,88^{aA}
	DS	16,79 ± 4,72^{bC}	1,26 ± 0,65^{dC}	0,45 ± 0,26^{aC}	8,51 ± 1,94^{bB}
	K	19,69 ± 2,87^{bBC}	1,59 ± 0,32^{aC}	0,38 ± 0,25^{aC}	6,97 ± 2,64^{aB}
Gm1	L	30,81 ± 0,45	8,40 ± 0,10	1,71 ± 0,05	114,08 ± 7,72
	C	27,25 ± 0,85	4,09 ± 0,03	1,60 ± 0,02	25,19 ± 1,60
	S	37,76 ± 1,22	7,86 ± 0,09	3,55 ± 0,11	49,46 ± 4,80
	DS	16,80 ± 0,54	0,90 ± 0,02	0,41 ± 0,01	8,27 ± 0,13
	K	15,86 ± 0,19	1,40 ± 0,09	0,26 ± 0,01	5,04 ± 0,15
Gm2	L	34,47 ± 0,39	10,84 ± 0,06	2,18 ± 0,10	84,63 ± 9,37
	C	16,74 ± 0,40	5,50 ± 0,08	1,02 ± 0,07	13,36 ± 0,47
	S	20,51 ± 0,49	6,68 ± 0,04	2,14 ± 0,01	45,67 ± 4,35
	DS	27,42 ± 0,13	2,65 ± 0,03	0,34 ± 0,01	15,83 ± 0,28
	K	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Gm3	L	23,03 ± 0,29	6,96 ± 0,08	1,38 ± 0,00	85,89 ± 5,76
	C	21,69 ± 0,78	5,16 ± 0,03	1,74 ± 0,02	37,65 ± 2,01
	S	29,50 ± 0,55	6,07 ± 0,03	2,12 ± 0,02	62,61 ± 1,42
	DS	17,56 ± 0,04	1,02 ± 0,02	0,34 ± 0,00	8,54 ± 0,12
	K	26,05 ± 0,68	2,25 ± 0,04	0,39 ± 0,00	15,98 ± 0,53
Gm4	L	34,44 ± 1,09	9,63 ± 0,29	2,24 ± 0,02	84,44 ± 5,97
	C+S	29,32 ± 0,85	7,16 ± 0,11	2,27 ± 0,06	42,69 ± 0,51
	DS	14,46 ± 0,31	0,97 ± 0,01	0,42 ± 0,01	7,43 ± 0,01
	K	30,97 ± 0,49	1,80 ± 0,00	0,34 ± 0,01	9,07 ± 0,14

Gm5	L	35,18 ± 0,22	11,32 ± 0,17	1,77 ± 0,03	70,50 ± 0,77
	C	18,28 ± 0,29	5,35 ± 0,07	1,86 ± 0,12	20,50 ± 1,55
	S	29,38 ± 0,45	6,37 ± 0,24	2,78 ± 0,09	40,94 ± 3,89
	DS	20,00 ± 0,17	1,71 ± 0,09	0,24 ± 0,00	9,29 ± 0,49
	K	17,13 ± 0,53	1,08 ± 0,01	0,19 ± 0,01	6,20 ± 0,22
Gm (prosjek vrste)	L	31,59 ± 5,08^{aA}	9,43 ± 1,79^{bA}	1,86 ± 0,36^{bAB}	87,91 ± 15,93^{bA}
	C	20,99 ± 4,66^{bB}	5,03 ± 0,64^{aB}	1,56 ± 0,37^{aAB}	24,18 ± 10,22^{aBC}
	S	29,29 ± 7,05^{abAB}	6,75 ± 0,78^{bcB}	2,65 ± 0,68^{bA}	49,67 ± 9,30^{aB}
	DS	19,25 ± 4,98^{bB}	1,45 ± 0,75^{dC}	0,35 ± 0,07^{aB}	9,87 ± 3,40^{bC}
	K	22,50 ± 7,24^{bAB}	1,63 ± 0,51^{aC}	0,30 ± 0,09^{aB}	9,07 ± 4,91^{aC}
Gp1	L	35,06 ± 1,12	14,47 ± 0,17	1,77 ± 0,06	177,53 ± 14,02
	C+S	19,09 ± 0,70	10,47 ± 0,09	0,99 ± 0,03	62,32 ± 1,84
	DS	42,57 ± 1,80	4,53 ± 0,02	0,65 ± 0,01	13,09 ± 0,04
	K	31,86 ± 0,42	2,80 ± 0,12	0,30 ± 0,00	3,34 ± 0,31
Gp2	L	36,10 ± 0,45	17,77 ± 0,87	1,49 ± 0,04	125,83 ± 1,79
	C	11,19 ± 0,13	5,52 ± 0,24	1,16 ± 0,07	8,02 ± 0,43
	S	19,50 ± 0,27	12,55 ± 0,21	1,55 ± 0,07	72,79 ± 1,47
	DS	30,79 ± 0,27	2,78 ± 0,00	0,30 ± 0,01	6,84 ± 0,28
	K	30,87 ± 0,47	2,71 ± 0,01	0,30 ± 0,00	4,76 ± 0,02
Gp3	L	35,31 ± 1,31	14,46 ± 0,20	1,68 ± 0,04	143,29 ± 7,15
	C	14,02 ± 0,25	6,76 ± 0,05	0,84 ± 0,02	15,26 ± 0,41
	S	24,60 ± 0,59	13,93 ± 0,25	0,97 ± 0,04	86,75 ± 1,62
	DS	34,96 ± 0,57	3,71 ± 0,04	0,58 ± 0,02	8,53 ± 0,18
	K	32,68 ± 0,59	2,47 ± 0,02	0,43 ± 0,01	4,37 ± 0,33
Gp4	L	27,13 ± 0,75	18,81 ± 0,55	1,38 ± 0,06	127,44 ± 12,33
	C	12,13 ± 0,28	5,92 ± 0,04	0,85 ± 0,02	8,88 ± 0,06
	S	18,51 ± 0,24	10,01 ± 0,20	1,12 ± 0,05	40,66 ± 0,17
	DS	33,42 ± 1,54	2,59 ± 0,02	0,34 ± 0,00	6,85 ± 0,15
	K	28,22 ± 1,23	2,12 ± 0,09	0,28 ± 0,00	5,45 ± 0,02
Gp5	L	32,00 ± 0,52	16,78 ± 0,63	2,88 ± 0,05	159,88 ± 6,87
	C+S	14,88 ± 0,53	7,42 ± 0,04	1,02 ± 0,01	30,02 ± 0,33
	DS	50,04 ± 1,19	3,71 ± 0,01	0,82 ± 0,00	13,02 ± 0,17
	K	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Gp6	L	30,46 ± 1,57	14,46 ± 0,58	2,38 ± 0,02	110,32 ± 1,14
	C	10,13 ± 0,23	5,57 ± 0,07	0,56 ± 0,03	9,44 ± 0,29
	S	22,38 ± 0,69	11,65 ± 0,13	2,11 ± 0,07	75,59 ± 1,03
	DS	44,77 ± 0,49	2,84 ± 0,11	0,60 ± 0,00	9,95 ± 0,52
	K	35,20 ± 0,83	2,75 ± 0,07	0,41 ± 0,01	3,94 ± 0,08
Gp (prosjek vrste)	L	32,68 ± 3,48^{aA}	16,13 ± 1,93^{aA}	1,93 ± 0,58^{bA}	140,70 ± 24,70^{aA}
	C	11,87 ± 1,65^{bB}	5,94 ± 0,57^{aC}	0,85 ± 0,25^{aA}	10,40 ± 3,29^{aC}
	S	21,25 ± 2,77^{bB}	12,04 ± 1,63^{aB}	1,44 ± 0,51^{bA}	68,95 ± 19,80^{aB}
	DS	39,43 ± 7,51^{aA}	3,36 ± 0,75^{cdD}	0,55 ± 0,20^{aA}	9,71 ± 2,84^{bC}
	K	31,77 ± 2,55^{aA}	2,57 ± 0,28^{aD}	0,34 ± 0,07^{aA}	4,37 ± 0,80^{aC}

Ga – *Globularia alypum* (Konavoske stijene, 2013), *Gc* – *G. cordifolia* (1 – Mostar, 2012, 2 – Baške Oštarije, 2012, 3 – Alan, 2013), *Gm* – *G. meridionalis* (1 – Baške Oštarije, 2012, 2 – Dinara, 2012, 3 – Učka, 2012, 4 – Grobničko polje, 2012, 5 – Grobničko polje, 2013), *Gp* – *G. punctata* (1 – Grobničko polje, 2012, 2 – Grobničko polje, 2013, 3 – Vižintini, 2012, 4 – Vižintini, 2013, 5 – Vugrovec, 2012, 6 – Slapnica, 2013); L – list, C – cvijet, S – stabljika (nosi cvjetove), DS – drvenasta stabljika, K – korijen; [a] – sadržaj izražen kao mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala, [b] – sadržaj izražen kao mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala, [c] – sadržaj izražen kao mg ekvivalenta katehina/g suhog biljnog materijala, [d] – sadržaj izražen kao mg ekvivalenta aukubina/g suhog biljnog materijala; * – drvenasta stabljika nosi cvjetove; n.i. – nije ispitano; vrijednosti u eksponentu naznačene različitim malim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju između vrsta ($P < 0,05$): a > b > c > d; vrijednosti u eksponentu naznačene različitim velikim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju između biljnih dijelova ($P < 0,05$): A > B > C > D

Flavonoidi

Sadržaj flavonoida u metanolnim ekstraktima uzoraka sabranih tijekom 2012. i 2013. godine kretao se između 0,84 mg EKV/g SM (drvenaste stabljike vrste *G. cordifolia*, Mostar) i 18,81 mg EKV/g SM (listovi vrste *G. punctata*, Vižintini, 2013) (Tablica XIX). Kod sve četiri istraživane vrste najviše flavonoida sadržavali su listovi, odnosno zeleni nadzemni dijelovi kod vrsta *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata*. Pri tome su listovi i stabljike vrste *G. punctata* sadržavali veće količine flavonoida nego kod ostalih istraživanih vrsta ($P < 0,05$). Sadržaj flavonoida vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* nije se međusobno statistički značajno razlikovao ($P > 0,05$).

Primijenjenom metodom s aluminijevim kloridom moguće je odrediti flavonoide iz skupina flavona i flavonola (Mammen i Daniel, 2012), što je bilo zadovoljavajuće za procjenu sadržaja flavonoida istraživanih vrsta, budući da su za vrste roda *Globularia* karakteristične upravo ove skupine flavonoida (Harborne i Williams, 1971; Klimek, 1988; Tomás-Barberán i sur., 1988; Kirmizibekmez i sur., 2004b; Es-Safi i sur., 2005c; Es-Safi i sur., 2007c; Kirmizibekmez i sur., 2008; Kirmizibekmez i sur., 2009; Tundis i sur., 2012a; Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a). Prisutnost spojeva koji pripadaju drugim skupinama, primjerice flavanona naringenina (Athmouni i sur, 2016) i eriodiktiol 7-*O*-diglukozida (Es-Safi i sur., 2005c; Es-Safi i sur., 2007c; Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a), flavanonola felamurina i flavan-3-ola (*epi*)galokatehina (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a) zabilježena je samo u rijetkim slučajevima kod vrste *G. alypum*.

Mogući nedostatak primijenjene metode je izostanak ili smanjena kompleksacija s aluminijevim kloridom onih flavonoida koji su glikozilirani ili metilirani u položajima *C*-3, *C*-5, *C*-3' i *C*-4' (Mammen i Daniel, 2012). Najveći broj flavonoida koji su dosad pronađeni u vrstama roda *Globularia* bio je glikoziliran u položaju *C*-7 (Harborne i Williams, 1971; Bernard i sur., 1974b; Ben Hassine i sur., 1982b; Klimek, 1988; Kirmizibekmez i sur., 2003a; Kirmizibekmez i sur., 2004b; Es-Safi i sur., 2005c; Es-Safi i sur., 2007c; Kirmizibekmez i sur., 2008; Kirmizibekmez i sur., 2009; Tundis i sur., 2012a; Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a), uz iznimku 3-*O*-glikoziliranih flavonola, izokvercitrina (Kirmizibekmez i sur., 2009) i rutina (Tiemann, 1903; Wunderlich, 1908; Ben Hassine i sur., 1982b; Athmouni i sur., 2016). Budući da su oni, kao i flavonoidi metilirani u nekom od prethodno navedenih položaja (demetoksicentaureidin, krizoeriol, pektolinarigenin, stahispinozid), nađeni samo u rijetkim slučajevima (Harborne i Williams, 1971; Kirmizibekmez i sur., 2003a; Kirmizibekmez i sur., 2004b; Tundis i sur., 2012a), nije smatrano da bi navedena ograničenja mogla značajno utjecati na rezultate usporedbe procijenjenog sadržaja flavonoida u istraživanim vrstama.

Kondenzirane trjeslovine

Sadržaj kondenziranih trjeslovina (proantocijanidina) varirao je između 0,19 mg EKT/g SM (korijen vrste *G. meridionalis*, Grobničko polje, 2013) i 9,77 mg EKT/g SM (stabljike vrste *G. cordifolia*, Mostar) (Tablica XIX). Uzorak vrste *G. cordifolia* sakupljen na području Mostara bio je posebno bogat ovom skupinom spojeva. Veću količinu trjeslovina sadržavale su stabljike, odnosno zeleni nadzemni dijelovi vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* ($P < 0,05$), dok kod preostale dvije vrste nisu uočene statistički značajne razlike između biljnih dijelova.

Iako je primijenjena vanilinska metoda zabilježena za određivanje kondenziranih trjeslovina i u nekim prethodnim istraživanjima kemizma vrste *G. alypum* (Khlifi i sur. 2011; Touaibia i Chaouch, 2016), potrebno je uzeti u ozbir da vanilin može reagirati i s različitim terpenoidima u koje se, između ostalog, ubrajaju i iridoidi (Wagner i Bladt, 1996). S obzirom na skromne i dvosmislene podatke o prisustvu kondenziranih trjeslovina u vrstama roda *Globularia* (Heckel i Schlagdenhauffen, 1883; Zellner, 1934; Awen i sur., 2010), ali i zabilježenu prisutnost monomera kondenziranih trjeslovina kao što je (*epi*)galokatehin (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a), dobivene rezultate potrebno je uzeti s rezervom.

Iridoidi

Sadržaj iridoida varirao je između 3,34 mg EA/g SM (korijen vrste *G. punctata*, Grobničko polje, 2012) i 177,53 mg EA/g SM (listovi vrste *G. punctata*, Grobničko polje, 2012) (Tablica XIX). Visok sadržaj iridoida zabilježen je kod vrsta *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata*, posebno u njihovim listovima i stabljikama ($P < 0,05$). Veći sadržaj iridoida nedavno je zabilježen i u nadzemnim dijelovima vrste *G. meridionalis* u odnosu na njezine podzemne dijelove (Tundis i sur., 2012a). Sadržaj iridoida vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* nije se značajno razlikovao ($P > 0,05$), dok je u listovima vrste *G. punctata* zabilježen nešto veći sadržaj ($P < 0,05$).

Primijenjenom spektrofotometrijskom metodom s Trim-Hillovim reagensom moguće je detektirati samo određeni tip iridoida, primjerice iridoide aukubinskog i asperulozidinskog tipa (Trim i Hill, 1952), koji su prethodno izolirani iz vrsta *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* (Chaudhuri i Sticher, 1980; Kirmizibekmez i sur., 2009; Tundis i sur., 2012b), ali ne i one katalpolskog tipa (Harborne, 1998), koji prevladavaju kod vrste *G. alypum* (Chaudhuri i Sticher, 1981; Es-Safi i sur., 2006; Es-Safi i sur., 2007c; Kirmizibekmez i sur., 2008; Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a; Feriani i sur., 2017). Ovime je moguće objasniti naizgled daleko niži sadržaj iridoida kod vrste *G. alypum* u odnosu na ostale istraživane vrste.

Uočeno ograničenje primijenjene spektrofotometrijske metode pokušalo se umanjiti razvojem kromatografske metode kojom je bilo moguće istovremeno odrediti sadržaj aukubina i sadržaj katalpola kao iridoida koji su karakteristični za vrste roda *Globularia* (Hegnauer i Kooiman, 1978).

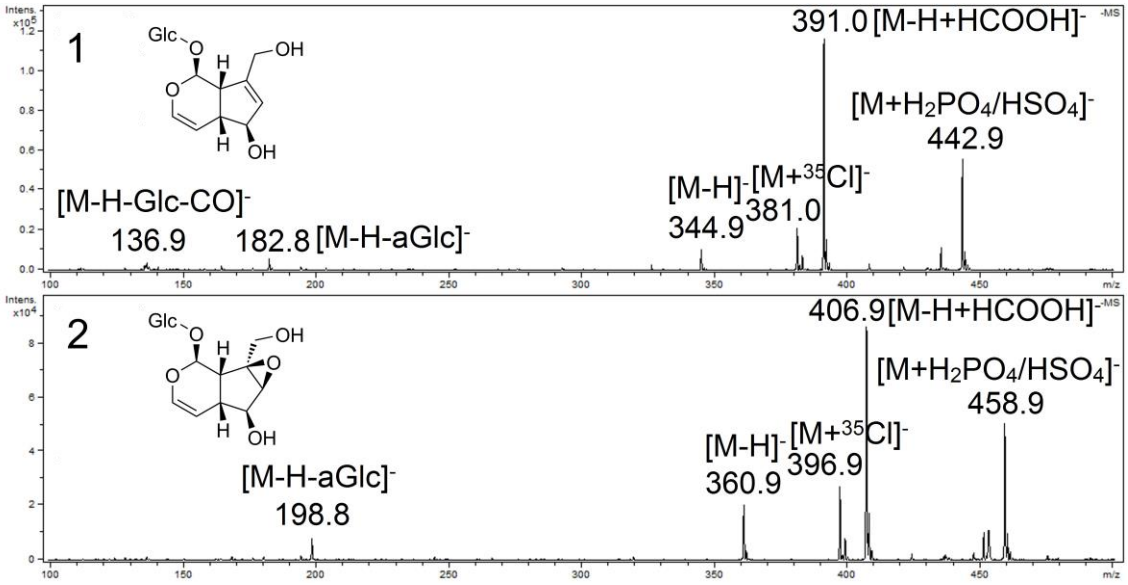
Sadržaj aukubina i katalpola

Prisutnost iridoida aukubina i katalpola u odabranim metanolnim ekstraktima različitih biljnih dijelova vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013), *G. cordifolia* (Mostar, 2012), *G. meridionalis* (Baške Oštarije, 2012) i *G. punctata* (Vižintini, 2012), koji su pripremljeni ultrazvučnom ekstrakcijom, istražena je pomoću spregnutog sustava tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti-fotodiodna detekcija-ionizacija elektroraspršenjem-masena spektrometrija (HPLC-DAD-ESI-MS). Iridoidi su identificirani na temelju usporedbe njihovih vremena zadržavanja, koja su iznosila 7,56 ± 0,01 min za katalpol i 12,23 ± 0,01 min za aukubin (n = 6), te UV/Vis i masenih spektara s onima standardnih tvari. Ionizacija elektroraspršenjem provedena je u negativnom načinu rada, pri kojem je, kao i u nekim prethodnim istraživanjima iridoida, uočena bolja osjetljivost metode (Li i sur., 2008; Deng i sur., 2013). Aukubin i katalpol pokazali su usporediv ionizacijski profil (Slika 53).

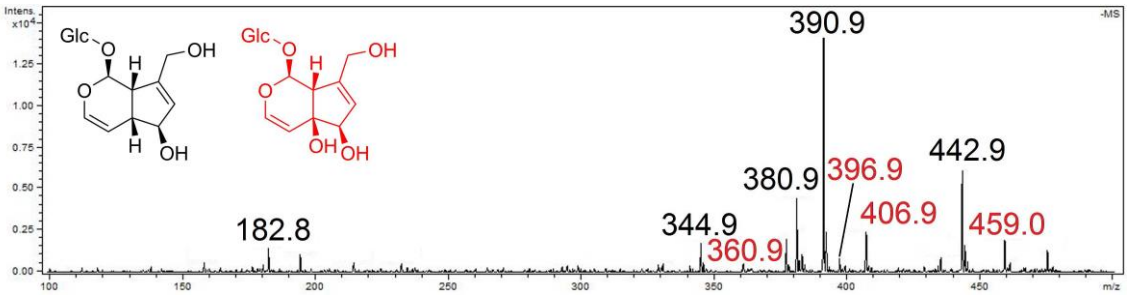
Molekulski ioni $[M-H]^-$ aukubina i katalpola primijećeni su kod *m/z* 345, odnosno *m/z* 361, a imali su manji intenzitet od većine ostalih iona, koji su pripisani stvaranju različitih adukata. Ioni najvećeg intenziteta pripisani su stvaranju adukata s mravljom kiselinom $[M-H+46]^-$, koji su dosad bili zabilježeni za katalpol (Ding i sur., 2014) i druge iridoidne glikozide kada je u pokretnoj fazi bila prisutna mravlja kiselina (Li i sur., 2008; Deng i sur., 2013). Ostali ioni pripisani su stvaranju adukata s kloridima $[M+35]^-$ i $[M+37]^-$, s obzirom na uočenu razliku u masi u odnosu na molekulski ion i međusobni odnos visine njihovih pikova (3:1) (Zhu i Cole, 2000) te fosfatnom/sulfatnom kiselinom odnosno dihidrogenfosfatnim/ hidrogensulfatnim ionima $[M+97]^-$ (Chowdhury i sur., 1990; Tong i sur., 1999; Harvey, 2005). Kod oba analita uočeni su i fragmenti karakteristični za iridoidne glukozide dobiveni gubitkom anhidroglukoze (Kumar i sur., 2013). Pik uočen kod *m/z* 137 u masenom spektru aukubina pripisan je gubitku glukoze i ugljikovog(II) oksida (CO) (Qi i sur., 2009).

Oba analita određena su primjenom masenog detektora, s obzirom na njegovu uočenu veću selektivnost u odnosu na fotodiodni detektor, kod kojeg su vrijednosti aukubina u uzorcima vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* bile i do deset puta veće u odnosu na iste vrijednosti dobivene pomoću masenog detektora. Ovakvi rezultati upućivali su na moguću koeluaciju dva ili više spojeva, što je potvrdila i pojava dodatnih pikova u masenim spektrima

aukubina, čije su se *m/z* vrijednosti podudarale s *m/z* vrijednostima pikova u masenom spektru katalpola (Slika 54). S obzirom na veliku razliku u vremenu zadržavanja između aukubina i katalpola, zaključeno je da ovi pikovi ne pripadaju katalpolu, već nekom drugom spoju iste molekulske mase. Na temelju sličnosti u strukturi, pretpostavljeno je da je riječ o monomelitozidu (*C*-5-hidroksiliranom aukubinu), koji je prethodno izoliran iz obje navedene vrste (Chaudhuri i Sticher, 1980; Tundis i sur., 2012b).



Slika 53. Maseni spektar standarda aukubina (1) i katalpola (2), pri negativnom načinu rada; aGlc – anhidroglukoza, Glc – glukoza



Slika 54. Maseni spektar aukubina, prisutnog u metanolnom ekstraktu korijena vrste *G. cordifolia* (Mostar, 2012), pri negativnom načinu rada; struktura i pikovi naznačeni crvenom bojom pripadaju monomelitozidu (5-hidroksiaukubinu)

Primijenjena metoda validirana je u skladu s ICH smjernicama (2005), a rezultati validacije prikazani su u Tablici XX. Raspon istraženih koncentracija (10 – 200 μg/mL) oba analita bio je unutar linearnog područja ($R > 0,99$). Granica dokazivanja (LOD) i granica

određivanja (LOQ) iznosile su 1 μg/mL i 3 μg/mL kod aukubina, odnosno 2,5 μg/mL i 7 μg/mL kod katalpola. Točnost metode kretala se između 98,11% i 102,09%. Preciznost metode unutar jednog dana (ponovljivost) i tri uzastopna dana (srednja preciznost), izražene kao relativna standardna devijacija vremena zadržavanja (< 1%) i površine pikova (< 5%), bile su također zadovoljavajuće.

Tablica XX. Validacijski parametri primijenjene HPLC-DAD-ESI-MS metode za određivanje aukubina i katalpola

Validacijski parametri		**Aukubin**	**Katalpol**
Linearno područje (μg/mL)		10 – 200	10 – 200
Jednadžba pravca		y = 23618x – 249491	y = 13700x – 25381
Koeficijent korelacije, *r*		0,993	0,995
LOD (μg/mL)		1	2,5
LOQ (μg/mL)		3	7
Točnost (%)	25 μg/mL	102,09	98,11
	50 μg/mL	100,87	101,32
	100 μg/mL	101,21	99,48
Ponovljivost	RSD (%) vremena zadržavanja	0,51	0,72
	RSD (%) površine pika	3,87	3,25
Srednja preciznost	RSD (%) vremena zadržavanja	0,54	0,87
	RSD (%) površine pika	4,92	4,85

LOD – granica dokazivanja, LOQ – granica određivanja, RSD – relativna standardna devijacija

Prisutnost aukubina zabilježena je kod sve četiri istraživane vrste, dok je katalpol bio prisutan samo kod vrsta *G. alypum* i *G. punctata* (Tablica XXI). Sadržaj određivanih iridoida u listovima i cvjetovima ponovno je bio veći kod vrsta *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* u usporedbi s vrstom *G. alypum* ($P < 0,05$). Najveći sadržaj iridoida zabilježen je u cvjetovima istraživanih vrsta ($P < 0,05$), pri čemu je posebno visok bio sadržaj katalpola kod vrste *G. punctata* (15,97 mg/g SM).

Općenito, moguće je primijetiti da su veće količine sekundarnih metabolita u pravilu sadržavali zeleni nadzemni dijelovi istraživanih vrsta, što se može povezati sa zaštitnom ulogom koju sekundarni metaboliti imaju za biljke, a koja je posebno važna za one organe koji osiguravaju njihovo preživljavanje i razmnožavanje (Wink, 2003).

Tablica XXI. Sadržaj aukubina i katalpola u različitim biljnim dijelovima odabranih populacija istraživanih vrsta roda *Globularia* izražen kao srednja vrijednost ± standardna devijacija u mg/g SM (n = 3)

Dio biljke	*G. alypum* (Konavoske stijene, 2013)	*G. cordifolia* (Mostar, 2012)	*G. meridionalis* (Baške Oštarije, 2012)	*G. punctata* (Vižintini, 2012)
Aukubin				
List	$0,58 \pm 0,01^{dB}$	$0,96 \pm 0,03^{bB}$	$1,53 \pm 0,03^{aB}$	$0,77 \pm 0,01^{cB}$
Cvijet	$0,92 \pm 0,00^{dA}$	$1,65 \pm 0,02^{bA}$	$2,00 \pm 0,01^{aA}$	$1,29 \pm 0,01^{cA}$
Drvenasta stabljika	$0,58 \pm 0,01^{bB}$	$0,59 \pm 0,00^{bD}$	$0,61 \pm 0,01^{bD}$	$0,66 \pm 0,01^{aC}$
Korijen	n.i.	$0,81 \pm 0,00^{aC}$	$0,76 \pm 0,01^{bC}$	$0,57 \pm 0,01^{cD}$
Katalpol				
List	$1,79 \pm 0,03^{bB}$	-	-	$2,52 \pm 0,06^{aB}$
Cvijet	$12,58 \pm 0,03^{bA}$	-	-	$15,97 \pm 0,63^{aA}$
Drvenasta stabljika	$1,47 \pm 0,02^{aB}$	-	-	$0,51 \pm 0,01^{bC}$
Korijen	n.i.	-	-	$0,66 \pm 0,01$

SM – suhi biljni materijal; n.i. – nije ispitano, - – nije detektirano; vrijednosti u eksponentu naznačene različitim malim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju između vrsta ($P < 0,05$): a > b > c > d; vrijednosti u eksponentu naznačene različitim velikim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju između biljnih dijelova ($P < 0,05$): A > B > C > D

U usporedbi s ostalim biljnim dijelovima, listovi vrste *G. alypum* i ostalih istraživanih vrsta bili su bogati svim određivanim skupinama sekundarnih metabolita. Ovime bi se mogla objasniti njihova česta primjena u narodnoj medicini mediteranskih zemalja (Merzouki i sur., 2000; Leporatti i Ghedira, 2009; Carrió i Vallès, 2012; De Natale i Pollio, 2012; Montanari, 2012; Bouzabata, 2013; El Abbouyi i sur., 2014; Messaoudi Moussi i sur., 2015). S druge strane, primjena cvjetova (Montanari, 2012; Bouzabata, 2013; Bousta i sur., 2014; Messaoudi Moussi i sur., 2015), mladih izdanaka (Leporatti i Ghedira, 2009; Boudjelal i sur., 2013; El-Mokasabi, 2014a; El-Mokasabi, 2014b), odnosno nadzemnih dijelova vrste *G. alypum* (Fresquet Febrer, 1996; Hammiche i Maiza, 2006; De Natale i Pollio, 2012; Sari i sur., 2012), koja je također zabilježena, mogla bi se objasniti visokim sadržajem različitih fenolnih spojeva i katalpola uočenim kod cvjetova ove vrste. Iako u provedenom istraživanju sadržaj sekundarnih metabolita kod korijena vrste *G. alypum* nije bio istražen, ranija istraživanja pokazala su da korijen može sadržavati povišene količine fenola i flavonoida u usporedbi s listovima i cvjetovima iste vrste (Rached i sur., 2010; Taghzouti i sur., 2016). U okviru ovog istraživanja, povišeni sadržaj fenola primijećen je prvenstveno kod korijena vrste *G. punctata*. Unatoč tome, čini se da je primjena korijena glavulja u narodnoj medicini vrlo rijetka (Vasisht i Kumar, 2004; Helmstädter, 2016), dok se nešto češće spominje primjena cijelih biljaka (Sezik i sur., 1991; Vasisht i Kumar, 2004; Eissa i sur., 2014; Fakchich i Elachouri, 2014; Ouhaddou i sur., 2014), koja bi uz ostale biljne dijelove mogla uključivati i korijen.

Povezanost između sadržaja sekundarnih metabolita i okolišnih čimbenika

Poznato je da okolišni čimbenici, kao što su vrsta tla, izloženost sunčevoj svjetlosti i količina oborina, mogu značajno utjecati na sintezu biljnih sekundarnih metabolita, primjerice polifenola (Manach i sur., 2004). Kako bi se provjerio mogući utjecaj pojedinih okolišnih čimbenika na varijabilnost određivanih spojeva između različitih populacija glavulja (Tablica XIX), istražena je povezanost dobivenih rezultata sa srednjim mjesečnim temperaturama zraka i mjesečnim količinama oborina (Tablica XXII).

Vrijednosti temperature zraka i količine oborina kojima je svaka od istraživanih populacija bila izložena procijenjene su kao srednje vrijednosti klimatskih podataka za mjesec u kojem je biljni materijal bio sakupljen i prethodna tri mjeseca, a koje su bile zabilježene na meteorološkim postajama najbližim mjestima sakupljanja biljnog materijala. S obzirom na iznimno veliku razliku u nadmorskoj visini između mjesta uzorkovanja na području Učke (926 m) i smještaja najbliže meteorološke postaje (120 m), zbog koje je bilo teško predvidjeti vrijednost prosječne temperature zraka kojima je bila izložena populacija vrste *G. meridionalis* s ovog područja, vrijednosti sadržaja sekundarnih metabolita za ovu populaciju isključene su iz korelacijskih analiza.

Uočena je dobra pozitivna povezanost između sadržaja ukupnih fenola u listovima istraživanih vrsta i prosječne mjesečne temperature (r = 0,63, P = 0,016, n = 14). Također, uočena je i dobra negativna povezanost između sadržaja ukupnih fenola u stabljikama istraživanih vrsta i prosječne mjesečne temperature (r = -0,62, P = 0,018, n = 14), pri čemu su u analizu bili uključeni i uzorci kod kojih su zbog nedostatka biljnog materijala stabljike bile spojene s cvjetovima. Kao što je vidljivo u Tablici XIX, sadržaj ukupnih fenola u stabljikama s cvjetovima bio je u najvećem broju slučajeva snižen ili usporediv u odnosu na sadržaj ukupnih fenola u stabljikama kod ostalih populacija iste vrste. Nakon isključivanja navedenih uzoraka (*G. meridionalis* i *G. punctata*, Grobničko polje, 2012; *G. punctata*, Vugrovec, 2012), uočena je vrlo dobra negativna povezanost između sadržaja ukupnih fenola u stabljikama i prosječne mjesečne temperature (r = -0,84, P = 0,001, n = 11). Dobiveni rezultati mogli bi ukazivati na promjene u mjestu sinteze polifenolnih spojeva i/ili na njihov premještaj iz stabljika u listove kod izloženosti istraživanih vrsta povišenim temperaturama, i obrnuto, na premještaj polifenola iz listova u stabljike kod izloženosti niskim temperaturama. Poznato je da niske temperature mogu potaknuti sintezu antocijana (Petrussa i sur., 2013), što bi moglo objasniti primijećenu crvenkastu obojenost stabljiki vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*, odnosno povišeni sadržaj kondenziranih trjeslovina primijećen kod navedenih vrsta.

Tablica XXII. Prosjeci* srednjih mjesečnih temperatura i mjesečnih količina oborina za mjesec u kojem je sakupljen biljni materijal i prethodna tri mjeseca (n = 4)

Populacija (Godina uzorkovanja)	Meteorološka postaja (Nadmorska visina (m))	Prosječna T (°C)	Prosječne oborine (mm)
G. alypum			
Konavoske stijene (2013)	Dubrovnik (52)	10,1	235,1
G. cordifolia			
Mostar (2012)	Mostar (99)	11,8	140,5
Baške Oštarije (2012)	Gospić (564)	6,4	69,4
Alan (2013)	Zavižan (1594)	0,0	246,2
G. meridionalis			
Baške Oštarije (2012)	Gospić (564)	6,4	69,4
Dinara (2012)	Knin (234)	10,1	65,3
Učka (2012)	Letaj (120)	9,2	47,5
Grobničko polje (2012)	Rijeka (120)	11,3	64,4
Grobničko polje (2013)	Rijeka (120)	11,0	226,3
G. punctata			
Grobničko polje (2012)	Rijeka (120)	11,3	64,4
Grobničko polje (2013)	Rijeka (120)	11,0	226,3
Vižintini (2012)	Pazin (291)	8,9	44,7
Vižintini (2013)	Pazin (291)	8,9	136,6
Vugrovec (2012)	Maksimir (128)	5,8	18,1
Slapnica (2013)	Maksimir (128)	8,7	93,0

* – prosječne vrijednosti izračunate su na temelju klimatskih podataka zabilježenih na meteorološkim postajama koje su najbliže lokacijama s kojih je tijekom 2012. i 2013. godine sakupljen biljni materijal (prema podacima Državnog hidrometeorološkog zavoda i Federalnog hidrometeorološkog zavoda Bosne i Hercegovine)

Povezanost između prosječnih mjesečnih temperatura i sadržaja flavonoida, trjeslovina i iridoida, kao ni između prosječnih mjesečnih količina oborina i sadržaja sekundarnih metabolita, nije uočena ($P > 0,05$). Uočene razlike između populacija mogle bi biti posljedica i nekih drugih čimbenika, primjerice starosti biljke ili pojedinih biljnih organa (Andrzejewska-Golec, 1995; Valares Masa i sur., 2016), odnosno reakcije na oštećenja koja su prouzročili biljojedi i patogeni mikroorganizmi (Marak i sur., 2002). Povišeni sadržaj kondenziranih trjeslovina koji je nađen u svim biljnim dijelovima vrste *G. cordifolia* s područja Mostara mogao bi biti povezan s njezinim rastom u samom koritu rijeke Neretve. Ostali uzorci sakupljeni su s dobro dreniranih područja izloženih punom svjetlu. Ranije je zabilježeno da biljke bogate trjeslovinama uglavnom rastu na neplodnom tlu koje je slabo drenirano (Kraus i sur., 2003). Navedene vrijednosti mogle bi se povezati s prisutnošću smeđih polimera, koji su kod mostarske populacije bili posebno povišeni. Moguće je i da nije riječ o kondenziranim trjeslovinama (polimerima flavan-3-ola), već o polimerima iridoida (npr. asperulozida), koji također mogu nastati u vlažnoj sredini (Berkowitz i sur., 1982).*

* – poglavlje sadrži objavljene rezultate (Sertić i sur., 2015) – vidi pod 7. Prilozi; Friščić i sur., 2017, u tisku

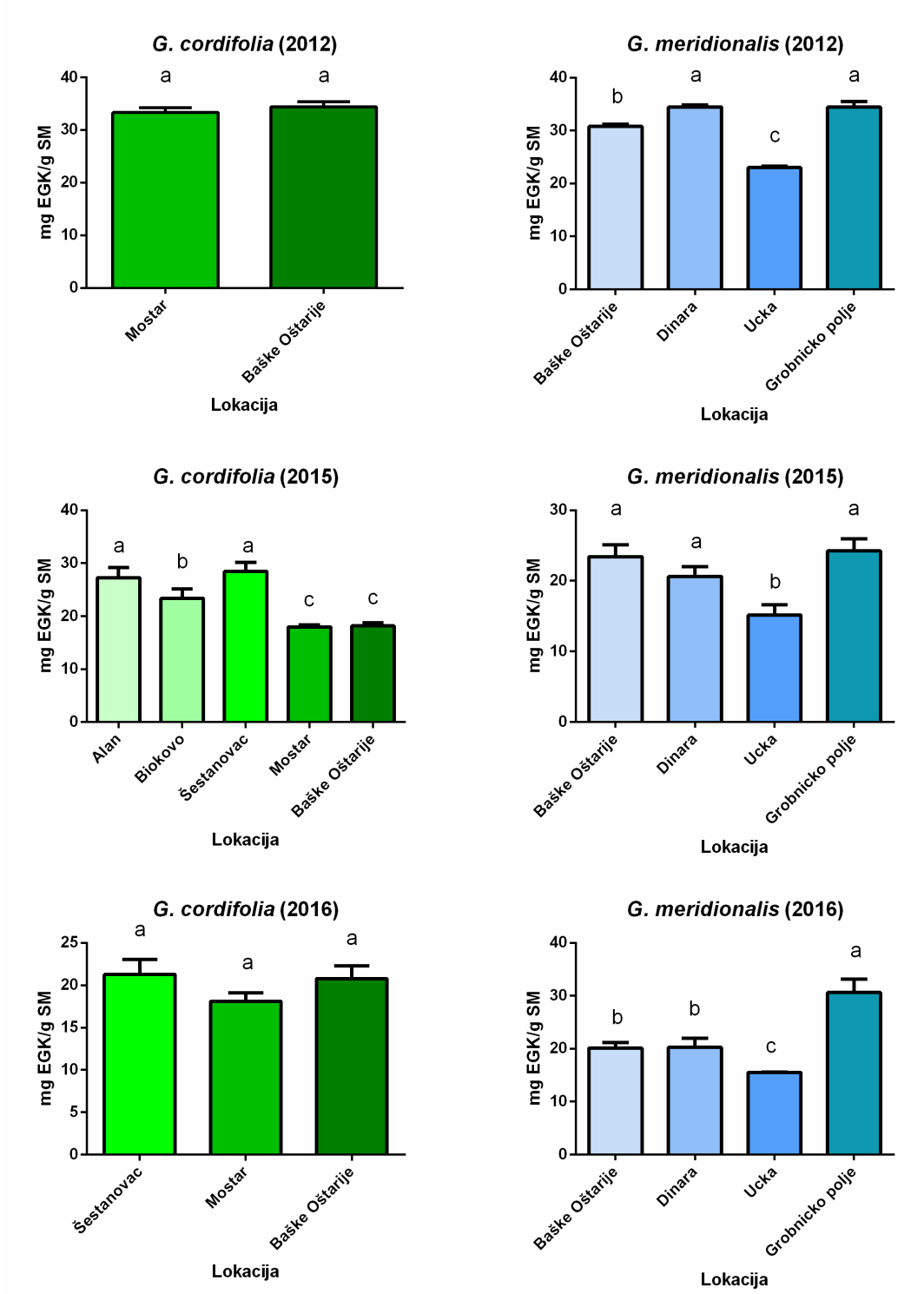
4.2.2.2. Usporedba između različitih populacija ovisno o sezoni

Ukupni fenoli

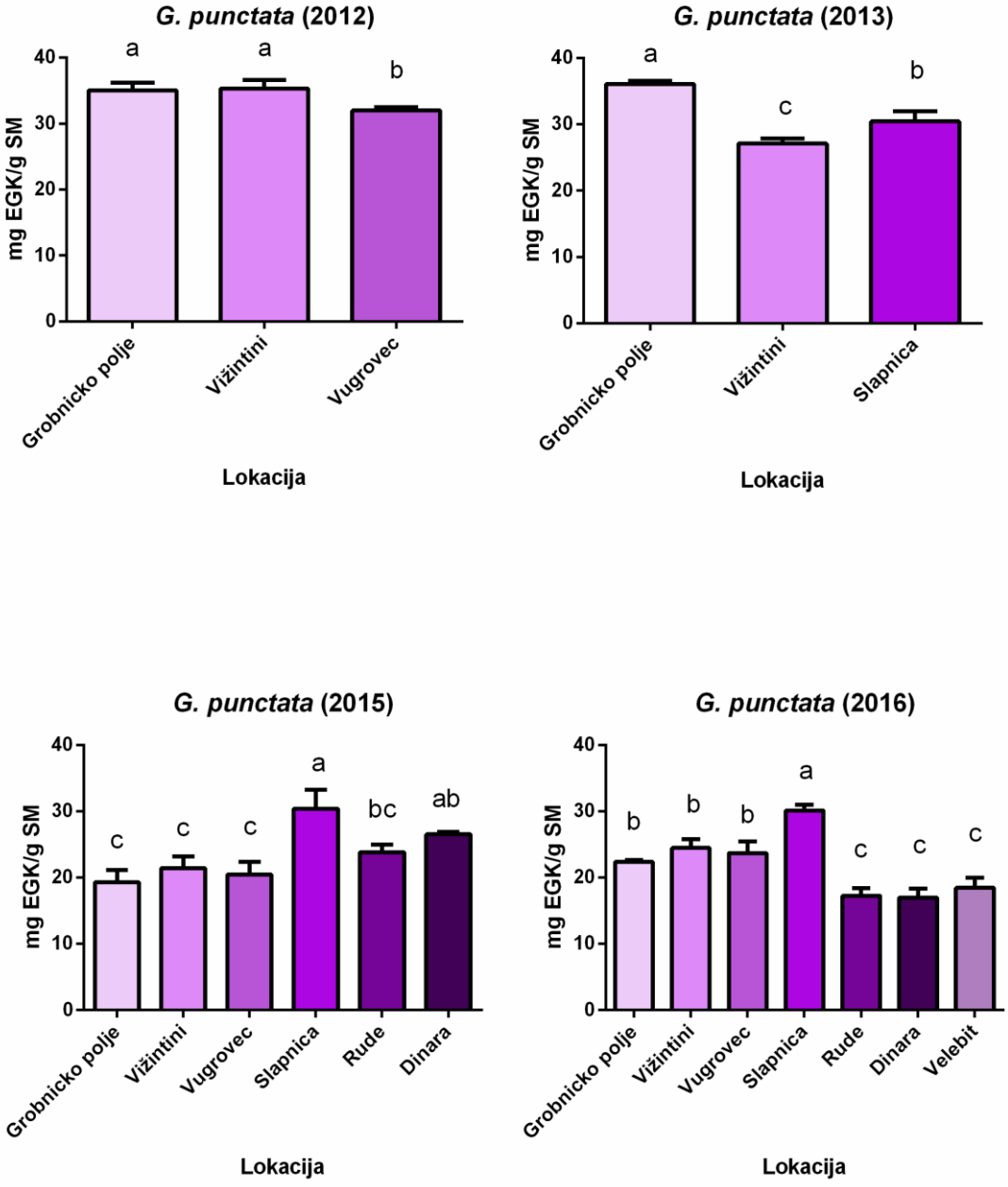
Sadržaj ukupnih fenola u listovima vrste *G. cordifolia* kretao se od 17,98 mg EGK/g SM (Mostar, 2015) do 34,42 mg EGK/g SM (Baške Oštarije, 2012), a u listovima vrste *G. meridionalis* od 15,14 mg EGK/g SM (Učka, 2015) do 35,18 mg EGK/g SM (Grobničko polje, 2013). Usporedba uzoraka sakupljenih unutar jedne sezone upućuje na to da se sadržaj ukupnih fenola može statistički značajno razlikovati između različitih populacija (Slika 55). Primjerice, pokazalo se da je biljni materijal vrste *G. cordifolia* sakupljen 2015. godine na području Alana i Šestanovca sadržavao veću količinu fenola od ostalih populacija, dok je materijal sakupljen na području Mostara i Baških Oštarija sadržavao najmanju količinu fenola ($P < 0,05$). Moguće je, također, primijetiti da je i u drugim sezonama biljni materijal sakupljen na području Mostara sadržavao nešto manje količine ukupnih fenola u usporedbi s ostalim populacijama (2012, 2016) ($P > 0,05$). Slično tome, pokazalo se da je polifenolima najsiromašniji biljni materijal vrste *G. meridionalis* bio onaj s područja Učke, dok se Grobničko polje istaknulo kao lokacija s koje je sakupljen biljni materijal s najvećim sadržajem polifenola ($P < 0,05$).

Raspon sadržaja ukupnih fenola za vrstu *G. punctata* bio je usporediv s rasponom sadržaja vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*, a iznosio je između 16,97 mg EGK/g SM (Dinara, 2016) i 36,10 mg EGK/g SM (Grobničko polje, 2013). Grobničko polje istaknulo se u 2012. i 2013. godini kao lokacija na kojoj je sakupljen biljni materijal vrste *G. punctata* koji je sadržavao nešto veću količinu ukupnih fenola, dok je u 2015. i 2016. godini ukupnim fenolima bio najbogatiji biljni materijal sakupljen na području Slapnice ($P < 0,05$) (Slika 56).

Uočene razlike u sadržaju ukupnih fenola kod različitih populacija iste vrste glavulja upućuju na to da okolišni uvjeti mogu značajno utjecati na proizvodnju navedenih spojeva kod istraživanih vrsta. Dobiveni rezultati opravdavaju uključivanje većeg broja populacija pojedinih vrsta glavulja prilikom usporedbe različitih vrsta koje su sakupljane na njihovim prirodnim staništima, odnosno koje nisu rasle u istim uvjetima. Iznimno, u ovom je istraživanju zastupljena samo jedna, a ujedno i u Hrvatskoj jedina do danas poznata populacija vrste *G. alypum*, čiji je sadržaj i sastav sekundarnih metabolita do danas najbolje istražen. Sadržaj ukupnih fenola u listovima vrste *G. alypum* (Konavoske stijene) kretao se između 30,52 mg EGK/g SM (2014) i 40,95 mg EGK/g SM (2015). Uzevši u obzir povišeni sadržaj ukupnih fenola za daljnja i detaljnija istraživanja fitokemijskog sastava i istraživanja bioloških učinaka, uz vrstu *G. alypum* s područja Konavoskih stijena, odabrane su još vrsta *G. cordifolia* s područja Alana te vrste *G. meridionalis* i *G. punctata* s Grobničkog polja.



Slika 55. Usporedba sadržaja ukupnih fenola u listovima različitih populacija vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* ovisno o sezoni; sadržaj je izražen kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 3); EGK – ekvivalent galne kiseline, SM – suhi biljni materijal; vrijednosti naznačene različitim bojama predstavljaju različite populacije; vrijednosti naznačene različitim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$): a > b > c

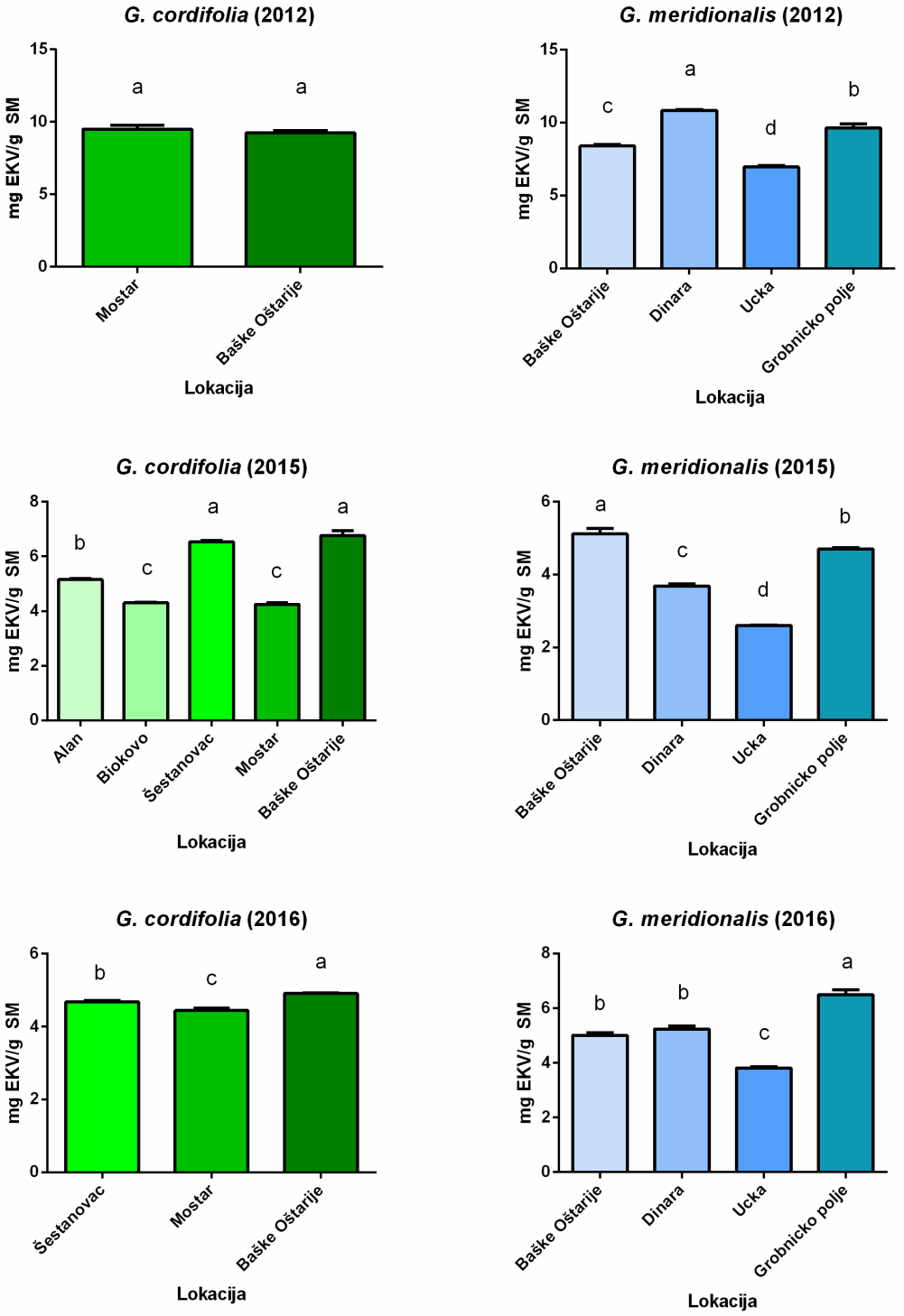


Slika 56. Usporedba sadržaja ukupnih fenola u listovima različitih populacija vrste *G. punctata* ovisno o sezoni; sadržaj je izražen kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 3); EGK – ekvivalent galne kiseline, SM – suhi biljni materijal; vrijednosti naznačene različitim bojama predstavljaju različite populacije; vrijednosti naznačene različitim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$): a > b > c

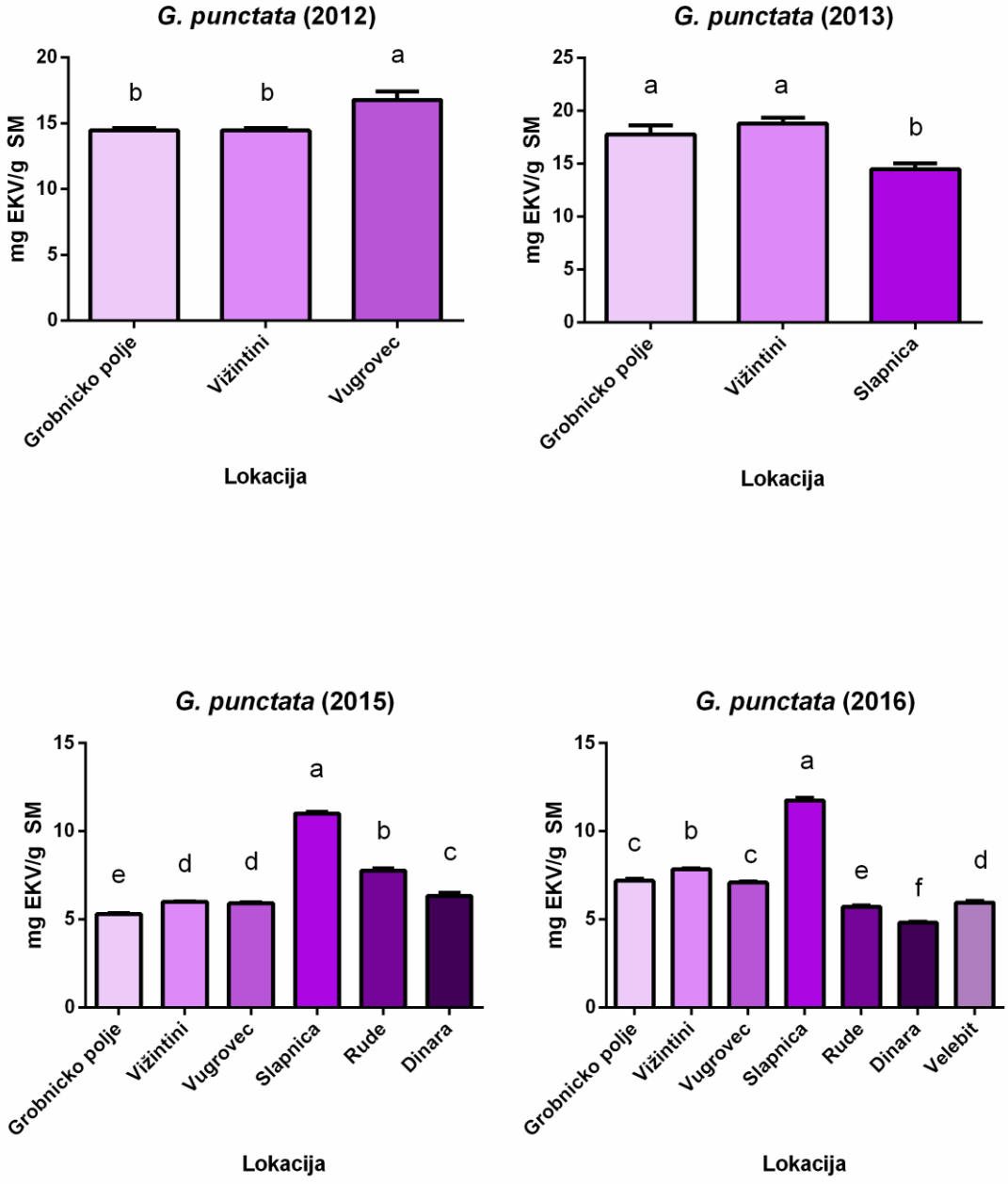
Flavonoidi

Sadržaj flavonoida u listovima značajno se razlikovao između različitih populacija vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* (Slika 57), odnosno vrste *G. punctata* (Slika 58). Kod vrste *G. cordifolia* on se kretao od 4,25 mg EKV/g SM (Mostar, 2015) do 9,50 mg EKV/g SM (Mostar, 2012), a kod vrste *G. meridionalis* od 2,60 mg EKV/g SM (Učka, 2015) do 11,32 mg EKV/g SM (Grobničko polje, 2013). Biljni materijal vrste *G. cordifolia* sakupljen na području Šestanovca i Baških Oštarija sadržavao je u 2015. godini veću količinu flavonoida u usporedbi s drugim populacijama, dok je 2016. godine flavonoidima najbogatiji biljni materijal bio onaj sakupljen na području Baških Oštarija ($P < 0,05$). Najmanju količinu flavonoida, imala je 2015. i 2016. godine, kao i u slučaju sadržaja ukupnih fenola, mostarska populacija vrste *G. cordifolia* ($P < 0,05$). Biljni materijal vrste *G. meridionalis* sakupljen s područja Dinare sadržavao je najviše flavonoida u 2012. godini, dok je onaj s područja Baških Oštarija sadržavao najviše flavonoida u 2015. godini, kao i u slučaju vrste *G. cordifolia* ($P < 0,05$). Biljni materijal vrste *G. meridionalis* sakupljen na području Grobničkog polja sadržavao je drugu najveću (2012, 2015), odnosno najveću količinu flavonoida (2016). Kao i u slučaju fenolnih spojeva, flavonoidima najsiromašniji bio je biljni materijal s područja Učke ($P < 0,05$).

Listovi vrste *G. punctata* sadržavali su između 4,80 mg EKV/g SM (Dinara, 2016) i 18,81 mg EKV/g SM (Vižintini, 2013). Uzorci ove vrste nerijetko su bili bogatiji flavonoidima od uzoraka ostalih istraživanih vrsta (*G. alypum, G. cordifolia, G. meridionalis*) sabranih tijekom iste sezone. Biljni materijal sakupljen 2012. godine na području Vugrovca sadržavao je više flavonoida u usporedbi s biljnim materijalom sakupljenim na ostalim lokacijama, odnosno biljni materijal sakupljen 2013. godine na području Grobničkog polja i Vižintina sadržavao je više flavonoida od materijala sakupljenog na području Slapnice. Suprotno tome, u 2015. i 2016. godini područje Slapnice istaknulo se kao lokacija na kojoj je sakupljen biljni materijal, koji je osim povišenog sadržaja ukupnih fenola imao i značajno veći sadržaj flavonoida ($P < 0,05$). Istovremeno, sadržaj flavonoida u listovima vrste *G. alypum* (Konavoske stijene) kretao se između 5,50 mg EKV/g SM (2014) i 9,23 mg EKV/g SM (2013). S obzirom na to da flavonoidi prema literaturnim podacima čine manji dio ukupnih fenola kod glavulja, ponajprije u odnosu na različite feniletanoide (Kirmizibekmez i sur., 2004b; Djeridane i sur., 2007; Kirmizibekmez i sur., 2008; Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a), odabir populacija za detaljnije istraživanje fitokemijskog sastava i istraživanje bioloških učinaka temeljio se na sadržaju ukupnih fenola, odnosno odabiru onih populacija kod kojih je taj sadržao bio najveći, kao što je prethodno opisano.



Slika 57. Usporedba sadržaja flavonoida u listovima različitih populacija vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* ovisno o sezoni; sadržaj je izražen kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 3); EKV – ekvivalent kvercetina, SM – suhi biljni materijal; vrijednosti naznačene različitim bojama predstavljaju različite populacije; vrijednosti naznačene različitim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$): a > b > c > d

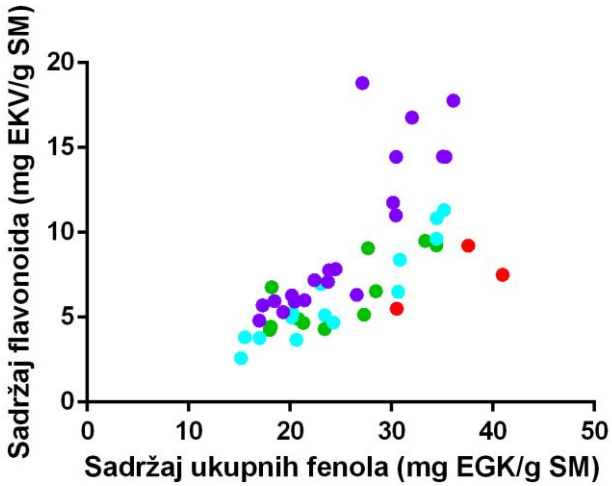


Slika 58. Usporedba sadržaja flavonoida u listovima različitih populacija vrste *G. punctata* ovisno o sezoni; sadržaj je izražen kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 3); EKV – ekvivalent kvercetina, SM – suhi biljni materijal; vrijednosti naznačene različitim bojama predstavljaju različite populacije; vrijednosti naznačene različitim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$): a > b > c > d > e > f

Povezanost između sadržaja ukupnih fenola i flavonoida

Sadržaj flavonoida u listovima istraživanih vrsta glavulja pokazao je dobru povezanost sa sadržajem ukupnih fenola u istim ekstraktima (r = 0,69, P < 0,001). Kod promatranja svake vrste pojedinačno, uočena je vrlo dobra povezanost između sadržaja ukupnih fenola i sadržaja flavonoida kod vrsta *G. cordifolia* (r = 0,78, P = 0,004) i *G. punctata* (r = 0,86, P < 0,001), odnosno izvrsna povezanost sadržaja ukupnih fenola i flavonoida kod vrste *G. meridionalis* (r = 0,93, P < 0,001). Izostanak ovakve povezanosti kod vrste *G. alypum* mogao bi se objasniti ograničenim brojem uzoraka koji su bili uključeni u istraživanje (jedna populacija istraživana kroz tri godine). Na Slici 59 moguće je uočiti kako su uzorci ove vrste za određenu vrijednost sadržaja flavonoida imali najveći sadržaj ukupnih fenola. S druge strane, uzorci vrste *G. punctata* za određenu vrijednost sadržaja ukupnih fenola imali su u pravilu najveći sadržaj flavonoida.

Dobiveni rezultati mogli bi se povezati s pojedinim sastavnicama metanolnih ekstrakata koje su karakteristične za vrstu *G. punctata*, primjerice aciliranim derivatima 6-hidroksiluteolin 7-*O*-diglukozida (Klimek, 1988), odnosno 6-*O*-esterima katalpola i feniletanoidima karakterističnim za vrstu *G. alypum* kao što su kalceolariozid A i B, galipumozid A i B (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a) i drugi fenolni spojevi čija prisutnost je utvrđena fitokemijskim istraživanjima u okviru ovog rada.



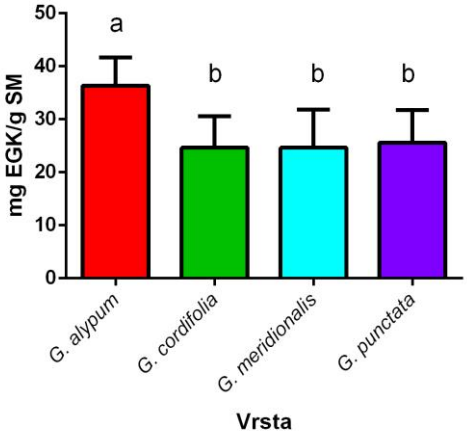
Slika 59. Vrijednosti sadržaja ukupnih fenola i flavonoida u metanolnim ekstraktima listova za sve uzorke sakupljene u razdoblju od 2012. do 2016. godine (n = 48); EGK – ekvivalent galne kiseline, EKV – ekvivalent kvercetina, SM – suhi biljni materijal; vrijednosti naznačene različitim bojama predstavljaju različite vrste: crveno – *G. alypum*, zeleno – *G. cordifolia*, svjetloplavo – *G. meridionalis*, ljubičasto – *G. punctata*

4.2.2.3. Usporedba između vrsta temeljena na njihovom višegodišnjem praćenju

Prosjeci sadržaja ukupnih fenola i flavonoida u listovima istraživanih vrsta dobiveni su iz prethodno prikazanih podataka za sve sakupljene uzorke (Slika 59).

Ukupni fenoli

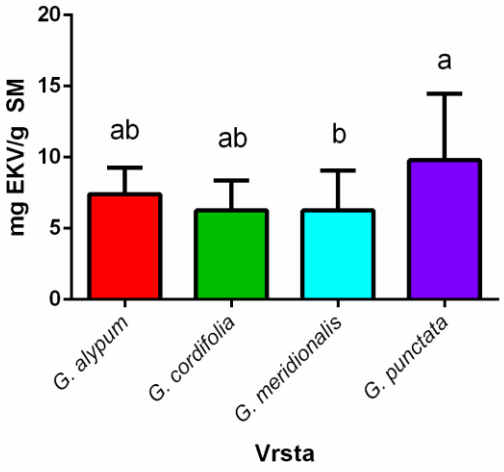
Usporedba uzoraka odabranih vrsta roda *Globularia* koji su sakupljeni s različitih lokacija u razdoblju od 2012. do 2016. godine ukazala je na to da su metanolni ekstrakti listova vrste *G. alypum* dobiveni ultrazvučnom ekstrakcijom značajno bogatiji fenolnim spojevima (36,35 ± 5,32 mg EGK/g SM) u usporedbi s ekstraktima vrsta *G. cordifolia* (24,63 ± 5,99 mg EGK/g SM), *G. meridionalis* (24,46 ± 7,18 mg EGK/g SM) i *G. punctata* (25,59 ± 6,20 mg EGK/g SM) ($P < 0,05$) (Slika 60). Ovo ide u prilog čestoj ljekovitoj primjeni listova vrste *G. alypum* u narodnoj medicini (Ziyyat i sur., 1997; El Rhaffari i Zaid, 2002; Leporatti i Ghedira, 2009; Benarba, 2016; Teixidor-Toneu i sur., 2016). Usporedbom sa srednjom vrijednošću sadržaja ukupnih fenola vrste *G. alypum* u literaturnim podacima, koja je izražena u odnosu na suhi biljni materijal (listovi, nadzemni dijelovi) (28,39 ± 10,40 mg EGK/g SM) (Djeridane i sur., 2006; Djeridane i sur., 2007; Djeridane i sur., 2010; Chograni i sur., 2012; El Guiche i sur., 2015), nije uočena statistički značajna razlika od vrijednosti utvrđenih ovim istraživanjem ($P > 0,05$). Sadržaj fenolnih spojeva u listovima ostalih istraživanih vrsta nije se međusobno statistički značajno razlikovao ni u pojedinim godinama ($P > 0,05$).



Slika 60. Sadržaj ukupnih fenola u listovima uzoraka odabranih vrsta roda *Globularia*, sakupljenih u razdoblju od 2012. do 2016. godine, izražen kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 48); EGK – ekvivalent galne kiseline, SM – suhi biljni materijal; vrijednosti naznačene različitim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$): a > b

Flavonoidi

Usporedba uzoraka odabranih vrsta roda *Globularia* koji su sakupljeni s različitih lokacija u razdoblju od 2012. do 2016. godine ukazala je na to da se sadržaj flavonoida u metanolnim ekstraktima listova vrsta *G. cordifolia* (6,26 ± 2,11 mg EKV/g SM), *G. meridionalis* (6,26 ± 2,80 mg EKV/g SM) i *G. punctata* (9,79 ± 4,68 mg EKV/g SM) dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom statistički značajno ne razlikuje od sadržaja flavonoida vrste *G. alypum* (7,41 ± 1,87 mg EKV/g SM) (Slika 61). Usporedba pojedinačnih rezultata za 2012., 2013. i 2014. godinu ukazivala je na to da listovi vrste *G. punctata* sadrže veću količinu flavonoida u usporedbi s ostalim vrstama ($P < 0,05$). Uzorci vrste *G. punctata* iz 2015. godine sadržavali su statistički značajno više flavonoida samo od uzoraka vrste *G. meridionalis*, dok se sadržaj flavonoida nije značajno razlikovao između vrsta za uzorke sabrane 2016. godine, unatoč tome što su povišene vrijednosti flavonoida zabilježene kod većeg broja uzoraka vrste *G. punctata* ($P > 0,05$).



Slika 61. Sadržaj flavonoida u listovima uzoraka odabranih vrsta roda *Globularia*, sakupljenih u razdoblju od 2012. do 2016. godine, izražen kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 48); EKV – ekvivalent kvercetina, SM – suhi biljni materijal; vrijednosti naznačene različitim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$): a > b

4.2.2.4. Usporedba između različitih metoda ekstrakcije

Spektrofotometrijskim istraživanjima metanolnih ekstrakata vrsta *G. alypum*, *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* koji su bili pripremljeni ultrazvučnom ekstrakcijom utvrđeno je da se sadržaj sekundarnih metabolita, osim između vrsta i njihovih biljnih dijelova, može razlikovati i između populacija, odnosno s obzirom na mjesto i vrijeme sakupljanja biljnog materijala te vremenske uvjete kojima su istraživane populacije bile izložene. Kako bi se provjerilo koliko navedene vrijednosti mogu varirati s obzirom na različite metode ekstrakcije, odnosno koja od metoda je najučinkovitija u izolaciji ukupnih fenola i flavonoida odabranih vrsta roda *Globularia*, istraženi su metanolni ekstrakti nadzemnih dijelova pripremljeni dekokcijom, ultrazvučnom ekstrakcijom, maceracijom te Soxhlet ekstrakcijom. Istraživanja su provedena na biljnom materijalu iz 2013. godine čiji je sadržaj sekundarnih metabolita bio prethodno istražen prilikom usporedbe između različitih biljnih dijelova: *G. alypum* (Konavoske stijene), *G. cordifolia* (Alan), *G. meridionalis* (Grobničko polje) i *G. punctata* (Grobničko polje).

Ukupni fenoli

Najveći sadržaj ukupnih fenola vrste *G. alypum* određen je u metanolnim ekstraktima pripremljenim maceracijom (21,52 mg EGK/g SM), dok je kod ostalih istraživanih vrsta ovim načinom pripreme izdvojeno najmanje fenolnih spojeva ($P < 0,05$) (Tablica XXIII). Dobiveni rezultat podudarao se s onime koji su dobili Djeridane i sur. (2006) za maceracijom pripremljeni etanolni ekstrakt nadzemnih dijelova vrste *G. alypum* (21,54 mg EGK/g SM). S druge strane, sadržaj ukupnih fenola u metanolnom ekstraktu nadzemnih dijelova iste vrste, koji je bio pripremljen ultrazvučnom ekstrakcijom (16,26 mg EGK/g SM), bio je nešto niži od literaturnih vrijednosti (22,36 mg EGK/g SM) (El Guiche i sur., 2015). Količina fenola u uzorcima koji su ekstrahirani kuhanjem u refluksnim uvjetima (dekokcijom) kretala se između 18,42 mg EGK/g SM kod vrste *G. alypum* i 24,83 mg EGK/g SM kod vrste *G. meridionalis*. Ovom metodom izolirano je ujedno i najviše fenolnih spojeva kod preostalih triju vrsta ($P < 0,05$) (Tablica XXIII).

Iako dobivene vrijednosti idu u prilog čestoj primjeni maceracije kod pripreme uzoraka za istraživanja kemijskog sadržaja i sastava vrste *G. alypum* (Djeridane i sur., 2006; Chograni i sur., 2012; Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a; Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014b; Athmouni i sur., 2016), potrebno je primijetiti da je primjena macerata ove vrste u narodnoj medicini izuzetno rijetka (Leporatti i Ghedira, 2009), dok prevladava primjena njezinog dekokta, odnosno infuza (Leporatti i Ghedira, 2009; Azzi i sur., 2012; Khabbach i

sur., 2012; Sari i sur., 2012; Boudjelal i sur., 2013; Benarba, 2016). S obzirom na uočene niže vrijednosti ukupnih fenola u dekoktu i ekstraktu pripremljenom ultrazvučnom ekstrakcijom od onih u maceratu, moguće je da ova vrsta posjeduje određenu količinu termolabilnih spojeva, koji su u vrstama *G. cordifolia, G. meridionalis* i *G. punctata* prisutni u manjoj količini ili koje one uopće ne sadrže. Obrnuto, preostale tri vrste mogle bi sadržavati određene čvrsto vezane spojeve čije oslobađanje je pospješeno povišenom temperaturom. Navedeno je bilo posebno izraženo kod vrste *G. meridionalis*, čiji je macerat sadržavao najmanje fenolnih spojeva, dok su ekstrakti iste vrste pripremljeni dekokcijom i ultrazvučnom ekstrakcijom bili najbogatiji ovim spojevima ($P < 0,05$). Ako se u obzir uzmu varijacije sadržaja ukupnih fenola između pojedinih biljnih dijelova koje su zabilježene u prethodnim istraživanjima provedenim u okviru ovog rada, razlike između pojedinih vrsta mogle bi biti i posljedica različitog omjera listova, cvjetova i stabljiki koji su činili istraživane nadzemne dijelove.

Sadržaj ukupnih fenola određen je i u ekstraktima pripremljenim Soxhlet ekstrakcijom na kojima je proveden dio istraživanja bioloških učinaka (antioksidativnog, antimikrobnog i protuupalnog). Sadržaj fenola vrste *G. alypum* (112,34 mg EGK/g SE) bio je veći u odnosu na sadržaj ostalih istraživanih vrsta ($P < 0,05$), odnosno nešto niži od literaturnih vrijednosti za metanolne Soxhlet ekstrakte listova (Khlifi i sur., 2011; Khantouche i sur., 2015). Posljednje je u skladu s očekivanjima s obzirom na prethodno utvrđenu nižu razinu fenola u stabljikama vrste *G. alypum*, a koje su svojom masom činile značajan dio istraživanih nadzemnih dijelova.

Flavonoidi

Nadzemni dijelovi vrste *G. punctata* sadržavali su najviše flavonoida, neovisno o načinu pripreme ekstrakata ($P < 0,05$). Najveća količina flavonoida određena je u uzorcima koji su ekstrahirani kuhanjem u refluksnim uvjetima (dekokcijom), a kretala se između 6,00 mg EKV/g SM kod vrste *G. alypum* i 11,69 EKV/g SM kod vrste *G. punctata* (Tablica XXIII). Moguće je da je povišena temperatura pri kojoj se provodila ova ekstrakcija povećala topljivost analita te smanjila viskoznost i površinsku napetost otapala, čime je olakšala njegovo prodiranje u uzorak i pospješila ekstrakciju (Dai i Mumper, 2010). Također, povišena temperatura mogla je dovesti do hidrolize glikoziliranih flavonoida (Rohn i sur., 2007), zbog koje je veća količina spojeva mogla reagirati s aluminijevim kloridom (Mammen i Daniel, 2012).

Tablica XXIII. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u metanolnim ekstraktima nadzemnih dijelova odabranih populacija istraživanih vrsta roda *Globularia* pripremljenim različitim metodama ekstrakcije izražen kao srednja vrijednost ± standardna devijacija u mg EGK/g SM i mg EKV/g SM (n = 3)

Priprema ekstrakata	***G. alypum* (Konavoske stijene, 2013)**	***G. cordifolia* (Alan, 2013)**	***G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013)**	***G. punctata* (Grobničko polje, 2013)**
Ukupni fenoli				
Dekokcija	$18,42 \pm 1,42^{cB}$	$22,35 \pm 0,87^{bA}$	$24,83 \pm 0,36^{aA}$	$22,02 \pm 1,07^{bA}$
Ultrazvučna ekstrakcija	$16,26 \pm 1,01^{bC}$	$13,40 \pm 0,79^{cB}$	$20,41 \pm 0,35^{aB}$	$15,51 \pm 0,36^{bB}$
Maceracija	$21,52 \pm 0,65^{aA}$	$11,69 \pm 0,63^{cC}$	$9,08 \pm 0,61^{dC}$	$14,17 \pm 0,90^{bB}$
Soxhlet ekstrakcija*	$112,34 \pm 2,17^{a}$	$95,59 \pm 1,62^{b}$	$98,90 \pm 3,93^{b}$	$79,92 \pm 2,18^{c}$
Flavonoidi				
Dekokcija	$6,00 \pm 0,26^{dA}$	$6,43 \pm 0,11^{cA}$	$7,78 \pm 0,10^{bA}$	$11,69 \pm 0,07^{aA}$
Ultrazvučna ekstrakcija	$2,96 \pm 0,00^{dC}$	$3,66 \pm 0,04^{cB}$	$5,96 \pm 0,08^{bB}$	$6,72 \pm 0,26^{aB}$
Maceracija	$4,17 \pm 0,24^{bB}$	$3,11 \pm 0,09^{cC}$	$2,01 \pm 0,09^{dC}$	$6,32 \pm 0,11^{aC}$
Soxhlet ekstrakcija**	$26,85 \pm 0,46^{b}$	$26,19 \pm 0,40^{bc}$	$25,42 \pm 0,24^{c}$	$43,25 \pm 0,31^{a}$

EGK – ekvivalent galne kiseline, EKV – ekvivalent kvercetina, SM – suhi biljni materijal; * – sadržaj izražen kao mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog ekstrakta; ** – sadržaj izražen kao mg ekvivalenta kvercetina/g suhog ekstrakta; vrijednosti u eksponentu naznačene različitim malim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju između vrsta ($P < 0,05$): a > b > c > d; vrijednosti u eksponentu naznačene različitim velikim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju između metoda ekstrakcije ($P < 0,05$): A > B > C

Uzorak nadzemnih dijelova vrste *G. alypum* pripremljen ultrazvučnom ekstrakcijom sadržavao je najmanju količinu flavonoida (2,96 mg EKV/g SM), dok je maceracijom zabilježena nešto veća količina flavonoida (4,17 mg EKV/g SM), koja redom veličina odgovara literaturnim podacima (Djeridane i sur., 2006; Chograni i sur., 2012). S druge strane, u Soxhlet ekstraktu nadzemnih dijelova iste vrste zabilježena je povišena količina flavonoida (26,85 mg EKV/g SE) u usporedbi s literaturnim podacima (Khlifi i sur., 2011; Khantouche i sur., 2015).

4.2.2.5. Sadržaj sekundarnih metabolita u ekstraktima listova koji su primijenjeni u istraživanjima bioloških učinaka

U istraživanju antidijabetskog i citotoksičnog učinka primijenjeni su ekstrakti listova pripremljeni ultrazvučnom ekstrakcijom s metanolom, kojima je prethodno određen sadržaj sekundarnih metabolita (Tablica XXIV). Među ekstraktima primijenjenim u istraživanju antidijabetskog učinka, ektrakti vrsta *G. alypum* i *G. meridionalis* sadržavali su najveću količinu fenolnih spojeva (130,46 mg EGK/g SE i 123,44 mg EGK/g SE), ekstrakt vrste *G. punctata* najviše flavonoida (48,49 mg EKV/g SE) i iridoida (343,33 mg EA/g SE), a vrste *G. cordifolia* najviše kondenziranih trjeslovina (10,02 mg EKT/g SE).

Među ekstraktima primijenjenim u istraživanju citotoksičnog učinka, ekstrakt vrste *G. alypum* sadržavao je manju količinu fenola (131,39 mg EGK/g SE) od ekstrakata ostalih vrsta (152,69-159,82 mg EGK/g SE). Najveću količinu flavonoida (63,03 mg EKV/g SE) i iridoida (440,04 mg EA/g SE) ponovno je sadržavao ekstrakt vrste *G. punctata*, a najveću količinu kondenziranih trjeslovina ekstrakti vrsta *G. cordifolia* (8,76 mg EKT/g SE) i *G. meridionalis* (8,88 mg EKT/g SE). Navedene razlike uzete su u obzir kod tumačenja opaženih bioloških učinaka.

Tablica XXIV. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, kondenziranih trjeslovina i iridoida u metanolnim ekstraktima listova vrsta roda *Globularia* primijenjenim u istraživanju antidijabetskog i citotoksičnog učinka izražen kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 3)

Skupina metabolita	***G. alypum***	***G. cordifolia***	***G. meridionalis***	***G. punctata***
Antidijabetski učinak	**(Konavoske stijene, 2013)**	**(Alan, 2013)**	**(Grobničko polje, 2013)**	**(Grobničko polje, 2013)**
Fenoli[a]	$130,46 \pm 5,99^{aA}$	$111,35 \pm 3,30^{bB}$	$123,44 \pm 0,77^{aB}$	$98,50 \pm 1,23^{cB}$
Flavonoidi[b]	$30,43 \pm 0,29^{cA}$	$36,54 \pm 1,45^{bB}$	$39,72 \pm 0,60^{bB}$	$48,49 \pm 2,37^{aB}$
Trjeslovine[c]	$3,00 \pm 0,06^{dA}$	$10,02 \pm 0,28^{aA}$	$6,21 \pm 0,11^{bB}$	$4,07 \pm 0,11^{cB}$
Iridoidi[d]	$27,49 \pm 3,08^{dA}$	$311,23 \pm 6,20^{bA}$	$247,37 \pm 2,70^{cB}$	$343,33 \pm 4,88^{aB}$
Citotoksični učinak	**(Konavoske stijene, 2013)**	**(Baške Oštarije, 2012)**	**(Baške Oštarije, 2012)**	**(Grobničko polje, 2012)**
Fenoli[a]	$131,39 \pm 2,98^{bA}$	$157,31 \pm 4,29^{aA}$	$159,82 \pm 2,34^{aA}$	$152,69 \pm 4,87^{aA}$
Flavonoidi[b]	$32,26 \pm 1,37^{cA}$	$42,23 \pm 0,67^{bA}$	$43,57 \pm 0,50^{bA}$	$63,03 \pm 0,72^{aA}$
Trjeslovine[c]	$2,66 \pm 0,09^{cB}$	$8,76 \pm 0,08^{aB}$	$8,88 \pm 0,27^{aA}$	$7,71 \pm 0,25^{bA}$
Iridoidi[d]	$12,07 \pm 0,18^{dB}$	$290,82 \pm 7,49^{cB}$	$310,25 \pm 4,30^{bA}$	$440,04 \pm 8,73^{aA}$

[a] – sadržaj izražen kao mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog ekstrakta, [b] – sadržaj izražen kao mg ekvivalenta kvercetina/g suhog ekstrakta, [c] – sadržaj izražen kao mg ekvivalenta katehina/g suhog ekstrakta, [d] – sadržaj izražen kao mg ekvivalenta aukubina/g suhog ekstrakta; vrijednosti u eksponentu naznačene različitim malim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju između vrsta ($P < 0,05$): a > b > c > d; vrijednosti u eksponentu naznačene različitim velikim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju između različitih uzoraka iste vrste ($P < 0,05$): A > B

4.2.3. Sastavnice ekstrakata

Usporedba fitokemijskog profila vrsta *G. alypum*, *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* provedena je pomoću sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnutog s fotodiodnom detekcijom i tandemskom masenom spektrometrijom. Početna analiza provedena je na metanolnim ekstraktima nadzemnih dijelova koji su dobiveni dekokcijom uzoraka sabranih 2013. godine na području Konavoskih stijena (*G. alypum*), Alana (*G. cordifolia*) i Grobničkog polja (*G. meridionalis, G. punctata*). Naknadno je uspoređen i sastav ekstrakata pripremljenih ultrazvučnom ekstrakcijom, maceracijom i Soxhlet ekstrakcijom, pri čemu je kao dopunska metoda primijenjena tankoslojna kromatografija. Također, na ekstraktima nadzemnih dijelova dobivenim maceracijom i ekstraktima listova dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom provedena je i usporedba između različitih populacija.

Fitokemijski profil ekstrakata pripremljenih dekokcijom uspoređen je primjenom masenog detektora pri pozitivnom i negativnom načinu rada. Kao što je zabilježeno i u nekim ranijim istraživanjima (Fabre i sur., 2001; Cuyckens i Claeys, 2004; Es-Safi i sur., 2007b), pri negativnom načinu rada postignuta je veća selektivnost i osjetljivost za sastavnice ekstrakata, prvenstveno iridoide i fenolne spojeve, te su sva daljnja istraživanja provedena samo pri negativnom načinu rada.

4.2.3.1. Metanolni ekstrakti nadzemnih dijelova dobiveni dekokcijom

Identifikaciji sastavnica ekstrakata prethodilo je podešavanje kromatografskih uvjeta za njihovo optimalno razdvajanje. U optimalnim su uvjetima zatim dobiveni kromatografski i spektralni podaci za 29 standardnih tvari (negativni način rada masenog detektora) (Tablica XXV), koje su uključivale glikozide iridoida, aromatske/fenolne kiseline, glikozide i aglikone flavonoida te feniletanoide, a pomoću kojih je nedvojbeno identificiran manji broj sastavnica (Slika 62). Identifikacija ostalih sastavnica temeljila se na usporedbi njihovih vremena zadržavanja, UV i masenih spektara te načina MS/MS fragmentacije (Tablica VI) s literaturnim podacima. Detaljna analiza podataka dobivenih tandemskom masenom spektrometrijom omogućila je ne samo identifikaciju ili okvirnu identifikaciju velikog broja sastavnica istraživanih vrsta roda *Globularia*, već i bolje razumijevanje karakterističnih puteva MS/MS fragmentacije spojeva koji pripadaju skupinama iridoida, feniletanoida i flavonoida.

Tablica XXV. Kromatografski i spektralni podaci standarada iridoida, aromatskih/fenolnih kiselina, flavonoida i feniletanoida dobiveni primjenom LC-PDA-ESI-MS^n tehnike pri negativnom načinu rada

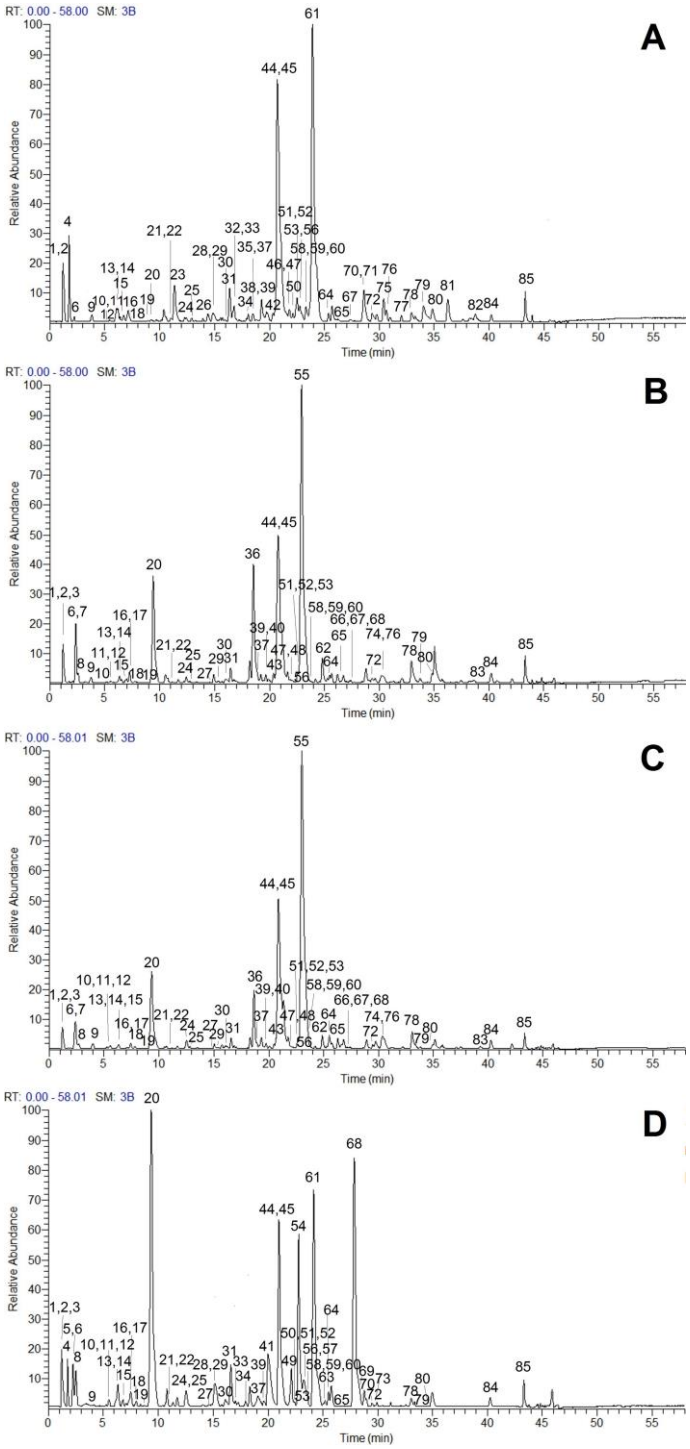
Naziv spoja	*Mr*	t_R (min)	UV λ_{max} (nm)	*m/z** MS^n fragmenti (% relativne zastupljenosti)
Katalpol[a]	362,33	1,9	194	199 $[M-H-aGlc]^-$, 361 $[M-H]^-$, 397 $[M+^{35}Cl]^-$, 399 $[M+^{37}Cl]^-$, **407** $[M-H+HCOOH]^-$, 459 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS^2:** 407 → 199 (42), 361 (100); **MS^3:** 361 → 137 (7), 169 (23), 181 (11), 199 (100), 343 (8); **MS^4:** 199 → 137 (22), 163 (7), 169 (100), 181 (31)
Aukubin[a]	346,33	2,6	191	345 $[M-H]^-$, 381 $[M+^{35}Cl]^-$, 383 $[M+^{37}Cl]^-$, **391** $[M-H+HCOOH]^-$, 443 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS^2:** 391 → 165 (8), 183 (64), 345 (100); **MS^3:** 345 → 165 (15), 183 (100); **MS^4:** 183 → 97 (4), 99 (13), 121 (5), 137 (40), 139 (52), 153 (35), 165 (100)
Protokatehuična kiselina[b]	154,12	3,7	205, 261, 295	109 $[M-H-CO_2]^-$, **153** $[M-H]^-$ **MS^2:** 153 → 109 (100), 153 (70); **MS^3:** 109 → 109 (100); **MS^4:** -
Klorogenska kiselina[b]	354,31	7,9	191, 219, 237, 327	191 $[M-H-aCA]^-$, **353** $[M-H]^-$, 451 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 483 $[M-H+130]^-$, 535 $[M-H+182]^-$, 569 $[M-H+216]^-$, 707 $[2M-H]^-$ **MS^2:** 353 → 191 (100); **MS^3:** 191 → 85 (71), 87 (16), 93 (48), 109 (22), 111 (36), 127 (100), 155 (10), 171 (26), 173 (87); **MS^4:** 127 → 81 (7), 83 (17), 85 (100), 99 (42), 109 (45), 127 (21)
Kavena kiselina[b]	180,16	8,1	192, 219, 236, 324	135 $[M-H-CO_2]^-$, **179** $[M-H]^-$ **MS^2:** 179 → 135 (100), 179 (17); **MS^3:** 135 → 135 (100); **MS^4:** -
Asperulozid[a]	414,36	9,5	191, 239	413 $[M-H]^-$, 449 $[M+^{35}Cl]^-$, 451 $[M+^{37}Cl]^-$, **459** $[M-H+HCOOH]^-$, 511 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 675 $[M-H+262]^-$ **MS^2:** 459 → 413 (100); **MS^3:** 413 → 147 (100), 191 (31), 251 (10); **MS^4:** 147 → 91 (8), 103 (18), 119 (100), 147 (73)
Siringinska kiselina[b]	198,17	10,0	217, 276	-
Genipozid[a]	388,37	11,2	192, 240	225 $[M-H-aGlc]^-$, 387 $[M-H]^-$, 423 $[M+^{35}Cl]^-$, 425 $[M+^{37}Cl]^-$, **433** $[M-H+HCOOH]^-$, 485 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS^2:** 433 → 225 (100), 387 (28); **MS^3:** 225 → 123 (100); **MS^4:** 123 → 105 (100), 123 (23)
p-Kumarinska kiselina[b]	164,16	12,1	210, 227, 311	119 $[M-H-CO_2]^-$, 147 $[M-OH]^-$, **163** $[M-H]^-$ **MS^2:** 163 → 119 (100); **MS^3:** 119 → 119 (100); **MS^4:** -
Cijanidinov klorid[c]	322,70	15,1	198, 279	**285** $[M-HCl]^-$, 303 $[M-H-H_2O]^-$,]$^-$, 331 $[M-HCl+HCOOH]^-$, 349 $[M-H-H_2O+HCOOH]^-$, 383 $[M-H-HCl+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 415 $[M-H-HCl+130]^-$, 467 $[M-H-HCl+182]^-$, 571 $[2(M-HCl)-H]^-$ **MS^2:** 285 → 125 (60), 147 (12), 163 (58), 199 (21), 213 (34), 217 (58), 241 (89), 257 (100), 267 (10);

				MS³: 241 → 185 (9), 197 (27), 199 (29), 213 (100), 223 (39), 241 (14); 257 → 147 (10), 171 (11), 189 (27), 213 (100), 214 (19), 215 (58), 229 (68), 239 (11); **MS⁴:** 213 → 157 (6), 169 (19), 171 (44), 185 (100), 195 (43), 198 (19)
Ferulinska kiselina[b]	194, 18	15,4	192, 218, 237, 323	177 $[M-OH]^-$, **193** $[M-H]^-$ **MS²:** 193 → 134 (37), 149 (100), 178 (54); **MS³:** 149 → 134 (100); **MS⁴:** 134 → 134 (100)
Benzojeva kiselina[b]	122, 12	16,0	195, 230	-
Salicilna kiselina[b]	138, 12	16,2	203, 238, 303	**137** $[M-H]^-$ **MS²:** 137 → 93 (40), 137 (100); **MS³:** 93 → 93 (100); **MS⁴:** -
Sinapinska kiselina[b]	224, 21	16,7	193, 238, 324	**223** $[M-H]^-$, 447 $[2M-H]^-$ **MS²:** 223 → 164 (26), 179 (47), 208 (100); **MS³:** 208 → 149 (9), 164 (100); **MS⁴:** 164 → 135 (27), 149 (100)
Eriodiktiol 7-*O*-glukozid[c]	450, 39	17,3	197, 286	287 $[M-H-aGlc]^-$, **449** $[M-H]^-$, 485 $[M+^{35}Cl]^-$, 579 $[M-H+130]^-$, 899 $[2M-H]^-$ **MS²:** 449 → 287 (100); **MS³:** 287 → 151 (100); **MS⁴:** 151 → 107 (72), 151 (100)
Rutin[c]	610, 52	18,5	204, 258, 355	463 $[M-H-aRha]^-$, **609** $[M-H]^-$, 707 $[M-H+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 739 $[M-H+130]^-$, 871 $[M-H+262]^-$, 1219 $[2M-H]^-$ **MS²:** 609 → 300 (23), 301 (100); **MS³:** 301→ 151 (64), 179 (100), 257 (16), 273 (16); **MS⁴:** 179 → 151 (100)
Izokvercitrin[c]	464, 38	18,9	205, 258, 355	**463** $[M-H]^-$, 561 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 593 $[M-H+130]^-$, 641 $[M-H+182]^-$, 725 $[M-H+262]^-$, 927 $[2M-H]^-$ **MS²:** 463 → 300 (19), 301 (100); **MS³:** 301→ 151 (65), 179 (100), 257 (15), 273 (15); **MS⁴:** 179 → 151 (100)
Luteolin 7-*O*-glukozid[c]	448, 37	19,1	206, 256, 348	**447** $[M-H]^-$, 483 $[M+^{35}Cl]^-$, 493 $[M-H+HCOOH]^-$, 577 $[M-H+130]^-$, 895 $[2M-H]^-$, 1343 $[3M-H]^-$ **MS²:** 447 → 285 (100); **MS³:** 285 → 151 (23), 175 (66), 199 (65), 217 (57), 241 (100), 243 (61), 257 (20), 285 (73); **MS⁴:** -
Verbaskozid[d]	624, 59	20,7	198, 218, 331	**623** $[M-H]^-$, 659 $[M+^{35}Cl]^-$, 721 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 1247 $[2M-H]^-$ **MS²:** 623 → 461 (100); **MS³:** 461 → 135 (38), 161 (12), 297 (13), 315 (100); **MS⁴:** 315 → 135 (100)
Izoverbasko-zid[d]	624, 59	22,2	198, 219, 294, 328	**623** $[M-H]^-$, 659 $[M+^{35}Cl]^-$, 721 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 1247 $[2M-H]^-$ **MS²:** 623 → 461 (100); **MS³:** 461 → 135 (38), 161 (11), 297 (13), 315 (100); **MS⁴:** 315 → 135 (100)
Apigenin 7-*O*-glukozid[c]	432, 38	22,7	199, 269, 338	**431** $[M-H]^-$, 467 $[M+^{35}Cl]^-$, 561 $[M-H+130]^-$, 863 $[2M-H]^-$, 1295 $[3M-H]^-$ **MS²:** 431 → 269 (100); **MS³:** 269 → 149 (16), 151 (9), 183 (14), 197 (18), 225 (66), 227 (16), 269 (100); **MS⁴:** -
Eriodiktiol[c]	288,	26,6	199, 290	**287** $[M-H]^-$, 333 $[M-H+HCOOH]^-$, 385

	25			$[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 417 $[M-H+130]^-$, 469 $[M-H+182]^-$, 549 $[M-H+262]^-$, 575 $[2M-H]^-$ **MS^2:** 287 → 151 (100); **MS^3:** 151 → 107 (100), 151 (17); **MS^4:** 107 → 65 (100), 107 (24)
Cimetna kiselina[b]	148, 16	27,3	204, 216, 280	-
Kvercetin[c]	302, 24	29,0	202, 257, 372	**301** $[M-H]^-$, 399 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 431 $[M-H+130]^-$, 483 $[M-H+182]^-$, 563 $[M-H+262]^-$, 603 $[2M-H]^-$ **MS^2:** 301 → 151 (69), 179 (100), 257 (14), 273 (14); **MS^3:** 179 → 151 (100); **MS^4:** 151 → 107 (100)
Luteolin[c]	286, 24	29,6	208, 255, 268, 348	**285** $[M-H]^-$, 383 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 415 $[M-H+130]^-$, 467 $[M-H+182]^-$, 571 $[2M-H]^-$ **MS^2:** 285 → 151 (19), 175 (59), 199 (55), 217 (51), 241 (100), 243 (58), 285 (28); **MS^3:** 241 → 185 (11), 197 (99), 198 (100), 199 (95), 213 (67), 226 (18); **MS^4:** 197 → 153 (16), 169 (100), 182 (20), 197 (21); 198 → 154 (20), 169 (78), 170 (100), 171 (60), 197 (9), 198 (43), 199 (15); 199 → 143 (18), 155 (17), 171 (100), 199 (23)
Apigenin[c]	270, 24	35,0	209, 269, 338	**269** $[M-H]^-$, 305 $[M+^{35}Cl]^-$, 539 $[2M-H]^-$ **MS^2:** 269 → 149 (34), 151 (18), 201 (25), 225 (100), 269 (16); **MS^3:** 225 → 169 (15), 181 (100), 183 (38), 196 (18), 197 (42); **MS^4:** 181 → 141 (16), 152 (15), 153 (30), 180 (15), 181 (100)
Kempferol[c]	286, 24	35,4	197, 267, 366	269 $[M-OH]^-$, **285** $[M-H]^-$, 383 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 571 $[2M-H]^-$ **MS^2:** 285 → 151 (100), 169 (39), 185 (39), 213 (55), 229 (53), 241 (51), 257 (68), 285 (97); **MS^3:** 151 → 107 (100); **MS^4:** 107 → 63 (50), 65 (100), 107 (20)
Krizoeriol[c]	300, 26	37,2	208, 253, 269, 347	284 $[M-H-CH_3]^-$, **299** $[M-H]^-$, 397 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 429 $[M-H+130]^-$, 599 $[2M-H]^-$ **MS^2:** 299 → 284 (100); **MS^3:** 284 → 256 (100); **MS^4:** 256 → 135 (5), 158 (8), 187 (9), 188 (26), 199 (10), 200 (18), 211 (19), 212 (18), 227 (100), 228 (31), 239 (7), 256 (26)
5,7-Dihidroksi-8-*C*-metil flavanon[c]	270, 28	47,0	-	**269** $[M-H]^-$ **MS^2:** 269 → 165 (34), 178 (26), 183 (19), 201 (10), 225 (86), 227 (100), 241 (38), 251 (12) 269 (33), 270 (9); **MS^3:** 227 → 155 (12), 181 (14), 183 (100), 199 (76); **MS^4:** 183 → 115 (28), 127 (9), 141 (32), 155 (100), 165 (10), 181 (22)

* – glavni ion otisnut je masnim slovima (relativna zastupljenost 100%); [a] – iridoid; [b] – aromatska/fenolna kiselina; [c] – flavonoid; [d] – feniletanoid; - – nije detektirano; aGlc – anhidroglukoza, aCA – anhidrokavena kiselina, aRha – anhidroramnoza

Identifikacija sastavnica



Slika 62. HPLC-MS kromatogram baznih pikova (engl. *Base peak chromatogram*) metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013) (A), *G. cordifolia* (Alan, 2013) (B), *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013) (C) i *G. punctata* (Grobničko polje, 2013) (D) dobivenih dekokcijom, pri negativnom načinu rada; brojevi odgovaraju spojevima koji su navedeni u Tablici XXVI

U metanolnim ekstraktima nadzemnih dijelova koji su dobiveni dekokcijom identificirano je ili okvirno identificirano ukupno 85 sastavnica (Tablica XXVII), od kojih su najveći dio činili glikozidi iridoida i bisiridoida (32), feniletanoidi (21) i flavonoidi (prisutni najvećim dijelom u obliku glikozida) (18). Velik dio spojeva identificiran je kod pojedinih ili svih istraživanih vrsta po prvi puta (naznačeni zvjezdicom (*) u Tablici XXVII).

Iridoidi i bisiridoidi

Iridoidi su bili prisutni u obliku glukozida, slobodni ili esterificirani s aromatskim/fenolnim kiselinama, kao što su benzojeva, cimetna, *p*-kumarinska, kavena i izoferulinska (Slika 63). Spojevi **4** (*m/z* 407, AMK), **6** (*m/z* 391, AMK) i **20** (*m/z* 459, AMK) jednoznačno su identificirani kao katalpol, aukubin i asperulozid na temelju usporedbe njihovih vremena zadržavanja, UV i MS/MS spektara s onima standardnih tvari. Ion najvećeg relativnog intenziteta u masenim spektrima prvog reda (MS^1) ovih spojeva bio je adukt mravlje kiseline (AMK) s molekulskim ionom, čija prisutnost je potvrđena gubitkom 46 Da u MS^2. Glavni fragmenti katalpola i aukubina u MS^3 dobiveni su neutralnim gubitkom anhidroglukoze (-162 Da), koji je uobičajen kod većine iridoidnih glukozida (Li i sur., 2008; Zhou i sur., 2010). Iza njega je slijedio gubitak 30 Da u MS^4 katalpola, pripisan odvajanju CH_2O skupine, i gubitak 18 Da u MS^4 aukubina, pripisan odvajanju vode. Fragment najvećeg relativnog intenziteta u MS^3 asperulozida zabilježen je pri *m/z* 147 i pripisan je istovremenom gubitku anhidroglukoze, octene kiseline i ugljikovog dioksida, a zajedno s njim bio je prisutan i fragment pri *m/z* 191, pripisan gubitku anhidroglukoze i octene kiseline (Li i sur., 2008). Glavni ion u MS^4 bio je prisutan pri *m/z* 119, a dobiven je gubitkom ugljikovog monoksida. U skladu s rezultatima prethodne (kvantitativne) analize, prisutnost katalpola utvrđena je samo kod vrsta *G. alypum* i *G. punctata*. Ovaj spoj prethodno je izoliran iz većeg broja vrsta roda *Globularia*, uključujući vrste *G. alypum* (Chaudhuri i Sticher, 1981; Kirmizibekmez i sur., 2008), *G. aphyllanthes* (Kirmizibekmez i sur., 2009), *G. dumulosa* (Kirmizibekmez i sur., 2003a), *G. nana* (Chaudhuri i sur., 1981), *G. orientalis* (Çaliş i sur., 2002b), *G. salicina* (Fikenscher i sur., 1969), *G. sintenisii* (Kirmizibekmez i sur., 2004a), *G. trichosantha* (Çaliş i sur., 2001) i *G. vulgaris* (Taskova i sur., 2006). Asperulozid je zabilježen kao jedan od glavnih glukozida iridoida vrsta *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata*, dok je kod vrste *G. alypum* nađen samo u tragovima. Navedeni iridoid prethodno je izoliran iz vrsta *G. aphyllanthes* (Kirmizibekmez i sur., 2009), *G. cordifolia* (Chaudhuri i Sticher, 1980; Kirmizibekmez i sur., 2004b), *G. davisiana* (Çaliş i sur., 2002a), *G. meridionalis* (Tundis i sur., 2012b), *G. nana* (Chaudhuri i sur., 1981), *G. nudicaulis* (Chaudhuri i sur., 1981),

G. orientalis (Çaliş i sur., 2002b), *G. trichosantha* (Çaliş i sur., 2001) i *G. vulgaris* (Taskova i sur., 2006). U sve četiri istraživane vrste zabilježena je mala količina aukubina, koji je prethodno izoliran iz velikog broja vrsta, primjerice *G. aphyllanthes* (Kirmizibekmez i sur., 2009), *G. cordifolia* (Chaudhuri i Sticher, 1980; Kirmizibekmez i sur., 2003b), *G. dumulosa* (Kirmizibekmez i sur., 2003a), *G. nana* (Chaudhuri i sur., 1981), *G. nudicaulis* (Chaudhuri i sur., 1981), *G. orientalis* (Çaliş i sur., 2002b), *G. salicina* (Fikenscher i sur., 1969), *G. trichosantha* (Çaliş i sur., 2001) i *G. vulgaris* (Taskova i sur., 2006).

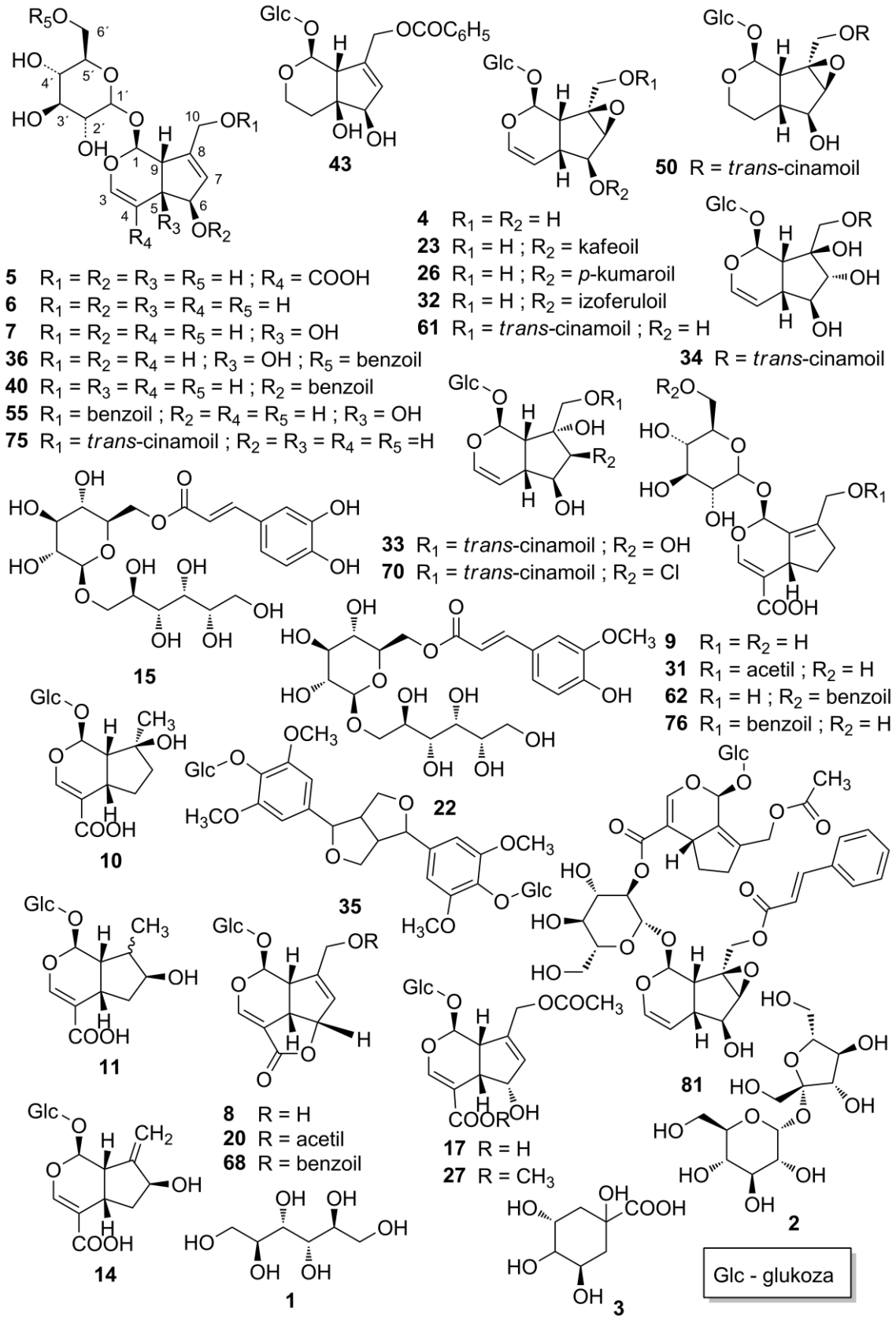
Prisutnost glavnog molekulskog iona i manjeg dimernog iona u MS^1 te gubitak 206 Da u MS^2, pripisan istovremenom odvajanju anhidroglukoze i ugljikovog dioksida, uočeni su kod spoja **5** (*m/z* 389), zabilježenog kod vrste *G. punctata*. Daljnje MS^3 i MS^4 fragmentacije bile su usporedive s onima aukubina. U usporedbi s fragmentima zabilježenim u literaturi (Hong i sur., 2010), spoj **5** okvirno je identificiran kao skandozid. Prisutnost ovog spoja prethodno je zabilježena kod vrsta *G. aphyllanthes* (Kirmizibekmez i sur., 2009) i *G. trichosantha* (Çaliş i sur., 2001). Vrijednosti glavnih fragmenata u MS^3 kod spoja **7** (*m/z* 407, AMK), koji je bio prisutan pri istom vremenu zadržavanja kao i aukubin, iznosile su *m/z* 179 [M-H-aglikon]$^-$ i 199 [M-H-anhidroglukoza]$^-$. Uz njih su uočeni i dodatni fragmenti manjeg intenziteta pri *m/z* 143 [M-H-aglikon-$2H_2O$]$^-$, 155 [M-H-anhidroglukoza-CO_2]$^-$ i 181 [M-H- anhidroglukoza-H_2O]$^-$. MS^4 produktnog iona pri *m/z* 179 odgovarao je fragmentacijskom obrascu heksoza (Verardo i sur., 2009), dok je MS^4 aglikona (*m/z* 199) ukazivao na daljnji gubitak 44 Da i 18 Da, koji su pripisani odvajanju C_2H_4O i H_2O (Hong i sur., 2010). Spoj **7** okvirno je identificiran kao monomelitozid, 5-hidroksilirani derivat aukubina, koji je prethodno izoliran iz vrste *G. cordifolia* (Chaudhuri i Sticher, 1980; Kirmizibekmez i sur., 2003b).

Spojevi **8** (*m/z* 417, AMK), **17** (*m/z* 431) i **27** (*m/z* 491, AMK) bili su prisutni kod vrsta *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata*. U MS^3 spoja **8** uočen je gubitak 206 Da [M-H-anhidroglukoza-CO_2]$^-$, iza kojeg je slijedio gubitak 30 Da u MS^4 [M-H-anhidroglukoza-CO_2-CH_2O]$^-$. U MS^1 spoja **17**, molekulski ion bio je prisutan kao ion najvećeg relativnog intenziteta, dok je uz njega uočen dimerni ion manjeg intenziteta [2M-H]$^-$, kao što je bilo uočeno i na primjeru skandozida. Glavni ion u MS^2 (*m/z* 251) spoja **17** dobiven je odvajanjem glukoze (-180 Da), dok se glavni ion u MS^3 (*m/z* 147) može pripisati daljnjem istovremenom gubitku octene kiseline (-60 Da) i ugljikovog dioksida (-44 Da). Primijećeno je da su MS/MS fragmentacijski putevi i UV spektri ovih spojeva bili slični onima asperulozida, koji je kod vrsta *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* bio prisutan u većoj količini. Iz ovog razloga, prethodno navedeni spojevi okvirno su

identificirani kao derivati asperulozida, deacetilasperulozid (**8**) i asperulozidinska kiselina (**17**). Mala količina deacetilasperulozida bila je primijećena i u referentnom standardu asperulozida. Prisutnost oba spoja u vrstama roda *Globularia* prethodno je zabilježena (Çaliş i sur., 2001; Kirmizibekmez i sur., 2009). Uz molekulski ion (*m/z* 445), koji je bio prisutan kao glavni fragment u MS^2 spoja **27**, primijećeni su i sljedeći fragmenti: *m/z* 241 [M-H-anhidroglukoza-anhidrooctena kiselina]$^-$, 283 [M-H-anhidroglukoza]$^-$ i 385 [M-H-octena kiselina]$^-$. Ovaj spoj identificiran je u usporedbi s drugim spojevima nađenim u vrstama *G. cordifolia, G. meridionalis* i *G. punctata* kao metilni ester asperulozidinske kiseline (dafilozid), koji je prethodno izoliran iz vrste *G. aphyllanthes* (Kirmizibekmez i sur., 2009). Spojevi **9**, **14** i **31** bili su prisutni u svim istraživanim vrstama. Sva tri spoja bila su zastupljena molekulskim ionima i aduktima mravlje kiseline relativno velikog intenziteta, koje su u MS^1 pratili manji pikovi dimernih iona, te su dala slične UV spektre. Spoj **31** (*m/z* 415, relativnog intenziteta 82; *m/z* 461, AMK relativnog intenziteta 100) bio je prisutan u relativno većoj količini u usporedbi s druga dva spoja. U MS^3, iz njegovog molekulskog iona (*m/z* 415) dobiven je glavni ion pri *m/z* 355, koji je pripisan gubitku octene kiseline (-60 Da). Dodatni ioni u MS^3, primijećeni pri *m/z* 149 [M-H-anhidroglukoza-octena kiselina-CO_2]$^-$ i 191 [M-H-glukoza-CO_2]$^-$, upućivali su na moguću prisutnost karboksilne skupine. Ovaj spoj okvirno je identificiran kao alpinozid, neobični iridoid koji sadrži dvostruku vezu *C*-8-*C*-9, a koji je prethodno izoliran iz mnogih vrsta roda *Globularia*, uključujući vrste *G. alypum* (Kirmizibekmez i sur., 2008), *G. aphyllanthes* (Kirmizibekmez i sur., 2009) i *G. cordifolia* (Kirmizibekmez i sur., 2003b). Spoj **9** (*m/z* 373, relativnog intenziteta 100; *m/z* 419, AMK relativnog intenziteta 72) dao je u MS^2 glavni fragment pri *m/z* 211 [M-H-anhidroglukoza]$^-$, kojeg su pratila dva uzastopna gubitka od 44 Da kojima su nastali fragmenti [M-H-anhidroglukoza-CO_2]$^-$ u MS^3 i [M-H-anhidroglukoza-$C_3H_4O_3$]$^-$ u MS^4 (Hong i sur., 2010). Opaženi MS/MS fragmentacijski obrazac bio je sličan fragmentacijskom obrascu standarda genipozidinske kiseline opisanom u literaturi (Hong i sur., 2010). Ipak, usporedbom molekulske mase spoja **9** s masom spojeva koji su bili prethodno izolirani iz vrsta roda *Globularia*, nađena su tri moguća identiteta: deacetilalpinozid, gardozid i genipozidinska kiselina (Çaliş i sur., 2001; Kirmizibekmez i sur., 2003a; Taskova i sur., 2006). Gubitak 162 Da (anhidroglukoza) u MS^2 ukazivao je na prisutnost hidroksilne skupine vezane na položaju *C*-8/*C*-10 (Zhou i sur., 2010) zbog čega je gardozid odbačen kao moguće riješenje. Deacetilalpinozid je strukturni izomer genipozidinske kiseline koji umjesto uobičajene dvostruke veze *C*-7-*C*-8 sadrži dvostruku vezu *C*-8-*C*-9. U ovom je istraživanju uočeno da spojevi koji u položaju *C*-4 imaju karboksilnu skupinu ne stvaraju AMK u MS^1

kada je dvostruka veza prisutna između *C*-7 i *C*-8 (spojevi **5** i **17**). Suprotno tome, kod spojeva koji nemaju ovu karakteristiku, poput alpinozida, primijećena je istovremena prisutnost molekulskog iona i AMK relativno veće zastupljenosti. Temeljeno na ovim opažanjima, spoj **9** okvirno je identificiran kao deacetilalpinozid, razgradni produkt alpinozida. Navedeni spoj prethodno je izoliran iz vrsta *G. dumulosa* (Kirmizibekmez i sur., 2003a) i *G. trichosantha* (Çaliş i sur., 2001). Spoj **14** (*m/z* 373, relativnog intenziteta 53; *m/z* 419, AMK relativnog intenziteta 100) karakterizirao je gubitak glukoze u MS^3 (*m/z* 193), kojeg je pratila dekarboksilacija u MS^4 (*m/z* 149). Neutralni gubitak od 180 Da uočen u MS^3 ukazivao je na odsutnost hidroksilne skupine u položaju *C*-8/*C*-10, koja je bila prisutna u većini identificiranih iridoida, a koja bi omogućila stvaranje vodikove veze s kisikom u položaju *C*-1. U usporedbi s literaturnim podacima ovaj spoj je okvirno identificiran kao gardozid (Zhou i sur., 2010), iridoid prethodno izoliran iz vrste *G. vulgaris* (Taskova i sur., 2006). Spojevi **10** i **11**, nađeni u sve četiri istraživane vrste, bili su također karakterizirani molekulskim ionom (*m/z* 375) i AMK relativno velike zastupljenosti (*m/z* 421). Oni su okvirno identificirani kao musaenozidinska kiselina i (*epi*)loganinska kiselina, kao u istraživanju provedenom na vrsti *G. alypum* (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014b). Sličnost u vremenima zadržavanja (*epi*)loganinske kiseline i gardozida bila je u skladu s njihovim sličnim strukturama (Slika 63).

Spojevi **23** (*m/z* 523), **26** (*m/z* 507) i **32** (*m/z* 537) bili su karakteristični za vrstu *G. alypum*. Kod sva tri spoja uočen je gubitak 344 Da u MS^2 $[M\text{-}H\text{-anhidroglukoza-}182]^-$. Dobiveni fragmenti za spojeve **23** i **26** pripisani su kavenoj kiselini (*m/z* 179) i *p*-kumarinskoj kiselini (*m/z* 163) na temelju usporedbe njihovih MS/MS fragmentacijskih obrazaca i UV spektara s onima poredbenih tvari. Spoj **32** dao je glavni ion pri *m/z* 193 u MS^2, od kojih su naknadno nastali fragmentni ioni pri *m/z* 134 $[M\text{-}H\text{-anhidroglukoza-}182\text{-}CO_2\text{-}CH_3]^-$ (glavni ion), 149 $[M\text{-}H\text{-anhidroglukoza-}182\text{-}CO_2]^-$ i 178 $[M\text{-}H\text{-anhidroglukoza-}182\text{-}CH_3]^-$ u MS^3. Isti fragmenti dobiveni su u MS^2 standarda ferulinske kiseline, ali s glavnim fragmentom prisutnim pri *m/z* 149. Spojevi iste molekulske mase i usporedivog redoslijeda izlaženja s kolone primijećeni su u nedavnom istraživanju metanolnih ekstrakata listova vrste *G. alypum*, a koji su okvirno identificirani kao 6-*O*-esteri katalpola, točnije verminozid, spekiozid i minekozid (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014b). Isti identitet pripisan je spojevima sličnih obrazaca MS/MS fragmentacije, koji su zajedno s katalpolom, aukubinom i skandozidom nađeni kod vrste *Veronica linariifolia* Pall. ex Link (Hong i sur., 2010), koja pripada istoj porodici kao i vrste roda *Globularia* (Plantaginaceae).



Slika 63. Strukture iridoida i nekih polarnih spojeva identificiranih u metanolnim ekstraktima nadzemnih dijelova vrsta roda *Globularia* dobivenim dekokcijom (brojevi odgovaraju spojevima koji su navedeni u Tablici XXVI)

Spojevi **33** (*m/z* 555, AMK), **34** (*m/z* 555, AMK), **50** (*m/z* 539, AMK), **61** (*m/z* 537, AMK) i **70** (*m/z* 573, AMK) bili su prisutni samo u vrstama *G. alypum* i *G. punctata*. S obzirom na obrasce MS/MS fragmentacije iridoida prethodno izoliranih iz vrste *G. alypum* (Es-Safi i sur., 2006; Es-Safi i sur., 2007b) i redoslijed njihovog izlaženja s kolone pri analitičkim uvjetima (Es-Safi i sur., 2007c) usporedivim s onima koji su korišteni u ovom istraživanju, ovi su spojevi identificirani redom kao globularinin, globularimin, globularidin, globularin i globulariozid. Svi navedeni spojevi su 10-*O*-cinamoilni esteri katalpola ili njegovih derivata, što podupiru njihovi UV spektri, koji su u skladu s UV spektrom standarda cimetne kiseline. Globularin (10-*O*-*trans*-cinamoilkatalpol) uočen je kao dominantni spoj u ekstraktu vrste *G. alypum*, kao što je i prethodno zabilježeno (Chaudhuri i Sticher, 1981; Es-Safi i sur., 2007c). Globularinin i globularimin su izomeri, vjerojatno nastali hidrolizom epoksidnog prstena globularina, dok je globularidin derivat globularina sa zasićenom vezom *C*3-*C*4. Globulariozid je spoj strukturno sličan globularininu, koji u položaju *C*-7 umjesto hidroksilne skupine sadrži atom klora (Slika 63). Prisutnost atoma klora u globulariozidu podupire i maseni spektar prvog reda kod kojeg su prisutni pikovi razmaknuti za 2 *m/z* vrijednosti, a s omjerom relativne zastupljenosti 3:1 (Es-Safi i sur., 2007b). Globularin je dosad zabilježen u većem broju vrsta roda *Globularia* (Fikenscher i sur., 1969; Chaudhuri i sur., 1981; Çaliş i sur., 2002a; Çaliş i sur., 2002b; Kirmizibekmez i sur., 2004; Taskova i sur., 2006; Kirmizibekmez i sur., 2008), a globularidin samo kod vrsta *G. alypum* (Kirmizibekmez i sur., 2008) i *G. trichosantha* (Çaliş i sur., 2001). S druge strane, ovo je prvi podatak o prisustvu globularinina, globularimina i globulariozida kod neke druge vrste roda *Globularia* osim vrste *G. alypum*. Ipak, valja spomenuti da je strukturni izomer globulariozida, baldakiozid, prethodno izoliran iz vrste *G. aphyllanthes* (Kirmizibekmez i sur., 2009).

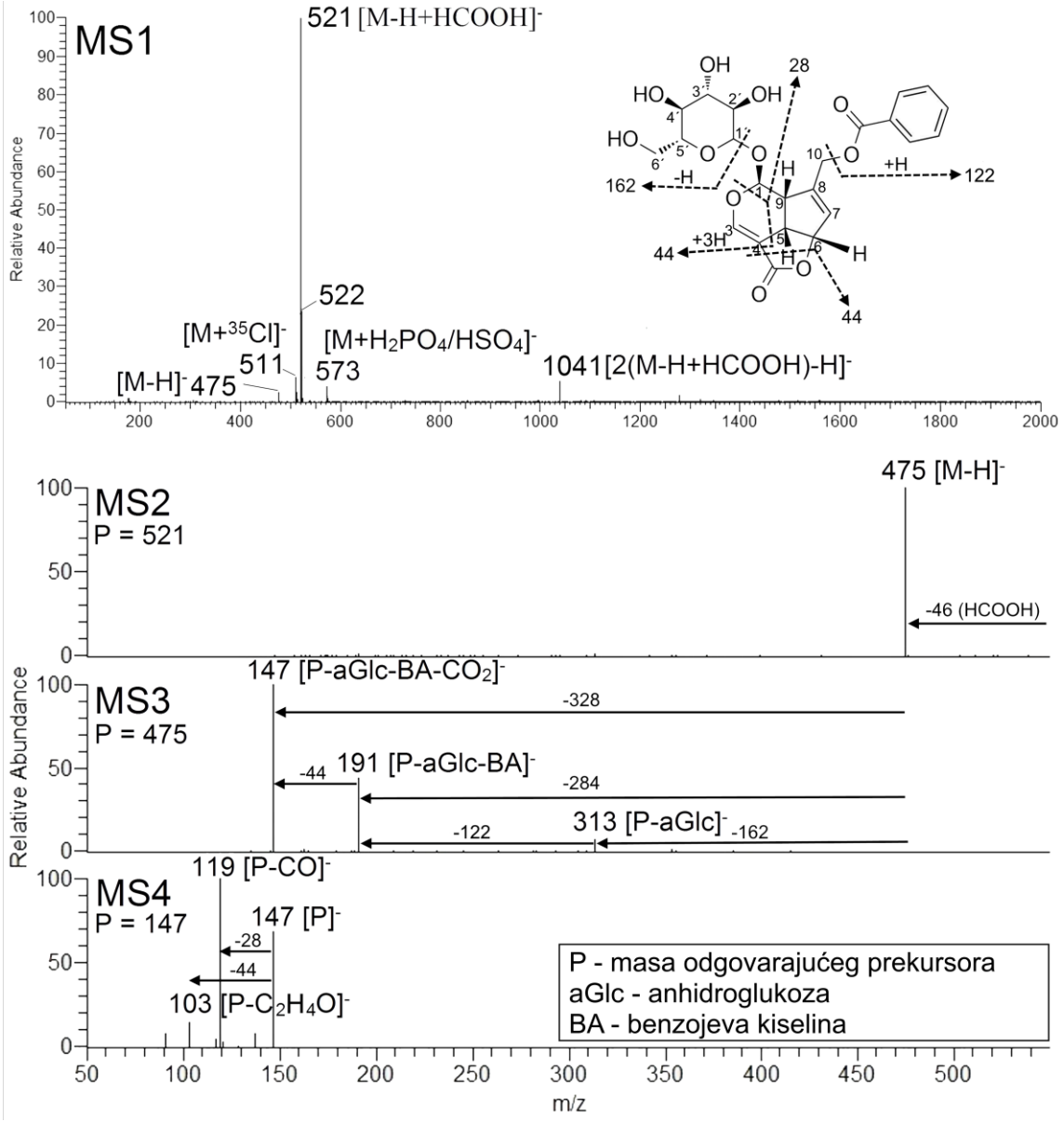
Spojevi **36** (*m/z* 511, AMK), **40** (*m/z* 495, AMK), **43** (*m/z* 513, AMK), **55** (*m/z* 511, AMK) i **62** (*m/z* 523, AMK) nađeni su samo kod vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*. UV spektri svih spojeva bili su usporedivi sa spektrom referentnog standarda benzojeve kiseline. Spojeve **43** i **55** karakterizirao je glavni ion pri *m/z* 179 $[Glc\text{-}H]^-$ u MS^3 te MS^4 usporediv s onim spoja **7** (monomelitozida). Spoj **55** (*m/z* 511) identificiran je kao globularifolin (10-*O*-benzoilmonomelitozid) u skladu s prethodnim istraživanjima u kojima je navedeni bio izoliran kao glavni spoj vrsta *G. cordifolia* (Kirmizibekmez i sur., 2003b) i *G. meridionalis* (Tundis i sur., 2012b). Razlika između vremena zadržavanja spoja **43** (*m/z* 513) i globularifolina (*m/z* 511) bila je usporediva s razlikom između vremena zadržavanja globularidina (3,4-dihidroglobularina) (spoj **50**, *m/z* 539) i globularina (spoj **61**, *m/z* 537). Spoj **43** (*m/z* 513) okvirno je identificiran kao 5-hidroksidaviziozid

(3,4-dihidroglobularifolin), koji je prethodno izoliran iz vrste *G. cordifolia* (Kirmizibekmez i sur., 2003b). Gubitak 122 Da uočen u MS^3 spojeva **36**, **40** i **62**, pripisan je benzojevoj kiselini. Spoj **36** okvirno je identificiran kao 5-hidroksidumulozid (6-*O*-benzoilmonomelitozid) na temelju njegove MS/MS fragmentacije. Pretpostavljeno je da je gubitak 230 Da u MS^4 bio rezultat pucanja prstena molekule iridoida kojim dolazi do nastanka $^{1,7}X^-$ produktnog iona (Es-Safi i sur., 2007b). Jednaki raspad primijećen je u MS^3 skandozida te MS^4 aukubina (-86 Da) i globularimina (-248 Da). Srodni spoj pod nazivom dumulozid (6-*O*-benzoilaukubin), prethodno je izoliran iz vrste *G. dumulosa*, zajedno s daviziozidom (3,4-dihidromelampirozidom) i melampirozidom (Kirmizibekmez i sur., 2003a). Uz manji fragment uočen u MS^3 pri *m/z* 327, koji je ukazivao na prisutnost benzojeve kiseline, glavni fragment dobiven za spoj **40** bio je prisutan pri *m/z* 431 (-18 Da). UV spektar odgovarao je onima standarada benzojeve kiseline i aukubina. Prethodno je u vrstama roda *Globularia* identificiran 10-*O*-benzoilaukubin (melampirozid) (Çaliş i sur., 2002a; Kirmizibekmez i sur., 2003a; Kirmizibekmez i sur., 2003b; Tundis i sur., 2012b). Vrijeme zadržavanja ovog spoja (20,1 min) bilo je nešto niže od očekivanog za melampirozid, s obzirom na vrijeme zadržavanja 5-hidroksiliranog derivata melampirozida, globularifolina (23,5 min). S druge strane, usporedba sa 6-*O*-aciliranim derivatima katalpola omogućila je njegovu okvirnu identifikaciju kao 6-*O*-benzoilaukubina.

Maseni spektar prvog reda spoja **62** dao je dva iona relativno visoke zastupljenosti, molekulski ion pri *m/z* 477 (83) i adukt mravlje kiseline pri *m/z* 523 (100). Osim gubitka 122 Da, kojim je dobiven glavni ion pri *m/z* 355 u MS^3, molekulski ion dao je ione pri *m/z* 167 i 211, koji su uočeni i u MS/MS spoja **9**. Gubitak 266 Da, kojime je nastao ion pri *m/z* 211, ukazivao je na to da je benzoilni ostatak vezan na glukozu [M-H-benzoilanhidroglukoza]$^-$. Pretpostavljeno je da je ion pri *m/z* 167 rezultat daljnje dekarboksilacije [M-H-benzoilanhidroglukoza-CO_2]$^-$. Ovaj spoj okvirno je identificiran kao 6'-*O*-benzoildeacetilalpinozid.

Spoj **68** (*m/z* 521, AMK) bio je prisutan kod vrste *G. punctata* u velikoj količini. Njegov UV spektar bio je usporediv s UV spektrima estera benzojeve kiseline, dok je MS/MS fragmentacijski obrazac nalikovao obrascu asperulozida. Glavni fragmenti u MS^3 i MS^4 bili su prisutni pri *m/z* 147 [M-H-anhidroglukoza-benzojeva kiselina-CO_2]$^-$ i 119 [M-H-anhidroglukoza-benzojeva kiselina-CO_2-CO]$^-$ (Slika 64), isto kao kod asperulozida. Na temelju ovih opažanja, spoj **68** okvirno je identificiran kao besperulozid, iridoid prethodno izoliran iz vrsta *G. aphyllanthes* (Kirmizibekmez i sur., 2009) i *G. vulgaris* (Taskova i sur., 2006). Spoj **75**, uočen kod vrste *G. alypum*, dao je u MS^1 glavni ion pri *m/z* 521 (AMK), kao i

besperulozid, ali njegovi UV i MS/MS spektri ukazivali su na prisutnost cimetne kiseline u strukturi. S obzirom na usporedbu načina fragmentacije i vremena zadržavanja s onima drugih aciliranih (10-*O*-*trans*-cinamoilkatalpol (**61**)) i neaciliranih iridoida (katalpol (**4**), aukubin (**6**)) uočenih kod vrste *G. alypum*, ovaj spoj okvirno je identificiran kao litantosalin (10-*O*-*trans*-cinamoilaukubin). Navedeni spoj prethodno je izoliran iz nekoliko vrsta roda *Globularia*, uključujući vrste *G. alypum* (Kirmizibekmez i sur., 2008), *G. davisiana* (Çaliş i sur., 2002a), *G. nana* (Chaudhuri i sur., 1981), *G. salicina* (Fikenscher i sur., 1969) i *G. sintenisii* (Kirmizibekmez i sur., 2004a).



Slika 64. MS^1-MS^4 fragmentacijska shema spoja **68**, besperulozida, pri negativnom načinu rada

Kod spoja **76** bila su u MS^1, slično kao kod spoja **9**, prisutna dva iona visokog intenziteta, molekulski ion (*m/z* 477, relativnog intenziteta 100) i adukt mravlje kiseline (*m/z* 523, relativnog intenziteta 73). MS^2 ukazivao je na gubitak benzojeve kiseline (*m/z* 355), za kojim je slijedio gubitak glukoze (*m/z* 175) i daljnja dekarboksilacija (*m/z* 131). S obzirom na usporedbu vremena izlazaka iz kolone drugih slobodnih (aukubin (**6**), monomelitozid (**7**), deacetilasperulozid (**8**), deacetilalpinozid (**9**)) i benzoiliranih iridoida (6'-*O*-benzoilmonomelitozid (**36**), 6-*O*-benzoilaukubin (**40**), globularifolin = 10-*O*-benzoilmonomelitozid (**55**), 6'-*O*-benzoildeacetilalpinozid (**62**), besperulozid = 10-*O*-benzoildeacetilasperulozid (**68**)), spoj **76** okvirno je identificiran kao 10-*O*-benzoildeacetilalpinozid.

Uz glukozide iridoida, tri sastavnice (**71**, **77** i **81**), nađene samo u ekstraktu vrste *G. alypum*, okvirno su identificirane kao glikozidi bisiridoida. Identifikacija je temeljena na njihovim MS/MS fragmentacijskim obrascima i usporedbi sa srodnim spojevima koji su ranije otkriveni u vrstama roda *Globularia*. Spoj **81** (*m/z* 935, AMK) prvi je okvirno identificiran kao globulozid A, ester alpinozida i globularina, glavnih iridoida vrste *G. alypum*. UV spektar ukazivao je na prisutnost ostatka cimetne kiseline u strukturi, dok je u MS^2 otkriveno da navedeni spoj stvara adukte s mravljom kiselinom, s obzirom na glavni produktni ion pri *m/z* 889 $[M-H]^-$. Ovakvu identifikaciju podupirali su i dodatni fragmenti u MS^2 prisutni pri *m/z* 337 [M-H-globularin-octena kiselina]$^-$, 537 [M-H-anhidroglukoza-anhidrooctena kiselina-cimetna kiselina]$^-$, 561 [M-H-glukoza-cimetna kiselina]$^-$, 667 [M-H-anhidroglukoza-octena kiselina]$^-$, 709 [M-H-glukoza]$^-$, 727 [M-H-anhidroglukoza]$^-$ i 829 [M-H-octena kiselina]$^-$. Glavni produktni ion u MS^3 bio je prisutan pri *m/z* 397 [M-H-globularin]$^-$. U MS^3, uz prethodno opažene ione pri *m/z* 337, 537, 667 i 829, dodatni pikovi koji podupiru predloženu identifikaciju bili su prisutni pri *m/z* 319 [M-H-globularin-octena kiselina-H_2O]$^-$, 415 [M-H-anhidroglobularin]$^-$, 519 [M-H-anhidroglukoza-octena kiselina-cimetna kiselina]$^-$ i 742 [M-H-cimetna kiselina]$^-$. Iz vrsta roda *Globularia* do sada su izolirana tri bisiridoida, globulozid A (alpinozid-globularin dimer), globulozid B (deacetilalpinozid-melampirozid dimer) (Çaliş i sur., 2001; Kirmizibekmez i sur., 2003b; Tundis i sur., 2012b) i globulozid C (deacetilalpinozid-aukubin dimer) (Kirmizibekmez i sur., 2003b). Moguće je primijetiti da svi ovi spojevi sadrže neuobičajenu dvostruku vezu *C*-8–*C*-9 u jednom od dva iridoida.

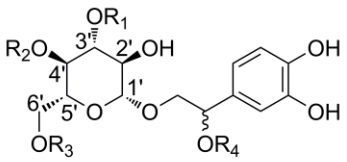
Spoj **71** (*m/z* 893, AMK) dao je UV spektar sličan onom cimetne kiseline. U MS^3 uočen je gubitak 492 Da [M-H-globularin]$^-$ iz molekulskog iona koji je bio prekursorski ion kao glavni fragment u MS^2 (*m/z* 847). Prisutnost cimetne kiseline potvrđena je fragmentom

pri *m/z* 699 (-148 Da) u MS^3. Na temelju usporedbe kromatografskih i spektralnih podataka spojeva koji su dokazani u okviru ovog istraživanja zajedno s literaturnim podacima prema kojima su kod vrsta roda *Globularia* do sada nađeni samo bisiridoidi koji u svojoj strukturi sadrže iridoid s nezasićenom vezom između atoma *C*-8 i *C*-9 (Çaliş i sur., 2001; Kirmizibekmez i sur., 2003b; Tundis i sur., 2012b), spoj **71** okvirno je identificiran kao dimer deacetilalpinozida i globularina, moguće deacetilirani globulozid A (spoj **81**). Spoj **77** (*m/z* 813) okvirno je identificiran kao alpinozid-alpinozid dimer na temelju njegovog UV spektra koji je bio sličan onom alpinozida, kao i na temelju načina MS/MS fragmentacije sa sljedećim ionima zabilježenim u MS^2: *m/z* 337 [M-H-alpinozid-octena kiselina]$^-$, 355 [M-H-anhidroalpinozid-octena kiselina]$^-$, 397 [M-H-alpinozid]$^-$, 415 [M-H-anhidroalpinozid]$^-$, 485 [M-H-glukoza-CO-2CH_3COOH]$^-$, 549 [M-H-anhidroglukoza-octena kiselina-anhidrooctena kiselina]$^-$, 573 [M-H-glukoza-octena kiselina]$^-$, 591 [M-H-anhidroglukoza-octena kiselina]$^-$, 693 [M-H-2CH_3COOH]$^-$, 753 [M-H-octena kiselina]$^-$ i 771 [M-H-anhidrooctena kiselina]$^-$. Najzastupljeniji ion prisutan pri *m/z* 415 dao je MS^3 usporediv s onime alpinozida (spoj **31**). Ovakva vrsta bisiridoida zabilježena je u nekoj od vrsta roda *Globularia* po prvi puta.

Feniletanoidi

Spojevi iz skupine feniletanoida najvećim su dijelom bili derivati kavene kiseline (Slika 65) s apsorpcijskim maksimumima oko 220 i 330 nm te za razliku od većine iridoida i bisiridoida, nisu stvarali adukte s mravljom kiselinom u MS^1. Glavni ion u MS^1 uvijek je bio molekulski ion [M-H]$^-$. Spoj **45** (*m/z* 623), koji je zabilježen kao glavni spoj u sve četiri istraživane vrste glavulja, i spoj **52** (*m/z* 623), također prisutan u sve četiri vrste, jednoznačno su identificirani kao verbaskozid (akteozid) i izoverbaskozid (izoakteozid) na temelju usporedbe sa standardnim spojevima. Izoverbaskozid je kao strukturni izomer verbaskozida kod kojeg je kavena kiselina vezana na glukozu u položaju *C*-6 umjesto u položaju *C*-4, u skladu s ranije zabilježenim opažanjima (Es-Safi i sur., 2007c), imao duže vrijeme zadržavanja od verbaskozida, dok su spektralne karakteristike navedenih izomera bile jednake. Glavni fragmenti u MS^2 (*m/z* 461), MS^3 (*m/z* 315) i MS^4 (*m/z* 135), pripisani su gubitku anhidrokavene kiseline (-162 Da), anhidroramnozilne skupine (-146 Da) i glukoze (-180 Da). Verbaskozid je prethodno izoliran iz velikog broja vrsta roda *Globularia*, uključujući vrste *G. alypum* (Kirmizibekmez i sur., 2008), *G. cordifolia* (Kirmizibekmez i sur., 2004b), *G. meridionalis* (Tundis i sur., 2012a) i *G. aphyllanthes* (Kirmizibekmez i sur., 2009). Izoverbaskozid je nađen kod vrsta *G. alypum* (Es-Safi i sur., 2005c), *G. cordifolia*

(Kirmizibekmez i sur., 2004b) i *G. meridionalis* (Tundis i sur., 2012a). Spoj **58** (*m/z* 623) bio je prisutan kod sve četiri istraživane vrste, a imao je usporediv UV spektar i obrazac MS/MS fragmentacije kao prethodna dva spoja. Iako je prisutnost dodatnog strukturnog izomera verbaskozida, forzitiazida, kod kojeg je ramnoza vezana na glukozu u položaju *C*-6, umjesto u položaju *C*-3, ranije zabilježena kod vrste *G. alypum* (Es-Safi i sur., 2005c), redoslijed izlaska ovog spoja s kolone nije odgovarao ranije zabilježenom (Es-Safi i sur., 2007c) te je on okvirno identificiran samo kao izomer verbaskozida. U sve četiri vrste bila je također prisutna i mala količina spoja **12** (*m/z* 461), koji je zbog MS/MS fragmentacije, koja je bila usporediva s onom verbaskozida, okvirno identificiran kao njegov mogući razgradni produkt dekafeoilverbaskozid, prethodno zabilježen kod vrsta *G. alypum* (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a) i *G. dumulosa* (Kirmizibekmez i sur., 2003a). Spoj **29** (*m/z* 639) okvirno je identificiran kao β-OH-verbaskozid na temelju usporedbe njegove MS/MS fragmentacije s literaturnim podacima (Innocenti i sur., 2006).



12 R_1 = ramnozil ; R_2 = R_3 = R_4 = H
29 R_1 = ramnozil ; R_2 = kafeoil ; R_3 = H ; R_4 = OH
38 R_1 = R_3 = R_4 = H ; R_2 = kafeoil
42 R_1 = R_2 = R_4 = H ; R_3 = kafeoil
44 R_1 = glukozil-(1-4)-ramnozil ; R_2 = kafeoil ; R_3 = R_4 = H
45 R_1 = ramnozil ; R_2 = kafeoil ; R_3 = R_4 = H
49 R_1 = ksilozil-(1-4)-ramnozil ; R_2 = kafeoil ; R_3 = ksilozil ; R_4 = H
51 R_1 = glukozil-(1-4)-ramnozil ; R_2 = R_4 = H ; R_3 = kafeoil
52 R_1 = ramnozil ; R_2 = R_4 = H ; R_3 = kafeoil
54 R_1 = ksilozil-(1-4)-ramnozil ; R_2 = kafeoil ; R_3 = R_4 = H
59 R_1 = R_2 = R_4 = H ; R_3 = *p*-kumaroil
60 R_1 = glukozil-(1-4)-ramnozil ; R_2 = *p*-kumaroil ; R_3 = R_4 = H
63 R_1 = ramnozil ; R_2 = kafeoil ; R_3 = ksilozil ; R_4 = H
64 R_1 = ramnozil ; R_2 = feruloil ; R_3 = R_4 = H
66 R_1 = ramnozil ; R_2 = R_4 = H ; R_3 = feruloil
72 R_1 = 6''''-*O*-kafeoil-glukozil-(1-4)-ramnozil ; R_2 = kafeoil ; R_3 = R_4 = H
78 R_1 = 6''''-*O*-feruloil-glukozil-(1-4)-ramnozil ; R_2 = kafeoil ; R_3 = R_4 = H
79 R_1 = ramnozil ; R_2 = R_3 = kafeoil ; R_4 = H
82 R_1 = ramnozil ; R_2 = kafeoil ; R_3 = feruloil ; R_4 = H

Slika 65. Strukture feniletanoida identificiranih u metanolnim ekstraktima nadzemnih dijelova vrsta roda *Globularia* dobivenim dekokcijom (brojevi odgovaraju spojevima koji su navedeni u Tablici XXVI)

Spojevi **38** i **42** (*m/z* 477) dali su u masenim spektrima drugog reda fragmente pri *m/z* 161, 179 i 315, koji su pripisani anhidrokavenoj i kavenoj kiselini te hidroksitirozol

glukozidu. Fragment prisutan pri *m/z* 161 izgubio je još 28 Da u MS^3. Na temelju sličnog obrasca MS/MS fragmentacije i usporedbe vremena zadržavanja s onima verbaskozida i izoverbaskozida, ovi spojevi identificirani su kao kalceolariozid A (desramnozil verbaskozid) i kalceolariozid B (desramnozil izoverbaskozid). Smanjeno cijepanje kavene kiseline (*m/z* 179) kod kalceolariozida B, moglo bi se objasniti stvaranjem vodikove veze između njezine fenolne hidroksilne skupine i fenolne hidroksilne skupine hidroksitirozola vezanog u položaju *C*-1 glukoze, a čije stvaranje je omogućeno smještajem kavene kiseline u položaju *C*-6 glukoze. Prisutnost ovih spojeva kod vrste *G. alypum* bila je i prethodno zabilježena (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a), dok je dosad izoliran samo obilnije prisutan kalceolariozid A (Kirmizibekmez i sur., 2008).

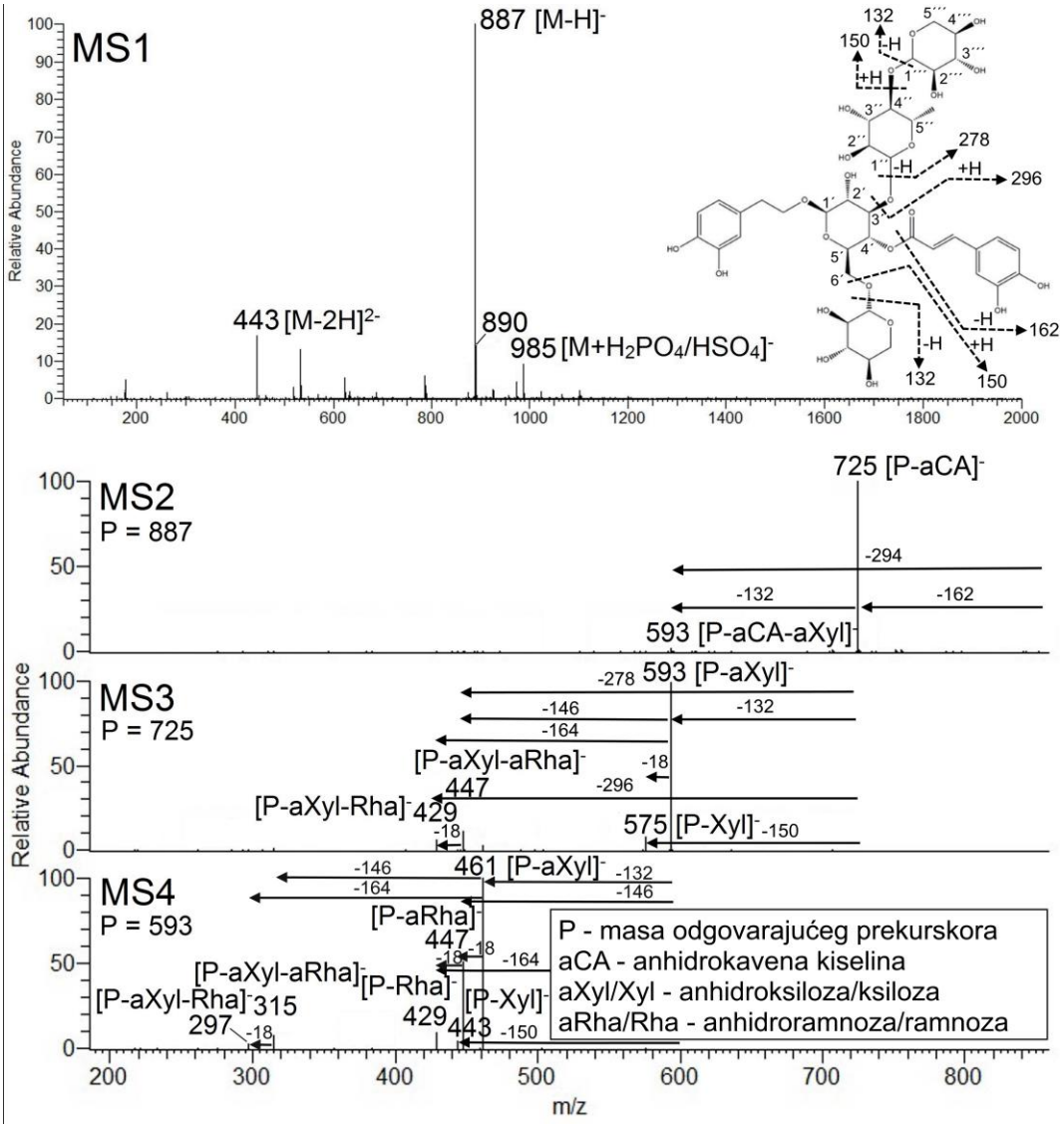
Spoj **44** (*m/z* 785), prisutan u sve četiri vrste, izgubio je u MS^2 162 Da. Ovaj gubitak je pripisan odvajanju anhidrokavene kiseline, a pratio ga je gubitak dodatna 162 Da (anhidroglukoza) u MS^3 koji je rezultirao nastankom glavnog iona pri *m/z* 461, koji je bio popraćen fragmentima pri *m/z* 315 (gubitak anhidroramnozilglukoze) i 443 (gubitak glukoze). MS^4 je bio usporediv s onima verbaskozida i ostalih feniletanoida. Ovaj spoj okvirno je identificiran kao rozikazid A, derivat verbaskozida koji u položaju *C*-4 ramnoze ima vezanu glukozu. Rozikazid A prethodno je izoliran iz nekoliko vrsta roda *Globularia* (*G. cordifolia* (Kirmizibekmez i sur., 2004b), *G. trichosantha* (Çaliş i sur., 1999) i *G. aphyllanthes* (Kirmizibekmez i sur., 2009)), a nedavno je zabilježen i kod vrste *G. alypum* (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a). Spojevi **46** i **51** (*m/z* 785) imali su usporedive UV spektre i pokazali sličan način MS/MS fragmentacije kao rozikazid A te su okvirno identificirani kao njegovi strukturni izomeri. Pri tome je kod spoja **51** kavena kiselina najvjerojatnije vezana u položaju *C*-6 s obzirom na njegovo usporedivo vrijeme zadržavanja (22,4 min) s vremenom zadržavanja izoverbaskozida (22,6 min). S druge strane, spoj **79** (*m/z* 785), koji je imao relativno duže vrijeme zadržavanja u usporedbi s prethodno spomenutim spojevima iste molekulske mase i kod kojeg su uočena dva uzastopna gubitka 162 Da u MS^2 i MS^3, nakon kojih je slijedila fragmentacija tipična za feniletanoide poput verbaskozida i izoverbaskozida, nađen samo kod vrste *G. alypum*, okvirno je identificiran kao 6′-*O*-kafeoilverbaskozid. Budući da je UV spektar ovog spoja ukazivao na prisutnost kavene kiseline u njegovoj strukturi, njegova identifikacija temeljila se na usporedbi s literaturnim podacima u kojima je zabilježena prisutnosti srodnih spojeva karakterističnih za vrstu *G. alypum* (Kirmizibekmez i sur., 2008; Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a), kao što su kalceolariozid A (desramnozil verbaskozid = 4′-*O*-kafeoil-1′-*O*-hidroksitirozilglukozid) i kalceolariozid B (desramnozil izoverbaskozid = 6′-*O*-kafeoil-1′-*O*-hidroksitirozilglukozid), odnosno galipumozid A

(6′-*O*-*p*-kumaroilverbaskozid) i galipumozid B (6′-*O*-feruloilverbaskozid). Nedavno istraživanje također je ukazalo na prisutnost 6′-*O*-kafeoilverbaskozida u listovima vrste *G. alypum* (Feriani i sur., 2017).

Spojevi **49** (*m/z* 887) i **54** (*m/z* 755) bili su karakteristični za vrstu *G. punctata*. Njihovi UV spektri bili su u skladu s onim standarda kavene kiseline. MS^2 spoja **49** rezultirao je gubitkom 162 Da (*m/z* 725), koji je pripisan odvajanju anhidrokavene kiseline (aCA). Daljnjom fragmentacijom u MS^3 dobiveni su ioni pri *m/z* 429 $[M-H-aCA-132-164]^-$, 447 $[M-H-aCA-132-146]^-$, 461 $[M-H-aCA-132-132]^-$, 575 $[M-H-aCA-150]^-$ i 593 $[M-H-aCA-132]^-$, pri čemu je posljednji bio najviše zastupljen. U MS^4, glavni ion dobiven u prethodnom fragmentacijskom koraku pocijepan je dalje na ione pri *m/z* 297 $[M-H-aCA-132-132-164]^-$, 315 $[M-H-aCA-132-132-146]^-$, 429, 447 i 461, pri čemu je posljednji navedeni bio najviše zastupljen (Slika 66). Usporedbom načina MS/MS fragmentacije s fragmentacijama drugih feniletanoida i feniletanoidima koji su prethodno izolirani iz vrsta roda *Globularia*, zaključeno je da bi dobiveni fragmentacijski obrazac spoja **49** mogao odgovarati predviđenoj fragmentaciji trihosantozida B, gdje su gubici 132/150 Da i 146/164 Da pripisani gubitku anhidroksiloze/ksiloze, odnosno anhidroramnoze/ramnoze. Trihosantozid B je derivat verbaskozida koji na sebi ima vezane dvije ksiloze, jednu na položaju *C*-4 ramnoze, a drugu na položaju *C*-6 središnje glukoze. Navedeni spoj ranije je izoliran iz vrste *G. trichosantha* (Çaliş i sur., 1999; Çaliş i sur., 2001). Spoj **54** (*m/z* 755) pokazao je usporediv obrazac fragmentacije, s gubitkom 162 Da u MS^2 (*m/z* 593), koji je pripisan anhidrokavenoj kiselini, zatim dominantnim gubitkom 132 Da u MS^3 (*m/z* 461), koji je pripisan ksilozi, i daljnjom fragmentacijom tipičnom za dekafeoilverbaskozid (Slika 67). Dodatni manji fragmenti uočeni u MS^3 bili su prisutni pri *m/z* 297 $[M-H-aCA-132-164]^-$, 315 $[M-H-aCA-132-146]^-$ i 443 $[M-H-aCA-150]^-$, a upućivali su na prisutnost ksilozilne skupine na ramnozi. Ovaj spoj okvirno je identificiran kao trihosantozid A, derivat trihosantozida B koji u položaju *C*-6 glukoze ne sadrži ksilozilnu skupinu, a prethodno je izoliran iz vrsta *G. trichosantha* (Çaliş i sur., 1999; Çaliş i sur., 2001) i *G. aphyllanthes* (Kirmizibekmez i sur., 2009).

Imajući na umu da su trihosantozid A (**54**) i rozikazid A (**44**) derivati verbaskozida koji na položaju *C*-4 ramnoze imaju vezanu dodatnu šećernu skupinu (ksilozu/glukozu), primijećena razlika između njihovih vremena zadržavanja u skladu je s očekivanjima s obzirom na moguću razliku u vremenima zadržavanja glukoze i ksiloze (Brúder i sur., 2008). Kod vrste *G. punctata* primijećen je i dodatni spoj iste *m/z* vrijednosti (755) kao i trihosantozid A (**63**). Glavni ion nastao u MS^2 (*m/z* 593), pripisan je gubitku anhidrokavene kiseline, a pratio ga je ion manjeg intenziteta pri *m/z* 609 $[M-H-anhidroramnoza]^-$.

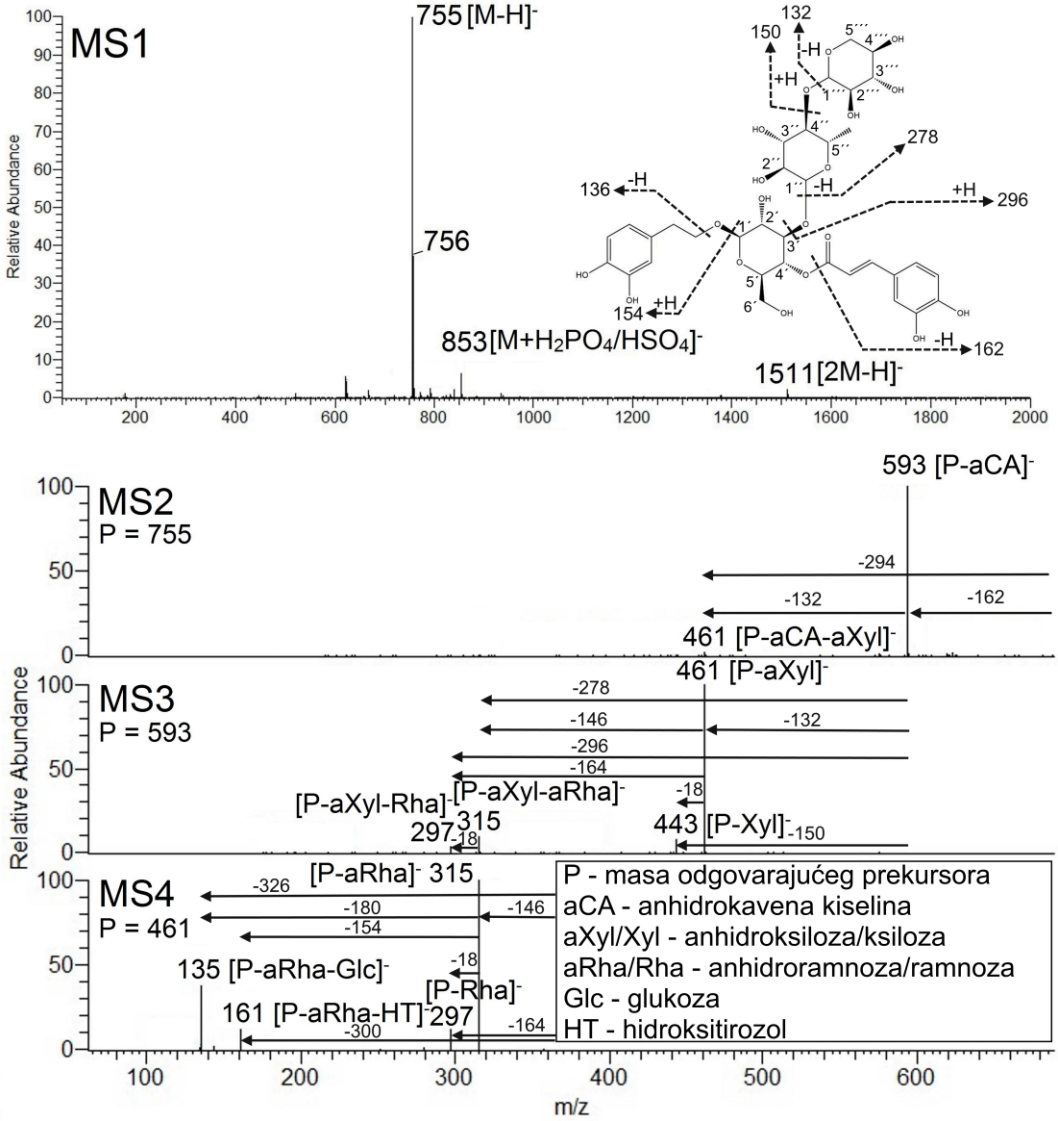
U MS^3 uočen je gubitak 132 Da (*m/z* 461), koji je povezan s mogućom prisutnošću ksilozilne skupine. Daljnja fragmentacija (MS^4), kojom je nastao hidroksitirozol glukozid kao glavni produkt, podudarala se s fragmentacijama ostalih feniletanoida. Ovaj spoj okvirno je identificiran kao arenariozid, derivat trihosantozida B, kojemu nedostaje ksiloza vezana na ramnozilnu skupinu. Arenariozid je ranije izoliran iz vrste *G. trichosantha* (Çaliş i sur., 1999; Çaliş i sur., 2001).



Slika 66. MS^1-MS^4 fragmentacijska shema spoja **49**, trihosantozida B, pri negativnom načinu rada

U sve četiri vrste nađena je mala količina spojeva **59** (*m/z* 461) i **60** (*m/z* 769). Iako je intenzitet molekulskog iona u MS^1 bio prenizak da bi osigurao dobivanje daljnjih MS^n spektara, spoj **59** okvirno je identificiran kao neosiringalid na temelju njegovog UV spektra i

uočenog vremena zadržavanja u usporedbi s onima srodnih spojeva, odnosno redoslijedom izlaska iz kolone navedenom u literaturnim podacima (Es-Safi i sur., 2007c; Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a). Ovaj spoj strukturno je sličan kalceolariozidu B (**42**), ali on umjesto kavene kiseline u položaju *C*-6 glukoze sadrži *p*-kumarinsku kiselinu. Prethodno je izoliran samo iz vrste *G. alypum* (Es-Safi i sur., 2005c). Razlika između vremena zadržavanja kalceolariozida B (20,3 min) i neosiringalida (23,5 min) odgovarala je razlici između vremena zadržavanja standarda kavene (8,1 min) i *p*-kumarinske kiseline (12,1 min).



Slika 67. MS^1-MS^4 fragmentacijska shema spoja **54**, trihosantozida A, pri negativnom načinu rada

Kod spoja **60** (*m/z* 769), glavni fragmenti u MS^2, MS^3 i MS^4 uočeni su redom pri *m/z* 623 (-146 Da), 461 (-162 Da) i 315 (-146 Da). Prilikom proučavanja fragmentacijskih

puteva identificiranih feniletanoida kao što su verbaskozid, rozikazid A, trihosantozid A i trihosantozid B, primijećeno je da prva fragmentacija obično uključuje gubitak acilnog dijela molekule, nakon kojeg dolazi do cijepanja vezanih šećera. Iz ovog razloga, prvi gubitak od 146 Da, zabilježen u MS^2, pripisan je *p*-kumaroilnom dijelu molekule, dok je kasniji gubitak od 146 Da, zabilježen u MS^4, pripisan gubitku anhidroramnoze. Dodatni fragmenti dobiveni u MS^3 bili su prisutni pri *m/z* 297 [M-H-anhidro-*p*-kumarinska kiselina-162-164]$^-$, 315 [M-H-anhidro-*p*-kumarinska kiselina-162-146]$^-$ i 443 [M-H-anhidro-*p*-kumarinska kiselina-180]$^-$, a podudarali su se s onima rozikazida A i njegovih izomera te su ukazivali na prisutnost glukozilne skupine koja je vezana na ramnozilni dio molekule. Budući da je rozikazid A, kao i verbaskozid, pretpostavljeno najzastupljeniji od strukturno srodnih spojeva, spoj **60** okvirno je identificiran kao deoksirozikazid A, njegov derivat koji u položaju *C*-4 središnje glukoze umjesto kavene kiseline sadrži *p*-kumarinsku kiselinu. Kao i u prethodnom slučaju, razlika u vremenima zadržavanja rozikazida A (20,8 min) i deoksirozikazida A (23,7 min) išla je u prilog predloženoj identifikaciji.

Spoj **82** (*m/z* 799) bio je prisutan samo kod vrste *G. alypum*. Kod ovog spoja uočen je glavni gubitak 162 Da u MS^2 (*m/z* 637), a pratio ga je gubitak 176 Da u MS^3 (*m/z* 461). Oni su pripisani odvajanju anhidrokavene i anhidroferulinske kiseline. Daljnja fragmentacija podudarala se s onom ostalih feniletanoida, pri čemu je kao glavni fragment u MS^4 dobiven hidroksitirozol glukozid (*m/z* 315). Navedeni spoj okvirno je identificiran kao galipumozid B (6′-*O*-feruloilverbaskozid), spoj koji je prethodno izoliran iz vrste *G. alypum* (Kirmizibekmez i sur., 2008).

Spoj **64** (*m/z* 637) još je jedan od feniletanoida koji su primijećeni kod sve četiri vrste. Na temelju glavnog gubitka 176 Da u MS^2, nakon kojeg je uočen tipični MS/MS fragmentacijski profil uočen kod ostalih feniletanoida, u usporedbi s literaturnim podacima, ovaj spoj okvirno je identificiran kao leukoskeptozid A, derivat verbaskozida koji na mjestu kavene kiseline sadrži ferulinsku kiselinu. Leukoskeptozid A prethodno je izoliran iz vrsta *G. cordifolia* (Kirmizibekmez i sur., 2004b), *G. davisiana* (Çaliş i sur., 2002a) i *G. dumulosa* (Kirmizibekmez i sur., 2003a). U prilog ovoj identifikaciji išla je usporedba njegovog vremena zadržavanja (25,5 min) i vremena zadržavanja verbaskozida (20,9 min), imajući na umu uočenu razliku u vremenima zadržavanja standarda kavene (8,1 min) i ferulinske kiseline (15,4 min). Spoj **66** (*m/z* 637), iste molekulske mase i načina fragmentacije, bio je prisutan samo kod vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*. Budući da je razlika između njegovog vremena zadržavanja (27,0 min) i vremena zadržavanja leukoskeptozida A (25,5 min) bila usporediva s razlikom vremena zadržavanja izoverbaskozida (22,6 min) i verbaskozida

(20,9 min), ovaj spoj identificiran je kao plantainozid C, derivat izoverbaskozida koji je ranije izoliran iz vrste *G. sintenisii* (Kirmizibekmez i sur., 2004a).

Spojevi **72** (*m/z* 947/948) i **78** (*m/z* 961/962) zabilježeni su kod sve četiri vrste. Oba spoja imala su UV spektre slične onima derivata kavene kiseline i MS/MS fragmentaciju sličnu onoj rozikazida A (spoj **44**) te je pretpostavljeno da je riječ o derivatima ovog spoja, a s obzirom na njegovu uočenu veću količinu u usporedbi s količinama njegovih izomera. S obzirom na glavni gubitak od 176 Da uočen u MS^2, spoj **78** okvirno je identificiran kao izomer globusintenozida, ester ferulinske kiseline i rozikazida A, koji je prethodno izoliran iz vrste *G. sintenisii* (Kirmizibekmez i sur., 2004a). Spoj **72** okvirno je identificiran na temelju načina MS/MS fragmentacije, pri kojoj u MS^2 dolazi do gubitka 162 Da, te usporedbe vremena zadržavanja s onim spoja **78** kao izomer desmetilglobusintenozida.

Tablica XXVI. Kromatografski i spektralni podaci spojeva detektiranih primjenom LC-PDA-ESI-MS^n tehnike pri negativnom načinu rada u metanolnim ekstraktima nadzemnih dijelova vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013), *G. cordifolia* (Alan, 2013), *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013) i *G. punctata* (Grobničko polje, 2013) dobivenim dekokcijom

Pik	Predložena identifikacija	*Mr*	t_R (min)	UV λ_{max} (nm)	*m/z** MS^n fragmenti (% relativne zastupljenosti)
Iridoidi					
4	Katalpol[a,c]	362,33	1,8	194	361 $[M-H]^-$, 397 $[M+^{35}Cl]^-$, **407** $[M-H+HCOOH]^-$, 459 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 623 $[M-H+262]^-$ **MS^2:** 407 → 199 (41), 361 (100); **MS^3:** 361 → 137 (7), 169 (23), 181 (10), 199 (100), 343 (8); **MS^4:** 199 → 137 (23), 163 (8), 169 (100), 181 (31)
5	Skandozid[b,c,d]	390,34	2,3	191, 239	**389** $[M-H]^-$, 425 $[M+^{35}Cl]^-$, 487 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 519 $[M-H+130]^-$, 571 $[M-H+182]^-$, 651 $[M-H+262]^-$, 735 $[2M-H-CO_2]^-$, 761 $[2M-H-H_2O]^-$, 779 $[2M-H]^-$ **MS^2:** 389 → 135 (6), 137 (11), 139 (16), 165 (35), 183 (100), 209 (60), 227 (86); **MS^3:** 183 → 97 (5), 99 (12), 137 (41), 139 (51), 153 (34), 165 (100); **MS^4:** 165 → 119 (6), 121 (30), 135 (100), 137 (52), 147 (41)
6	Aukubin[a,c]	346,33	2,4	191	381 $[M+^{35}Cl]^-$, **391** $[M-H+HCOOH]^-$, 443 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 607 $[M-H+262]^-$ **MS^2:** 391 → 165 (6), 183 (50), 345 (100); **MS^3:** 345 → 139 (4), 165 (14), 183 (100), 301 (15), 317 (3); **MS^4:** 183 → 85 (2), 97 (4), 99 (11), 121 (6), 137 (34), 139 (45), 153 (30), 165 (100)
7	Monomelitozid[c,d]	362,33	2,4	192	361 $[M-H]^-$, 397 $[M+^{35}Cl]^-$, **407** $[M-H+HCOOH]^-$, 459 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 623 $[M-H+262]^-$ **MS^2:** 407 → 361 (100); **MS^3:** 361 → 143 (11), 155 (26), 179 (100), 181 (32), 199 (98); **MS^4:** 179 → 89 (65), 113 (20), 119 (49), 131 (22), 143 (93), 161 (100); 199 → 155 (100), 181 (14)
8	Deacetilasperulozid[c,d]	372,32	2,6	191, 242	371 $[M-H]^-$, 407 $[M+^{35}Cl]^-$, **417** $[M-H+HCOOH]^-$, 469 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 547 $[M-H+HCOOH+130]^-$, 599 $[M-H+HCOOH+182]^-$, 633 $[M-H+262]^-$

					MS²: 417 → 371 (100); **MS³:** 371 → 147 (14), 165 (100), 191 (23), 209 (29); **MS⁴:** 165 → 135 (100), 147 (37)
9	Deacetilalpinozid[c,d]	374, 34	3,9	192, 239	**373** $[M-H]^-$, 409 $[M+^{35}Cl]^-$, 419 $[M-H+HCOOH]^-$, 471 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 503 $[M-H+130]^-$, 555 $[M-H+182]^-$, 747 $[2M-H]^-$ **MS²:** 373 → 123 (50), 149 (14), 167 (30), 193 (2), 211 (100); **MS³:** 211 → 123 (60), 149 (7), 167 (100); **MS⁴:** 167 → 123 (100), 149 (18)
10	Musaenozidinska kiselina[c,d]	376, 36	5,3	239	**375** $[M-H]^-$, 411 $[M+^{35}Cl]^-$, 421 $[M-H+HCOOH]^-$, 473 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 505 $[M-H+130]^-$, 557 $[M-H+182]^-$, 591 $[M-H+216]^-$, 637 $[M-H+262]^-$, 751 $[2M-H]^-$ **MS²:** 375 → 151 (58), 169 (62), 213 (100); **MS³:** 213 → 151 (100), 169 (96); **MS⁴:** -
11	(*epi*)Loganinska kiselina[b,c,d]	376, 36	5,5	238	**375** $[M-H]^-$, 411 $[M+^{35}Cl]^-$, 421 $[M-H+HCOOH]^-$, 473 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 505 $[M-H+130]^-$, 557 $[M-H+182]^-$, 591 $[M-H+216]^-$, 637 $[M-H+262]^-$, 751 $[2M-H]^-$ **MS²:** 375 → 151 (12), 169 (55), 213 (100); **MS³:** 213 → 125 (24), 151 (10), 169 (100); **MS⁴:** 169 → 95 (21), 151 (100)
14	Gardozid[b,c,d]	374, 34	6,3	192, 239	373 $[M-H]^-$, 409 $[M+^{35}Cl]^-$, **419** $[M-H+HCOOH]^-$, 471 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 503 $[M-H+130]^-$, 555 $[M-H+182]^-$, 589 $[M-H+216]^-$, 635 $[M-H+262]^-$, 747 $[2M-H]^-$ **MS²:** 419 → 373 (100); **MS³:** 373 → 149 (16), 167 (26), 193 (100), 209 (8), 221 (7), 251 (8), 329 (6); **MS⁴:** 193 → 119 (6), 149 (100)
17	Asperulozidinska kiselina[c,d]	432, 38	7,4	191, 239	**431** $[M-H]^-$, 467 $[M+^{35}Cl]^-$, 529 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 561 $[M-H+130]^-$, 613 $[M-H+182]^-$, 647 $[M-H+216]^-$, 691 $[M-H+262]^-$, 863 $[2M-H]^-$ **MS²:** 431 → 147 (8), 165 (21), 225 (14), 251 (100), 269 (19); **MS³:** 251 → 147 (100), 165 (36), 191 (46), 207 (66), 233 (15); **MS⁴:** -
20	Asperulozid[a,c]	414, 36	9,4	192, 239	413 $[M-H]^-$, 449 $[M+^{35}Cl]^-$, **459** $[M-H+HCOOH]^-$, 511 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 641 $[M-H+HCOOH+182]^-$, 675 $[M-H+262]^-$ **MS²:** 459 → 413 (100); **MS³:** 413 → 147 (100), 191 (32); **MS⁴:** 147 → 103 (16), 119 (100), 137 (8), 147 (79)
23	Verminozid[b,c]	524, 47	11,3	241, 327	**523** $[M-H]^-$, 559 $[M+^{35}Cl]^-$, 569 $[M-H+HCOOH]^-$, 621 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 653 $[M-H+130]^-$, 705 $[M-H+182]^-$, 785 $[M-H+262]^-$, 1047 $[2M-H]^-$ **MS²:** 523 → 161 (55), 179 (100), 323 (29); **MS³:** 179 → 135 (100); **MS⁴:** 135 → 135 (100)
26	Spekiozid[b,c]	508, 47	14,4	229, 313	**507** $[M-H]^-$, 543 $[M+^{35}Cl]^-$, 553 $[M-H+HCOOH]^-$, 605 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 637 $[M-H+130]^-$, 689 $[M-H+182]^-$, 723 $[M-H+216]^-$, 769 $[M-H+262]^-$ **MS²:** 507 → 145 (15), 163 (100), 181 (10), 307 (15), 323 (7), 345 (9); **MS³:** 163 → 119 (100); **MS⁴:** 119 → 119 (100)
27	Dafilozid[c,d]	446, 40	14,7	193, 236	481 $[M+^{35}Cl]^-$, **491** $[M-H+HCOOH]^-$, 543 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS²:** 491 → 241 (25), 283 (39), 385 (17), 393 (8), 445 (100); **MS³:** 445 → 241 (18), 385 (100); **MS⁴:** 385 → 241 (100)
31	Alpinozid[b,c]	416, 38	16,5	192, 238	415 $[M-H]^-$, 451 $[M+^{35}Cl]^-$, **461** $[M-H+HCOOH]^-$, 513 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 545 $[M-H+130]^-$, 597 $[M-H+182]^-$, 831 $[2M-H]^-$ **MS²:** 461 → 415 (100); **MS³:** 415 → 149 (20), 191 (17), 355 (100); **MS⁴:** -
32	Minekozid[b,c]	538, 50	16,7	191, 218,	**537** $[M-H]^-$, 573 $[M+^{35}Cl]^-$, 583 $[M-H+HCOOH]^-$, 635 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 667 $[M-H+130]^-$, 719 $[M-H+182]^-$,

				238, 295, 327	779 [M-H+262]$^-$ **MS^2:** 537 → 175 (23), 193 (100), 337 (13), 375 (15); **MS^3:** 193 → 134 (100), 149 (95), 178 (45); **MS^4:** 134 → 134 (100)
33	Globularinin[b,c]	510, 49	16,9	218, 284	545 [M+^{35}Cl]$^-$, **555** [M-H+HCOOH]$^-$, 607 [M+H_2PO_4/HSO_4]$^-$, 771 [M-H+262]$^-$ **MS^2:** 555 → 509 (100); **MS^3:** 509 → 147 (100), 199 (50), 283 (23), 361 (27); **MS^4:** 147 → 103 (100), 147 (20)
34	Globularimin[b,c]	510, 49	18,1	199, 220, 283	545 [M+^{35}Cl]$^-$, **555** [M-H+HCOOH]$^-$, 607 [M+H_2PO_4/HSO_4]$^-$ **MS^2:** 555 → 361 (24), 509 (100); **MS^3:** 509 → 361 (100); **MS^4:** 361 → 119 (21), 181 (20), 199 (54), 217 (78), 295 (36), 329 (58), 343 (100)
36	6'-*O*-Benzoil monomelitozid[d,e]	466, 44	18,6	194, 232	465 [M-H]$^-$, 501 [M+^{35}Cl]$^-$, **511** [M-H+HCOOH]$^-$, 563 [M+H_2PO_4/HSO_4]$^-$, 727 [M-H+262]$^-$ **MS^2:** 511 → 465 (100); **MS^3:** 465 → 343 (100); **MS^4:** 343 → 113 (100), 155 (17), 161 (94), 181 (32), 199 (12)
40	6-*O*-Benzoilaukubin[d]	450, 44	19,7	191, 232	485 [M+^{35}Cl]$^-$, **495** [M-H+HCOOH]$^-$, 547 [M+H_2PO_4/HSO_4]$^-$ **MS^2:** 495 → 449 (100); **MS^3:** 449 → 327 (13), 431 (100); **MS^4:** -
43	5-Hidrodaviziozid[c,d]	468, 45	20,6	197, 224	503 [M+^{35}Cl]$^-$, **513** [M-H+HCOOH]$^-$, 565 [M+H_2PO_4/HSO_4]$^-$, 695 [M-H+HCOOH+182]$^-$, 729 [M-H+262]$^-$ **MS^2:** 513 → 179 (14), 467 (100); **MS^3:** 467 → 161 (16), 179 (100), 449 (26); **MS^4:** 179 → 87 (16), 89 (34), 101 (36), 107 (24), 119 (40), 131 (12), 143 (100), 161 (74)
50	Globularidin[b,c]	494, 49	22,2	207, 281	529 [M+^{35}Cl]$^-$, **539** [M-H+HCOOH]$^-$, 591 [M+H_2PO_4/HSO_4]$^-$, 755 [M-H+262]$^-$ **MS^2:** 539 → 493 (100); **MS^3:** 493 → 147 (100), 345 (6); **MS^4:** -
55	Globularifolin[c,d]	466, 44	22,9	200, 233, 275	465 [M-H]$^-$, 501 [M+^{35}Cl]$^-$, **511** [M-H+HCOOH]$^-$, 563 [M+H_2PO_4/HSO_4]$^-$, 727 [M-H+262]$^-$ **MS^2:** 511 → 465 (100); **MS^3:** 465 → 179 (100), 303 (20), 343 (13); **MS^4:** 179 → 89 (61), 113 (13), 119 (41), 131 (24), 143 (86), 161 (100)
61	Globularin[b,c]	492, 47	24,1	204, 217, 283	527 [M+^{35}Cl]$^-$, **537** [M-H+HCOOH]$^-$, 589 [M+H_2PO_4/HSO_4]$^-$ **MS^2:** 537 → 199 (15), 491 (100); **MS^3:** 491 → 147 (100); **MS^4:** 147 → 103 (100), 147 (9)
62	6'-*O*-Benzoil deacetilalpinozid[d]	478, 45	24,8	193, 234	477 [M-H]$^-$, 513 [M+^{35}Cl]$^-$, **523** [M-H+HCOOH]$^-$, 575 [M+H_2PO_4/HSO_4]$^-$, 607 [M-H+130]$^-$, 659 [M-H+182]$^-$, 739 [M-H+262]$^-$, 955 [2M-H]$^-$ **MS^2:** 523 → 477 (100); **MS^3:** 477 → 167 (13), 211 (45), 355 (100); **MS^4:** -
68	Besperulozid[c,d]	476, 43	27,8	195, 233	475 [M-H]$^-$, 511 [M+^{35}Cl]$^-$, **521** [M-H+HCOOH]$^-$, 573 [M+H_2PO_4/HSO_4]$^-$, 1041 [2(M-H+HCOOH)-H]$^-$ **MS^2:** 521 → 475 (100); **MS^3:** 475 → 147 (100), 191 (44), 313 (7); **MS^4:** 147 → 91 (8), 103 (16), 117 (2), 119 (100), 121 (2), 137 (7), 147 (66)
70	Globulariozid[b,c]/ Baldakiozid[c]	528, 93	28,6	219, 283	527 [M(^{35}Cl)-H]$^-$, 563 [M(^{35}Cl)+^{35}Cl]$^-$, **573** [M(^{35}Cl)-H+HCOOH]$^-$, 575 [M(^{37}Cl)-H+HCOOH]$^-$, 625 [M(^{35}Cl)+H_2PO_4/HSO_4]$^-$, 789 [M(^{35}Cl)-H+262]$^-$ **MS^2:** 573 → 527 (100); **MS^3:** 527 → 181 (17), 383 (8), 415 (11), 471 (32), 481 (16), 499 (100); **MS^4:** -
71	Deacetilglobulozid A[d]	848, 80	28,7	219, 283	883 [M+^{35}Cl]$^-$, **893** [M-H+HCOOH]$^-$, 945 [M+H_2PO_4/HSO_4]$^-$, 1023 [M-H+HCOOH+130]$^-$, 1075 [M-H+HCOOH+182]$^-$, 1109 [M-H+262]$^-$ **MS^2:** 893 → 685 (10), 847 (100); **MS^3:** 847 → 355

					(100), 485 (9), 561 (26), 685 (21), 699 (12) 757 (10), 788 (8); **MS⁴:** -
75	Litantosalin[c,d]	476, 47	30,4	205, 216, 283	511 $[M+^{35}Cl]^-$, **521** $[M-H+HCOOH]^-$, 573 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 737 $[M-H+262]^-$ **MS²:** 521 → 313 (30), 475 (100); **MS³:** 475 → 147 (100); **MS⁴:** 147 → 103 (100)
76	10-*O*-Benzoil deacetilalpinozid[d]	478, 45	30,6	194, 235	**477** $[M-H]^-$, 513 $[M+^{35}Cl]^-$, 523 $[M-H+HCOOH]^-$, 575 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 607 $[M-H+130]^-$, 659 $[M-H+182]^-$, 955 $[2M-H]^-$ **MS²:** 477 → 175 (57), 193 (38), 271 (24), 315 (37), 355 (100); **MS³:** 355 → 123 (8), 131 (40), 149 (10), 175 (100); **MS⁴:** 175 → 131 (100)
77	Alpinozid-alpinozid dimer[d]	814, 74	32,1	194, 240	**813** $[M-H]^-$, 849 $[M+^{35}Cl]^-$, 859 $[M-H+HCOOH]^-$, 911 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 943 $[M-H+130]^-$, 995 $[M-H+182]^-$, 1029 $[M-H+216]^-$ **MS²:** 813 → 337 (14), 355 (41), 397 (35), 415 (100), 485 (87), 549 (13), 573 (14), 591 (98), 693 (11), 753 (62), 771 (11); **MS³:** 415 → 149 (26), 191 (12), 251 (9), 295 (16), 355 (100); **MS⁴:** -
81	Globulozid A[c,d]	890, 83	36,3	201, 219, 250, 284	**813** $[M-H]^-$, 849 $[M+^{35}Cl]^-$, 859 $[M-H+HCOOH]^-$, 911 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 943 $[M-H+130]^-$, 995 $[M-H+182]^-$, 1029 $[M-H+216]^-$ **MS²:** 935 → 337 (7), 537 (7), 561 (15), 667 (22), 709 (16) 727 (45), 829 (53), 889 (100); **MS³:** 889 → 259 (15), 319 (24), 337 (21), 397 (100), 415 (16), 431 (19), 515 (21), 519 (42), 537 (47), 562 (31), 650 (18), 667 (19), 675 (20), 694 (10), 728 (23), 742 (22), 829 (40), 845 (12), 871 (8); **MS⁴:** -
Feniletanoidi					
12	Dekafeoil verbaskozid[b,c,d]	462, 45	5,6	202, 235	**461** $[M-H]^-$, 497 $[M+^{35}Cl]^-$, 559 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS²:** 461→ 135 (38), 161 (12), 297 (9), 315 (100), 415 (11); **MS³:** 315→ 119 (8), 135 (100); **MS⁴:** -
29	β-OH-Verbaskozid[b,d]	640, 59	15,4	195, 230, 327	**639** $[M-H]^-$, 737 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS²:** 639 → 621 (100); **MS³:** 621 → 459 (100), 469 (12); **MS⁴:** 459 → 151 (100), 161 (78), 247 (16), 307 (12)
38	Kalceolariozid A[b,c,d]	478, 45	19,3	200, 218, 289, 327	**477** $[M-H]^-$, 575 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS²:** 477 → 161 (100), 179 (21), 315 (22); **MS³:** 161 → 133 (100), 161 (28); **MS⁴:** -
42	Kalceolariozid B[b,c,d]	478, 45	20,3	198, 235, 327	**477** $[M-H]^-$, 575 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS²:** 477 → 161 (100), 179 (3), 315 (23); **MS³:** 161 → 133 (100), 161 (30); **MS⁴:** -
44	Rozikazid A[c,d]	786, 73	20,8	219, 250, 290, 331	**785** $[M-H]^-$, 821 $[M+^{35}Cl]^-$, 883 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 1571 $[2M-H]^-$ **MS²:** 785 → 623 (100); **MS³:** 623 → 315 (14), 443 (13), 461 (100); **MS⁴:** 461 → 135 (41), 161 (9), 297 (14), 315 (100)
45	Verbaskozid[a,c]	624, 59	20,9	219, 250, 290, 331	**623** $[M-H]^-$, 659 $[M+^{35}Cl]^-$, 721 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 1247 $[2M-H]^-$ **MS²:** 623 → 461 (100); **MS³:** 461 → 135 (35), 161 (11), 297 (12), 315 (100); **MS⁴:** 315 → 135 (100)
46	Rozikazid A (izomer 1)[c,d]	786, 73	21,8	197, 233, 330	**785** $[M-H]^-$, 883 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS²:** 785 → 623 (100); **MS³:** 623 → 315 (14), 443 (13), 461 (100); **MS⁴:** 461 → 135 (41), 161 (9), 297 (14), 315 (100)
49	Trihosantozid B[c,d]	888, 82	22,1	197, 219, 331	443 $[M-2H]^{2-}$, **887** $[M-H]^-$, 923 $[M+^{35}Cl]^-$, 985 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS²:** 887 → 593 (2), 725 (100); **MS³:** 725 → 429 (5), 447 (11), 461 (3), 575 (7), 593 (100); **MS⁴:** 593 → 297

					(3), 315 (9), 429 (9), 447 (53), 461 (100)
51	Rozikazid A (izomer 2)[d]	786, 73	22,4	199, 218, 291, 328	**785** $[M-H]^-$, 883 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS^2:** 785 → 623 (100); **MS^3:** 623 → 315 (14), 443 (12), 461 (100); **MS^4:** 461 → 135 (41), 161 (9), 297 (16), 315 (100)
52	Izoverbaskozid[a,c]	624, 59	22,6	199, 218, 291, 328	**623** $[M-H]^-$, 659 $[M+^{35}Cl]^-$, 721 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS^2:** 623 → 461 (100); **MS^3:** 461 → 135 (33), 161 (11), 297 (11), 315 (100); **MS^4:** 315 → 135 (100)
54	Trihosantozid A[c,d]	756, 70	22,8	198, 218, 331	**755** $[M-H]^-$, 791 $[M+^{35}Cl]^-$, 853 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 1511 $[2M-H]^-$ **MS^2:** 755 → 461 (2), 593 (100); **MS^3:** 593 → 297 (3), 315 (10), 443 (8), 461 (100); **MS^4:** 461 → 135 (37), 161 (11), 297 (11), 315 (100)
58	Verbaskozid izomer[d]	624, 59	23,4	191, 221, 329	**623** $[M-H]^-$, 721 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS^2:** 623 → 461 (100); **MS^3:** 461 → 135 (34), 161 (12), 297 (12), 315 (100); **MS^4:** 315 → 135 (100)
59	Neosiringalid[c,e]	462, 45	23,5	194, 230, 285, 328	**461** $[M-H]^-$, 497 $[M+^{35}Cl]^-$, 559 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS^2:** -; **MS^3:** -; **MS^4:** -
60	Deoksirozikazid A[d]	770, 73	23,7	202, 217, 283, 329	**769** $[M-H]^-$, 805 $[M+^{35}Cl]^-$, 867 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 899 $[M-H+130]^-$, 951$[M-H+182]^-$ **MS^2:** 769 → 623 (100); **MS^3:** 623 → 297 (3), 315 (14), 443 (12), 461 (100); **MS^4:** 461 → 135 (34), 161 (11), 297 (11), 315 (100)
63	Arenariozid[c,d]	756, 70	25,2	195, 213, 336	**755** $[M-H]^-$, 853 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS^2:** 755 → 593 (100), 609 (28); **MS^3:** 593 → 461 (100); **MS^4:** 461 → 135 (41), 315 (100)
64	Leukoskeptozid A[c,d]	638, 61	25,5	334	**637** $[M-H]^-$, 673 $[M+^{35}Cl]^-$, 683 $[M-H+HCOOH]^-$, 735 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 767 $[M-H+130]^-$, 819 $[M-H+182]^-$, 899 $[M-H+HCOOH+262]^-$, 1275 $[2M-H]^-$ **MS^2:** 637 → 461 (100); **MS^3:** 461 → 135 (34), 161 (12), 297 (11), 315 (100); **MS^4:** 315 → 135 (100)
66	Plantainozid C[c,d]	638, 61	27,0	214, 243, 364	**637** $[M-H]^-$, 735 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS^2:** 637 → 461 (100); **MS^3:** 461 → 135 (26), 161 (8), 297 (8), 315 (100); **MS^4:** -
72	Desmetilglobusinte nozid izomer[e]	948, 87	29,4	218, 248, 310, 332	**947/948** $[M-H]^-$, 1045 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS^2:** 947 → 785 (100); **MS^3:** 785 → 623 (100); **MS^4:** 623 → 297 (3), 315 (13), 443 (12), 461 (100)
78	Globusintenozid izomer[c,d]	962, 90	33,0	219, 327	**961/962** $[M-H]^-$, 997 $[M+^{35}Cl]^-$, 1059 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS^2:** 961 → 623 (14), 767 (7), 785 (100), 799 (44); **MS^3:** 785 → 623 (100); **MS^4:** 623 → 315 (15), 443 (11), 461 (100)
79	6'-*O*-Kafeoil verbaskozid[d]	786, 73	34,1	196, 222, 245, 302, 329	**785** $[M-H]^-$, 883 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS^2:** 785 → 623 (100); **MS^3:** 623 → 461 (100); **MS^4:** 461 → 135 (36), 161 (12), 297 (11), 315 (100)
82	Galipumozid B[b,c]	800, 76	38,8	197, 213, 310, 320	**799** $[M-H]^-$, 897 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS^2:** 799 → 461 (13), 623 (65), 637 (100); **MS^3:** 637 → 443 (5), 461 (100), 475 (10), 491 (14); **MS^4:** 461 → 135 (39), 161 (11), 297 (6), 315 (100)
Flavonoidi					
25	Vicenin-2[b]	594, 52	12,9	218, 244, 273, 343	**593** $[M-H]^-$, 723 $[M-H+130]^-$ **MS^2:** 593 → 353 (23), 383 (12), 473 (100), 503 (28), 575 (11); **MS^3:** 473 → 353 (100), 383 (16); **MS^4:** 353 → 297 (38), 325 (100)
28	6-Hidroksiluteolin	626,	15,0	213,	**625** $[M-H]^-$, 661 $[M+^{35}Cl]^-$, 671 $[M-H+HCOOH]^-$, 723

	7-*O*-diglukozid[b,c]	52		285, 348	$[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 755 $[M-H+130]^-$, 1251 $[2M-H]^-$ **MS²:** 625 → 301 (100), 445 (18), 463 (25); **MS³:** 301 → 165 (26), 191 (9), 192 (11), 201 (30), 211 (14), 215 (10), 227 (10), 229 (29), 255 (55), 257 (25), 283 (100), 301 (12); **MS⁴:** 283 → 227 (13), 237 (14), 255 (100)
30	6-Hidroksiluteolin 7-*O*-glukozid[b,c]	464, 38	16,1	195, 215, 282, 346	**463** $[M-H]^-$, 561 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 593 $[M-H+130]^-$, 927 $[2M-H]^-$ **MS²:** 463 → 301 (100); **MS³:** 301 → 165 (19), 201 (31), 229 (27), 255 (46), 257 (22), 283 (100); **MS⁴:** 283 → 227 (16), 237 (15), 255 (100)
37	Izokvercitrin[a,c]	464, 38	18,9	271, 350	**463** $[M-H]^-$, 561 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 593 $[M-H+130]^-$, 645 $[M-H+182]^-$, 927 $[2M-H]^-$ **MS²:** 463 → 300 (31), 301 (100); **MS³:** 301 → 151 (62), 179 (100), 229 (10), 255 (9), 257 (19), 273 (17); **MS⁴:** 179 → 151 (100)
39	Luteolin 7-O-glukozid[a,c]	448, 37	19,5	215, 288, 334	**447** $[M-H]^-$, 483 $[M+^{35}Cl]^-$, 493 $[M-H+HCOOH]^-$, 545 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 577 $[M-H+130]^-$, 895 $[2M-H]^-$ **MS²:** 447 → 285 (100); **MS³:** 285 → 151 (26), 175 (67), 199 (64), 217 (63), 241 (100), 243 (65), 257 (24), 267 (15), 285 (21); **MS⁴:** -
41	6-Hidroksiluteolin 7-*O*-(6'''-*O*-kafeoil)-soforozid[c,d]	788, 66	20,0	214, 288, 335	**787** $[M-H]^-$, 885 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 1575 $[2M-H]^-$ **MS²:** 787 → 625 (100); **MS³:** 625 → 300 (21), 301 (100), 343 (7), 445 (19), 463 (26); **MS⁴:** 301 → 137 (7), 165 (25), 192 (11), 201 (33), 211 (16), 229 (27), 239 (15), 255 (53), 257 (26), 273 (14), 283 (100), 301 (10)
47	Skutelarein 7-*O*-glukozid[e]	448, 37	21,9	215, 256, 285, 342	**447** $[M-H]^-$ **MS²:** -; **MS³:** -; **MS⁴:** -
48	6-Hidroksi krizoeriol 7-*O*-glukozid[d]	478, 40	22,0	197, 216, 234, 287, 337	**477** $[M-H]^-$, 513 $[M+^{35}Cl]^-$, 523 $[M-H+HCOOH]^-$, 575 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 607 $[M-H+130]^-$ **MS²:** 477 → 315 (100); **MS³:** 315 → 300 (100); **MS⁴:** 300 → 137 (13), 174 (19), 199 (12), 200 (36), 201 (30), 202 (12), 211 (17), 212 (34), 213 (35), 214 (46), 216 (100), 227 (63), 228 (67), 239 (10), 241 (36), 243 (28), 244 (19), 254 (15), 255 (48), 256 (57), 271 (36), 272 (60), 283 (36), 299 (40)
53	Apigenin 7-*O*-glukuronid[d]	446, 36	22,8	199, 269, 337	**445** $[M-H]^-$, 543 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 575 $[M-H+130]^-$, 891 $[2M-H]^-$ **MS²:** 445 → 175 (14), 269 (100); **MS³:** 269 → 149 (33), 151 (17), 181 (11), 183 (18), 197 (8), 201 (25), 225 (100), 227 (17), 269 (26); **MS⁴:** -
56	Apigenin 7-*O*-glukozid[a,c]	432, 38	23,0	199, 268, 338	**431** $[M-H]^-$, 467 $[M+^{35}Cl]^-$, 477 $[M-H+HCOOH]^-$, 529 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 561 $[M-H+130]^-$ **MS²:** 431 → 269 (100); **MS³:** 269 → 149 (22), 151 (13), 169 (14), 181 (14), 183 (22), 197 (27), 201 (21), 224 (24), 225 (100), 227 (28), 241 (10), 269 (52); **MS⁴:** -
57	6-Hidroksiluteolin 7-*O*-(6'''-*O*-*p*-kumaroil)-soforozid[c,d]	772, 66	23,3	214, 288, 324	**771** $[M-H]^-$, 807 $[M+^{35}Cl]^-$, 869 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 901 $[M-H+130]^-$ **MS²:** 771 → 625 (100); **MS³:** 625 → 301 (100), 445 (19), 463 (27); **MS⁴:** 301 → 165 (23), 201 (31), 229 (27), 255 (50), 257 (26), 283 (100), 301 (9)
65	6-Hidroksi krizoeriol 7-*O*-alozilglukozid[d]	640, 54	26,5	215, 289, 338	**639** $[M-H]^-$, 737 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS²:** 639 → 301 (92), 315 (100), 323 (90); **MS³:** 315 → 300 (100); 301 → 137 (12), 165 (46), 201 (17), 229 (36), 255 (84), 273 (27), 283 (100), 301 (20); **MS⁴:** -
67	Skutelarein 4'-*O*-metil eter 7-*O*-diglukozid[d]	624, 54	27,3	200, 288, 332	**623** $[M-H]^-$, 659 $[M+^{35}Cl]^-$, 669 $[M-H+HCOOH]^-$, 721 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS²:** 623 → 299 (100); **MS³:** 299 → 284 (100); **MS⁴:** -
69	Afilantozid[c,d]	730,	28,2	195,	**729** $[M-H]^-$, 765 $[M+^{35}Cl]^-$, 775 $[M-H+HCOOH]^-$, 827

		62		243, 282, 345	$[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 859 $[M-H+130]^-$, 911 $[M-H+182]^-$ **MS²:** 729 → 607 (100); **MS³:** 607 → 300 (58), 301 (100), 445 (11), 463 (13); **MS⁴:** 301 → 165 (17), 201 (27), 229 (36), 255 (41), 283 (100), 301 (12)
73	Luteolin[a,c]	286, 24	29,7	208, 257, 350	**285** $[M-H]^-$ **MS²:** 285 → 175 (44), 199 (42), 217 (36), 241 (100), 243 (48), 257 (15), 285 (18); **MS³:** -; **MS⁴:** -
74	Demetoksi centaureidin 7-*O*-heksozilglukozid[e]	654, 57	30,2	214, 288, 341	**653** $[M-H]^-$, 689 $[M+^{35}Cl]^-$, 751 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 1307 $[2M-H]^-$ **MS²:** 653 → 300 (20), 315 (100); **MS³:** 315 → 300 (100); **MS⁴:** 300 → 174 (7), 214 (16), 216 (36), 227 (27), 272 (100), 283 (14), 299 (16)
80	Apigenin[a,c]	270, 24	34,9	197, 207, 268, 340	**269** $[M-H]^-$, 305 $[M+^{35}Cl]^-$ **MS²:** 269 → 149 (33), 151 (18), 201 (25), 225 (100), 226 (15), 227 (15), 269 (16); **MS³:** 225 → 157 (5), 169 (13), 180 (13), 181 (100), 183 (36), 196 (20), 197 (38); **MS⁴:** -
83	Pektolinarigenin 7-*O*-heksozilglukozid[e]	638, 57	39,3	191, 217, 242, 292, 334	**637** $[M-H]^-$, 673 $[M+^{35}Cl]^-$, 735 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 819 $[M-H+182]^-$, 1275 $[2M-H]^-$ **MS²:** 637 → 284 (13), 299 (100), 337 (11); **MS³:** 299 → 284 (100); **MS⁴:** 284 → 137 (45), 150 (10), 200 (27), 212 (43), 227 (100), 228 (81), 256 (63), 283 (47)
Ostali polarni spojevi					
1	Manitol[b,c]	182, 17	1,2	-	181 $[M-H]^-$, **217** $[M+^{35}Cl]^-$, 219 $[M+^{37}Cl]^-$, 227 $[M-H+HCOOH]^-$ **MS²:** 217 → 163 (14), 181 (100); **MS³:** 181 → 89 (26), 101 (46), 113 (13), 119 (43), 131 (17), 143 (13), 163 (100); **MS⁴:** 163 → 59 (32), 71 (12), 85 (100), 89 (55), 101 (93), 113 (51), 119 (16), 131 (34), 145 (18)
2	Saharoza[b,c]	342, 30	1,2	-	341 $[M-H]^-$, **377** $[M+^{35}Cl]^-$, 379 $[M+^{37}Cl]^-$, 387 $[M-H+HCOOH]^-$ **MS²:** 377 → 215 (10), 341 (100); **MS³:** 341 → 113 (12), 119 (11), 143 (15), 161 (17), 179 (100); **MS⁴:** 179 → 87 (10), 89 (48), 113 (11), 119 (38), 131 (22), 143 (100), 161 (72)
3	Kina kiselina[b,c]	192, 17	1,3	-	**191** $[M-H]^-$ **MS²:** 191 → 127 (100); **MS³:** -; **MS⁴:** -
13	Kafeoilglukozid (izomer 1)[b,c]	342, 30	6,1	192, 217, 243, 305, 327	**341** $[M-H]^-$, 439 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 471 $[M-H+130]^-$ **MS²:** 341 → 179 (20), 221 (17), 251 (61), 281 (100), 323 (13); **MS³:** 281 → 179 (100), 221 (32); **MS⁴:** 179 → 135 (100)
15	Hebitol II[b,c]	506, 45	6,8	244, 327	**505** $[M-H]^-$, 603 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS²:** 505 → 161 (100), 179 (72), 221 (16), 251 (35), 281 (62), 341 (21), 343 (24); **MS³:** 161 → 133 (100), 161 (21); **MS⁴:** -
16	Kafeoilglukozid (izomer 2)[b,c]	342, 30	7,2	192, 217, 241, 305, 327	**341** $[M-H]^-$, 439 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 471 $[M-H+130]^-$ **MS²:** 341→ 179 (20), 221 (17), 251 (62), 281 (100), 323 (12); **MS³:** 281→ 179 (100), 221 (30); **MS⁴:** 179 → 135 (100)
18	*p*-Kumaroilglukozid (izomer 1)[b,c]	326, 30	7,9	226, 314	**325** $[M-H]^-$, 423 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 455 $[M-H+130]^-$, 507 $[M-H+182]^-$, 541 $[M-H+216]^-$ **MS²:** 325 → 119 (7), 145 (46), 163 (100), 187 (27), 265 (11); **MS³:** 163 → 119 (100); **MS⁴:** -
19	*p*-Kumaroilglukozid (izomer 2)[b,c]	326, 30	8,7	236, 313	**325** $[M-H]^-$ **MS²:** 325 → 235 (100), 265 (93); **MS³:** 235 → 163 (100); **MS⁴:** 163 → 119 (100)
21	Feruloilglukozid (izomer 1)[d]	356, 32	11,0	218, 296,	**355** $[M-H]^-$, 391 $[M+^{35}Cl]^-$, 401 $[M-H+HCOOH]^-$, 453 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 485 $[M-H+130]^-$

				325	**MS²:** 355 → 193 (15), 235 (76), 265 (100), 295 (82); **MS³:** 265 → 193 (100), 217 (5), 221 (5); **MS⁴:** 193 → 134 (20), 149 (100), 178 (60)
22	Globularitol[c]	520, 48	11,1	218, 296, 325	**519** $[M-H]^-$, 555 $[M+^{35}Cl]^-$, 565 $[M-H+HCOOH]^-$, 617 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 649 $[M-H+130]^-$, 701 $[M-H+182]^-$, 781 $[M-H+262]^-$ **MS²:** 519 → 193 (100), 235 (26), 265 (15), 295 (18), 325 (43), 355 (12); **MS³:** 193 → 134 (36), 149 (100), 178 (55); **MS⁴:** -
24	Feruloilglukozid (izomer 2)[d]	356, 32	12,4	217, 241, 327	**355** $[M-H]^-$, 391 $[M+^{35}Cl]^-$, 401 $[M-H+HCOOH]^-$, 453 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS²:** 355 → 161 (20), 193 (14), 235 (79), 265 (100), 295 (80); **MS³:** 265 → 193 (100); **MS⁴:** 193 → 134 (21), 149 (100), 178 (62)
35	Liriodendrin[c]	742, 72	18,5	207, 230	777 $[M+^{35}Cl]^-$, **787** $[M-H+HCOOH]^-$, 839 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 917 $[M-H+262]^-$ **MS²:** 787 → 417 (7), 579 (100), 624 (30), 625 (28), 741 (67), 769 (41); **MS³:** -; **MS⁴:** -
Ostali nepolarni spojevi					
84	Okso-dihidroksi-oktadecenoična kiselina[b]	328, 44	40,2	-	**327** $[M-H]^-$, 425 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 457 $[M-H+130]^-$, 509 $[M-H+182]^-$, 543 $[M-H+216]^-$ **MS²:** 327 → 171 (31), 209 (18), 211 (46), 221 (18), 229 (100), 239 (16), 291 (62), 309 (23); **MS³:** 229 → 125 (17), 127 (11), 155 (13), 167 (10), 209 (41), 211 (100); **MS⁴:** 211 → 125 (31), 167 (56), 183 (100), 193 (30)
85	Trihidroksi-oktadecenoična kiselina[b]	330, 46	43,3	-	**329** $[M-H]^-$, 365 $[M+^{35}Cl]^-$, 427 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 459 $[M-H+130]^-$, 511 $[M-H+182]^-$, 545 $[M-H+216]^-$ **MS²:** 329 → 171 (26), 211 (58), 229 (100), 293 (32), 311 (52); **MS³:** 229 → 125 (18), 127 (13), 155 (13), 167 (12), 209 (41), 211 (100); **MS⁴:** 211 → 125 (18), 167 (63), 183 (100), 193 (52)

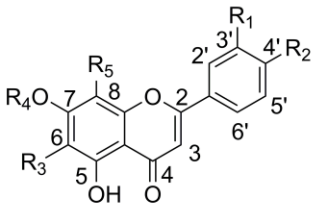
* – glavni ion otisnut je masnim slovima (relativna zastupljenost 100%); [a] – identifikacija temeljena na usporedbi t_R, MS^1 i PDA spektara te načina MS/MS fragmentacije s istim vrijednostima referentnog standarda; [b] – identifikacija temeljena na usporedbi t_R, MS^1 i PDA spektara te načina MS/MS fragmentacije s literaturnim vrijednostima; [c] – identifikacija temeljena na načinu MS/MS fragmentacije očekivanom za spojeve koji su prethodno zabilježeni u vrstama roda *Globularia* (+PDA za dodatnu potvrdu); [d] – identifikacija temeljena na načinu MS/MS fragmentacije (i t_R) spojeva koji su slični drugim identificiranim spojevima (+PDA za dodatnu potvrdu); [e] – identifikacija temeljena na MS^1 ili načinu MS/MS fragmentacije očekivanom za spojeve koji su slični spojevima prethodno zabilježenim u vrstama roda *Globularia* uz usporedbu t_R koji je sličan onima drugih identificiranih spojeva (+PDA za dodatnu potvrdu); - – nije detektirano

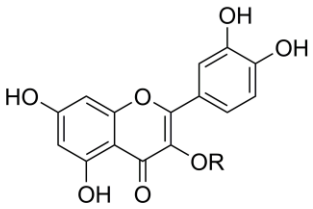
Flavonoidi

U sve četiri istraživane vrste nađeni su flavonoidi koji pripadaju skupinama flavona i flavonola (Slika 68). Kod spojeva iz ove skupine, kao i kod feniletanoida, glavni ioni prisutni u MS^1 bili su njihovi molekulski ioni $[M-H]^-$. Prisutnost izokvercitrina (kvercetin 3-*O*-glukozida, spoj **37**, *m/z* 301) u uzorcima utvrđena je pomoću standarda ovog spoja. Izokvercitrin je prethodno izoliran iz vrste *G. aphyllanthes* (Kirmizibekmez i sur., 2009), a prisutnost glukozida kvercetina zabilježena je i kod vrste *G. alypum* (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a). Spojevi **39** (*m/z* 447) i **56** (*m/z* 431), prisutni u sve četiri vrste, jednoznačno su identificirani kao luteolin 7-*O*-glukozid i apigenin 7-*O*-glukozid, temeljeno na usporedbi njihovih vremena zadržavanja, UV i MS^n spektara s istim podacima za standardne tvari. Apigenin 7-*O*-glukozid prethodno je izoliran iz vrsta *G. alypum* (Ben Hassine i sur., 1982b) i

G. meridionalis (Tundis i sur., 2012a). Predloženi identitet spoja **53** (*m/z* 445) je apigenin 7-*O*-glukuronid, temeljeno na njegovom vremenu zadržavanja u usporedbi s onim apigenin 7-*O*-glukozida, njihovim usporedivim UV spektrima te zabilježenom gubitku 176 Da u MS^2 (*m/z* 269) i jednakim MS^3 oba spoja. Prisutnost luteolina (spoj **73**, *m/z* 285) kod vrste *G. punctata* i apigenina (spoj **80**, *m/z* 269) kod svih istraživanih vrsta također je potvrđena usporedbom sa standardnim tvarima. Apigenin i luteolin prethodno su izolirani iz vrste *G. alypum* (Boutiti i sur., 2008) dok je luteolin izoliran iz vrste *G. meridionalis* (Tundis i sur., 2012a).

Spoj **25** (*m/z* 593) karakterizirala su dva uzastopna gubitka 120 Da u MS^2 i MS^3 kojima su dobiveni glavni ioni pri *m/z* 473 i 353. Ovakav oblik fragmentacije obično je karakterističan za *C*-glikozilirane flavonoide (Cuyckens i Claeys, 2004). Navedeni spoj okvirno je identificiran kao apigenin-6,8-di-*C*-glukozid (vicenin-2) nakon usporedbe njegove MS/MS fragmentacije s literaturnim podacima (Spínola i sur., 2015). Pregledom dostupne literature utvrđeno je da je za vrstu *G. alypum* prisutnost *C*-glikoziliranih flavonoida, točnije 8-*C*-glukozil-4′,7-dihidroksiflavona (bajina), bila i ranije primijećena (Ben Hassine i sur., 1982b).





37 R = glukozil

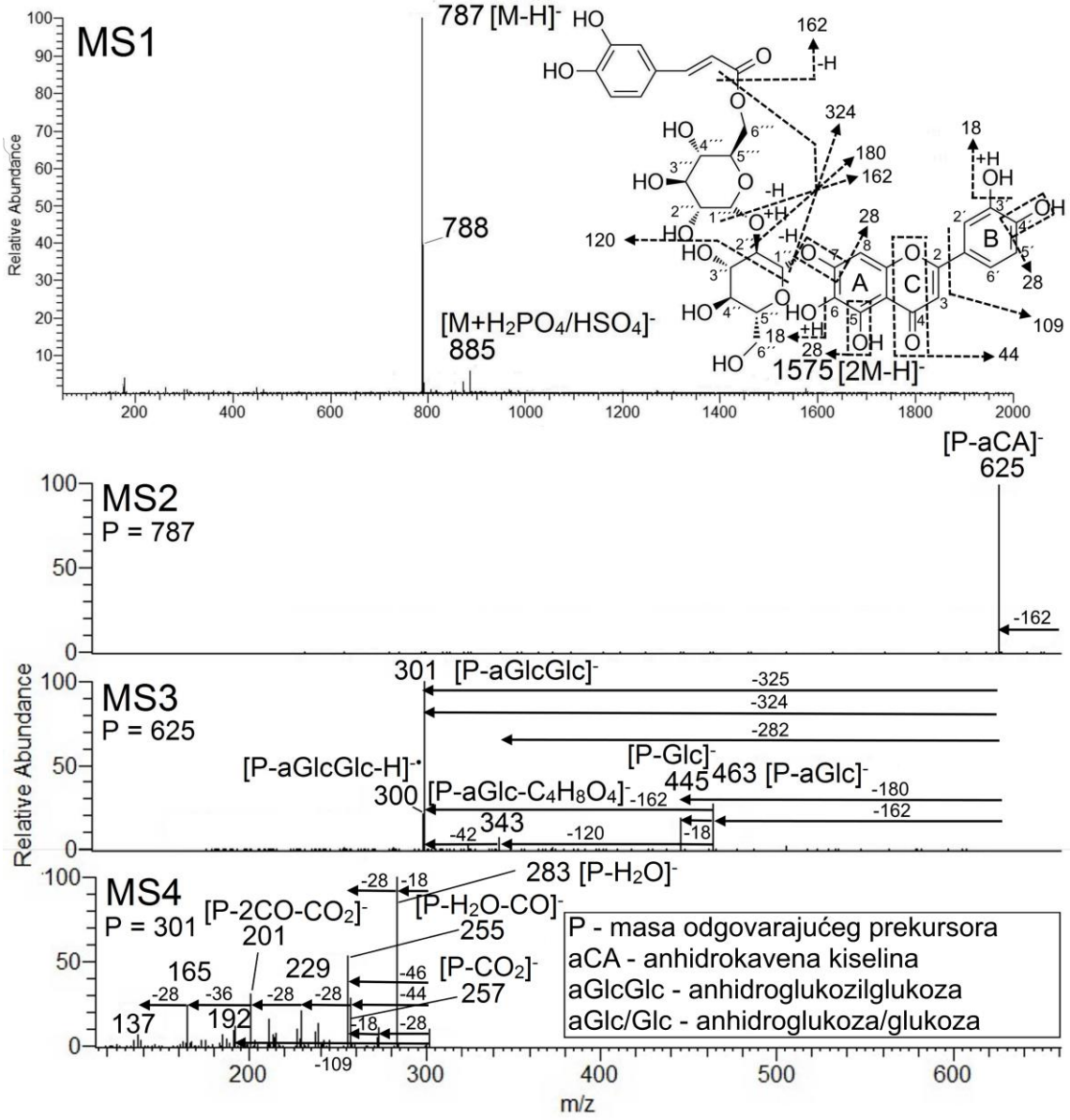
25 $R_1 = R_4 = H$; $R_2 = OH$; $R_3 = R_5$ = glukozil
28 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$; R_4 = glukozil-(1-2)-glukozil ; $R_5 = H$
30 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$; R_4 = glukozil ; $R_5 = H$
39 $R_1 = R_2 = OH$; $R_3 = R_5 = H$; R_4 = glukozil
41 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$; R_4 = 6'''-*O*-kafeoilsoforozil ; $R_5 = H$
47 $R_1 = R_5 = H$; $R_2 = R_3 = OH$; R_5 = glukozil
48 $R_1 = OCH_3$; $R_2 = R_3 = OH$; R_4 = glukozil; $R_5 = H$
53 $R_1 = R_3 = R_5 = H$; $R_2 = OH$; R_4 = glukuronil
56 $R_1 = R_3 = R_5 = H$; $R_2 = OH$; R_4 = glukozil
57 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$; R_4 = 6'''-*O*-*p*-kumaroilsoforozil ; $R_5 = H$
65 $R_1 = OCH_3$; $R_2 = R_3 = OH$; R_4 = alozilglukozil ; $R_5 = H$
67 $R_1 = R_5 = H$; $R_2 = OCH_3$; $R_3 = OH$; R_4 = diglukozil
69 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$; R_4 = 6'''-*O*-benzoilsoforozil ; $R_5 = H$
73 $R_1 = R_2 = OH$; $R_3 = R_4 = R_5 = H$
74 $R_1 = OH$; $R_2 = R_3 = OCH_3$; R_4 = heksozilglukozil ; $R_5 = H$
80 $R_1 = R_3 = R_4 = R_5 = H$; $R_2 = OH$
83 $R_1 = R_5 = H$; $R_2 = R_3 = OCH_3$; R_4= heksozilglukozil

Slika 68. Strukture flavona i flavonola identificiranih u metanolnim ekstraktima nadzemnih dijelova vrsta roda *Globularia* dobivenim dekokcijom (brojevi odgovaraju spojevima koji su navedeni u Tablici XXVI)

Spojevi **28** (*m/z* 625) i **30** (*m/z* 463) imali su slična vremena zadržavanja i UV spektre. Kod oba spoja, najzastupljeniji ion u MS^2 bio je prisutan pri *m/z* 301, dok im se obrazac fragmentacije u MS^3 poklapao. Spoj **30** bio je prisutan u sve četiri istraživane vrste, a identificiran je kao 6-hidroksiluteolin 7-*O*-glukozid na temelju usporedbe obrasca MS/MS fragmentacije s literaturnim podacima zabilježenim za isti spoj izoliran iz vrste *G. alypum* (Es-Safi i sur., 2005a). Ovoj identifikaciji išla je u prilog i usporedba dobivenog UV spektra s literaturnim podacima (Lin i sur., 2007). Osim kod vrste *G. alypum*, spoj je prethodno pronađen i kod vrste *G. cordifolia* (Harborne i Williams, 1971). Dominantni gubitak od 324 Da zabilježen u MS^2 spoja **28**, popraćen manjim gubicima od 162 Da (anhidroglukoza) i 180 Da (glukoza), pripisan je prisutnosti diglukozida (Es-Safi i sur., 2005a). Iz vrsta roda *Globularia* prethodno su izolirana dva 6-hidroksiluteolin diglukozida: 7-*O*-soforozid (7-*O*-glukozil-(1→2)-glukozid) iz vrsta *G. alypum* (Kirmizibekmez i sur., 2008) i *G. punctata* (Klimek i sur., 1988) te 7-*O*-laminaribiozid (7-*O*-glukozil-(1→3)-glukozid), iz vrste *G. alypum* (Es-Safi i sur., 2005c). Prisutnost nepoznatog 6-hidroksiluteolin diglukozida zabilježena je i kod vrste *G. cordifolia* (Harborne i Williams, 1971). Spoj **28** bio je prisutan kod vrsta *G. alypum* i *G. punctata*. S obzirom na usporedbu s ostalim identificiranim spojevima (**41**, **57**, **69**), koji su bili prisutni kod vrste *G. punctata* (Slika 62), odnosno s drugim flavonoidnim diglukozidima zabilježenim kod vrste *G. alypum*, a koji su vezani glikozidnom vezom *C*1-*C*2 (Es-Safi i sur., 2005c), ovaj spoj je najvjerojatnije 6-hidroksiluteolin 7-*O*-soforozid.

Spojevi **41** (*m/z* 787), **57** (*m/z* 771) i **69** (*m/z* 729) okvirno su identificirani kao 6’’’-*O*-esteri 6-hidroksiluteolin 7-*O*-soforozida s kavenom, *p*-kumarinskom i benzojevom kiselinom, prema usporedbi sa spojevima koji su ranije izolirani iz vrsta *G. punctata* (Klimek, 1988) i/ili *G. aphyllanthes* (Kirmizibekmez i sur., 2009). Položaj *C*-6 glavno je mjesto acilacije heksoza (Cuyckens i Claeys, 2004). Glavni fragment u MS^2 za prva dva spoja bio je prisutan pri *m/z* 625, a pripisan je gubitku anhidrokavene kiseline (-162 Da) (Slika 69) i anhidro-*p*-kumarinske kiseline (-146 Da). Spoj **69** karakterizirao je gubitak od 122 Da u MS^2 (*m/z* 607), koji je bilo moguće pripisati benzojevoj kiselini. Daljnja fragmentacija glavnih iona dobivenih u MS^2 sva tri spoja rezultirala je nastankom glavnog iona pri *m/z* 301 u MS^3, čiji se daljnji obrazac fragmentacije podudarao s onime spoja **28**. Fragment manjeg relativnog intenziteta prisutan pri *m/z* 343, zabilježen kod spoja **41**, pripisan je gubitku jedne anhidroglukoze i djelomičnom cijepanju druge glukoze ($-C_4H_8O_4$). Navedeno cijepanje ide u prilog pretpostavci da su dvije glukoze međusobno povezane glikozidnom vezom *C*-1-*C*-2.

Iako za spoj **47** (*m/z* 447) nije bilo moguće dobiti MS/MS spektre, on je okvirno identificiran kao skutelarein (6-hidroksiapigenin) 7-*O*-glukozid. Identifikacija se temeljila na usporedbi njegove strukture i vremena zadržavanja (21,9 min) s istim svojstvima identificiranih spojeva, 6-hidroksiluteolin 7-*O*-glukozida (**30**) (16,1 min), luteolin 7-*O*-glukozida (**39**) (19,5 min) i apigenin 7-*O*-glukozida (**56**) (23,0 min), kao i usporedbe njegovog UV spektra s literaturnim podacima (Lin i sur., 2007). Skutelarein 7-*O*-diglukozid ranije je zabilježen kod vrste *G. cordifolia*, dok je prisutnost njegovog aglikona zabilježena i kod drugih vrsta roda *Globularia*, točnije kod vrsta *G. orientalis*, *G. salicina* i *G. spinosa* (Harborne i Williams, 1971).



Slika 69. MS^1-MS^4 fragmentacijska shema spoja **41**, 6-hidroksiluteolin 7-*O*-(6'''-*O*-kafeoil)-soforozida, pri negativnom načinu rada

Spojevi **48** (*m/z* 477), **65** (*m/z* 639), **67** (*m/z* 623), **74** (*m/z* 653) i **83** (*m/z* 637), karakteristični za vrste *G. cordifolia* i/ili *G. meridionalis*, okvirno su identificirani kao glikozidi metoksiliranih flavonoida na temelju njihovih sličnih UV i MS^n spektara. Molekulski ion spoja **48** (*m/z* 477) izgubio je 162 Da u MS^2. Ovaj gubitak pripisan je odvajanju anhidroglukoze, a za njim je slijedio gubitak 15 Da u MS^3, koji je pripisan odvajanju metilne skupine. Gubitak od 324 Da uočen u MS^2 spojeva **65** (*m/z* 639) i **67** (*m/z* 623), ukazivao je na prisutnost diheksozidnog dijela molekule. MS^3 dobivenih aglikonskih iona u prethodnom koraku rezultirao je gubitkom 15 Da, odnosno fragmentima čije su *m/z* vrijednosti iznosile 300 i 284. Daljnja fragmentacija ovih demetiliranih iona nije zabilježena. Gubitak metilne skupine primijećen je i kod standarda krizoeriola (3'-*O*-metil-luteolina), a zabilježen je kao karakterističan za metoksilirane flavonoide (Fabre i sur., 2001).

Metoksilirani flavonoidi mogu biti prisutni u većem broju vrsta roda *Globularia*. Primjerice, nepetin 7-*O*-glukozid (nepitrin) nađen je kod vrsta *G. alypum* (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a) i *G. dumulosa* (Kirmizibekmez i sur., 2003a), nepetin 7-*O*-ramnozilglukozid kod vrste *G. cordifolia* (Harborne i Williams, 1971), pektolinarigenin 7-*O*-glukozid kod vrsta *G. dumulosa* (Kirmizibekmez i sur., 2003a) i *G. meridionalis* (Tundis i sur., 2012a), odnosno pektolinarigenin kod vrste *G. cordifolia* (Harborne i Williams, 1971), demetoksicentaureidin 7-*O*-glukozid kod vrsta *G. cordifolia* (Harborne i Williams, 1971) i *G. dumulosa* (Kirmizibekmez i sur., 2003a) te krizoeriol 7-*O*-alozilglukozid kod vrste *G. cordifolia* (Kirmizibekmez i sur., 2004b). UV spektar spoja **48** išao je u prilog pretpostavci da je riječ o metoksiliranom flavonskom glukozidu, a ukazivao je na prisutnost 6-OH skupine i dvije hidroksilne skupine u prstenu B, od kojih je jedna metoksilirana (Lin i sur., 2007). Usporedba s flavonoidima koji su ranije izolirani iz srodnih vrsta omogućila je okvirnu identifikaciju ovog spoja kao 6-hidroksikrizoeriol 7-*O*-glukozida. Zabilježeno vrijeme njegovog zadržavanja na koloni išlo je u prilog navedenoj identifikaciji, budući da se pokazalo da metilacija 6-hidroksiluteolin 7-*O*-glukozida (**30**) (16,1 min) u prstenu B značajno povećava lipofilnost, odnosno vrijeme izlaženja 6-hidroksikrizoeriol 7-*O*-glukozida (**48**) (26,5 min). Sličan pomak u vremenu zadržavanja primijećen je i kod standarada luteolina (29,6 min) i krizoeriola (37,2 min). UV spektar spoja **67** ukazivao je na prisutnost 6-OH skupine, odnosno na metoksilaciju u prstenu B (Lin i sur., 2007). Na temelju usporedbe sa srodnim spojevima, ovaj spoj okvirno je identificiran kao skutelarein 4'-metil eter 7-*O*-diglukozid. Skutelarein 7-*O*-diglukozid prethodno je izoliran iz vrste *G. cordifolia*, dok je prisutnost skutelarein 6,4'-dimetilnog etera zabilježena kod iste vrste nakon kisele hidrolize (Harborne i Williams, 1971). Na temelju usporedbe sa srodnim

spojevima (**48**) i spojevima nađenim u literaturnim podacima (Kirmizibekmez i sur., 2004b), spoj **65** okvirno je identificiran kao 6-hidroksikrizoeriol 7-*O*-alozilglukozid.

Spojeve **74** (*m/z* 653) i **83** (*m/z* 637) obilježio je glavni gubitak od 338 Da u MS^2, zajedno s manjim gubitkom od 353 Da. MS^3 iona većeg relativnog intenziteta rezultirao je gubitkom 15 Da ($-CH_3$), odnosno nastankom fragmenata pri *m/z* 300 i 284, koji su daljnjom fragmentacijom u MS^4 dali ione pri *m/z* 272 (spoj **74**) i 227 (spoj **83**). S obzirom na uočeni način MS/MS fragmentacije derivata aciliranih 6-hidroksiluteolin 7-*O*-soforozida, uočeni gubitak 338 Da nije pripisan aciliranoj anhidroglukozi (176 Da + 162 Da), već istovremenom odvajanju diheksozidnog dijela molekule (324 Da) i 14 Da, od kojih je posljednji gubitak pripisan prisutnosti dodatne metoksilne skupine. Ovi spojevi okvirno su identificirani kao demetoksicentaureidin (6,4'-dimetil eter 6-hidroksiluteolina) 7-*O*-heksozilglukozid i pektolinarigenin (6,4'-dimetil eter 6-hidroksiapigenina) 7-*O*-heksozilglukozid, temeljeno na prethodno spomenutim izvještajima o prisutnosti 7-*O*-monoglukozida istih flavonskih aglikona i usporedbi s drugim prisutnim glikoziliranim flavonima u vrstama roda *Globularia* (Harborne i Williams, 1971; Kirmizibekmez i sur., 2003a; Tundis i sur., 2012a).

Ostali polarni spojevi

Ostali polarni spojevi, nađeni u sve četiri vrste, bili su različiti ugljikohidrati i njihovi esteri. Vrlo polarne spojeve, poput spojeva **1** i **2**, karakterizirala je prisutnost kloridnih adukata u MS^1, čije vrijednosti su se međusobno razlikovale za 2 *m/z* jedinice, u kombinaciji s molekulskim ionom. Stvaranje kloridnih adukata kod masene spektrometrije koja koristi ionizaciju elektroraspršenjem pri negativnom načinu rada prethodno je zabilježeno za različite ugljikohidrate (Zhu i Cole, 2001). Spoj **1** karakterizirao je glavni ion pri *m/z* 217 $[M+^{35}Cl]^-$, u čijoj pratnji su bili ioni pri *m/z* 181 $[M-H]^-$ i 219 $[M+^{37}Cl]^-$. Osim kroz gubitak 36 Da koji je uočen u MS^2, prisutnost kloridnih adukata bila je vidljiva i kroz omjer relativnih intenziteta iona pri *m/z* 217 i 219 u MS^1 koji je bio približno jednak 3:1. Daljnjom fragmentacijom molekulskog iona dobiven je pik pri *m/z* 163 $[M-H-H_2O]^-$. Ovaj spoj okvirno je identificiran kao manitol, šećerni alkohol koji je karakterističan za vrste roda *Globularia* (Heckel i Schlagdenhauffen, 1883; Zellner, 1934; Fikenscher i sur., 1969; Ben Hassine i sur., 1982b; Amer i El-Masry, 1988; Taskova i sur., 2006). U MS^1 spoja **2**, glavni pik uočen je pri *m/z* 377 $[M+^{35}Cl]^-$, a imao je približno tri puta veći relativni intenzitet od pika pri *m/z* 379 $[M+^{37}Cl]^-$, što je upućivalo na prisutnost kloridnih adukata. MS^2 najzastupljenijeg iona dao je ion pri *m/z* 341 $[M-H]^-$ kao glavni ion, koji se dalje raspao na ione *m/z* 179 u MS^3 i *m/z* 143 u MS^4. Spoj **2**, u usporedbi s literaturnim podacima, okvirno je identificiran kao saharoza (Zhu i

Cole, 2001). Spoj **3** (*m/z* 191) imao je otprilike isto vrijeme zadržavanja na koloni kao prethodna dva spoja te je okvirno identificiran kao kina kiselina, čija prisutnost je zajedno s manitolom i saharozom bila zabilježena u ranijem istraživanju kemijskog sastava vrste *G. alypum* (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a).

Spojevi **13** i **16** (*m/z* 341) okvirno su identificirani kao izomeri glukozida kavene kiseline, koji su ranije bili primijećeni kod vrste *G. alypum* (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a), a sastavni su dio velikog broja feniletanoida koji su nađeni u istraživanim uzorcima. Njihovi UV spektri bili su usporedivi s onime standarda kavene kiseline, dok je MS/MS fragmentaciju karakterizirao gubitak 60 Da u MS^2 (*m/z* 281) i 102 Da u MS^3 (*m/z* 179), odnosno gubitak 44 Da (dekarboksilacija) u MS^4, kakav je uočen i kod standarda kavene kiseline. S obzirom na usporedivu razliku u vremenima zadržavanja ovih spojeva s onom zabilježenom kod verbaskozida i izoverbaskozida, kod ovih spojeva kavena kiselina mogla bi biti prisutna u položajima *C*-4 i *C*-6 glukoze. Spojevi **18** i **19** (*m/z* 325) okvirno su identificirani kao izomeri glukozida *p*-kumarinske kiseline, temeljeno na usporedbi njihovih UV spektara i karakterističnih MS fragmenata, pri *m/z* 163 [M-H-anhidroglukoza]$^-$ i 119 [M-H-anhidroglukoza-CO_2]$^-$, s onima standarda *p*-kumarinske kiseline. Prisutnost navedenih glukozida nedavno je zabilježena kod vrste *G. alypum* (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a). Na isti način, spojevi **21** i **24** (*m/z* 355), koji su bili prisutni u manjoj količini kod sve četiri vrste, okvirno su identificirani kao izomeri glukozida ferulinske kiseline. U MS^2 ovih spojeva glavni ion bio je prisutan pri *m/z* 265 [M-H-90]$^-$. Daljnja fragmentacija dovela je do nastanka glavnih iona pri *m/z* 193 [M-H-90-72]$^-$ u MS^3 i 149 [M-H-90-72-CO_2]$^-$ u MS^4, što je odgovaralo fragmentaciji standarda ferulinske kiseline. Iako ovi spojevi do sada nisu bili zabilježeni kod vrsta roda *Globularia*, moguće je primijetiti da oni čine sastavni dio feniletanoida prisutnih u sve četiri vrste, primjerice leukoskeptozida A (spoj **64**), globusintenozida (spoj **78**) i drugih (**66**, **82**).

Spoj **15** (*m/z* 505) okvirno je identificiran kao hebitol II (ester manitola), što je bilo u skladu s njegovom MS/MS fragmentacijm, UV spektrom i vremenom zadržavanja, koje se nalazilo između onih izomera glukozida kavene kiseline, kao što je zabilježeno i u prethodno provedenom istraživanju (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a). Spoj **22** (*m/z* 519) dao je u MS^2 glavni ion pri *m/z* 193, čija je daljnja fragmentacija bila usporediva s onom standarda ferulinske kiseline (MS^3). Dodatni fragmenti prisutni u MS^2 upućivali su na mogućnost da je riječ o šećernom esteru globularitolu, koji je prethodno izoliran iz vrste *G. orientalis* (Çaliş i sur., 2002b), a nedavno je zabilježen i kod vrste *G. alypum* (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a).

Tablica XXVII. Spojevi identificirani primjenom LC-PDA-ESI-MS^n tehnike u dekokcijom dobivenim metanolnim ekstraktima nadzemnih dijelova istraživanih vrsta roda *Globularia*

Naziv spoja	*Ga*	*Gc*	*Gm*	*Gp*
Iridoidi				
Alpinozid	+	+	+*	+
Alpinozid-alpinozid dimer	+*	-	-	-
Asperulozid	t	+	+	+
Asperulozidinska kiselina	-	+*	+*	+
Aukubin	+	t	t	t
6-*O*-Benzoilaukubin	-	+*	+*	-
6'-*O*-Benzoildeacetilalpinozid	-	+*	+*	-
10-*O*-Benzoildeacetilalpinozid	+*	t*	t*	-
6'-*O*-Benzoilmonomelitozid	-	+*	+*	-
Besperulozid	-	t*	t*	+
Dafilozid	-	+*	+*	+
Deacetilalpinozid	+*	+*	+*	+*
Deacetilasperulozid	-	+*	+*	+*
Deacetilglobulozid A	+*	-	-	-
Gardozid	+	+*	+*	+*
Globularidin	+	-	-	+*
Globularifolin	-	+	+	-
Globularimin	+	-	-	+*
Globularin	+	-	-	+
Globularinin	+	-	-	+*
Globulariozid	+	-	-	+
Globulozid A	+*	-	-	-
5-Hidroksidaviziozid	-	+	+*	-
Katalpol	+	-	-	+
Litantosalin	+	-	-	-
(*epi*)Loganinska kiselina	t	+*	+*	+*
Minekozid	+	-	-	-
Monomelitozid	-	+	+*	-
Musaenozidinska kiselina	t	+*	+*	+*
Skandozid	-	-	-	+
Spekiozid	+	-	-	-
Verminozid	+	-	-	-
Feniletanoidi				
Arenariozid	-	-	-	+*
Dekafeoilverbaskozid	+	+*	+*	t*
Deoksirozikazid A	+*	t*	t*	t*
Desmetilglobusintenozid izomer	+*	+*	+*	+*
Galipumozid B	+	-	-	-
Globusintenozid izomer	+*	+*	+*	+*
β-OH-Verbaskozid	+*	+*	+*	t*
Izoverbaskozid	+	+	+	+*
6'-*O*-Kafeoilverbaskozid	+*	t*	t*	t*
Kalceolariozid A	+	-	-	-
Kalceolariozid B	+	-	-	-
Leukoskeptozid A	+*	+	+*	t*

Neosiringalid	t	t*	t*	t*
Plantainozid C	-	t*	+*	-
Rozikazid A	+	+	+*	+
Rozikazid A (izomer 1)	+*	-	-	-
Rozikazid A (izomer 2)	+*	t*	t*	+*
Trihosantozid A	-	-	-	+
Trihosantozid B	-	-	-	+*
Verbaskozid	+	+	+	+
Verbaskozid izomer	+*	+*	+*	+*
Flavonoidi				
Afilantozid	-	-	-	+
Apigenin	+	+*	+*	+*
Apigenin 7-*O*-glukozid	+*	t*	t	t*
Apigenin 7-*O*-glukuronid	+*	t*	t*	t*
Demetoksicentaureidin 7-*O*-heksozilglukozid	-	+*	+*	-
6-Hidroksikrizoeriol 7-*O*-alozilglukozid	t*	+*	+*	t*
6-Hidroksikrizoeriol 7-*O*-glukozid	-	t*	+*	-
6-Hidroksiluteolin 7-*O*-diglukozid	+	-	-	+
6-Hidroksiluteolin 7-*O*-glukozid	+	+	+*	+*
6-Hidroksiluteolin 7-*O*-(6'''-*O*-kafeoil)-soforozid	-	-	-	+
6-Hidroksiluteolin 7-*O*-(6'''-*O*-*p*-kumaroil)-soforozid	-	-	-	+
Izokvercitrin	t	t*	t*	+
Luteolin	-	-	-	+*
Luteolin 7-*O*-glukozid	+	+*	+*	+*
Pektolinarigenin 7-*O*-heksozilglukozid	-	t*	+*	-
Skutelarein 7-*O*-glukozid	t*	t*	t*	-
Skutelarein 4'-metil eter 7-*O*-diglukozid	t*	t*	t*	-
Vicenin-2	+*	t*	t*	t*
Ostali polarni spojevi				
Feruloilglukozid (izomer 1)	+*	t*	t*	t*
Feruloilglukozid (izomer 2)	+*	t*	+*	+*
Globularitol	+	+*	+*	t*
Hebitol II	t	t*	t*	+*
Kafeoilglukozid (izomer 1)	+	+*	+*	+*
Kafeoilglukozid (izomer 2)	+	+*	+*	+*
Kina kiselina	-	+*	+*	+*
p-Kumaroilglukozid (izomer 1)	+	+*	+*	+*
p-Kumaroilglukozid (izomer 2)	t	t*	t*	+*
Liriodendrin	+	-	-	-
Manitol	+	+*	+*	+*
Saharoza	+	+*	+*	+*
Ostali nepolarni spojevi				
Okso-dihidroksi-oktadecenoična kiselina	+*	+*	+*	+*
Trihidroksi-oktadecenoična kiselina	+*	+*	+*	+*

Ga – *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013), *Gc* – *G. cordifolia* (Alan, 2013), *Gm* – *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013), *Gp* – *G. punctata* (Grobničko polje, 2013); + – spoj je detektiran (dobivena je MS/MS fragmentacija); t – spoj je prisutan u tragovima (MS/MS fragmentacija nije dobivena); - – spoj nije detektiran; * – naznačeni spoj zabilježen je za ovu vrstu po prvi puta

Spoj **35** (*m/z* 787, AMK) zabilježen je samo kod vrste *G. alypum*. Glavni fragmenti dobiveni u MS^2 bili su prisutni pri *m/z* 579 (-208 Da) i 741 (-46 Da), zajedno s fragmentom manjeg relativnog intenziteta pri *m/z* 417 (-370 Da), a ukazivali su na to da ovaj spoj stvara adukte s mravljom kiselinom u MS^1. Pregled spojeva koji su bili prethodno izolirani iz vrste *G. alypum* ukazao je na to da bi ovaj spoj mogao biti lignanski diglukozid liriodendrin (Chaudhuri i Sticher, 1981), koji je također nađen i kod vrste *G. trichosantha* (Çaliş i sur., 2001).

Ostali nepolarni spojevi

Spojevi **84** (*m/z* 327) i **85** (*m/z* 329) pokazali su sličan obrazac MS/MS fragmentacije s glavnim fragmentima pri *m/z* 229, 211 i 183 redom u MS^2, MS^3, odnosno MS^4, a bili su prisutni u svim uzorcima. Okvirno su identificirani u usporedbi s literaturnim podacima kao oksilipini, oksidacijski produkti masnih kiselina: okso-dihidroksi-oktadecenoična kiselina i trihidroksi-oktadecenoična kiselina (Llorent-Martinez i sur., 2015).

Značajke masenih spektara prvog reda i MS/MS fragmentacije identificiranih skupina spojeva pri negativnom načinu rada

Iridoidi i bisiridoidi

Kod mnogih iridoida i bisiridoida, isključujući iridoide s karboksilnom skupinom u položaju *C*-4 i uobičajenom dvostrukom vezom *C*-7-*C*-8, kao glavni ion u MS^1 uočen je adukt mravlje kiseline $[M-H+46]^-$, kao što je i ranije zabilježeno (Ren i sur., 2007; Li i sur., 2008). Kod iridoida s *C*-4-karboksilnom skupinom i manje uobičajenom dvostrukom vezom *C*-8-*C*-9 (derivata alpinozida) uočena je istovremena prisutnost molekulskog iona i adukta mravlje kiseline visokog relativnog intenziteta. Stvaranje adukata ovisi o brojnim čimbenicima, uključujući koncentraciju sastavnica i aditiva, strukturu sastavnica, parametre uređaja i druge (Chowdhury i sur., 1990; Zhu i Cole, 2001; Ren i sur., 2007; Li i sur., 2008). Iako obilno stvaranje adukata s mravljom kiselinom nije ograničeno samo na iridoide, kao što je primijećeno u ovom radu (liriodendrin), ali i u prethodnim istraživanjima (Moco i sur., 2006), važno je napomenuti da je opažanje navedenih adukata u ovom istraživanju olakšalo raspoznavanje iridoidnih sastavnica. Ovisno o prethodno navedenim čimbenicima, ova pojava može, ali i ne mora biti primijećena u drugim istraživanjima. Ipak, navedenu mogućnost moglo bi biti korisno uzeti u obzir prilikom analize složenih smjesa biljnih metabolita u kojima se očekuje prisutnost iridoida. Kod iridoida je također primijećeno stvaranje $[M+97]^-$ i $[M+35/37]^-$ adukata manje relativne zastupljenosti. Prvi su okvirno identificirani kao adukti sa

sumpornom kiselinom (hidrogensulfatima)/fosfatnom kiselinom (dihidrogenfosfatima), kao što je navedeno u ranijim istraživanjima (Chowdhury i sur., 1990; Harvey, 2005), a drugi kao adukti s kloridima (Zhu i Cole, 2001). Njihov izvor mogao bi biti sam biljni materijal (Rouached, 2011), odnosno otapala korištena u pripremi otopina uzoraka i standarada i/ili otapala korištena za razdvajanje sastavnica ekstrakata (prema navedenim anionskim onečišćenjima na oznakama otapala). Navedenim bi se mogla objasniti i relativno veća zastupljenost $[M+^{35}Cl]^-$ i $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ adukata uočena prilikom prethodnog određivanja sadržaja aukubina i katalpola, koja je bila provedena na drugom instrumentu, pri drugim uvjetima razdvajanja te uz primjenu otapala koja nisu bila LC-MS čistoće. Prisutni adukti mogli bi, također, biti posljedica onečišćenja zaostalih u korištenom sustavu, što podupire i činjenica da je nekoliko adukata manjeg intenziteta, koji bi se mogli pripisati polarnim sastavnicama uzoraka, bilo prisutno i u uzorcima i u standardima, imajući na umu da su uzorci bili analizirani prije standarada. Oni su okvirno identificirani kao: +130 Da $[M-H+(\text{kina kiselina}-CO_2-H_2O)]^-$, +182 Da [M-H+manitol]$^-$, +216 Da $[M-H+(\text{manitol}-H+^{35}Cl)]^-$ i +262 Da $[M-H+(\text{manitol}-H+^{35}Cl+HCOOH)]^-$. Pri tome je kombinacija prva dva navedena adukta uglavnom bila primijećena zajedno s trećim aduktom i dimernim ionom $[2M-H]^-$ kod iridoida karboksiliranih u položaju *C*-4 te zajedno s trećim i/ili četvrtim aduktom kod derivata asperulozida, iridoida aciliranih u položaju *C*-6 i iridoida koji u položaju *C*-8/*C*-10 ne sadrže hidroksilnu skupinu. Adukti +262 Da bili su također obično prisutni kod iridoida koji su u MS^1 stvarali dominantne adukte s mravljom kiselinom.

Glavni MS/MS fragmentacijski put iridoida uključivao je sljedeće korake: gubitak mravlje kiseline (ukoliko je bila vezana u MS^1), gubitak šećernog dijela molekule (veliki pik aglikonskog iona) i gubitak vode i/ili CH_2O, kod jednostavnih glukozida iridoida. Gubitak vode primijećen je u MS^4 iridoida sa *C*-6-hidroksilnom skupinom (katalpol, skandozid, aukubin, monomelitozid, deacetilasperulozid i asperulozidinska kiselina) i onih bez ove skupine (genipozid i deacetilalpinozid). Iz ovog razloga on je pripisan *C*-1-hidroksilnoj skupini, kao što je prethodno opisano (Hong i sur., 2010). Obrnuto, gubitak CH_2O (-30 Da), koji je opažen u MS^4 katalpola, skandozida i aukubina, mogao bi biti povezan s prisutnošću *C*-6-hidroksilne skupine (Hong i sur., 2010) ili *C*-1-hidroksilne skupine, budući da je također primijećen kod deacetilasperulozida. Kod (*epi*)loganinske kiseline i gardozida koji sadrže hidroksilnu skupinu u položaju *C*-7 primijećeno je isto cijepanje u kombinaciji s gubitkom C_2H_4O, odnosno CO_2 (-74 Da). Iznimno, iridoidi hidroksilirani u položaju *C*-5 (derivati monomelitozida) bili su karakterizirani velikim pikom iona glukoze. Istovremeno ili nakon gubitka šećera primijećen je gubitak CO_2 ($+H_2O$) za iridoide karboksilirane u položaju *C*-4.

Gubitak octene ili benzojeve kiseline, kod laktona u kombinaciji s gubitkom anhidroglukoze i CO_2 (Slika 64), imao je prednost kod iridoida esterificiranih s jednom od ovih kiselina. U slučaju laktona (asperulozida i besperulozida) prevladavao je daljnji gubitak CO, koji bi se mogao pripisati položaju *C*-1, a kojeg je pratio manje zastupljeni gubitak 44 Da. Pik dobiven ovim gubitkom mogao bi se pripisati produktnom ionu $^{1,4}X$ ($-C_2H_4O$) (Ren i sur., 2007; Hong i sur., 2010). Isto cijepanje primijećeno je u MS^3 genipozida (-102 Da)/MS^4 drugih iridoida (skandozida, aukubina, monomelitozida, deacetilalpinozida i (*epi*)loganinske kiseline). 10-*O*-cinamoilirani glukozidi iridoida i oni acilirani u položaju *C*-6 bili su obilježeni gubitkom cimetne kiseline ili gubitkom iridoidnog dijela molekule, nakon kojeg je slijedio gubitak vode iz preostalog iridoidnog dijela, odnosno dekarboksilacija fenolne kiseline. Cijepanje esterske veze prevladavalo je kod bisiridoida.

Feniletanoidi

Kod svih feniletanoida uočeno je stvaranje hidrogensulfatnih/dihidrogenfosfatnih adukata relativno male zastupljenosti. Kloridni adukti bili su uglavnom prisutni kod feniletanoida koji su acilirani u položaju *C*-4 središnje glukoze, dok su rjeđe uočeni kod feniletanoida aciliranih u položaju *C*-6. Dimerni ioni i drugi adukti (+46 Da, +130 Da i +182 Da), uočeni su samo kod pojedinih spojeva iz ove skupine.

Karakteristična MS/MS fragmentacija aciliranih feniletanoida uključivala je sljedeće korake: gubitak acilne skupine (anhidrokavene, anhidro-*p*-kumarinske i anhidroferulinske kiseline), gubitak anhidroramnoze te gubitak glukoze kod spojeva s dva šećera u strukturi (glukoza i ramnoza) ili gubitak acilne skupine nakon kojeg je slijedio postepeni gubitak anhidrošećera kod spojeva s tri ili četiri šećera u strukturi. Preostali ion hidroksitirozol glukozida zatim je izgubio glukozu (pretežito) ili hidroksitirozilnu skupinu (Slika 67). Podaci upućuju na to da je kod feniletanoida s četiri šećera, kod kojih je jedan šećer bio vezan na ramnozu (vanjski šećer), a drugi na središnju glukozu (trihosantozid B), bilo povoljnije cijepanje vanjskog šećera. Na ovo su ukazivali karakteristični manji fragmenti koji se mogu pripisati gubitku (anhidro)ramnozilksiloze (*m/z* 429 i 447) (Slika 66). Feniletanoide s tri šećera i dodatnom acilnom skupinom vezanom na vanjskom šećeru, kakav je primjerice globusintenozid, obilježio je uzastopni gubitak dvije acilne skupine (prvo vanjske acilne skupine, pa zatim acilne skupine vezane na središnju glukozu), nakon kojeg je slijedio gubitak vanjske glukoze. Manji fragment pri *m/z* 443 (relativne zastupljenosti oko 10), koji je dobiven cijepanjem cijelog šećera, ukazivao je na to da mjesto njegovo vezanja nije na središnjoj glukozi, već na ramnozilnom dijelu molekule. Feniletanoid s dodatnom kafeoilnom skupinom

vezanom na središnjoj glukozi razlikovao se od onih s dodatnom glukozom na temelju velikog pomaka unatrag u vremenu zadržavanja na koloni (više od 10 min). Slično, glavni pomak unaprijed u vremenu zadržavanja (približno 15 min) mogao se uočiti za deacetilirani spoj (usporedba dekafeoilverbaskozida i verbaskozida).

Flavonoidi

Dimerni ioni te adukti $[M+97]^-$ i $[M-H+130]^-$ relativno male zastupljenosti bili su prisutni kod većine flavonoidnih glikozida. Također, kod mnogih su spojeva iz ove skupine uočeni i adukti $[M+35/37]^-$, dok su adukti $[M-H+46]^-$, $[M-H+182]^-$ i $[M-H+262]^-$, kao i trimerni ioni $[3M-H]^-$ relativno male zastupljenosti bili samo povremeno prisutni.

Karakteristični obrazac MS/MS fragmentacije flavonoida uključivao je gubitak acilnog dijela molekule (anhidrokavene, anhidro-*p*-kumarinske i benzojeve kiseline), u slučaju njegove prisutnosti, iza kojeg je slijedio gubitak *O*-vezanog šećernog dijela (gubitak 324/308 Da za diheksozide) i gubitak vode (Slika 69). Gubitak 162 Da (ili 176 Da) kod *O*-monoglikoziliranih flavonoida kojim su nastali produktni ioni aglikona bio je kod flavona praćen gubitkom CO_2. U slučaju flavonola i 6-hidroksiliranih flavonskih glikozida (Slika 68), stvaranje normalnog produktnog iona aglikona bilo je popraćeno stvaranjem produktnog radikal iona aglikona manje relativne zastupljenosti. Nastanak navedenih radikala kod *O*-glikoziliranih flavonoida prethodno je opisan, a objašnjava se homolitičkim cijepanjem (Cuyckens i Claeys, 2004). Primijećeno je da je za 6-hidroksilirane flavone karakterističan gubitak vode (i CO) (Slika 69), a za metilirane flavone gubitak CH_3. Za dimetilirane diheksozide flavona prvo je uočen gubitak 338 Da (324 + 14 Da), a zatim gubitak dodatne metilne skupine (-15 Da). Karakteristična MS/MS fragmentacija koja je ukazivala na cijepanje prstena u šećernom dijelu molekule također je omogućila okvirnu identifikaciju *C*-6-*C*-8-diglikoziliranog flavona (Cuyckens i Claeys, 2004). Aglikoni flavonola i flavanona bili su karakterizirani obilnim ionima $^{1,2}A^-$ i/ili $^{1,3}A^-$, što je u skladu s ranijim istraživanjima (Fabre i sur., 2001). Obrnuto, ioni $^{1,3}A^-$ (*m/z* 151) manjeg relativnog intenziteta (Tablica XXV) primijećeni su kod aglikona flavona apigenina i luteolina, dok kod 6-hidroksiluteolina nisu bili primijećeni (Tablica XXVI). Fragmentacija ovih flavona bila je karakterizirana kombinacijom specifičnog redoslijeda neutralnih gubitaka H_2O (-18 Da), CO (-28 Da), CO_2 (-44 Da) i H_2CCO (-42 Da), kao što je prethodno opisano (Cuyckens i Claeys, 2004). Nakon usporedbe fragmentacijskih puteva različitih standarada flavonoida, ovi gubici mogli su se pripisati specifičnim dijelovima strukture flavona. Mjesta cijepanja prikazuje Slika 69 na primjeru 6-hidroksiluteolin 7-*O*-(6’’’-*O*-kafeoil)-soforozida. Većinski

gubitak vode iz deprotoniranog aglikona (*m/z* 301), uočen u MS^4 (*m/z* 283), pripisan je hidroksilnoj skupini na položaju *C*-6 (prsten A), budući da se struktura ovog spoja njome razlikovala i od apigenina i od luteolina. Predloženi gubitak dodatne vode iz deprotoniranog aglikona u kombinaciji s dvije molekule CO i jednom molekulom CO_2 (*m/z* 165) ili tri CO i CO_2 (*m/z* 137) podržava maseni spektar četvrtog reda 6-hidroksiluteolin 7-*O*-glukozida (Tablica XXVI). Glavni fragment u navedenom spektru, koji je dobiven od dehidriranog ionskog fragmenta prisutnog pri *m/z* 283 bio je rezultat gubitka molekule CO (*m/z* 255), dok su se manji fragmenti mogli pripisati istovremenom gubitku CO i H_2O (-46 Da) i dva CO (-56 Da). U masenom spektru trećeg reda luteolin 7-*O*-glukozida (*m/z* 285), od aglikonskog iona dobiven je manji dehidrirani ionski fragment (*m/z* 267) (Tablica XXVI). Imajući na umu da ovakva fragmentacija nije uočena za apigenin, dodatni gubitak vode pripisan je *C*-3'-hidroksilnoj skupini (prsten B). Posljedično su gubici tri CO pripisani ostalim hidroksiliranim *C*-atomima (*C*-7, *C*-5 i *C*-4'). Gubitak 44 Da pripisan je pucanju prstena C ($-CO_2$), budući da je opažen i u MS^3 flavonola kvercetina i kempferola i flavanona eriodiktiola (Tablica XXV). Gubitak CO_2 uočen je kao pojedinačan (*m/z* 257) i u kombinaciji s H_2O (*m/z* 239), CO (*m/z* 229), H_2O i CO (*m/z* 211), dva CO (*m/z* 201), dva H_2O i dva CO (*m/z* 165), dva H_2O i tri CO (*m/z* 137). S obzirom na uočene kombinacije, gubitak CO nije pripisan oslobađanju iz prstena C, kao što je prethodno opisano (Fabre i sur., 2001). U konačnici, manji fragment pri *m/z* 192 mogao se pripisati odvajanju prstena B (-109 Da), koje je također primijećeno u masenom spektru drugog reda luteolina (-110 Da) (Tablica XXV).

Ostali polarni spojevi

U slučaju polarnih ugljikohidrata, u MS^1 manitola i saharoze bili su obilno prisutni kloridni adukti, dok su kod ostalih spojeva često uočeni adukti +98 Da i +130 Da relativno manje zastupljenosti. Adukt mravlje kiseline bio je glavni ion prisutan u MS^1 lignanskog diglukozida liriodendrina, dok je u slučaju drugih polarnih spojeva bio samo povremeno prisutan kao ion male relativne zastupljenosti. Za ugljikohidratne estere bio je uobičajen cjeloviti ili postepeni gubitak glikozidnog dijela molekule.

Ostali nepolarni spojevi

Oksidacijski produkti masnih kiselina dali su brojne adukte male relativne zastupljenosti u MS^1, poput +36 Da, +98 Da, +130 Da, +182 Da i +216 Da. Karakterizirala ih je prisutnost glavnih fragmentnih iona pri *m/z* 229, 211 i 183 redom u MS^2, MS^3 i MS^4.*

* – poglavlje sadrži objavljene rezultate (Friščić i sur., 2016) – vidi pod 7. Prilozi

4.2.3.2. Metanolni ekstrakti nadzemnih dijelova dobiveni ultrazvučnom ekstrakcijom

Sastav ultrazvučnom ekstrakcijom dobivenih metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013), *G. cordifolia* (Alan, 2013), *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013) i *G. punctata* (Grobničko polje, 2013) međusobno je uspoređen primjenom tankoslojne kromatografije na aluminijskim TLC silikagel 60 F_{254} pločama uz različite pokretne faze za koje se prethodno pokazalo da uspješno razdvajaju neke od njihovih glavnih sastavnica, kao što su glikozidi iridoida i feniletanoida (etil acetat-metanol-voda (20:2:1, *V*/*V*/*V*) (sustav 1) i kloroform-metanol-voda (61:32:7, *V*/*V*/*V*) (sustav 2) (Kirmizibekmez i sur., 2008)), odnosno flavonoida (etil acetat-etil metil keton-mravlja kiselina-voda (5:3:1:1, *V*/*V*/*V*/*V*) (sustav 3) i etil acetat-mravlja kiselina-ledena octena kiselina-voda (100:11:11:26, *V*/*V*/*V*/*V*) (sustav 4) (Wagner i Bladt, 1996)). Detekcija sastavnica provedena je pri dnevnom i UV svjetlu valne duljine 365 i 254 nm nakon prskanja reagensima za detekciju terpenoida (iridoida) i feniletanoida (anisaldehid-sumporna kiselina i vanilin-sumporna kiselina) i zagrijavanja, odnosno prskanja reagensom za detekciju flavonoida i derivata fenolnih kiselina (NP/PEG) (Wagner i Bladt, 1996). Detekcija i identifikacija pojedinih sastavnica ekstrakata provedena je uz usporedbu njihovih boja i R_f vrijednosti s bojom i R_f vrijednostima standardnih tvari, koje su uključivale tri glikozida iridoida, jedan feniletanoid esterificiran s fenolnom kiselinom (verbaskozid) i šest slobodnih aromatskih/fenolnih kiselina te tri glikozida i četiri aglikona flavonoida (Tablica XXVIII).

Bojanje anisaldehidom i vanilinom omogućilo je ponajprije detekciju glavnih iridoidnih sastavnica, čije su se zone jednako obojile uz oba reagensa, a poprimile su različite nijanse smeđe, ljubičaste i plave boje vidljive pod dnevnim svjetlom. Navedeni spojevi nisu bili vidljivi nakon bojanja NP/PEG reagensom, uz iznimku asperulozida (i njemu srodnih iridoida), koji je tek nakon duljeg stajanja ploča na zraku postao vidljiv pod dnevnim svjetlom (sivoljubičasta zona). Primjena UV svjetla valne duljine 365 nm omogućila je i detekciju dominantne tamnoplave zone u uzorcima vrsta *G. alypum* i *G. punctata,* koja se mogla pripisati njihovoj zajedničkoj dominantnoj sastavnici globularinu, esteru katalpola i cimetne kiseline, a bila je najbolje vidljiva u sustavu 2 (R_f = 0,76). Isti spoj dao je s prethodno spomenutim reagensima smeđe obojenje.

Glavni feniletanoidi bili su vidljivi kao žućkaste do sivosmeđe zone nakon prskanja reagensom vanilin-sumporna kiselina, odnosno anisaldehid-sumporna kiselina (dnevno svjetlo), ili kao zone svjetloplave fluorescencije pri UV 365 nm nakon prskanja NP/PEG reagensom, koja je bila usporediva s onom kakvu je dao standard kavene kiseline. Isti standard dao je smeđu zonu s prethodno spomenutim reagensima.

Tablica XXVIII. R_f vrijednosti* i boje** standarada iridoida, flavonoida, aromatskih/fenolnih kiselina i feniletanoida dobivene primjenom tankoslojne kromatografije u različitim sustavima razdvajanja

Naziv spoja	Boja	Sustav 1	Sustav 2	Sustav 3	Sustav 4
Katalpol[a]	smeđa (A/V)	0,10	0,36	0,22	0,23
Aukubin[a]	sivoljubičasta (A/V)	0,11	0,40	0,23	0,24
Rutin[b]	narančastosmeđa (N)	0,19	0,40	0,42	0,46
Asperulozid[a]	sivoplava (A/V) sivoljubičasta (N_v)	0,26	0,71	0,44	0,43
Klorogenska kiselina[c]	svjetloplava (N)	n.i.	n.i.	0,68	0,63
Luteolin 7-*O*-glukozid[b]	žutonarančasta (N)	0,36	0,56	0,64	0,66
Verbaskozid[d]	sivosmeđa/žuta (A/V) svjetloplava (N)	0,37	0,43	0,70	0,67
Apigenin 7-*O*-glukozid[b]	žutozelena (N)	0,43	0,69	0,70	0,71
p-Kumarinska kiselina[c]	tamnoplava (N)	n.i.	n.i.	0,95	0,94
Cimetna kiselina[c]	siva (N)	n.i.	n.i.	0,95	0,96
Kavena kiselina[c]	smeđa (A) svjetloplava (N)	n.i.	n.i.	0,96	0,96
Luteolin[b]	žutozelena (N)	0,66	0,79	0,98	0,96
Kvercetin[b]	svjetlonarančasta (V) narančasta (N)	0,89	0,84	0,97	0,96
Galna kiselina[c]	sivoplava (N)	n.i.	n.i.	0,96	0,97
Ferulinska kiselina[c]	modra (N)	n.i.	n.i.	0,97	0,98
Apigenin[b]	žutozelena (N)	0,88	0,87	0,99	0,96
Kempferol[b]	svjetlonarančasta (V) plavozelena (N)	0,90	0,95	0,99	0,97

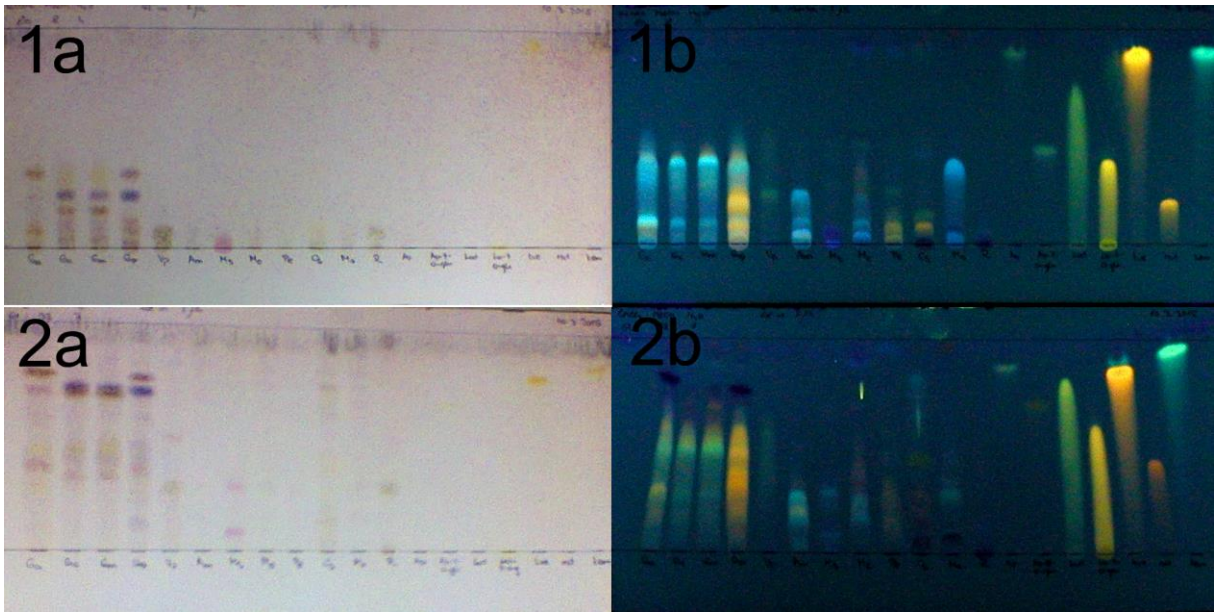
* – vrijednosti su dobivene razdvajanjem sastavnica na aluminijskim TLC silikagel 60 F_{254} pločama (moguće varijacije za (0,01) 0,03–0,07 (0,15) s obzirom na razlike u visini startne linije, stupnju zasićenosti komore, temperaturi i vlažnosti zraka, debljini sloja silikagela, koncentraciji i položaju uzoraka na ploči te drugim čimbenicima); ** – moguće varijacije u nijansi s obzirom na razlike u primijenjenoj količini reagensa za detekciju, temperaturi i dužini zagrijavanja ploča, vremenu očitavanja rezultata, koncentraciji sastavnica i njihovom preklapanju s drugim sastavnicama uzoraka te drugim čimbenicima; Sustav 1 – etil acetat-metanol-voda (20:2:1, *V*/*V*/*V*); Sustav 2 – kloroform-metanol-voda (61:32:7, *V*/*V*/*V*); Sustav 3 – etil acetat-etil metil keton-mravlja kiselina-voda (5:3:1:1, *V*/*V*/*V*/*V*); Sustav 4 – etil acetat-mravlja kiselina-ledena octena kiselina-voda (100:11:11:26, *V*/*V*/*V*/*V*); [a] – iridoid; [b] – flavonoid; [c] – aromatska/fenolna kiselina; [d] – feniletanoid; A – detekcija pri dnevnom svjetlu nakon prskanja reagensom anisaldehid-sumporna kiselina; N – detekcija pri UV 365 nm nakon prskanja reagensom NP/PEG; N_v – detekcija pri dnevnom svjetlu nakon prskanja reagensom NP/PEG; V – detekcija pri dnevnom svjetlu nakon prskanja reagensom vanilin-sumporna kiselina; n.i. – nije ispitano

Neki flavonoidi, primjerice flavonoli kvercetin i kempferol, bili su slabo vidljivi s reagensom za detekciju terpenoida (svjetlonarančaste zone). S druge strane, prskanje sa

specifičnim reagensom za detekciju flavonoida (NP/PEG) dalo je zone intenzivne žutozelene do žutonarančaste (flavoni), odnosno narančaste i plavozelene fluorescencije (flavonoli) pri UV 365 nm (žućkaste pri dnevnom svjetlu). Za razliku od zona iridoida koje nakon reakcije sa specifičnim reagensima ostaju vidljive i nakon dužeg stajanja na zraku (uz moguću promjenu boje), navedena fluorescencija flavonoida i fenolnih kiselina smanjivala se s vremenom (svjetloplava boja postaje žutozelena). Dominantne sastavnice ekstrakata bilo je moguće uočiti i primjenom UV svjetla valne duljine 254 nm kao zone gašenja fluorescencije, zahvaljujući prisutnosti dvostrukih veza u njihovim strukturama (Wagner i Bladt, 1996).

Na Slici 70 vidljive su glavne sastavnice metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova istraživanih vrsta dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom. Izraženije zone svjetloplave fluorescencije kod vrste *G. alypum*, odnosno narančaste fluorescencije kod vrste *G. punctata* moguće je povezati s njihovim karakterističnim spojevima, feniletanoidima derivatima kavene kiseline, odnosno flavonoidima derivatima 6-hidroksiluteolina, koji su identificirani na temelju analize tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti spregnutom s masenom detekcijom. Prisutnost navedenih spojeva objašnjava i rezultate dobivene kvantifikacijom sekundarnih metabolita, u pravilu veći sadržaj ukupnih fenola kod vrste *G. alypum* i veći sadržaj flavonoida kod vrste *G. punctata* u usporedbi s ostalim istraživanim vrstama. Fitokemijski profili vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* nisu se međusobno značajno razlikovali kao ni u slučaju primjene tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnute s masenom detekcijom. Na istoj je slici moguće uočiti i složenost kemijskog sastava vrsta roda *Globularia* u usporedbi s nekim ljekovitim biljnim vrstama (Slika 70).

U usporedbi sa standardima, kod vrste *G. alypum* zabilježena je prisutnost katalpola, luteolin 7-*O*-glukozida (u tragovima), verbaskozida, apigenin 7-*O*-glukozida i apigenina. Vrste *G. cordifolia* i *G. meridionalis* pokazale su prisutnost aukubina, asperulozida, luteolin 7-*O*-glukozida (u tragovima), verbaskozida, apigenin 7-*O*-glukozida i apigenina. Kod vrste *G. puncata* detektirane su zone koje odgovaraju onima standarda rutina, katalpola, asperulozida, luteolin 7-*O*-glukozida, apigenin 7-*O*-glukozida i apigenina. Pri tome su zone identificiranih flavonoida bile slabije izražene u usporedbi s drugim zonama. Iako većina rezultata odgovara rezultatima dobivenim primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnute s masenom detekcijom, prisutnost veće količine rutina, na koju su ukazivali rezultati tankoslojne kromatografije, nije utvrđena prethodnom metodom, što ukazuje na jedno od mogućih ograničenja tankoslojne kromatografije kod identifikacije pojedinačnih sastavnica. Unatoč tome, dobiveni rezultati pokazali su da se navedena tehnika može primijeniti za brzu fitokemijsku karakterizaciju istraživanih vrsta roda *Globularia*.



Slika 70. TLC kromatogram ultrazvučnom ekstrakcijom dobivenih metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova odabranih populacija istraživanih vrsta roda *Globularia* i osam poredbenih ljekovitih biljnih vrsta (sustav 1, sustav 2):

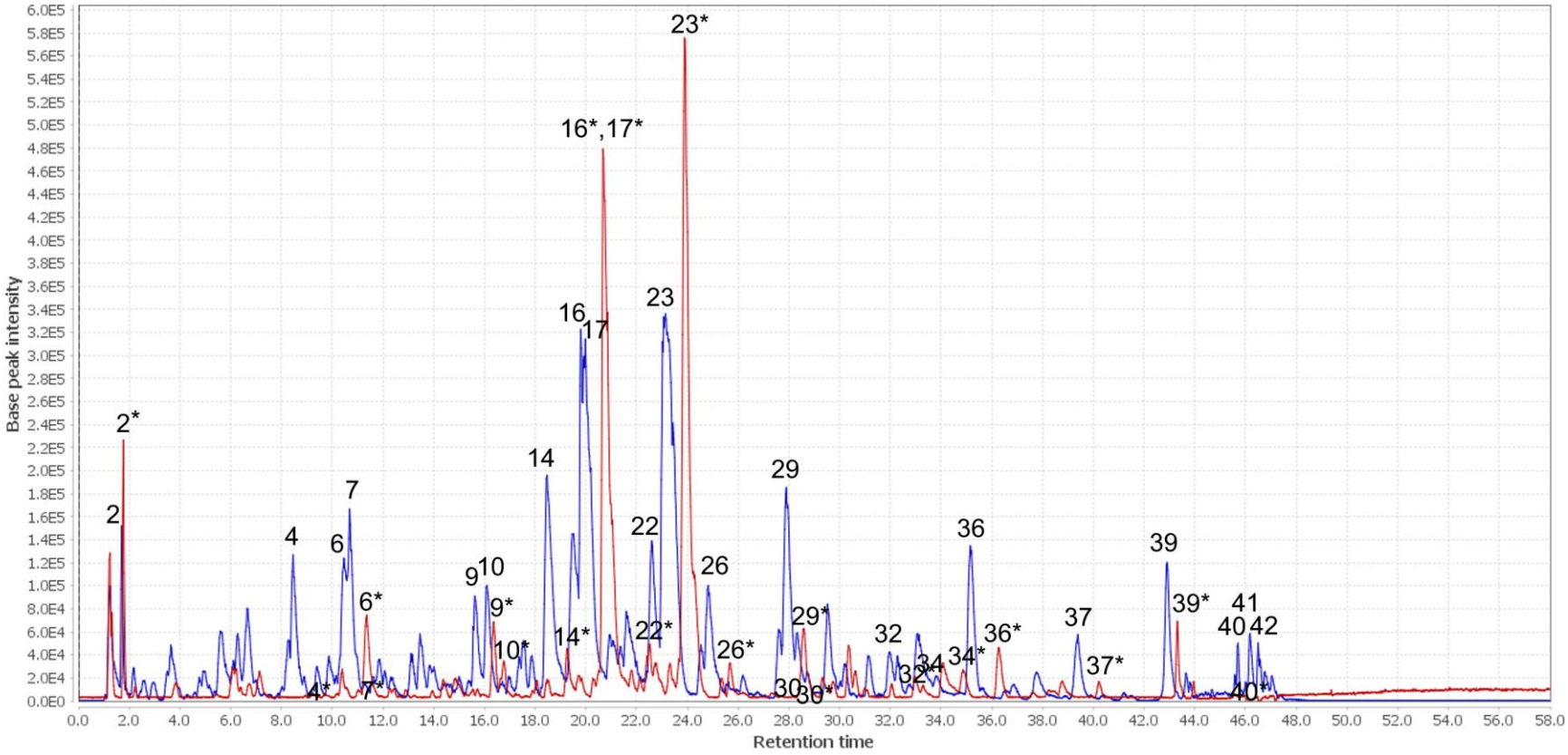
Nepokretna faza:	TLC silikagel 60 F_{254} ploče (aluminijske)
Pokretna faza:	etil acetat-metanol-voda (20:2:1, *V*/*V*/*V*) (1a, 1b)
	kloroform-metanol-voda (61:32:7, *V*/*V*/*V*) (2a, 2b)
Detekcija:	anisaldehid-sumporna kiselina, 100-105 °C, dnevno svjetlo (1a, 2a)
	NP/PEG, dnevno svjetlo (1b, 2b)
Uzorci:	*Ga* – *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013), *Gc* – *G. cordifolia* (Alan, 2013), *Gm* – *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013), *Gp* – *G. punctata* (Grobničko polje, 2013)
Poredbene biljke:	*Vp* – *Verbascum* sp. (cvijet), *Am* – *Achillea millefolium* L. (zelen), *Ms* – *Malva sylvestris* L. (cvijet), *Mc* – *Matricaria chamomilla* L. (cvijet), *Pe* – *Primula elatior* L. (cvijet), *Cs* – *Cassia senna* L. (list), *Mo* – *Melissa officinalis* L. (list), *Rc* – *Rosa canina* L. (plod)
Referentni standardi:	apigenin, apigenin 7-*O*-glukozid, luteolin, luteolin 7-*O*-glukozid, kvercetin, rutin, kempferol

4.2.3.3. Metanolni ekstrakti nadzemnih dijelova dobiveni maceracijom

Usporedba HPLC-MS kromatograma baznih pikova ekstrakata nadzemnih dijelova vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene, 2015), *G. cordifolia* (Alan, 2015), *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2015) i *G. punctata* (Grobničko polje, 2015) dobivenih maceracijom s ekstraktima dobivenim dekokcijom ukazala je na prisutnost veće količine pojedinih sastavnica koje su u dekoktima bile manje zastupljene ili prisutne tek u tragovima, što je bilo posebno izraženo kod vrste *G. alypum* (Slika 71). Macerat ove vrste sadržavao je iste glavne sastavnice kao i dekokt, pri čemu veću količinu mnogih iridoida (verminozida, genipozida, alpinozida, globularinina, globulariozida, globulozida A), feniletanoida (kalceolariozida A, 6′-*O*-feruloil-1′-*O*-hidroksitirozil glukozida, izomera globusintenozida), oksidacijskih produkata masnih kiselina i liriodendrina. Dekokt vrste *G. alypum* sadržavao je veću količinu njezinog najzastupljenijeg iridoida globularina te feniletanoida verbaskozida i rozikazida A. Navedeni rezultati objašnjavaju rezultate kvantifikacije sekundarnih metabolita koji su pokazali da su macerati vrste *G. alypum* bogatiji fenolnim spojevima od macerata ostalih istraživanih vrsta, dok dekokti ove vrste sadrže manje fenola u usporedbi s drugim vrstama. U ove fenole mogli bi se ubrojiti prethodno spomenuti karakteristični feniletanoidi i esteri fenolnih kiselina.

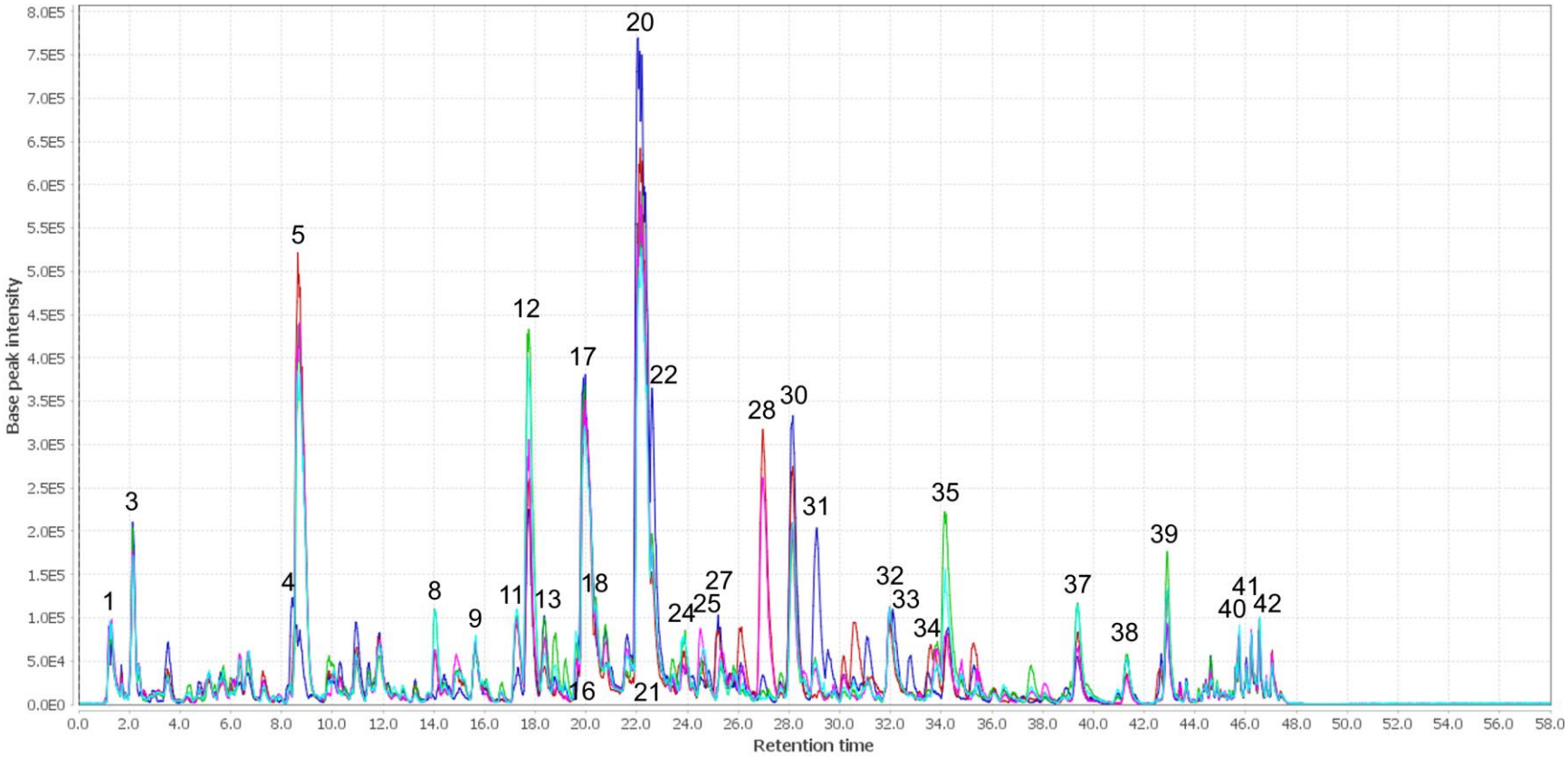
U dekoktima vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* zabilježen je veći udio globularifolina i verbaskozida (Slika 72 i 73), dok su ostale sastavnice bile u pravilu snižene u usporedbi s maceratima (primjerice alpinozid, izomer globusintenozida, izomer benzoilrozikazida A i oksidacijski produkti masnih kiselina), doduše, u manjoj mjeri nego kod uzoraka vrste *G. alypum*. Dekokt vrste *G. punctata* sadržavao je, također, u većoj količini od macerata, svoje dominantne sastavnice: asperulozid, verbaskozid, trihosantozid A i B, globularin te besperulozid (Slika 74). U maceratima navedene vrste povišeni su pak bili spojevi poput alpinozida, apigenina i oksidacijskih produkata masnih kiselina.

U usporedbu sastavnica macerata uključeno je uz prethodno spomenute uzorke još dodatnih 11 uzoraka, koji su uključivali četiri populacije vrste *G. cordifolia*, tri vrste *G. meridionalis* i četiri vrste *G. punctata*, prvenstveno u cilju pronalaska kemotaksonomskih biljega koji bi omogućili lakše raspoznavanje između vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*, budući da prilikom usporedbe ekstrakata dobivenih dekokcijom nisu bile uočene značajne fitokemijske razlike između ove dvije vrste. Veći broj uzoraka treće vrste (*G. punctata*) služio je kao kontrola moguće varijabilnosti kemijskog sastava unutar vrsta, dok je priprema ekstrakata maceracijom odabrana s pretpostavkom da će sastav na ovaj način pripremljenih ekstrakata vjernije prikazati karakteristične sastavnice svake od triju vrsta s obzirom na smanjenu mogućnost razgradnje termolabilnih spojeva u usporedbi s dekokcijom.



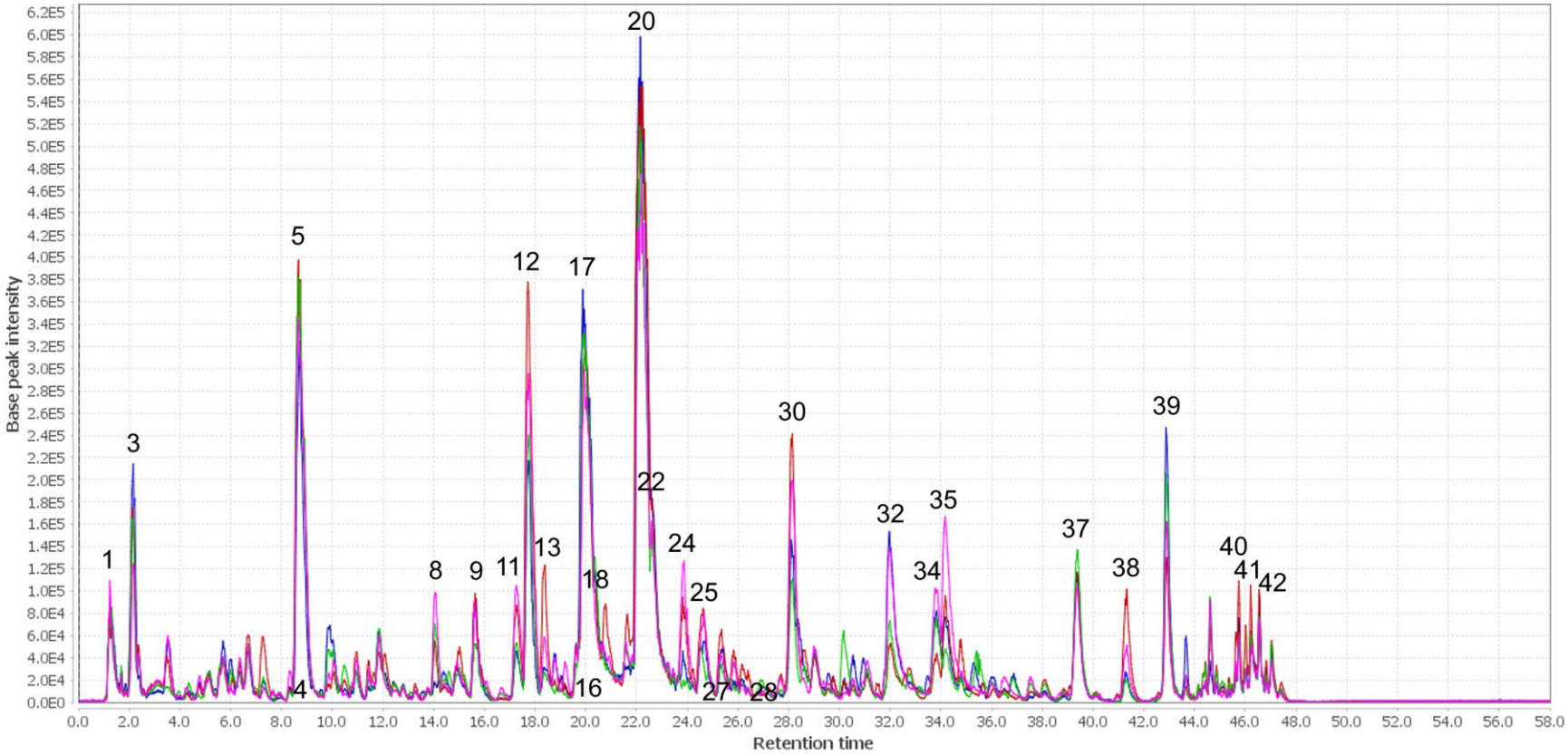
Slika 71. Preklopljeni HPLC-MS kromatogrami baznih pikova metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova vrste *G. alypum* (Konavoske stijene, 2015) dobivenih maceracijom (plavo) i dekokcijom (crveno), pri negativnom načinu rada; brojevi odgovaraju spojevima koji su navedeni u Tablici XXX:

***** – označava sastavnice dekokta; **2** – katalpol, **4** – nepoznati spoj (*m/z* 305), **6** – verminozid, **7** – genipozid, **9** – alpinozid, **10** – globularinin, **14** – kalceolariozid A, **16** – rozikazid A, **17** – verbaskozid, **22** – izoverbaskozid, **23** – globularin, **26** – 6′-*O*-feruloil-1′-*O*-hidroksitirozil glukozid, **29** – globulariozid, **30** – nepoznati spoj (*m/z* 467), **32** – globusintenozid izomer, **34** – apigenin, **36** – globulozid A, **37** – okso-dihidroksi-oktadecenoična kiselina, **39** – trihidroksi-oktadecenoična kiselina, **40** – nepoznati spoj (*m/z* 577), **41** – nepoznati spoj (*m/z* 721), **42** – nepoznati spoj (*m/z* 555)



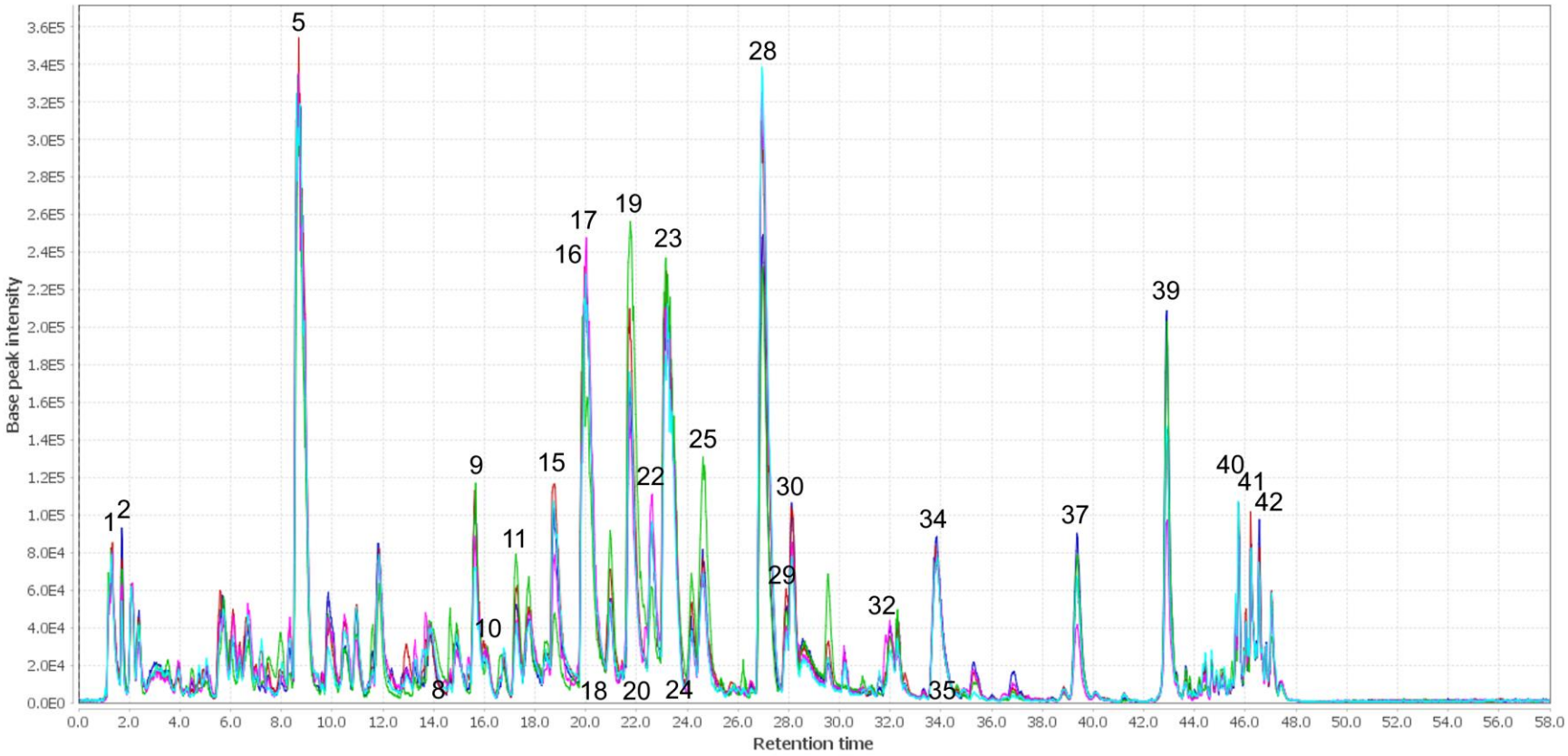
Slika 72. Preklopljeni HPLC-MS kromatogrami baznih pikova metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova istraživanih populacija vrste *G. cordifolia* (plavo – Mostar, 2015, crveno – Biokovo, 2015, zeleno – Alan, 2015, ružičasto – Šestanovac, 2015, svjetloplavo – Baške Oštarije, 2015) dobivenih maceracijom, pri negativnom načinu rada; brojevi odgovaraju spojevima koji su navedeni u Tablici XXX:

1 – kina kiselina, **3** – monomelitozid, **4** – nepoznati spoj (*m/z* 305), **5** – asperulozid, **8** – 6'-*O*-benzoildeacetilasperulozidinska kiselina glukozid, **9** – alpinozid, **11** – 6'-*O*-benzoildeacetilasperulozidinska kiselina, **12** – 6'-*O*-benzoilmonomelitozid, **13** – 6'-*O*-benzoildeacetilalpinozid glukozid[c], **16** – rozikazid A, **17** – verbaskozid, **18** – metoksiverbaskozid, **20** – globularifolin, **21** – melampirozid, **22** – izoverbaskozid, **24** – 6'-*O*-benzoildeacetilalpinozid, **25** – 10-*O*-*p*-kumaroildeacetilasperulozid, **27** – leukoskeptozid A, **28** – besperulozid, **30** – nepoznati spoj (*m/z* 467), **31** – 10-*O*-cinamoilmonomelitozid, **32** – globusintenozid izomer, **33** – nepoznati spoj (*m/z* 667), **34** – apigenin, **35** – benzoilrozikazid A izomer, **37** – okso-dihidroksi-oktadecenoična kiselina, **38** – nepoznati spoj (*m/z* 615), **39** – trihidroksi-oktadecenoična kiselina, **40** – nepoznati spoj (*m/z* 577), **41** – nepoznati spoj (*m/z* 721), **42** – nepoznati spoj (*m/z* 555)



Slika 73. Preklopljeni HPLC-MS kromatogrami baznih pikova metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova istraživanih populacija vrste *G. meridionalis* (plavo – Grobničko polje, 2015, crveno – Učka, 2015, zeleno – Dinara, 2015, ružičasto – Baške Oštarije, 2015) dobivenih maceracijom, pri negativnom načinu rada; brojevi odgovaraju spojevima koji su navedeni u Tablici XXX:

1 – kina kiselina, **3** – monomelitozid, **4** – nepoznati spoj (*m/z* 305), **5** – asperulozid, **8** – 6'-*O*-benzoildeacetilasperulozidinska kiselina glukozid, **9** – alpinozid, **11** – 6'-*O*-benzoildeacetilasperulozidinska kiselina, **12** – 6'-*O*-benzoilmonomelitozid, **13** – 6'-*O*-benzoildeacetilalpinozid glukozid[c], **16** – rozikazid A, **17** – verbaskozid, **18** – metoksiverbaskozid, **20** – globularifolin, **22** – izoverbaskozid, **24** – 6'-*O*-benzoildeacetilalpinozid, **25** – 10-*O*-*p*-kumaroildeacetilasperulozid, **27** – leukoskeptozid A, **28** – besperulozid, **30** – nepoznati spoj (*m/z* 467), **32** – globusintenozid izomer, **34** – apigenin, **35** – benzoilrozikazid A izomer, **37** – okso-dihidroksi-oktadecenoična kiselina, **38** – nepoznati spoj (*m/z* 615), **39** – trihidroksi-oktadecenoična kiselina, **40** – nepoznati spoj (*m/z* 577), **41** – nepoznati spoj (*m/z* 721), **42** – nepoznati spoj (*m/z* 555)



Slika 74. Preklopljeni HPLC-MS kromatogrami baznih pikova metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova istraživanih populacija vrste *G. punctata* (plavo – Grobničko polje, 2015, crveno – Vižintini, 2015, zeleno – Slapnica, 2015, ružičasto – Vugrovec, 2015, svjetloplavo – Dinara, 2015) dobivenih maceracijom, pri negativnom načinu rada; brojevi odgovaraju spojevima koji su navedeni u Tablici XXX:

1 – kina kiselina, **2** – katalpol, **5** – asperulozid, **8** – 6'-*O*-benzoildeacetilasperulozidinska kiselina glukozid, **9** – alpinozid, **10** – globularinin, **11** – 6'-*O*-benzoildeacetilasperulozidinska kiselina, **15** – 6-hidroksiluteolin 7-*O*-(6'''-*O*-kafeoil)-soforozid, **16** – rozikazid A, **17** – verbaskozid, **18** – metoksiverbaskozid, **19** – trihosantozid A, **20** – globularifolin, **22** – izoverbaskozid, **23** – globularin, **24** – 6'-*O*-benzoildeacetilalpinozid, **25** – 10-*O*-*p*-kumaroildeacetilasperulozid, **28** – besperulozid, **29** – globulariozid, **30** – nepoznati spoj (*m/z* 467), **32** – globusintenozid izomer, **34** – apigenin, **35** – benzoilrozikazid A izomer, **37** – okso-dihidroksi-oktadecenoična kiselina, **39** – trihidroksi-oktadecenoična kiselina, **40** – nepoznati spoj (*m/z* 577), **41** – nepoznati spoj (*m/z* 721), **42** – nepoznati spoj (*m/z* 555)

Identifikacija sastavnica

Identifikacija velikog broja sastavnica maceracijom dobivenih ekstrakata vrsta roda *Globularia* temeljila se na usporedbi s prethodno utvrđenim fitokemijskim profilima uzoraka pripremljenih dekokcijom. Identifikacija sastavnica koje nisu bile prethodno identificirane ili su kao karakteristične uočene tek u nekim od novouključenih populacija temeljila se na usporedbi njihove MS/MS fragmentacije s prethodno utvrđenim fragmentacijskim obrascima, u kombinaciji s provjerom njihovih UV spektralnih podataka i literaturnih podataka, odnosno na usporedbi s podacima dobivenim za standardne spojeve (Tablica XXIX).

Iridoidi

Spoj **7** (*m/z* 433, AMK), karakterističan za vrstu *G. alypum*, identificiran je kao genipozid na temelju usporedbe njegovog vremena zadržavanja, UV i MS/MS spektara s istim parametrima standarda genipozida. Prisutnost ovog iridoida prethodno je zabilježena kod vrsta *G. davisiana* (Çaliş i sur., 2002a) i *G. meridionalis* (Tundis i sur., 2012b).

Spojevi **8** (*m/z* 701, AMK) i **11** (*m/z* 493), prisutni kod vrsta *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata*, bili su posebno zastupljeni kod populacija s područja Velebita. Maseni spektar drugog reda spoja **8** ukazivao je na dominantni gubitak anhidroglukoze i mravlje kiseline (-208 Da), odnosno mravlje kiseline (-46 Da). Njegov UV spektar (195 i 238 nm) i MS^3 prekursorskog iona pri *m/z* 493 ukazivali su na prisutnost benzojeve kiseline i strukturu usporedivu s onom prethodno identificiranih iridoida, koji su u položaju *C*-4 imali karboksilnu skupinu. Pri tome je dominantni fragment pri *m/z* 183 pripisan istovremenom gubitku benzojeve kiseline vezane na anhidroglukozu (-266 Da) i CO_2 (-44 Da). Na prvo je ukazivala i prisutnost manje zastupljenih fragmenata pri *m/z* 209 [M-H-benzoilglukoza]$^-$, 227 [M-H-benzoilanhidroglukoza]$^-$ i 371 [M-H-benzojeva kiselina]$^-$. Dominantni ioni u MS^4 bili su usporedivi s onima aukubina. Maseni spektri drugog i trećeg reda spoja **11** odgovarali su MS^3 i MS^4 spoja **8**, dok je u MS^4 iona pri *m/z* 165 zabilježen daljnji gubitak 30 Da (-CH_2O) uz manje zastupljene fragmente pri *m/z* 121 (-C_2H_4O), 137 (-CO) i 147 (-H_2O). Predloženi identititeti navedenih spojeva su 6'-*O*-benzoildeacetilasperulozidinska kiselina glukozid i 6'-*O*-benzoildeacetilasperulozidinska kiselina. Spoj **13** (*m/z* 685, AMK) bio je, također, u većoj količini prisutan u populacijama s područja Velebita, a najzastupljeniji kod uzorka vrste *G. meridionalis* s područja Učke i uzorka vrste *G. cordifolia* s područja Mostara. Kao i kod spoja **8**, karakterizirao ga je gubitak 208 Da u MS^2, pripisan odvajanju anhidroglukoze i mravlje kiseline, uz manji fragment pri *m/z* 639 (-46 Da), pripisan gubitku mravlje kiseline. MS^3 prekursorskog iona pri *m/z* 477 dao je fragmente pri *m/z* 167

[M-H-benzoilanhidroglukoza-CO_2]$^-$, 193 [M-H-benzoilglukoza]$^-$ i 355 [M-H-benzojeva kiselina]$^-$, koji su kao i njegov UV spektar ukazivali na prisutnost benzojeve kiseline u strukturi. Pri tome je fragment najvećeg relativnog intenziteta bio onaj prisutan pri *m/z* 193, koji je u MS^4 izgubio još 44 Da (-CO_2) i 72 Da (-CO_2-CO). Kao i kod prethodna dva spoja, pretpostavljeno mjesto vezanja benzojeve kiseline na glukozi bilo je u položaju *C*-6', dok je iridoidni dio molekule pripisan deacetilalpinozidu, iridoidu koji je sastavni dio bisiridoida globulozida B, a čija prisutnost je prethodno zabilježena kod vrsta *G. meridionalis* (Tundis i sur., 2012b) i *G. trichosantha* (Çaliş i sur., 2001), odnosno globulozida C, čija prisutnost je zabilježena kod vrste *G. cordifolia* (Kirmizibekmez i sur., 2003b). Spoj **13** okvirno je identificiran kao 6'-*O*-benzoildeacetilalpinozid glukozid.

Spoj **21** (*m/z* 495, AMK), prisutan samo kod mostarske populacije vrste *G. cordifolia*, identificiran je kao melampirozid (10-*O*-benzoilaukubin), iridoid koji je ranije izoliran iz iste vrste (Chaudhuri i Sticher, 1980; Kirmizibekmez i sur., 2003b), kao i vrste *G. meridionalis* (Tundis i sur., 2012b) te srodnih vrsta (Çaliş i sur., 2002a; Kirmizibekmez i sur., 2003a; Chaudhuri i sur., 1981; Çaliş i sur., 2002b), na temelju vremena zadržavanja koje se podudaralo s onim globularifolina (10-*O*-benzoilmonomelitozida). Jedino kod ove populacije bio je prisutan i spoj **31** (*m/z* 537, AMK), koji je nakon gubitka 46 Da u MS^2 (*m/z* 491), u MS^3 dao glavni ion pri *m/z* 179, a čiji je MS^4 odgovarao onom monomelitozida. Manje zastupljeni fragmenti uočeni u MS^3 pripisani su cimetnoj kiselini (*m/z* 147) i njezinom odvajanju (*m/z* 343), odnosno anhidroglukozi (*m/z* 161) i njezinom odvajanju (*m/z* 329), dok je fragment pri *m/z* 181 pripisan istovremenom cijepanju anhidroglukoze i cimetne kiseline. UV spektar također je odgovarao derivatu cimetne kiseline i monomelitozida. Na temelju usporedivog vremena zadržavanja s onim litantosalina (10-*O*-cinamoilaukubina), spoj **31** identificiran je kao 10-*O*-cinamoilmonomelitozid.

Spoj **25** (*m/z* 517) bio je u manjoj ili većoj količini prisutan u uzorcima vrsta *G. cordifolia, G. meridionalis* i *G. punctata*, ali ne i u mostarskoj populaciji vrste *G. cordifolia*. U MS^1 karakterizirala ga je prisutnost dominantnog molekulskog iona uz kojeg je bio prisutan i adukt mravlje kiseline relativno manje zastupljenosti (*m/z* 563). Dominantni gubitak 326 Da u MS^2, kojim je nastao fragment pri *m/z* 191, pripisan je istovremenom gubitku anhidroglukoze i *p*-kumarinske kiseline, uz manje zastupljene fragmente pri *m/z* 147 [M-H-anhidroglukoza-*p*-kumarinska kiselina-CO_2]$^-$, 163 [*p*-kumarinska kiselina-H]$^-$, 293 [M-H-glukoza-CO_2]$^-$ i 355 [M-H-anhidroglukoza]$^-$. Fragmenti dobiveni daljnjim fragmentacijama u MS^3 i MS^4 odgovarali su onima kakve su dali iridoidi asperulozid i besperulozid, koji u položaju *C*-10 imaju vezanu octenu i benzojevu kiselinu. Navedeni spoj

identificiran je kao 10-*O*-*p*-kumaroildeacetilasperulozid, čemu u prilog ide i njegov UV spektar (191, 232 i 315 nm), koji je kombinacija spektara asperulozida (191 i 239 nm) i *p*-kumarinske kiseline (210, 227 i 311 nm).

Feniletanoidi

Spojevi **18** (*m/z* 653) i **35** (*m/z* 889), karakteristični za vrste *G. cordifolia* i *G. meridionalis*, a koji su u tragovima bili prisutni i kod vrste *G. punctata*, identificirani su kao feniletanoidi na temelju njihovih UV spektara i MS fragmenata pri *m/z* 297 i 315. Maseni spektar drugog reda spoja **18** ukazao je na gubitak 192 Da, dok su naredni spektri odgovarali onima verbaskozida/izoverbaskozida. Navedeni gubitak pripisan je derivatu kavene kiseline metoksiliranom u položaju *C*-3 (= derivatu ferulinske kiseline hidroksiliranom u položaju *C*-5), s obzirom na prethodno uočene feniletanoide derivate kavene (verbaskozid, izoverbaskozid) i ferulinske kiseline (leukoskeptozid A, plantainozid C). Navedeni spoj identificiran je kao metoksiverbaskozid s obzirom na usporedivo vrijeme zadržavanja (20,4 min) s onim verbaskozida (20,0 min). Također, razlika u vremenu zadržavanja između navedenog spoja (20,4 min) i leukoskeptozida A (25,3 min), koji sadrži jednu hidroksilnu skupinu manje, bila je usporediva s prethodno uočenom razlikom u vremenu zadržavanja između kavene (8,1 min) i *p*-kumarinske kiseline (12,1 min). MS^2 spoja **35** dao je glavni ion pri *m/z* 767 (-122 Da), čija je daljnja fragmentacija odgovarala onima izomera rozikazida A, uz ione manjeg relativnog intenziteta pri *m/z* 605 (-284 Da) i 727 (-162 Da), koji su pripisani istovremenom gubitku anhidrokavene i benzojeve kiseline, odnosno gubitku anhidrokavene kiseline. Spoj je identificiran kao benzoilrozikazid A izomer. Spoj **26** (*m/z* 491) bio je prisutan samo kod vrste *G. alypum*, a u MS^2 karakterizirali su ga fragmenti visoke relativne zastupljenosti pri *m/z* 161 (-330 Da) i 175 (-316 Da), koji su naknadno izgubili još 28 Da (MS^3), odnosno 15 Da (MS^3) i 28 Da (MS^4). Iz ovog razloga prvi fragment u MS^2 pripisan je istovremenom gubitku hidroksitirozol glukozida i metilne skupine, a drugi gubitku hidroksitirozol glukozida. Spoj je okvirno identificiran kao 6′-*O*-feruloil-1′-*O*-hidroksitirozilglukozid (= desramnozil dekafeoilgalipumozid B = metilirani kalceolariozid B = desramnozil izoverbaskozid) s obzirom na usporedbu s drugim identificiranim spojevima karakterističnim za vrstu *G. alypum* te usporedbu njegovog vremena zadržavanja (24,8 min) s prethodno zabilježenim vremenom zadržavanja plantainozida C (= metiliranog izoverbaskozida) (27,0 min), pri čemu je sličan odnos bio uočen u vremenskoj razlici između pikova kalceolariozida B i izoverbaskozida. Kod iste je vrste nedavno zabilježena prisutnost dihidroksifeniletil-metilkafeoil-heksozida (Feriani i sur., 2017).

Tablica XXIX. Kromatografski i spektralni podaci glavnih spojeva detektiranih primjenom LC-PDA-ESI-MS^n tehnike pri negativnom načinu rada u maceracijom dobivenim metanolnim ekstraktima nadzemnih dijelova uzoraka vrsta *G. alypum*, *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* sakupljenih 2015. godine (dodatak podacima koji su zabilježeni za prethodno identificirane spojeve)

Pik	Predložena identifikacija	*Mr*	t_R (min)	UV λ_{max} (nm)	*m/z** MS^n fragmenti (% relativne zastupljenosti)
Iridoidi					
7	Genipozid[a,b]	388, 37	10,6	193, 241	225 $[M-H-aGlc]^-$, 387 $[M-H]^-$, 423 $[M+^{35}Cl]^-$, 425 $[M+^{37}Cl]^-$, **433** $[M-H+HCOOH]^-$, 485 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS^2:** 433 → 225 (100), 387 (46); **MS^3:** 225 → 123 (100); **MS^4:** 123 → 105 (100), 123 (55)
8	6'-*O*-Benzoildeacetil asperulozidinska kiselina glukozid[c]	656, 59	14,1	195, 238	691 $[M+^{35}Cl]^-$, 693 $[M+^{37}Cl]^-$, **701** $[M-H+HCOOH]^-$ **MS^2:** 701 → 493 (100), 655 (22); **MS^3:** 493 → 165 (38), 183 (100), 209 (63), 227 (83), 371 (81); **MS^4:** 183 → 99 (14), 137 (50), 139 (65), 153 (38), 165 (100)
11	6'-*O*-Benzoil deacetil asperulozidinska kiselina[c]	494, 45	17,3	196, 232	**493** $[M-H]^-$, 591 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 623 $[M-H+130]^-$, 987 $[2M-H]^-$ **MS^2:** 493 → 165 (40), 183 (100), 209 (67), 227 (82), 331 (13), 371 (86); **MS^3:** 183 → 99 (14), 137 (41), 139 (51), 153 (34), 165 (100); 371 → 121 (18), 147 (37), 165 (47), 183 (41), 191 (92), 209 (100); **MS^4:** 165 → 121 (23), 135 (100), 137 (47), 147 (34)
13	6'-*O*-Benzoildeacetil alpinozid glukozid[c]	640, 59	18,4	195, 237	639 $[M-H]^-$, **685** $[M-H+HCOOH]^-$, 737 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS^2:** 685 → 477 (100), 639 (68); **MS^3:** 477 → 167 (8), 193 (100), 355 (5); **MS^4:** 193 → 121 (18), 149 (100)
21	Melampirozid[b]	450, 44	22,4	199, 233	**495** $[M-H+HCOOH]^-$ **MS^2:** -; **MS^3:** -; **MS^4:** -
25	10-*O*-*p*-Kumaroildeacetil asperulozid[c]	518, 46	24,6	191, 232, 315	**517** $[M-H]^-$, 553 $[M+^{35}Cl]^-$, 555 $[M+^{37}Cl]^-$, 563 $[M-H+HCOOH]^-$, 1035 $[2M-H]^-$ **MS^2:** 517 → 147 (71), 163 (37), 191 (100), 293 (15), 355 (25); **MS^3:** 191 → 147 (100), 163 (35); **MS^4:** 147 → 91 (18), 103 (20), 119 (100), 147 (15)
31	10-*O*-Cinamoil monomelitozid[c]	492, 47	29,0	191, 218, 284	491 $[M-H]^-$, 527 $[M+^{35}Cl]^-$, 529 $[M+^{37}Cl]^-$, **537** $[M-H+HCOOH]^-$, 1029 $[2M-H+HCOOH]^-$ **MS^2:** 537 → 491 (100); **MS^3:** 491 → 147 (9), 161 (14), 179 (100), 181 (15), 329 (30), 343 (17); **MS^4:** 179 → 89 (83), 113 (15), 119 (42), 131 (20), 143 (100), 161 (74)
Feniletanoidi					
18	Metoksiverbaskozid[c]	654, 62	20,4	198, 221, 331	**653** $[M-H]^-$, 1307 $[2M-H]^-$ **MS^2:** 653 → 461 (100); **MS^3:** 461 → 135 (36), 161 (11), 297 (12), 315 (100); **MS^4:** 315 → 135 (100)
26	6′-*O*-Feruloil-1′-*O*-hidroksitirozil glukozid[b,c]	492, 48	24,8	197, 236, 292, 330	**491** $[M-H]^-$, 983 $[2M-H]^-$ **MS^2:** 491 → 161 (100), 175 (93), 179 (14), 281 (10), 297 (20), 315 (40); **MS^3:** 161 → 133 (100), 161 (13); 175 → 160 (100); **MS^4:** 133 → 105 (72), 133 (100); 160 → 132 (100)
35	Benzoilrozikazid A izomer[c]	890, 83	34,2	196, 223, 332	**889** $[M-H]^-$, 925 $[M+^{35}Cl]^-$, 927 $[M+^{37}Cl]^-$, 987 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 1779 $[2M-H]^-$ **MS^2:** 889 → 605 (34), 727 (82), 767 (100); **MS^3:** 767 → 605 (100); **MS^4:** 605 → 297 (8), 315 (11), 443 (22), 461 (100)

Ostali neidentificirani spojevi					
4	-	-	8,5	-	**305** [M-H]$^-$ **MS^2:** 305 → 97 (53), 225 (100); **MS^3:** 225 → 135 (26), 147 (32), 163 (42), 165 (82), 181 (100), 207 (92); **MS^4:** 181 → 163 (100)
30	-	-	28,1	-	421 [M-H]$^-$, 457 [M+^{35}Cl]$^-$, 459 [M+^{37}Cl]$^-$, **467** [M-H+HCOOH]$^-$ **MS^2:** 467 → 421 (100); **MS^3:** 421 → 161 (10), 289 (100); **MS^4:** 289 → 101 (18), 113 (10), 159 (11), 161 (100)
33	-	-	32,1	197, 278, 333	621 [M-H]$^-$, 657 [M+^{35}Cl]$^-$, 659 [M+^{37}Cl]$^-$, **667** [M-H+HCOOH]$^-$, 1289 [2M-H]$^-$ **MS^2:** 667 → 313 (82), 621 (100); **MS^3:** 621 → 298 (14), 313 (100); **MS^4:** 313 → 298 (100)
38	-	-	41,3	194, 232	569 [M-H]$^-$, 605 [M+^{35}Cl]$^-$, 607 [M+^{37}Cl]$^-$, **615** [M-H+HCOOH]$^-$ **MS^2:** 615 → 569 (100); **MS^3:** 569 → 223 (19), 283 (65), 303 (19), 447 (100); **MS^4:** -
40	-	-	45,7	-	**577** [M-H]$^-$ **MS^2:** 577 → 207 (9), 225 (100), 277 (20), 299 (77); **MS^3:** 225 → 81 (24), 125 (54), 149 (9), 153 (26), 165 (69), 189 (8), 207 (100); **MS^4:** 207 → 81 (22), 125 (100), 127 (10), 189 (12)
41	-	-	46,2	-	**721** [M-H+HCOOH]$^-$ **MS^2:** 721 → 397 (11), 675 (100); **MS^3:** 675 → 397 (100), 415 (35); **MS^4:** 397 → 125 (17), 143 (15), 161 (25), 179 (7), 235 (100), 253 (32), 287 (53), 305 (72), 323 (27), 361 (10)
42	-	-	46,5	-	**555** [M-H]$^-$ **MS^2:** 555 → 207 (9), 225 (100), 255 (15), 299 (76); **MS^3:** 225 → 81 (27), 125 (56), 149 (8), 153 (26), 165 (69), 189 (8), 207 (100); **MS^4:** 207 → 81 (24), 125 (100), 127 (8), 189 (17)

* – glavni ion otisnut je masnim slovima (relativna zastupljenost 100%); [a] – identifikacija temeljena na usporedbi t_R, MS^1 i PDA spektara te načina MS/MS fragmentacije s istim vrijednostima referentnog standarda; [b] – identifikacija temeljena na MS^1 očekivanom za spojeve koji su prethodno zabilježeni u vrstama roda *Globularia* uz usporedbu t_R koji je sličan onima drugih identificiranih spojeva (+PDA za dodatnu potvrdu); [c] – identifikacija temeljena na načinu MS/MS fragmentacije (i t_R) spojeva koji su slični drugim identificiranim spojevima (+PDA za dodatnu potvrdu); - – nije poznato/nije detektirano; aGlc – anhidroglukoza

Ostali neidentificirani spojevi

Od spojeva koji nisu identificirani, spojevi **30**, **33**, **38** i **41** stvarali su adukte s mravljom kiselinom (gubitak 46 Da u MS^2) (Tablica XXIX). Spojevi **4** (*m/z* 305), **30** (*m/z* 467) i **33** (*m/z* 667) bili su najzastupljeniji kod mostarske populacije vrste *G. cordifolia*, pri čemu je prvi bio u većoj mjeri zastupljen i kod vrste *G. alypum*, a posljednji još jedino prisutan kod uzorka vrste *G. cordifolia* s područja Biokova. Glavni fragmenti spoja **33** prisutni pri *m/z* 313 u MS^3 i *m/z* 298 u MS^4 ukazivali su na mogući gubitak diheksozida (-308 Da) i metilne skupine (-15 Da). UV spektar spoja **38** (*m/z* 615) (194 i 232 nm), posebno zastupljenog kod uzorka vrste *G. meridionalis* s područja Učke, i gubitak 122 Da u MS^3 ukazivali su na prisutnost benzojeve kiseline. Spojevi **40** (*m/z* 577), **41** (*m/z* 721) i **42** (*m/z* 555) bili su prisutni u svim istraživanim uzorcima, a najzastupljeniji

kod uzorka vrste *G. meridionalis* s područja Učke, kod kojeg je prethodno utvrđen najmanji sadržaj fenolnih spojeva i flavonoida. Spojevi **40** i **42** dali su usporedive MS/MS fragmente, od kojih su najveći relativni intenzitet imali fragmenti pri *m/z* 225 u MS^2, *m/z* 207 u MS^3 i *m/z* 125 u MS^4.

Usporedba između različitih populacija

Usporedba fitokemijskog sastava različitih populacija istraživanih vrsta roda *Globularia* (Tablica XXX) potkrijepila je rezultate fitokemijske usporedbe koja je uključivala po jedan uzorak od svake vrste i dodatno pojasnila rezultate usporedba sadržaja sekundarnih metabolita različitih populacija vrsta *G. cordifolia, G. meridionalis* i *G. punctata*.

Glavna sastavnica u svim populacijama vrste *G. cordifolia* bio je iridoid globularifolin, koji je bio izrazito povišen kod mostarske populacije. Ova populacija sadržavala je iridoide prisutne u maceratima ostalih populacija navedene vrste (6'-*O*-benzoilmonomelitozid, monomelitozid), ali i neke karakteristične iridoide kao što su 10-*O*-cinamoilmonomelitozid i melampirozid (10-*O*-benzoilaukubin) te 10-*O*-cinamoil-aukubin (litantosalin), prisutan također kod vrste *G. alypum*. Glavni feniletanoidi bili su verbaskozid i izoverbaskozid, pri čemu je kod mostarske populacije prevladavao izoverbaskozid. Osim globularifolinom, ostale populacije vrste *G. cordifolia* bile su bogate iridoidima asperulozidom (posebno Biokovo i Šestanovac) i 6'-*O*-benzoilmonomelitozidom (posebno Alan i Baške Oštarije). Populacije s područja Biokova i Šestanovca istaknule su se i povišenim udjelom besperulozida, a s područja Alana i Baških Oštarija povišenim udjelom iridoida 6'-*O*-benzoildeacetilasperulozidinske kiseline i njezinog glukozida te feniletanoida izomera benzoilrozikazida A. Također, populacije za koje se ranije pokazalo da sadrže više flavonoida (Alan, Šestanovac i Baške Oštarije) (Slika 57), bile su bogatije apigeninom.

Sve populacije vrste *G. meridionalis* sadržavale su visoku količinu globularifolina (posebno Grobničko polje i Učka), asperulozida i 6'-*O*-benzoilmonomelitozida (posebno Učka) te verbaskozida (posebno Dinara) i izoverbaskozida. Populacije s područja Grobničkog polja i Baških Oštarija istaknule su se povišenim udjelom izomera globusintenozida i rozikazida A, dok je prva sadržavala i najviše monomelitozida, a posljednja najviše 6'-*O*-benzoildeacetilasperulozidinske kiseline, izomera benzoilrozikazida A te apigenina. Populacija s područja Učke sadržavala je najviše nepolarnih spojeva, a bila je najsiromašnija spojevima poput verbaskozida i apigenina, što objašnjava njezin prethodno utvrđeni sniženi sadržaj fenola i flavonoida u usporedbi s ostalim populacijama (Slika 55, Slika 57).

Tablica XXX. Usporedba glavnih spojeva različitih populacija istraživanih vrsta roda *Globularia* temeljena na analizi maceracijom dobivenih metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova primjenom LC-PDA-ESI-MS^n tehnike pri negativnom načinu rada

Pik	t_R (min)	*m/z*	Predložena identifikacija	*Ga*	*Gc1*	*Gc2*	*Gc3*	*Gc4*	*Gc5*	*Gm1*	*Gm2*	*Gm3*	*Gm4*	*Gp1*	*Gp2*	*Gp3*	*Gp4*	*Gp5*
1	1,2	191	Kina kiselina[a]	-	3,8*	4,2	3,9	5,5	5,9	3,6	5,0	4,6	6,0	1,4	0,7	1,4	0,5	1,9
2	1,6	407	Katalpol[b]	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,8	5,1	5,3	1,7	3,4
3	2,1	407	Monomelitozid[b]	-	**21****	14	**20**	**20**	17	**27**	18	19	13	-	-	-	-	-
4	8,5	305	Nepoznati spoj[a]	**20**	**27**	8,1	5,3	4,5	2,7	1,9	3,9	2,5	2,2	-	-	-	-	-
5	8,7	459	Asperulozid[b]	-	13	**120**	**92**	**110**	**93**	**60**	**87**	**86**	**63**	**76**	**40**	**21**	**21**	**78**
6	10,4	523	Verminozid[b]	**27**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	10,6	433	Genipozid[b]	**24**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	14,1	701	6'-*O*-Benzoildeacetil asperulozidinska kiselina glukozid[b]	-	-	8,0	15	4,4	15	1,9	6,8	6,1	8,3	0,5	1,2	1,0	1,1	0,7
9	15,6	831	Alpinozid[b]	3,6	6,7	5,3	6,8	1,7	5,0	5,7	4,6	3,1	4,7	9,3	13	12	10	6,8
10	16,1	555	Globularinin[b]	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,6	1,6	3,1	2,5	2,9
11	17,3	493	6'-*O*-Benzoildeacetil asperulozidinska kiselina[b]	-	1,0	14	18	18	**20**	6,6	11	5,0	19	7,3	5,8	7,6	6,3	1,9
12	17,8	511	6'-*O*-Benzoil monomelitozid[b]	-	**27**	**41**	**58**	**49**	**77**	**27**	**69**	**32**	**47**	-	-	-	-	-
13	18,4	685	6'-*O*-Benzoildeacetil alpinozid glukozid[b]	-	14	0,7	10	3,9	8,1	2,4	19	4,1	8,4	-	-	-	-	-
14	18,5	477	Kalceolariozid A[c]	**78**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	18,8	787	6-Hidroksiluteolin 7-*O*-(6'''-*O*-kafeoil)-soforozid[d]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**27**	**29**	4,6	18	**30**
16	19,8	785	Rozikazid A[c]	**74**	2,5	2,3	2,2	4,5	4,0	**24**	4,7	2,0	16	**29**	**27**	**40**	**23**	**21**
17	20,0	623	Verbaskozid[c]	**82**	**53**	**92**	**92**	**78**	**96**	**50**	**40**	**110**	**59**	**51**	**59**	**41**	**66**	**50**
18	20,4	653	Metoksiverbaskozid[c]	-	6,5	16	**22**	18	**21**	**20**	9,4	**23**	5,1	0,8	0,7	-	-	0,8
19	21,8	755	Trihosantozid A[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**27**	**47**	**77**	**23**	**31**
20	22,2	511	Globularifolin[b]	-	**240**	**180**	**160**	**170**	**150**	**160**	**180**	**48**	**51**	-	-	-	-	2,0
21	22,4	495	Melampirozid[b]	-	**32**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	22,6	623	Izoverbaskozid[c]	**28**	**69**	**32**	**37**	**39**	**41**	**44**	**41**	**45**	**38**	6,2	16	6,1	**37**	12
23	23,2	537	Globularin[b]	**71**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**63**	**44**	**70**	**60**	11

24	23,8	523	6'-O-Benzoildeacetil alpinozid[b]	-	2,4	4,4	3,7	2,2	4,8	1,0	3,8	-	5,1	-	-	0,6	-	-
25	24,6	517	10-*O*-*p*-Kumaroildeacetilasperulozid[b]	-	-	3,0	9,7	-	2,1	4,8	17	-	11	16	15	**30**	5,3	11
26	24,8	491	6′-*O*-Feruloil-1′-*O*-hidroksitirozil glukozid[c]	**20**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	25,3	637	Leukoskeptozid A[c]	-	16	2,3	0,5	-	-	0,5	-	-	0,6	-	-	-	-	-
28	27,0	521	Besperulozid[b]	-	5,1	**63**	2,3	**54**	1,0	0,6	-	-	0,6	**53**	**72**	**47**	**78**	**81**
29	27,9	573	Globulariozid[b]	**35**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	3,0	4,6	1,0	1,7
30	28,1	467	Nepoznati spoj	0,7	**65**	**53**	**33**	**36**	**40**	**25**	**44**	19	**38**	17	17	6,3	11	12
31	29,0	537	10-*O*-Cinamoil monomelitozid[b]	-	**40**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	32,0	961	Globusintenozid izomer[c]	3,4	4,6	**20**	6,0	**25**	**25**	**40**	10	16	**38**	3,7	6,9	5,0	7,5	3,0
33	32,1	667	Nepoznati spoj	-	**22**	5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	33,8	269	Apigenin[d]	2,6	0,9	2,7	14	14	7,9	11	4,0	18	**24**	15	10	14	**21**	19
35	34,2	889	Benzoilrozikazid A izomer[c]	-	3,6	5,4	**51**	19	**36**	13	7,0	4,4	**46**	0,8	-	0,6	-	-
36	35,1	935	Globulozid A[b]	**22**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	39,4	327	Okso-dihidroksi-oktadecenoična kiselina[e]	8,8	5,4	11	**22**	11	**21**	**20**	**22**	**26**	19	16	11	13	3,6	9,9
38	41,3	615	Nepoznati spoj[e]	-	6,4	5,8	8,0	1,9	9,1	1,0	17	1,9	6,1	-	-	-	-	-
39	42,9	329	Trihidroksi-oktadecenoična kiselina[e]	16	7,3	17	**24**	11	18	**34**	17	**29**	**22**	**30**	**21**	**29**	14	**21**
40	45,7	577	Nepoznati spoj[e]	3,9	5,1	2,4	4,6	7,9	2,4	3,7	10	5,3	5,7	8,2	8,9	5,3	8,1	9,7
41	46,2	721	Nepoznati spoj[e]	1,4	4,7	2,3	4,0	3,7	5,3	3,4	6,1	3,1	0,8	5,1	2,7	2,8	2,8	3,1
42	46,5	555	Nepoznati spoj[e]	3,6	6,8	7,3	4,5	6,8	7,9	6,1	8,3	4,7	6,7	5,6	7,3	4,4	6,7	6,0

[a] – polarni spoj; [b] – iridoid; [c] – feniletanoid; [d] – flavonoid; [e] – nepolarni spoj; *Ga* – *G. alypum* (Konavoske stijene, 2015), *Gc* – *G. cordifolia* (1 – Mostar, 2015, 2 – Biokovo, 2015, 3 – Alan, 2015, 4 – Šestanovac, 2015, 5 – Baške Oštarije, 2015), *Gm* – *G. meridionalis* (1 – Grobničko polje, 2015, 2 – Učka, 2015, 3 – Dinara, 2015, 4 – Baške Oštarije, 2015), *Gp* – *G. punctata* (1 – Grobničko polje, 2015, 2 – Vižintini, 2015, 3 – Slapnica, 2015, 4 – Vugrovec, 2015, 5 – Dinara, 2015); * – vrijednosti prikazuju odnose površina pikova dobivenih masenim detektorom (apsolutne vrijednosti površina veće su 10^5 puta); ** – vrijednosti veće ili jednake 20 naznačene su masnim slovima; - – nije detektirano

Sve populacije vrste *G. punctata* sadržavale su kao glavne sastavnice iridoide besperulozid i asperulozid te feniletanoide verbaskozid, trihosantozid A i rozikazid A. Sve populacije osim dinarske sadržavale su visoku količinu globularina. Populacije s područja Grobničkog polja, Vižintina i Dinare sadržavale su veći udio flavonoida 6-hidroksiluteolin 7-*O*-(6'''-*O*-kafeoil)-soforozida, dok se populacija s područja Slapnice istaknula povišenim udjelom iridoida 10-*O*-*p*-kumaroildeacetilasperulozida, koji je u većoj mjeri bio prisutan i kod uzorka vrste *G. meridionalis* s područja Učke. U usporedbi s drugim populacijama vrste *G. punctata*, populacija s područja Slapnice imala je veći udio globularina, rozikazida A i trihosantozida A, a sniženi udio asperulozida i besperulozida.

U svrhu brze i jednostavne usporedbe fitokemijskog profila vrsta *G. alypum*, *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata*, odnosno detekcije spojeva karakterističnih za pojedine vrste i populacije, primijenjena je tankoslojna kromatografija u različitim sustavima razdvajanja (Tablica XXXI). U sustavu 2 uspješno su razdvojeni glavni iridoidi i feniletanoidi istraživanih vrsta. Iridoidi su s reagensom anisaldehid-sumporna kiselina dali sivosmeđa i sivoplava obojenja pri dnevnom svjetlu, ali i pri UV 365 nm. Za razliku od njih feniletanoidi su pri UV 365 nm bili vidljivi kao svjetloplave zone, koje su se poklapale sa svjetloplavim zonama vidljivim nakon prskanja NP/PEG reagensom (Slika 75). Pri tome su kod vrste *G. alypum* najistaknutije bile smeđe zone R_f vrijednosti 0,32, 0,63 i 0,70. Prva i zadnja bile su vidljive i kod vrste *G. punctata* te su na temelju prethodno dobivenih rezultata pripisane katalpolu i globularinu, dominantnim zajedničkim iridoidima. Zona R_f vrijednosti 0,63 pripisana je derivatima globularina, primjerice globularininu i globulariminu, koji su također bili prisutni u uzorcima vrste *G. punctata*. Zbog preklapanja s njezinim dominantnim iridoidom, asperulozidom (R_f = 0,64), ova zona kod vrste *G. punctata* nije bila vidljiva. S druge strane, zona R_f vrijednosti 0,11, prisutna u sve četiri vrste, kod iste je vrste bila izraženija te bi se mogla pripisati skandozidu kao karakterističnom spoju vrste *G. punctata*, odnosno zajedničkim iridoidima karboksiliranim u položaju *C*-4. Vrste *G. cordifolia* i *G. meridionalis* karakterizirale su sivosmeđe zone iridoida monomelitozida (R_f = 0,28) i globularifolina (R_f = 0,62), pri čemu se druga zona preklapala sa sivoplavom zonom asperulozida (R_f = 0,64), prisutnom kod svih uzoraka osim kod uzorka vrste *G. cordifolia* s područja Mostara. Ovaj je uzorak karakterizirala smeđa zona R_f vrijednosti 0,68, a u usporedbi s R_f vrijednostima 10-*O*-cinamoilkatalpola (globularina) i 10-*O*-benzoil-monomelitozida (globularifolina) koje su bile jednake 0,70 i 0,62 te R_f vrijednostima aukubina, katalpola i monomelitozida, pripisana je njemu svojstvenim iridoidima, 10-*O*-cinamoilmonomelitozidu i 10-*O*-benzoilaukubinu (melampirozidu).

Tablica XXXI. Usporedba glavnih spojeva (R_f vrijednosti* i boje**) istraživanih vrsta roda *Globularia* temeljena na analizi maceracijom dobivenih metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova primjenom tankoslojne kromatografije u različitim sustavima razdvajanja

R_f	*G. alypum*	*G. cordifolia*	*G. meridionalis*	*G. punctata*	Predložena identifikacija
Kloroform-metanol-voda (61:32:7, *V/V/V*) (sustav 2)					
0,11	svjetlosiva (A)	svjetlosiva (A)	svjetlosiva (A)	sivosmeđa (A)	skandozid i/ili srodni iridoidi[a]
0,19	-	-	-	narančasta (N)	6-hidroksiluteolin 7-*O*-soforozid i/ili acilirani derivati[a]
0,20	sivosmeđa (A) svjetloplava (N)	sivosmeđa (A) svjetloplava (N)	sivosmeđa (A) svjetloplava (N)	sivosmeđa (A) svjetloplava (N)	rozikazid A[a]
0,26	-	-	-	svjetloplava (N)	trihosantozid A[a]
0,28	-	sivosmeđa (A)	sivosmeđa (A)	-	monomelitozid[a]
0,32	sivosmeđa (A)	-	-	sivosmeđa (A)	katalpol[a,b]
0,36	sivosmeđa (A) svjetloplava (N)	sivosmeđa (A) svjetloplava (N)	sivosmeđa (A) svjetloplava (N)	sivosmeđa (A) svjetloplava (N)	verbaskozid[a,b], izoverbaskozid[a,b] i/ili metoksi verbaskozid[a]
0,56	-	sivosmeđa (A) plava (N)	sivosmeđa (A) plava (N)	-	6'-*O*-benzoil monomelitozid[a]
0,62	-	smeđa (A)	smeđa (A)	-	globularifolin[a]
0,63	sivosmeđa (A) plava (N)	-	-	-	globularinin, globularimin i/ili srodni iridoidi[a]
0,64	-	sivoplava (A)[NM] sivoljubičasta (N_v)[NM]	sivoplava (A) sivoljubičasta (N_v)	sivoplava (A) sivoljubičasta (N_v)	asperulozid[a,b]
0,68	-	smeđa (A)[B,M,Š] sivoplava (A)[B,Š] sivoljubičasta (N_v)[B,Š]	-	- sivoplava (A) sivoljubičasta (N_v)	10-*O*-cinamoil monomelitozid[aM], melampirozid[aM] besperulozid[aB,Š]
0,70	smeđa (A) plava (N)	-	-	smeđa (A) plava (N)	globularin[a]
Etil acetat-etil metil keton-mravlja kiselina-voda (5:3:1:1, *V/V/V/V*) (sustav 3)					
0,06	-	smeđa (A)	smeđa (A)	-	monomelitozid[a]
0,11	narančasta (N)	-	-	narančasta (N)	6-hidroksiluteolin 7-*O*-soforozid[a]
0,14	svjetlosmeđa (A)	svjetlosmeđa (A)	svjetlosmeđa (A)	smeđa (A)	katalpol[a,b], skandozid i/ili srodni iridoidi[a]
0,22	svjetlosmeđa (A)	svjetlosmeđa (A)	svjetlosmeđa (A)	svjetlosmeđa (A)	rozikazid A[a]

	žutozelena (N)	žutozelena (N)	žutozelena (N)	žutozelena (N)	
0,29	-	-	-	narančasta (N)	6-hidroksiluteolin 7-*O*-(6'''-*O*-kafeoil)-soforozid[a]
0,31	-	-	-	žutozelena (N)	trihosantozid A[a]
0,32	-	smeđa (A)	smeđa (A)	-	globularifolin[a]
0,36	-	sivoplava (A)[NM] sivoljubičasta (N_v)[NM]	sivoplava (A) sivoljubičasta (N_v)	sivoplava (A) sivoljubičasta (N_v)	asperulozid[a,b]
0,48	žutozelena (N)	-	-	-	kalceolariozid A[a]
0,50	narančasta (N)	narančasta (N)	narančasta (N)	narančasta (N)	6-hidroksiluteolin 7-*O*-glukozid[a]
0,56	-	sivoplava (A)[B,Š] sivoljubičasta (N_v)[B,Š]	-	sivoplava (A) sivoljubičasta (N_v)	besperulozid[a]
0,58	-	smeđa (A)[M]	-	-	10-*O*-cinamoil monomelitozid[a], melampirozid[a]
0,59	žutozelena (N)	svjetlosmeđa (A) žutozelena (N)	svjetlosmeđa (A) žutozelena (N)	žutozelena (N)	verbaskozid[a,b]
0,60	smeđa (A)	-	-	smeđa (A)	globularin[a]
0,62	žutozelena (N)	žutozelena (N)	žutozelena (N)	žutozelena (N)	apigenin 7-*O*-glukozid[a,b]
0,97	žutozelena (N)	žutozelena (N)	žutozelena (N)	žutozelena (N)	luteolin[a,b]
0,98	žutozelena (N)	žutozelena (N)	žutozelena (N)	žutozelena (N)	apigenin[a,b]
Toluen-etil format-mravlja kiselina (5:4:1, *V*/*V*/*V*) (sustav 5)					
0,12	žućkastoplava (N)	žutozelena (N)	žutozelena (N)	žutozelena (N)	apigenin 7-*O*-glukozid[a,b]
0,42	svjetložuta (N)	svjetložuta (N)	svjetložuta (N)	žutonarančasta (N)	luteolin[a,b]
0,46	žutozelena (N)	žutozelena (N)	žutozelena (N)	žutozelena (N)	apigenin[a,b]

* – vrijednosti su dobivene razdvajanjem sastavnica na staklenim TLC silikagel 60 F_{254} pločama (moguće varijacije za (0,01) 0,03–0,07 (0,15) s obzirom na razlike u visini startne linije, stupnju zasićenosti komore, temperaturi i vlažnosti zraka, debljini sloja silikagela, koncentraciji i položaju uzoraka na ploči te drugim čimbenicima); ** – moguće varijacije u nijansi s obzirom na razlike u primijenjenoj količini reagensa za detekciju, temperaturi i dužini zagrijavanja ploča, vremenu očitavanja rezultata, koncentraciji sastavnica i njihovom preklapanju s drugim sastavnicama uzoraka te drugim čimbenicima; [a] – identifikacija temeljena na usporedbi R_f vrijednosti, boje i intenziteta zone s drugim identificiranim spojevima i spojevima karakterističnim za pojedinu vrstu i/ili populaciju čija prisutnost je prethodno utvrđena primjenom LC-PDA-ESI-MS^n tehnike; [b] – identifikacija temeljena na usporedbi R_f vrijednosti i boje zone s istim vrijednostima referentnog standarda; A – detekcija pri dnevnom svjetlu nakon prskanja reagensom anisaldehid-sumporna kiselina; N – detekcija pri UV 365 nm nakon prskanja reagensom NP/PEG; N_v – detekcija pri dnevnom svjetlu nakon prskanja reagensom NP/PEG; [B] – spoj karakterističan za uzorak *G. cordifolia* (Biokovo); [M] – spoj karakterističan za uzorak *G. cordifolia* (Mostar); [NM] – spoj karakterističan za sve uzorke osim uzorka *G. cordifolia* (Mostar); [Š] – spoj karakterističan za uzorak *G. cordifolia* (Šestanovac); - – nije detektirano

Iridoidi esterificirani s cimetnom ili benzojevom kiselinom bili su vidljivi i nakon prskanja NP/PEG reagensom pri UV 365 nm kao plave zone. Na temelju usporedbe podataka o relativnom udjelu pojedinih spojeva kod 15 istraživanih populacija vrsta roda *Globularia* (Tablica XXX) i prethodno navedenog, identificirana je i plava zona 6'-*O*-benzoilmonomelitozida (R_f = 0,56), koja je nakon prskanja anisaldehid-sumpornom kiselinom bila slabije vidljiva. Također, nakon prskanja NP/PEG reagensom i stajanja na zraku, pri dnevnom svjetlu postale su vidljive i dvije sivoljubičaste zone R_f vrijednosti 0,64 i 0,68, od kojih je prva dala smeđe obojenje pri UV 365 nm, a pripisana je asperulozidu. Druga je zona, na temelju usporedbe s podacima dobivenim primjenom LC-PDA-ESI-MS^n tehnike (Tablica XXX), pripisana njemu srodnom spoju, besperulozidu. Ovime je razjašnjena i pojava dodatnih smeđih zona u uzorcima vrste *G. cordifolia* s područja Biokova i Šestanovca nakon prskanja anisaldehidom. Na temelju iste usporedbe identificirana je i zona feniletanoida prisutnog u manjoj ili većoj mjeri kod različitih uzoraka sve četiri vrste, rozikazida A (R_f = 0,20), kao i zona preklapanja metoksiverbaskozida i/ili verbaskozida te izoverbaskozida (R_f = 0,36), odnosno zona trihosantozida A (R_f = 0,26), feniletanoida karakterističnog za vrstu *G. punctata*. Narančasta zona R_f vrijednosti 0,19, koja je bila dobro vidljiva u uzorcima vrste *G. punctata,* pripisana je glikozidima 6-hidroksiluteolina, koji su kod ove vrste bili posebno zastupljeni. U svim su uzorcima nakon prskanja NP/PEG reagensom pri UV 365 nm dobro vidljive bile i nespecifične plave zone R_f vrijednosti 0,79 i 0,82, kao i crvena zona R_f vrijednosti 0,99. Prskanje anisaldehid-sumpornom kiselinom otkrilo je pri UV 365 nm prisutnost najmanje pet nespecifičnih bijelih zona R_f vrijednosti između 0,75 i 0,90 te crvenu zonu R_f vrijednosti 0,99.

Primjena sustava 3 omogućila je, kao i primjena sustava 2, detekciju glavnih iridoida i feniletanoida (Slika 76). Pri tome su, u usporedbi s prethodnim sustavom, R_f vrijednosti iridoida bile smanjene, a feniletanoida povišene (Tablica XXXI). Također, u ovom sustavu postignuto je bolje razdvajanje glavnih flavonoida. Nakon prskanja reagensom anisaldehid-sumporna kiselina dominantna zona kod vrste *G. alypum* vidljiva pri dnevnom svjetlu bila je smeđa zona globularina (R_f = 0,60), dok su slabije vidljive bile svjetlosmeđe zone katalpola (R_f = 0,14) i rozikazida A (R_f = 0,22). Primjena NP/PEG reagensa, omogućila je uz detekciju žutozelene zone rozikazida A pri UV 365 nm, detekciju srodnih spojeva čije zone su pripisane kalceolariozidu A (R_f = 0,48) i verbaskozidu/izoverbaskozidu (R_f = 0,59), od kojih je druga bila prisutna u svim istraživanim uzorcima. Svjetloplave zone rozikazida A i verbaskozida/izoverbaskozida bile su vidljive pri UV 365 nm i nakon prskanja anisaldehidom. Vrste *G. cordifolia* i *G. meridionalis* karakterizirala je pojava smeđih zona

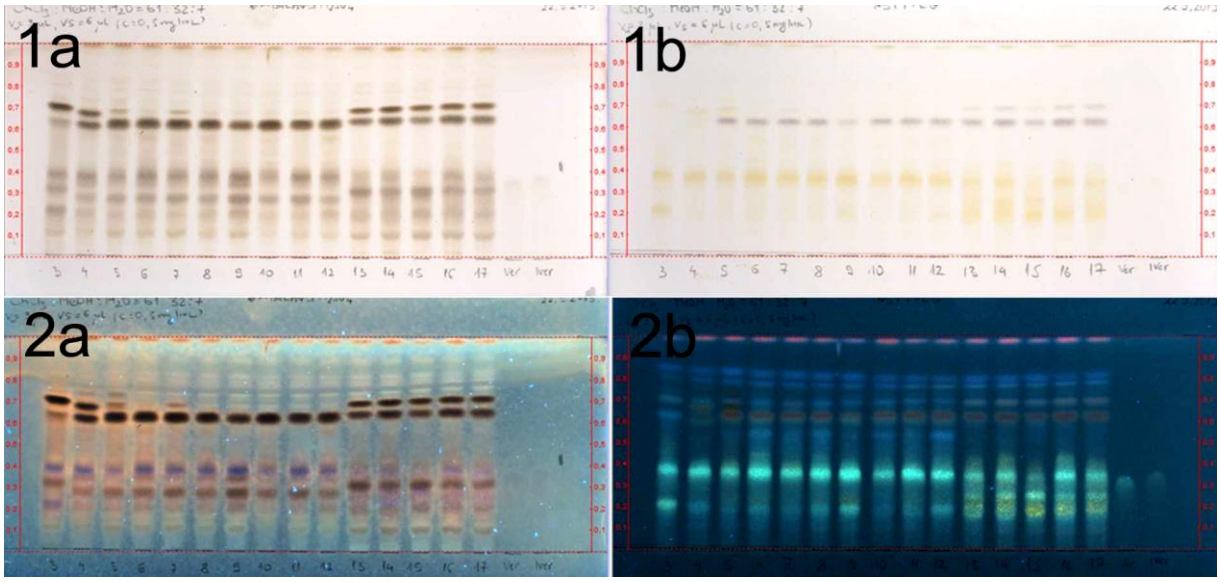
globularifolina (R_f = 0,32) i monomelitozida (R_f = 0,06), uz sivoplavu zonu asperulozida (R_f = 0,36), koja je bila prisutna u svim uzorcima osim mostarske *G. cordifolia* te snižena kod uzorka vrste *G. meridionalis* sabranog na području Grobničkog polja, što je odgovaralo prethodno provedenoj usporedbi temeljenoj na primjeni LC-PDA-ESI-MS^n tehnike (Tablica XXX). Kod istog je uzorka uočen povišeni udio monomelitozida i rozikazida A, što je također bilo u skladu s prethodno dobivenim rezultatima. Sivoplava/sivoljubičasta zona R_f vrijednosti 0,56, koja je bila vidljiva pri dnevnom svjetlu u uzorcima vrste *G. cordifolia* s biokovskog područja i svim uzorcima vrste *G. punctata*, nakon prskanja reagensima anisaldehid-sumporna kiselina i NP/PEG, pripisana je besperulozidu. Uzorak mostarske *G. cordifolia* karakterizirala je prisutnost dodatne smeđe zone, vidljive nakon prskanja anisaldehidom, a koja je pripisana njoj svojstvenim iridoidima,10-*O*-cinamoilmonomelitozidu i melampirozidu (R_f = 0,58). Isti je uzorak dao i tri dodatne sive zone pri 365 nm nakon prskanja NP/PEG reagensom (R_f = 0,28, 0,35 i 0,74), od kojih je posljednja bila vidljiva i kod uzorka s područja Biokova te bi se mogla pripisati spoju *m/z* vrijednosti 667 (Tablica XXX) i/ili srodnim spojevima.

Kod uzoraka vrste *G. punctata*, nakon prskanja anisaldehid-sumpornom kiselinom bile su vidljive dvije smeđe i dvije sivoplave zone, pripisane katalpolu i skandozidu te globularinu (R_f = 0,14 i 0,60), odnosno asperulozidu i besperulozidu (R_f = 0,36 i 0,56), od kojih su posljednji bili vidljivi i nakon prskanja NP/PEG reagensom i stajanja ploča na zraku kao sivoljubičaste zone. NP/PEG reagens otkrio je i prisutnost tri glavne svjetloplave zone koje su stajanjem poprimile žutozelenu boju, a pripisane su glavnim feniletanoidima rozikazidu A, trihosantozidu A (R_f = 0,31) te verbaskozidu i izoverbaskozidu. Trihosantozidom A bila je posebno bogata populacija s područja Slapnice, koja je imala najmanje verbaskozida i izoverbaskozida, što je odgovaralo prethodno dobivenim rezultatima (Tablica XXX). Suprotno njoj, populacija s područja Vugrovca bila je posebno bogata verbaskozidom i izoverbaskozidom. Uzorci vrste *G. punctata* dali su s NP/PEG reagensom i tri narančaste zone pripisane glikozidima 6-hidroksiluteolina (R_f = 0,11, 0,29 i 0,50) te žutozelenu zonu pripisanu apigenin 7-*O*-glukozidu (R_f = 0,62). Od narančastih zona, prva je bila najzastupljenija kod populacije s područja Slapnice, a u manjoj mjeri prisutna i kod vrste *G. alypum* te je identificirana kao njihov zajednički flavonoid 6-hidroksiluteolin 7-*O*-soforozid. Druga zona pripisana je glavnom flavonoidu vrste *G. punctata*, 6-hidroksiluteolin 7-*O*-(6'''-*O*-kafeoil)-soforozidu, koji je bio zastupljeniji u uzorcima sabranim na području Grobničkog polja, Vižintina i Dinare (Tablica XXX). Treća narančasta zona bila je, kao i zona apigenin 7-*O*-glukozida, uočljiva i u uzorcima ostalih vrsta, a

pripisana je 6-hidroksiluteolin 7-*O*-glukozidu. Također, u svim uzorcima vrste *G. punctata* bile su slabo vidljive žutozelene zone luteolina (R_f = 0,97) i apigenina (R_f = 0,98). U većini ostalih uzoraka bolje uočljiva bila je zona apigenina, uz iznimku uzoraka vrste *G. alypum* te vrste *G. cordifolia* s područja Mostara i Biokova, za koje je prethodno utvrđeno da su najsiromašniji ovim flavonoidom (Tablica XXX).

Primjena sustava 5 omogućila je detekciju nespecifičnih nepolarnih spojeva prisutnih u svim uzorcima, koji su bili najbolje vidljivi pri UV svjetlu 365 nm nakon prskanja anisaldehidom (Slika 77). Uočeno je pet bijelih zona R_f vrijednosti između 0,35 i 0,65 te tri crvene zone R_f vrijednosti 0,58, 0,78 i 0,90, koje su bile vidljive i nakon prskanja NP/PEG reagensom. Pri bojanju anisaldehidom bile su vidljive i tri izražene zone R_f vrijednosti 0,01, 0,12 i 0,15, koje su se svojom bojom razlikovale kod uzorka vrste *G. alypum* (svjetloplava, svjetlosiva i žućkastoplava), mostarskog uzorka vrste *G. cordifolia* (svjetloplava/crna, svjetlosiva i crvenosmeđa), preostalih uzoraka vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* (svjetloplava/crna i svjetlosiva) te uzoraka vrste *G. punctata* svjetloplava/crna, svjetlosiva i žućkastosmeđa). U usporedbi sa standardima i s prethodno utvrđenim glavnim sastavnicama, svjetloplava boja mogla bi se pripisati derivatima verbaskozida, kojima je posebno bogata bila vrsta *G. alypum*, žućkasta derivatima katalpola (npr. globularinu), prisutnim kod vrsta *G. alypum* i *G. punctata*, a crna i crvenosmeđa strukturno sličnim iridoidima, asperulozidu i besperulozidu, pri čemu je crna boja prve zone vjerojatno rezultat preklapanja sa svjetloplavom zonom feniletanoida. Istaknuta crvenosmeđa zona, koja se isticala jedino u uzorku mostarske *G. cordifolia* mogla bi ukazivati na prisutnost novih lipofilnijih derivata asperulozida, koji su pretpostavljeno nastali njegovom razgradnjom i polimerizacijom u uvjetima povećane vlažnosti. Na moguću prisutnost navedenih derivata ukazuju i relativno visoke vrijednosti sadržaja iridoida asperulozidinskog tipa, koje su prethodno utvrđene na ekstraktima pripremljenim ultrazvučnom ekstrakcijom (Tablica XIX).

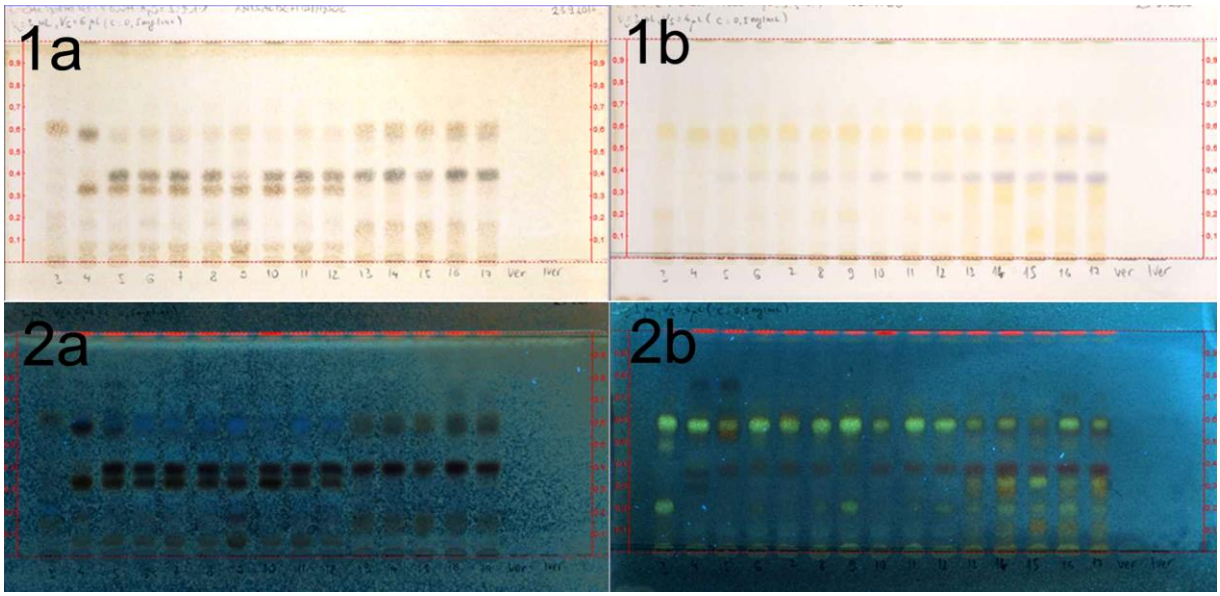
Iste zone su s NP/PEG reagensom pri UV 365 nm dale svjetloplavo/svjetlosivo i žućkastoplavo obojenje (*G. alypum*), svjetloplavo, žućkastoplavo i crno obojenje (mostarska *G. cordifolia*), svjetloplavo i žutozeleno obojenje (preostali uzorci *G. cordifolia* i *G. meridionalis*) te sivobijelo i žutozeleno obojenje (*G. punctata*). Pri tome je žutozelenu fluorescenciju dao i standard apigenin 7-*O*-glukozida (R_f = 0,12) Prskanje istim reagensom otkrilo je prisutnost apigenina (R_f = 0,42) i luteolina (R_f = 0,46) u svim istraživanim uzorcima, pri čemu su veću količinu luteolina sadržavali uzorci vrste *G. punctata*. Razlike u intenzitetu fluorescencije apigenina također odgovaraju podacima o njegovoj relativnoj zastupljenosti u različitim uzorcima (Tablica XXX).



Slika 75. TLC kromatogram maceracijom dobivenih metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova uzoraka vrsta roda *Globularia* sakupljenih 2015. godine (sustav 2):

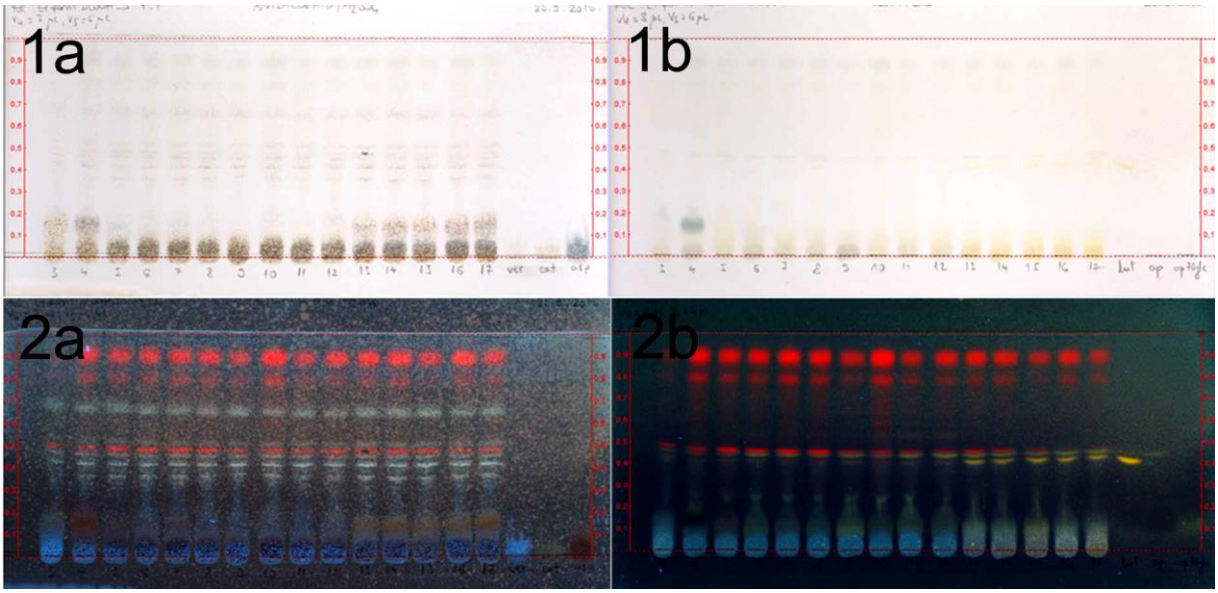
Nepokretna faza:	TLC silikagel 60 F_{254} ploče (staklene)
Pokretna faza:	kloroform-metanol-voda (61:32:7, *V*/*V*/*V*)
Detekcija:	anisaldehid-sumporna kiselina, 100-105 °C, dnevno svjetlo (1a), UV 365 nm (2a) NP/PEG, dnevno svjetlo (1b), UV 365 nm (2b)
Uzorci:	3 – *G. alypum* (Konavoske stijene), 4 – *G. cordifolia* (Mostar), 5 – *G. cordifolia* (Biokovo), 6 – *G. cordifolia* (Alan), 7 – *G. cordifolia* (Šestanovac), 8 – *G. cordifolia* (Baške Oštarije), 9 – *G. meridionalis* (Grobničko polje), 10 – *G. meridionalis* (Učka), 11 – *G. meridionalis* (Dinara), 12 – *G. meridionalis* (Baške Oštarije), 13 – *G. punctata* (Grobničko polje), 14 – *G. punctata* (Vižintini), 15 – *G. punctata* (Slapnica), 16 – *G. punctata* (Vugrovec), 17 – *G. punctata* (Dinara)
Referentni standardi:	verbaskozid, izoverbaskozid

U svim primijenjenim sustavima razdvajanja, neovisno o metodi detekcije (anisaldehid-sumporna kiselina, NP/PEG), bilo je moguće uočiti zone karakterističnih boja i/ili R_f vrijednosti koje su ukazivale na jednu od sljedećih vrsta: *G. alypum*, *G. cordifolia*/ *G. meridionalis* i *G. punctata*. Iznimno, posebnim kemijskim sastavom istaknula se mostarska populacija vrste *G. cordifolia*. Rezultati tankoslojne kromatografije dali su uvid u glavne sastavnice istraživanih vrsta i populacija, kao i u njihove međusobne odnose. Dobiveni rezultati ukazuju na to da primjena tankoslojne kromatografije može omogućiti brzu preliminarnu karakterizaciju uzoraka istraživanih vrsta roda *Globularia*, zbog čega bi mogla poslužiti kao komplementarna metoda pri identifikaciji (nepoznatog) biljnog materijala.



Slika 76. TLC kromatogram maceracijom dobivenih metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova uzoraka vrsta roda *Globularia* sakupljenih 2015. godine (sustav 3):

Nepokretna faza:	TLC silikagel 60 F_{254} ploče (staklene)
Pokretna faza:	etil acetat-etil metil keton-mravlja kiselina-voda (5:3:1:1, *V*/*V*/*V*/*V*)
Detekcija:	anisaldehid-sumporna kiselina, 100-105 °C, dnevno svjetlo (1a), UV 365 nm (2a) NP/PEG, dnevno svjetlo (1b), UV 365 nm (2b)
Uzorci:	3 – *G. alypum* (Konavoske stijene), 4 – *G. cordifolia* (Mostar), 5 – *G. cordifolia* (Biokovo), 6 – *G. cordifolia* (Alan), 7 – *G. cordifolia* (Šestanovac), 8 – *G. cordifolia* (Baške Oštarije), 9 – *G. meridionalis* (Grobničko polje), 10 – *G. meridionalis* (Učka), 11 – *G. meridionalis* (Dinara), 12 – *G. meridionalis* (Baške Oštarije), 13 – *G. punctata* (Grobničko polje), 14 – *G. punctata* (Vižintini), 15 – *G. punctata* (Slapnica), 16 – *G. punctata* (Vugrovec), 17 – *G. punctata* (Dinara)
Referentni standardi:	verbaskozid, izoverbaskozid



Slika 77. TLC kromatogram maceracijom dobivenih metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova uzoraka vrsta roda *Globularia* sakupljenih 2015. godine (sustav 5):

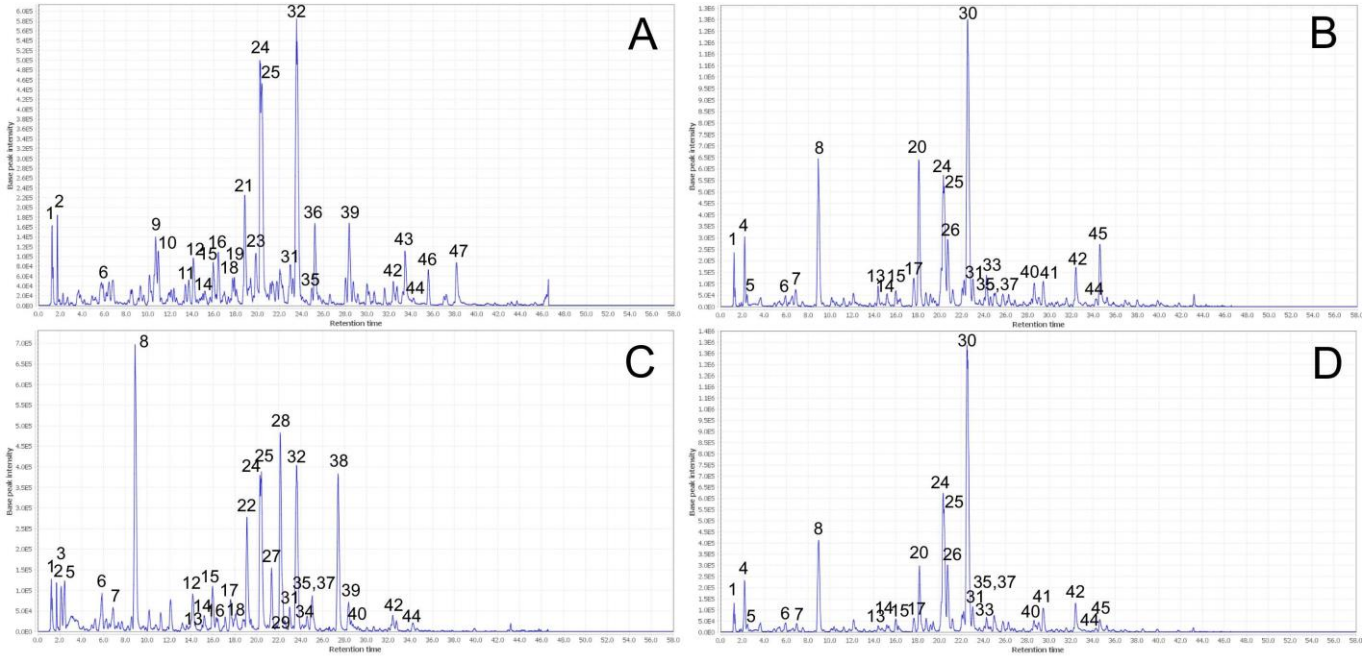
Nepokretna faza:	TLC silikagel 60 F_{254} ploče (staklene)
Pokretna faza:	toluen-etil format-mravlja kiselina (5:4:1, *V*/*V*/*V*)
Detekcija:	anisaldehid-sumporna kiselina, 100-105 °C, dnevno svjetlo (1a), UV 365 nm (2a)
	NP/PEG, dnevno svjetlo (1b), UV 365 nm (2b)
Uzorci:	3 – *G. alypum* (Konavoske stijene), 4 – *G. cordifolia* (Mostar), 5 – *G. cordifolia* (Biokovo), 6 – *G. cordifolia* (Alan), 7 – *G. cordifolia* (Šestanovac), 8 – *G. cordifolia* (Baške Oštarije), 9 – *G. meridionalis* (Grobničko polje), 10 – *G. meridionalis* (Učka), 11 – *G. meridionalis* (Dinara), 12 – *G. meridionalis* (Baške Oštarije), 13 – *G. punctata* (Grobničko polje), 14 – *G. punctata* (Vižintini), 15 – *G. punctata* (Slapnica), 16 – *G. punctata* (Vugrovec), 17 – *G. punctata* (Dinara)
Referentni standardi:	verbaskozid, katalpol, asperulozid (1a, 2a)
	luteolin, apigenin, apigenin 7-*O*-glukozid (2a, 2b)

4.2.3.4. Metanolni ekstrakti nadzemnih dijelova dobiveni Soxhlet ekstrakcijom

Fitokemijski profil metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013), *G. cordifolia* (Alan, 2013), *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013) i *G. punctata* (Grobničko polje, 2013) dobivenih Soxhlet ekstrakcijom, koji su primijenjeni u istraživanju antioksidativnog, protuupalnog i antimikrobnog učinka, bio je usporediv s onima ekstrakata dobivenih dekokcijom i maceracijom. Kao i u slučaju macerata, udio većine glavnih sastavnica bio je veći u Soxhlet ekstraktima u usporedbi s ekstraktima pripremljenim dekokcijom, ali uz također povišeni udio glavnih biološki aktivnih sastavnica poput globularina, globularifolina i verbaskozida. Udio besperulozida bio je nešto viši kod ekstrakata pripremljenih dekokcijom. S druge strane, nepolarni spojevi poput oksidacijskih produkata masnih kiselina izostali su u ekstraktima pripremljenim Soxhlet ekstrakcijom, što je bilo posljedica dodatnog izmućkavanja dobivenih ekstrakata kloroformom.

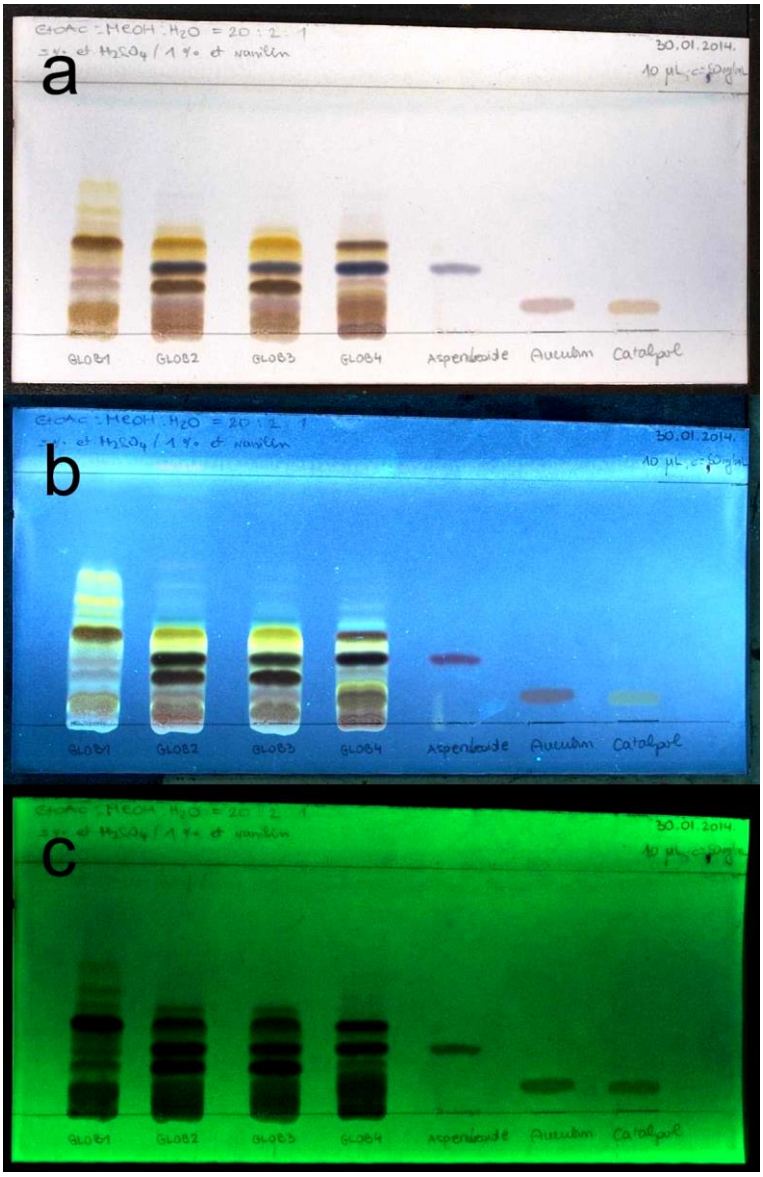
U HPLC-MS kromatogramu baznih pikova vrste *G. alypum* dominirali su pikovi sljedećih spojeva: manitola/saharoze, katalpola, verminozida, genipozida, 6-hidroksiluteolin 7-*O*-soforozida, alpinozida, globularinina, kalceolariozida A, kalceolariozida B, rozikazida A, verbaskozida, izoverbaskozida, globularina, 6′-*O*-feruloil-1′-*O*-hidroksitirozil glukozida, globulariozida, 6'-*O*-kafeoilverbaskozida, globulozida A i galipumozida B (Slika 78). U kromatogramima vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* istaknuli su se pikovi manitola/saharoze, monomelitozida, asperulozida, 6'-*O*-benzoilmonomelitozida, verbaskozida, metoksiverbaskozida, globularifolina, izoverbaskozida te izomera globusintenozida i benzoilrozikazida A. U kromatogramu vrste *G. punctata* istaknuli su se pikovi manitola/saharoze, katalpola, skandozida, deacetilasperulozida, gardozida i izomera kafeoilglukozida, asperulozida, 6-hidroksiluteolin 7-*O*-soforozida, alpinozida, 6-hidroksiluteolin 7-*O*-(6’’’-*O*-kafeoil)-soforozida, rozikazida A, verbaskozida, trihosantozida B, trihosantozida A, izoverbaskozida, globularina, 10-*O*-*p*-kumaroildeacetilasperulozida, besperulozida, globulariozida i izomera globusintenozida.

Brza i jednostavna usporedba glavnih sastavnica Soxhlet ekstrakata omogućena je i primjenom tankoslojne kromatografije uz pokretnu fazu etil acetat-metanol-voda (20:2:1, *V*/*V*/*V*) (sustav 1) (Slika 79). Dominantne zone vidljive pri dnevnom svjetlu nakon prskanja vanilin-sumpornom kiselinom bile su sljedeće: smeđe zone katalpola (R_f = 0,10) i globularina (R_f = 0,35) kod vrste *G. alypum*, smeđe zone monomelitozida (R_f = 0,06) i globularifolina (R_f = 0,24), plava asperulozida (R_f = 0,27) i žuta verbaskozida (R_f = 0,34) kod vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* te smeđe zone katalpola i skandozida (R_f = 0,11) te globularina s plavom zonom asperulozida kod vrste *G. punctata*.



Slika 78. HPLC-MS kromatogrami baznih pikova metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013) (A), *G. cordifolia* (Alan, 2013) (B), *G. punctata* (Grobničko polje, 2013) (C) i *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013) (D) dobivenih Soxhlet ekstrakcijom, pri negativnom načinu rada:

1 – manitol, saharoza, **2** – katalpol, **3** – skandozid, **4** – monomelitozid, **5** – deacetilasperulozid, **6** – gardozid, kafeoilglukozid izomer, **7** – asperulozidinska kiselina, **8** – asperulozid, **9** – verminozid, **10** – genipozid, **11** – spekiozid, **12** – 6-hidroksiluteolin 7-*O*-soforozid, **13** – 6'-*O*-benzoildeacetilasperulozidinska kiselina glukozid, **14** – 6-hidroksiluteolin 7-*O*-glukozid, **15** – alpinozid, **16** – globularinin, **17** – 6'-*O*-benzoildeacetilasperulozidinska kiselina, **18** – globularimin, **19** – liriodendrin, **20** – 6'-*O*-benzoilmonomelitozid, **21** – kalceolariozid A, **22** – 6-hidroksiluteolin 7-*O*-(6'''-*O*-kafeoil)-soforozid, **23** – kalceolariozid B, **24** – rozikazid A, **25** – verbaskozid, **26** – metoksiverbaskozid, **27** – trihosantozid B, **28** – trihosantozid A, **29** – 6-hidroksiluteolin 7-*O*-(6'''-*O*-*p*-kumaroil)-soforozid, **30** – globularifolin, **31** – izoverbaskozid, **32** – globularin, **33** – 6'-*O*-benzoildeacetilalpinozid, **34** – arenariozid, **35** – leukoskeptozid A, **36** – 6'-*O*-feruloil-1'-*O*-hidroksitirozil glukozid, **37** – 10-*O*-*p*-kumaroildeacetilasperulozid, **38** – besperulozid, **39** – globulariozid, **40** – nepoznati spoj (*m/z* 467), **41** – demetoksicentaureidin 6,4'-dimetil eter, **42** – globusintenozid izomer, **43** – 6'-*O*-kafeoilverbaskozid, **44** – apigenin, **45** – benzoilrozikazid A izomer, **46** – globulozid A, **47** – galipumozid B



Slika 79. TLC kromatogram Soxhlet ekstrakcijom dobivenih metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova odabranih populacija istraživanih vrsta roda *Globularia* (sustav 1):

Nepokretna faza:	TLC silikagel 60 F_{254} ploče (aluminijske)
Pokretna faza:	etil acetat-metanol-voda (20:2:1, *V/V/V*)
Detekcija:	vanilin-sumporna kiselina, 100-105 °C, dnevno svjetlo (a), UV 365 nm (b) i 254 nm (c)
Uzorci:	GLOB1 – *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013), GLOB2 – *G. cordifolia* (Alan, 2013), GLOB3 – *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013), GLOB4 – *G. punctata* (Grobničko polje, 2013)
Referentni standardi:	asperulozid, aukubin, katalpol

4.2.3.5. Metanolni ekstrakti listova dobiveni ultrazvučnom ekstrakcijom

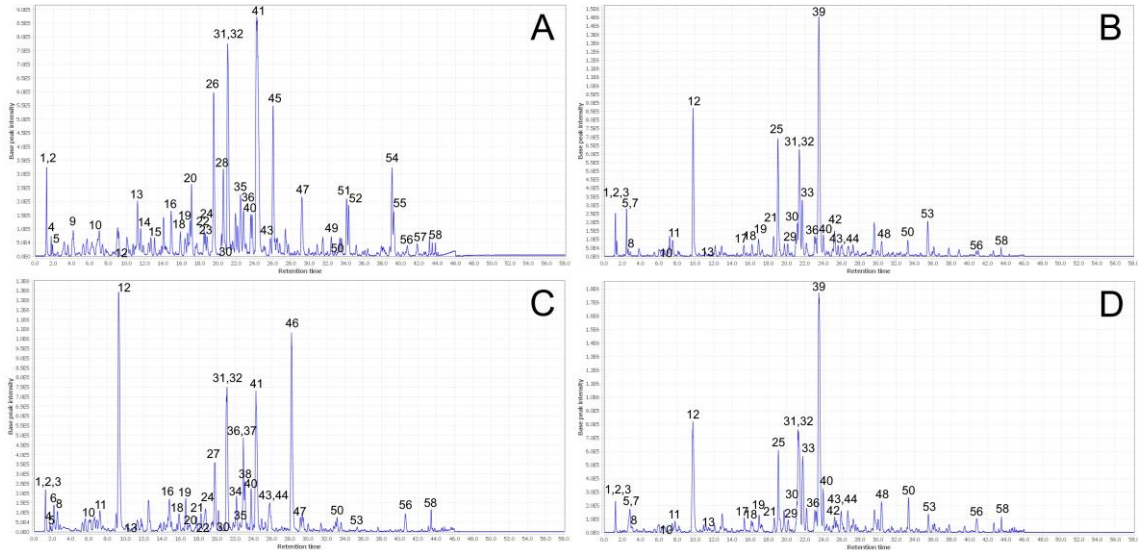
Fitokemijski profil metanolnih ekstrakata listova dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom, koji su primijenjeni u istraživanju antidijabetskog i citotoksičnog učinka vrsta roda *Globularia*, utvrđen je primjenom spregnutog sustava tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s fotodiodnom detekcijom i tandemskom masenom spektrometrijom.

Sastav ekstrakata koji su primijenjeni u istraživanju antidijabetskog učinka

U usporedbi s ekstraktima nadzemnih dijelova vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013), *G. cordifolia* (Alan, 2013), *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013) i *G. punctata* (Grobničko polje, 2013) pripremljenim Soxhlet ekstrakcijom, ekstrakti listova istih uzoraka dobiveni ultrazvučnom ekstrakcijom, a koji su bili primijenjeni u istraživanju antidijabetskog učinka, sadržavali su veću količinu glavnih sastavnica, što je bilo najviše izraženo kod vrste *G. alypum*, koja je bila posebno bogata feniletanoidima (Slika 80, Tablica XXXII). Navedeno bi se jednim dijelom moglo pripisati činjenici da su, u usporedbi s uzorcima drugih vrsta, u nadzemnim dijelovima vrste *G. alypum* listovi bili manje zastupljeni u odnosu na ostale biljne dijelove, posebice u odnosu na stabljike za koje je ranije utvrđeno da su siromašnije sekundarnim biljnim metabolitima. Dodatni čimbenik koji je mogao povoljno djelovati na povišeni sadržaj detektiranih spojeva kod ove vrste je i smanjena temperatura ekstrakcije.

U usporedbi sa Soxhlet ekstraktom nadzemnih dijelova, ekstrakt listova vrste *G. alypum* sadržavao je značajno više feniletanoida, poput kalceolariozida A i B, verbaskozida, izoverbaskozida, 6'-*O*-feruloil-1'-*O*-hidroksitirozil glukozida, 6'-*O*-kafeoilverbaskozida, galipumozida B i drugih, ali i iridoida poput globularinina i globularina te drugih spojeva (npr. globularitola). Udio katalpola bio je, u usporedbi sa Soxhlet ekstraktom, snižen kod ekstrakta listova ove vrste, kao i listova vrste *G. punctata*.

U ekstraktu listova vrste *G. cordifolia* značajnije povišene bile su njegove glavne sastavnice asperulozid i globularifolin. Dio sastavnica bio je prisutan u manjoj količini nego u Soxhlet ekstraktima nadzemnih dijelova, primjerice izomeri globusintenozida i benzoilrozikazida A, što nije bio slučaj kod ostalih istraživanih vrsta. Ovo bi moglo biti uvjetovano različitim omjerom pojedinih biljnih dijelova u nadzemnom materijalu primijenjenom prilikom Soxhlet ekstrakcije. U ekstraktu listova vrste *G. meridionalis* bili su posebno povišeni asperulozid, 6'-*O*-benzoilmonomelitozid, metoksiverbaskozid, globularifolin te izomeri verbaskozida i globusintenozida, a kod vrste *G. punctata* asperulozid, verbaskozid, globularin i besperulozid, ali i drugi spojevi poput 6-hidroksiluteolin 7-*O*-soforozida, alpinozida i 10-*O*-*p*-kumaroildeacetilasperulozida.



Slika 80. HPLC-MS kromatogrami baznih pikova metanolnih ekstrakata listova vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013) (A), *G. cordifolia* (Alan, 2013) (B), *G. punctata* (Grobničko polje, 2013) (C) i *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013) (D) dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom, koji su primijenjeni u istraživanju antidijabetskog učinka, pri negativnom načinu rada:

1 – manitol, **2** – saharoza, **3** – kina kiselina, **4** – katalpol, **5** – aukubin, **6** – skandozid, **7** – monomelitozid, **8** – deacetilasperulozid, **9** – hidroksitirozol glukozid, **10** – hebitol II, **11** – asperulozidinska kiselina, **12** – asperulozid, **13** – globularitol, **14** – genipozid, **15** – vicenin-2, **16** – 6-hidroksiluteolin 7-*O*-soforozid, **17** – 6'-*O*-benzoildeacetilasperulozidinska kiselina glukozid, **18** – 6-hidroksiluteolin 7-*O*-glukozid, **19** – alpinozid, **20** – globularinin, **21** – 6'-*O*-benzoildeacetilasperulozidinska kiselina, **22** – globularimin, **23** – liriodendrin, **24** – izokvercitrin, **25** – 6'-*O*-benzoilmonomelitozid, **26** – kalceolariozid A, **27** – 6-hidroksiluteolin 7-*O*-(6'''-*O*-kafeoil)-soforozid, **28** – kalceolariozid B, **29** – 6-*O*-benzoilaukubin, **30** – nepetin 7-*O*-glukozid, **31** – rozikazid A, **32** – verbaskozid, **33** – metoksiverbaskozid, **34** – trihosantozid B, **35** – globularidin, **36** – izoverbaskozid, **37** – trihosantozid A, **38** – 6-hidroksiluteolin 7-*O*-(6'''-*O*-*p*-kumaroil)-soforozid, **39** – globularifolin, **40** – verbaskozid izomer, **41** – globularin, **42** – 6'-*O*-benzoildeacetilalpinozid, **43** – leukoskeptozid A, **44** – 10-*O*-*p*-kumaroildeacetilasperulozid, **45** – 6'-*O*-feruloil-1'-*O*-hidroksitirozil glukozid, **46** – besperulozid, **47** – globulariozid, **48** – demetoksicentaureidin 6,4'-dimetil eter, **49** – alpinozid-alpinozid dimer, **50** – globusintenozid izomer, **51** – desramnozil 6'-*O*-kafeoilverbaskozid, **52** – 6'-*O*-kafeoilverbaskozid, **53** – benzoilrozikazid A izomer, **54** – galipumozid B, **55** – desramnozil galipumozid B, **56** – okso-dihidroksi-oktadecenoična kiselina, **57** – galipumozid C, **58** – trihidroksi-oktadecenoična kiselina

Identifikacija sastavnica

Identifikacija većine sastavnica ekstrakata vrsta roda *Globularia* dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom temeljila se na usporedbi s prethodno utvrđenim fitokemijskim profilima uzoraka pripremljenih dekokcijom i maceracijom. Identifikacija novih sastavnica temeljila se na usporedbi njihovih obrazaca MS/MS fragmentacije s prethodno utvrđenim obrascima u kombinaciji s provjerom UV spektralnih i literaturnih podataka (Tablica XXXII).

Feniletanoidi

Spojevi **9** (*m/z* 315), **51** (*m/z* 639), **55** (*m/z* 653) i **57** (*m/z* 789) bili su karakteristični za vrstu *G. alypum*. Spoj **9** okvirno je identificiran kao hidroksitirozol glukozid, sastavni dio svih identificiranih feniletanoida, na temelju uočenih produktnih iona prisutnih pri *m/z* 135 i 153 u MS^2, a koji su pripisani gubitku glukoze i anhidroglukoze. Spojeve **51** i **55** karakterizirali su UV spektri usporedivi s onima feniletanoida derivata kavene kiseline te vremena zadržavanja diaciliranih feniletanoida. Gubitak 162 Da, pripisan odvajanju anhidrokavene kiseline, primijećen je u MS^2 spoja **51**, dok su u MS^2 spoja **55** uočeni glavni fragment pri *m/z* 477 te manji fragmenti pri *m/z* 459 i 491, a koji su pripisani gubitku anhidroferulinske, ferulinske i kavene kiseline. Kod oba spoja slijedio je dominantni gubitak 316 Da u MS^3 i gubitak 28 Da u MS^4. Navedeni gubici pripisani su odvajanju hidroksitirozol glukozida i CO, pri čemu je drugi ukazivao na prisutnost kavene kiseline u strukturi feniletanoida. Spoj **51** okvirno je identificiran kao desramnozil 6'-*O*-kafeoilverbaskozid, a spoj **55** kao desramnozil galipumozid B (= 4'-*O*-kafeoil-6'-*O*-feruloil-1'-*O*-hidroksitirozil glukozid), na temelju usporedbe s drugim karakterističnim feniletanoidima vrste *G. alypum*. Feniletanoidi koji sadrže dvije acilne skupine i/ili ne sadrže ramnozu bili su uočeni samo kod ove vrste.

MS^2 spoja **57** karakterizirali su fragmenti pri *m/z* 461 (-328 Da) i 623 (-166 Da) uz dominantni fragment pri *m/z* 627 (-162 Da), koji je u MS^3 izgubio 166 Da. Dobiveni produktni ion (*m/z* 461) pokazao je u MS^4 fragmentaciju tipičnu za feniletanoide s dominantnim produktnim ionom pri *m/z* 315. Spoj **57** okvirno je identificiran kao galipumozid C u usporedbi s prethodnim literaturnim podacima o prisutnosti ovog feniletanoida u listovima vrste *G. alypum* (Kirmizibekmez i sur., 2008; Feriani i sur., 2017).

Flavonoidi

Spoj **30** (*m/z* 477) bio je zastupljeniji u listovima vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*. Karakterizirao ga je gubitak 162 Da u MS^2, pripisan odvajanju anhidroglukoze, uz nastanak produktnog radikal iona aglikona manje relativne zastupljenosti te gubitak metilne skupine u

MS^3 i gubitak 84 Da u MS^4, pripisan odvajanju tri CO. Fragment pri *m/z* 174 (-126 Da) mogao bi se pripisati odvajanju prstena B i atoma kisika, na temelju čega je navedeni spoj identificiran kao nepetin 7-*O*-glukozid, flavon koji je prethodno izoliran iz vrste *G. dumulosa* (Kirmizibekmez i sur., 2003a), a čija prisutnost je zabilježena i u listovima vrste *G. alypum* (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014b; Feriani i sur., 2017).

Tablica XXXII. Kromatografski i spektralni podaci glavnih spojeva detektiranih primjenom LC-PDA-ESI-MS^n tehnike pri negativnom načinu rada u ultrazvučnom ekstrakcijom dobivenim metanolnim ekstraktima listova vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013), *G. cordifolia* (Alan, 2013), *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013) i *G. punctata* (Grobničko polje, 2013), koji su primijenjeni u istraživanju antidijabetskog učinka (dodatak podacima koji su zabilježeni za prethodno identificirane spojeve)

Pik	Predložena identifikacija	*Mr*	t_R (min)	UV λ_{max} (nm)	*m/z** MS^n fragmenti (% relativne zastupljenosti)
Feniletanoidi					
9	Hidroksitirozol glukozid[a]	316, 31	4,0	197, 224, 282	**315** $[M-H]^-$, 351 $[M+^{35}Cl]^-$, 353 $[M+^{37}Cl]^-$, 361 $[M-H+HCOOH]^-$ **MS^2:** 315 → 135 (100), 153 (7); **MS^3:** -; **MS^4:** -
51	Desramnozil 6'-*O*-kafeoil verbaskozid[a]	641, 18	34,1	195, 218, 306, 327	**639** $[M-H]^-$ **MS^2:** 639 → 477 (100); **MS^3:** 477 → 161 (100), 179 (11), 315 (21); **MS^4:** 161 → 133 (100), 161 (36)
55	Desramnozil galipumozid B[a]	654, 61	39,2	197, 217, 301, 328	**653** $[M-H]^-$, 689 $[M+^{35}Cl]^-$, 691 $[M+^{37}Cl]^-$ **MS^2:** 653 → 459 (8), 477 (100), 491 (59); **MS^3:** 477 → 161 (100), 179 (6), 315 (21); **MS^4:** 161 → 133 (100), 161 (43)
57	Galipumozid C[a,b]	790, 80	41,8	197, 214, 291, 334	**789** $[M-H]^-$ **MS^2:** 789 → 461 (24), 623 (17), 627 (100); **MS^3:** 627 → 461 (100); **MS^4:** 461 → 135 (35), 161 (11), 297 (11), 315 (100)
Flavonoidi					
30	Nepetin 7-*O*-glukozid[a,b]	478, 40	20,8	198, 213, 284, 344	**477** $[M-H]^-$, 513 $[M+^{35}Cl]^-$, 955 $[2M-H]^-$ **MS^2:** 477 → 314 (40), 315 (100), 462 (20); **MS^3:** 315 → 300 (100); **MS^4:** 300 → 111 (5), 137 (16), 174 (20), 200 (47), 216 (100), 227 (67), 228 (68), 241 (36), 255 (51), 256 (58), 272 (94), 283 (36), 299 (80), 300 (39)

* – glavni ion otisnut je masnim slovima (relativna zastupljenost 100%); [a] – identifikacija temeljena na načinu MS/MS fragmentacije (i t_R) spojeva koji su slični drugim identificiranim spojevima (+PDA za dodatnu potvrdu); [b] – identifikacija temeljena na načinu MS/MS fragmentacije očekivanom za spojeve koji su prethodno zabilježeni u vrstama roda *Globularia* (+PDA za dodatnu potvrdu); - – nije detektirano

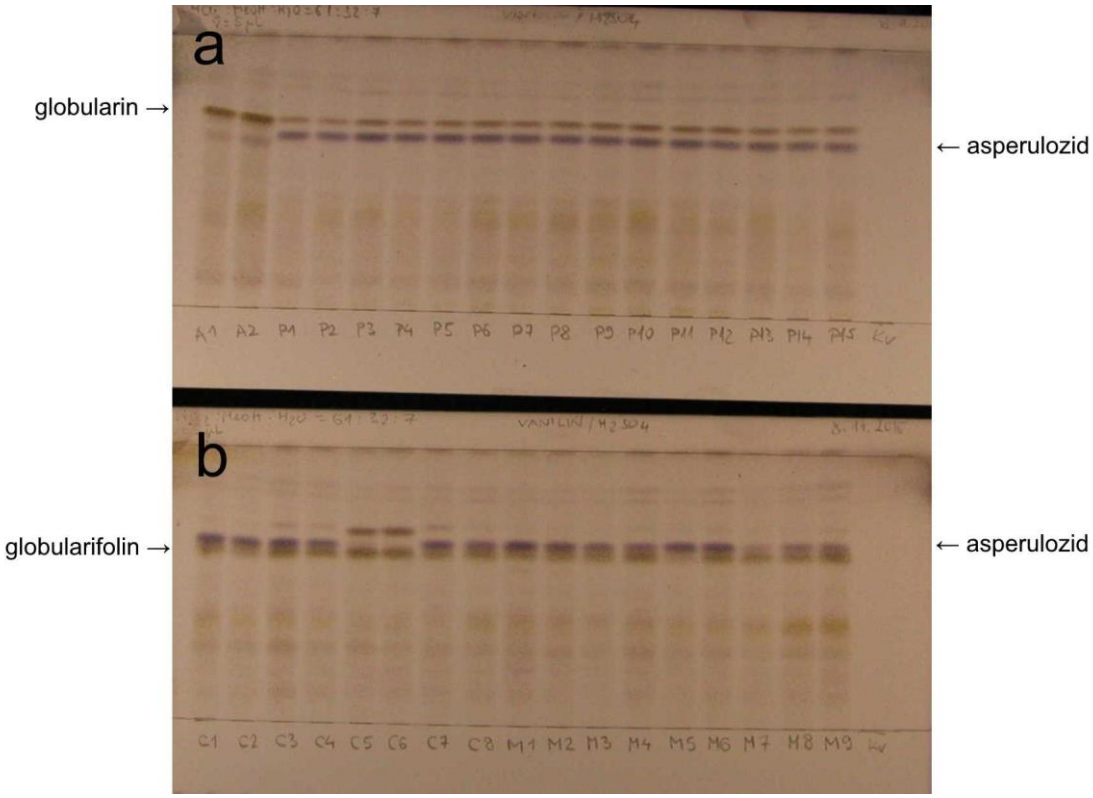
Sastav ekstrakata koji su primijenjeni u istraživanju citotoksičnog učinka

U istraživanju citotoksičnog učinka primijenjeni su metanolni ekstrakti listova vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013), *G. cordifolia* (Baške Oštarije, 2012), *G. meridionalis* (Baške Oštarije, 2012) i *G. punctata* (Grobničko polje, 2012), koji su također bili pripremljeni ultrazvučnom ekstrakcijom. U uzorcima su nađene iste sastavnice kao i u slučaju ekstrakata primijenjenih u istraživanju antidijabetskog učinka.

Usporedba između različitih populacija i sezona

Primjena tankoslojne kromatografije omogućila je brzu i jednostavnu usporedbu fitokemijskog profila uzoraka vrsta roda *Globularia* koji su sakupljeni u periodu od 2014. do 2016. godine, s naglaskom na dominantne iridoidne sastavnice (Slika 81), te su njome potvrđeni prethodno dobiveni rezultati. Iridoidne sastavnice detektirane su u metanolnim ekstraktima listova dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom reagensom vanilin-sumporna kiselina nakon razdvajanja u pokretnoj fazi kloroform-metanol-voda (61:32:7, *V*/*V*/*V*). Globularin (R_f = 0,70, smeđa zona) je uočen kao glavni iridoidni spoj vrste *G. alypum*, globularin i asperulozid (R_f = 0,64, plava zona) dominirali su kod vrste *G. punctata*, dok su kao glavne iridoidne sastavnice vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* prepoznati asperulozid i globularifolin (R_f = 0,62, smeđa zona). Iznimno, uzorci populacije vrste *G. cordifolia* s područja Mostara, sakupljeni u koritu rijeke Neretve, ponovno su se razlikovali od ostalih populacija ove vrste, prisutnošću dominantne smeđe zone (R_f = 0,68), koja je pripisana njezinim prethodno utvrđenim karakterističnim spojevima poput 10-*O*-cinamoil-monomelitozida i melampirozida (10-*O*-benzoilaukubina) te izostankom karakteristične zone asperulozida.

Kako bi se provjerila pretpostavka da je izostanak asperulozida posljedica okolišnih, a ne genetskih čimbenika, uspoređen je fitokemijski profil uzoraka vrste *G. cordifolia* s područja Mostara (blizina rijeke Neretve) (4K) i Šestanovca (3I), koji su više od šest mjeseci rasli u vrtnom uzgoju. Za usporedbu su uzeta dva ogranka usporedive veličine i oblika listova, po jedan od svake jedinke. Također, u analizu je uključen i uzorak vrste *G. cordifolia*, koji je naknadno sakupljen u travnju 2017. godine u okolici Mostara (udaljenost rijeke Neretve). Zona asperulozida bila je prisutna u sva tri uzorka, dok je prisutnost smeđe zone karakteristične za mostarsku populaciju, siromašnu asperulozidom, izostala. Unatoč tome što uzorci uključeni u ovu analizu nisu bili reprezentativni, dobiveni rezultati pokazali su da jedinke s mostarskog područja također posjeduju sposobnost sinteze asperulozida kao jednog od dominantnih spojeva vrste *G. cordifolia*. Prilikom prethodne usporedbe kemijskog sastava različitih populacija pojedinih vrsta roda *Globularia* s područja Hrvatske, koja se temeljila na masenoj detekciji, veće količine asperulozida uočene su kod južnijih populacija vrsta *G. cordifolia* (Biokovo, Šestanovac), *G. meridionalis* (Učka, Dinara) i *G. punctata* (Grobničko polje, Vižintini, Dinara) (Tablica XXX), što bi moglo biti povezano s dužim sunčanim razdobljima i mogućim periodima suše. Manja količina asperulozida kod mostarske populacije mogla bi pak, s druge strane, biti posljedica ubrzane razgradnje asperulozida u uvjetima relativno veće vlažnosti (Berkowitz i sur., 1982).

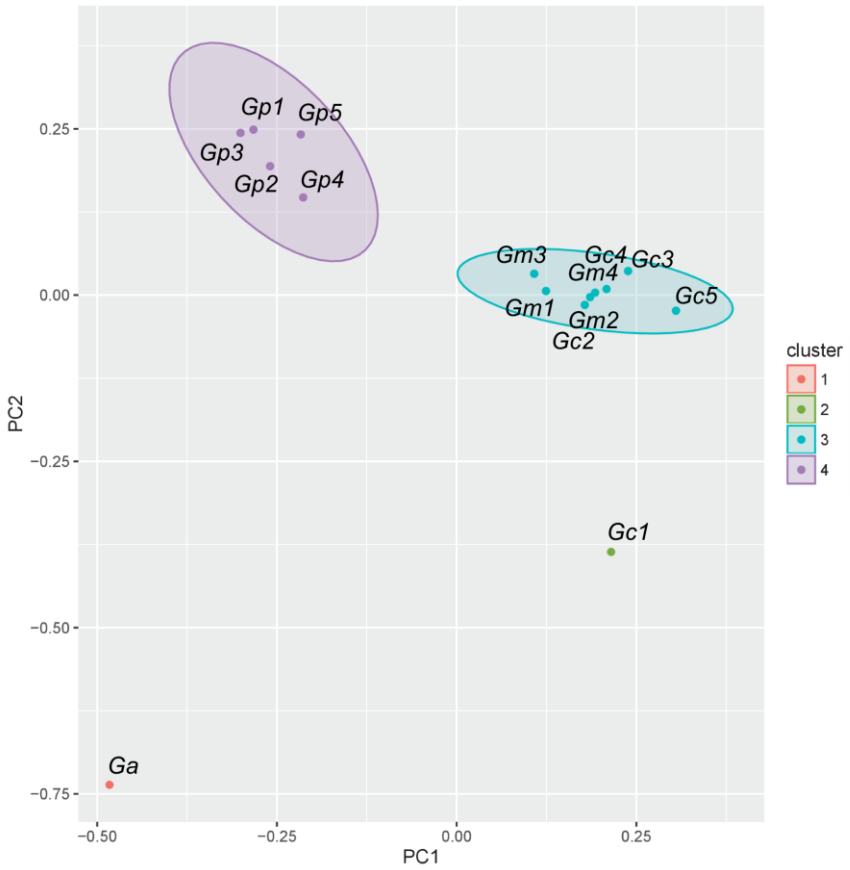


Slika 81. TLC kromatogram ultrazvučnom ekstrakcijom dobivenih metanolnih ekstrakata listova uzoraka vrsta roda *Globularia* sakupljenih u periodu od 2014. do 2016. Godine (sustav 2):

Nepokretna faza:	TLC silikagel 60 F_{254} ploče (staklene)
Pokretna faza:	kloroform-metanol-voda (61:32:7, *V*/*V*/*V*)
Detekcija:	vanilin-sumporna kiselina, 100-105 °C, dnevno svjetlo
Uzorci:	A – *G. alypum* (1 - Konavoske stijene, 2014, 2 - Konavoske stijene, 2015), P – *G. punctata* (1 – Grobničko polje, 2014, 2 – Grobničko polje, 2015, 3 – Grobničko polje, 2016, 4 – Vižintini, 2015, 5 – Vižintini, 2016, 6, 7 – Vugrovec, 2015, 8 – Vugrovec, 2016, 9 – Slapnica, 2015, 10 – Slapnica, 2016, 11 – Rude, 2015, 12 – Rude, 2016, 13 – Dinara, 2015, 14 – Dinara, 2016, 15 – Velebit, 2016) (a)
	C – *G. cordifolia* (1 – Alan, 2015, 2 – Biokovo, 2015, 3 – Šestanovac, 2015, 4 – Šestanovac, 2016, 5 – Mostar, 2015, 6 – Mostar, 2016, 7 – Baške Oštarije, 2015, 8 – Baške Oštarije, 2016), M – *G. meridionalis* (1 – Baške Oštarije, 2015, 2 – Baške Oštarije, 2016, 3 – Učka, 2015, 4 – Učka, 2016, 5 – Dinara, 2015, 6 – Dinara, 2016, 7 – Grobničko polje, 2014, 8 – Grobničko polje, 2015, 9 – Grobničko polje, 2016) (b)

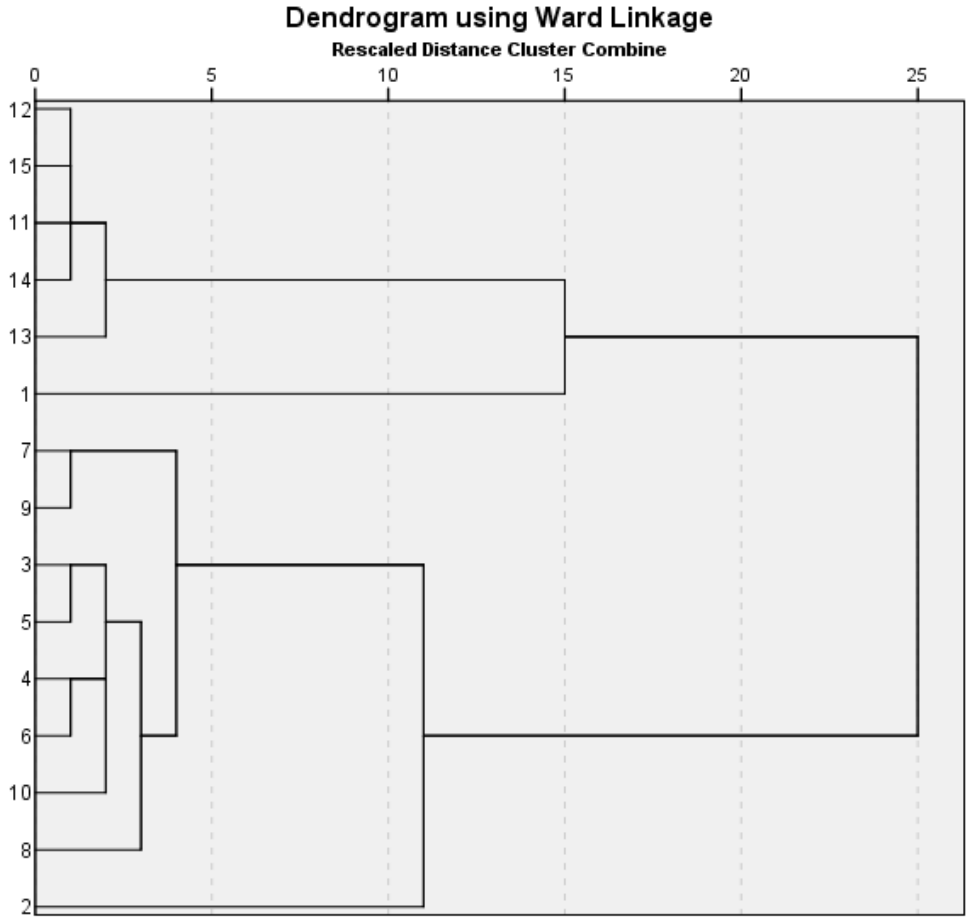
4.2.3.6. Kemotaksonomska karakterizacija vrsta s obzirom na sastavnice ekstrakata

Kemotaksonomska karakterizacija istraživanih vrsta roda *Globularia* provedena je pomoću analize glavnih komponenti u koju su bile uključene 42 glavne sastavnice metanolnih ekstrakata njihovih nadzemnih dijelova dobivenih maceracijom (Tablica XXX). Rezultati su pokazali jasno odvajanje vrste *G. alypum* od ostalih istraživanih vrsta, koje su se odvojile u dvije skupine (Slika 82). Prvu skupinu činile su populacije vrste *G. punctata*, a drugu populacije vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*, pri čemu se zahvaljujući svom karakterističnom kemijskom sastavu izdvojila mostarska populacija vrste *G. cordifolia*. Dobiveni rezultati ukazuju na to da vrste *G. cordifolia* i *G. meridionalis*, osim na temelju rezultata histološko-anatomskih, citoloških i filogenetskih analiza, nije moguće razlikovati ni na temelju njihovog kemijskog sastava.



Slika 82. Grupiranje 15 uzoraka vrsta roda *Globularia* sakupljenih 2015. godine dobiveno analizom glavnih komponenti u koju su bile uključene 42 glavne sastavnice metanolnih esktrakata nadzemnih dijelova dobivenih maceracijom; *Ga* – *G. alypum* (Konavoske stijene); *Gc* – *G. cordifolia* (1 – Mostar, 2 – Biokovo, 3 – Alan, 4 – Šestanovac, 5 – Baške Oštarije); *Gm* – *G. meridionalis* (1 – Grobničko polje, 2 – Učka, 3 – Dinara, 4 – Baške Oštarije); *Gp* – *G. punctata* (1 – Grobničko polje, 2 – Vižintini, 3 – Slapnica, 4 – Vugrovec, 5 – Dinara)

Također, u svrhu jasnijeg utvrđivanja srodstvenih odnosa između istraživanih populacija i vrsta roda *Globularia* provedena je i hijerarhijska klaster analiza u koju su također bile uključene 42 glavne sastavnice metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova dobivenih maceracijom (Tablica XXX). Dobiveni dendrogram pokazao je grupiranje u dvije glavne skupine (Slika 83), točnije razdvajanje uzoraka vrsta *G. alypum* i *G. punctata* od uzoraka vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*, unutar kojih su se redom izdvojile vrsta *G. alypum* te mostarska populacija vrste *G. cordifolia*.



Slika 83. Dendrogram dobiven hijerarhijskom klaster analizom glavnih sastavnica metanolnih esktrakata nadzemnih dijelova dobivenih maceracijom 15 uzoraka vrsta roda *Globularia* sakupljenih 2015. godine; 1 – *G. alypum* (Konavoske stijene); 2 – *G. cordifolia* (Mostar), 3 – *G. cordifolia* (Biokovo), 4 – *G. cordifolia* (Alan), 5 – *G. cordifolia* (Šestanovac), 6 – *G. cordifolia* (Baške Oštarije); 7 – *G. meridionalis* (Grobničko polje), 8 – *G. meridionalis* (Učka), 9 – *G. meridionalis* (Dinara), 10 – *G. meridionalis* (Baške Oštarije); 11 – *G. punctata* (Grobničko polje), 12 – *G. punctata* (Vižintini), 13 – *G. punctata* (Slapnica), 14 – *G. punctata* (Vugrovec), 15 – *G. punctata* (Dinara)

Unutar podskupine koju su činili uzorci vrste *G. punctata* došlo je do izdvajanja populacije s područja Slapnice od ostalih populacija. Zanimljivo je da su na posebnost kemijskog sastava navedene populacije ukazivali i preliminarni rezultati kvantifikacije sekundarnih metabolita, prema kojima je ekstrakt njezinih listova bio najbogatiji fenolnim spojevima i flavonoidima (Slika 56, Slika 58). Unutar podskupine koju su činili uzorci vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* došlo je do daljnje podjele na uzorke vrste *G. meridionalis* s područja Grobničkog polja i Dinare te na ostale uzorke, među kojima se izdvojio uzorak vrste *G. meridionalis* s područja Učke. Preostali uzorci dodatno su se razdvojili na uzorke vrste *G. cordifolia* s biokovskog područja (Biokovo i Šestanovac), uzorke vrste *G. cordifolia* s velebitskog područja (Alan i Baške Oštarije) i uzorak vrste *G. meridionalis* s velebitskog područja (Baške Oštarije). Zanimljivo je da su na morfološkoj razini uzorci sabrani na području Grobničkog polja i Dinare imali listove dominantno ušiljenog i/ili zaobljenog vrha, dok je kod ostalih uzoraka povremeno zabilježena prisutnost listova nazubljenog vrha. Moguće je uočiti i da su se ostali uzorci međusobno grupirali ovisno o području s kojeg dolaze, što je također moglo utjecati na njihov kemijski sastav.

Kao glavni spojevi vrste *G. alypum* istaknuli su se iridoid globularin, koji je u većoj ili manjoj količini bio prisutan i kod vrste *G. punctata*, te feniletanoid verbaskozid, jedan od glavnih spojeva u sve četiri istraživane vrste. Globularin, verbaskozid, kao i 6-hidroksiluteolin 7-*O*-diglukozid, koji je u ovom istraživanju uočen kao jedan od glavnih flavonoida vrste *G. alypum* (uz apigenin i njegove glikozide), nedavno su se također pokazali dominantnim sastavnicama listova iste vrste (Feriani i sur., 2017). Karakteristični iridoidi za vrstu *G. alypum* bili su 6-*O*-esteri katalpola (verminozid, spekiozid i minekozid), dok su katalpol i različiti derivati globularina, kao što je globulariozid, bili prisutni i kod vrste *G. punctata*. Genipozid i litantosalin, 10-*O*-benzoilirani derivat aukubina, kao i karakteristični desramnozilirani i acilirani derivati verbaskozida/izoverbaskozida (kalceolariozid A i B, 6′-*O*-feruloil-1′-*O*-hidroksitirozil glukozid, 6’-*O*-kafeoilverbaskozid i galipumozid B) nađeni su samo kod vrste *G. alypum*. U usporedbi s ostalim vrstama, navedena vrsta sadržavala je veću količinu glikozida apigenina. U ovom istraživanju po prvi puta je uočena prisutnost bisiridoidnih spojeva kod vrste *G. alypum*, među kojima je prevladavao globulozid A, ester alpinozida i globularina. Osim verbaskozida, u sve četiri vrste bili su prisutni i sljedeći feniletanoidi: rozikazid A (u većoj mjeri kod vrsta *G. alypum* i *G. punctata*), izoverbaskozid (u većoj mjeri kod vrsta *G. alypum* i *G. cordifolia*/*G. meridionalis*) i izomer globusintenozida (u većoj mjeri kod vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*). Glavni zajednički iridoid za sve četiri vrste bio je alpinozid.

Vrste *G. cordifolia* i *G. meridionalis* pokazale su usporedive fitokemijske profile te, osim u slučaju mostarske populacije vrste *G. cordifolia*, nisu uočeni dominantni spojevi koji bi mogli poslužiti kao kemotaksonomski biljezi za njihovo međusobno razlikovanje. Obje vrste karakterizirala je relativno visoka količina asperulozida (osim mostarske populacije vrste *G. cordifolia*), kao i monomelitozida s njegovim benzoiliranim esterima, 6'-*O*-benzoilmonomelitozidom i globularifolinom. Uz njih su uočeni i drugi benzoilirani iridoidi, primjerice besperulozid, koji je bio karakterističan za južne populacije vrste *G. cordifolia* (Biokovo, Šestanovac). Od navedenih spojeva, besperulozid i asperulozid bili su u relativno visokoj količini prisutni i kod vrste *G. punctata*. Također, sve tri vrste sadržavale su i druge derivate asperulozida: deacetilasperulozid, musaenozidinsku kiselinu, (*epi*)loganinsku kiselinu, asperulozidinsku kiselinu, metilni ester asperulozidinske kiseline (dafilozid) i 10-*O*-*p*-kumaroildeacetilasperulozid. Prisutnost glukozida 6'-*O*-benzoil-deacetilasperulozidinske kiseline i 6'-*O*-benzoildeacetilasperulozidinske kiseline te izomera benzoilrozikazida A bila je u većoj mjeri karakteristična za populacije s velebitskog područja (Alan, Baške Oštarije). Kod vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* nađen je i karakterističan feniletanoid, plantainozid C. Prisutnost metoksiliranih flavonoida bila je izraženija nego kod drugih dviju vrsta. Mostarsku populaciju vrste *G. cordifolia* karakterizirala je, između ostalog, prisutnost 10-*O*-cinamoilmonomelitozida, litantosalina (10-*O*-cinamoilaukubina) i melampirozida (10-*O*-benzoilaukubina) te smanjeni udio asperulozida.

Vrsta *G. punctata* pokazala je poseban feniletanoidni i flavonoidni profil. Karakterizirali su ju ksilozilirani derivati verbaskozida (trihosantozid A i B, arenariozid) i acilirani derivati 6-hidroksiluteolin 7-*O*-diglukozida, posebno 6-hidroksiluteolin 7-*O*-(6'''-*O*-kafeoil)-soforozid, koji je u većoj mjeri bio prisutan kod južnih populacija (Grobničko polje, Vižintini, Dinara). Populacija s područja Slapnice istaknula se povišenim sadržajem rozikazida A, trihosantozida A, globularina i 10-*O*-*p*-kumaroildeacetilasperulozida. Dok je 6-hidroksiluteolin 7-*O*-diglukozid bio prisutan samo kod vrsta *G. alypum* i *G. punctata*, sve istraživane vrste sadržavale su 7-*O*-glukozide 6-hidroksiluteolina i luteolina. Iridoid karakterističan za vrstu *G. punctata* bio je skandozid.

Vrsta *G. alypum*, osim s vrstom *G. punctata*, dio karakterističnih spojeva dijeli i s vrstama pripadnicama sekcija *Polycephalium*, *G. davisiana* (genipozid, globularin, litantosalin) (Çaliş i sur., 2002a), *G. orientalis* (globularin, kalceolariozid A, katalpol) (Çaliş i sur., 2002b) i *G. sintenisii* (globularin, katalpol, litantosalin) (Kirmizibekmez i sur., 2004a), odnosno *Lytanthus*, *G. salicina* (globularin, katalpol, litantosalin) (Fikenscher i sur., 1969), kao i s drugim vrstama sekcije *Globularia*, *G. nana* (globularin, katalpol, litantosalin)

(Chaudhuri i sur., 1981), *G. trichosantha* (globularidin, globulozid A, katalpol, liriodendrin) (Çaliş i sur., 2001) i *G. vulgaris* (globularin, katalpol) (Taskova i sur., 2006). Sve navedene sekcije prema ranije predloženoj podjeli pripadaju podrodu *Globularia* (*Jasionopsis*), dok vrsta *G. alypum* pripada podrodu *Abolaria* (Schwarz, 1938; Schwarz, 1963; Holländer i Jäger, 1994). Na moguću povezanost s vrstama iz sekcije *Polycephalium* ukazali su nedavno i rezultati analize ITS sljedova 13 vrsta roda *Globularia* (Hazler Pilepić i sur., 2016).

Fitokemijska sličnost vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* primijećena je i ranije (Tundis i sur., 2012b), a mogla bi se obrazložiti njihovom bliskom srodnošću (Schwarz, 1938; Schwarz, 1963). Također, prema ranijim istraživanjima, dio u njih identificiranih spojeva (dekafeoilverbaskozid, demetoksicentaureidin 7-*O*-glukozid, leukoskeptozid A, pektolinarigenin 7-*O*-glukozid) (Harborne i Williams, 1971; Tundis i sur., 2012a) nađen je i kod vrste *G. dumulosa* (Kirmizibekmez i sur., 2003a), koja je u starijem pregledu roda *Globularia* bila uključena u zajedničku sekciju *Empetron* (Schwarz, 1938).

Na sličan način, vrsta *G. punctata*, iz sekcije *Globularia*, posjedovala je spojeve karakteristične za pripadnike iste sekcije, vrste *G. trichosantha* (Çaliş i sur., 1999; Çaliş i sur., 2001) i *G. vulgaris* (Taskova i sur., 2006), odnosno za vrstu *G. aphyllanthes*, čiji su naziv u svom radu autori naveli kao sinonim za vrstu *G. vulgaris* (Kirmizibekmez i sur., 2009). S obzirom na podatke o ograničenoj rasprostranjenosti vrste *G. vulgaris* (Schwarz, 1938; Holländer i Jäger, 1994), najvjerojatnije je riječ o pogrešno korištenom nazivu za vrstu *G. punctata*, te su u Tablici XXVII identificirani spojevi naznačeni kao prvi puta zabilježeni ukoliko prethodno nisu bili detektirani ni kod vrste *G. aphyllanthes* ni kod vrste *G. punctata*.

Iako su prema novijoj literaturi *G. cordifolia* i *G. meridionalis* prepoznate kao odvojene vrste (Tundis i sur., 2012a; Tundis i sur., 2012b; www.theplantlist.org), zadnja predložena podjela smatra ih varijetetima vrste *G. cordifolia* (Holländer i Jäger, 1994), što bi moglo objasniti izostanak značajnijih razlika u njihovom kemijskom sastavu. Istraživanje iridoidnih glikozida u vrstama roda *Plantago*, koje pripadaju istoj porodici kao i vrste roda *Globularia* (Albach i sur., 2005), ukazalo je da ovi spojevi nemaju sistematsku važnost u taksonomskim kategorijama ispod vrste (Taskova i sur., 2002). Imajući na umu da značajne razlike nisu uočene ni u provedenim histološko-anatomskim, citološkim i filogenetskim istraživanjima, dobiveni rezultati podupiru rezultate istraživanja koja su ukazala na upitnu opravdanost njihove podjele na vrste (Ravnik, 1965; Milletti, 1987). Također, navedene vrste pokazale su veću fitokemijsku sličnost s vrstom *G. punctata*, nego s vrstom *G. alypum*, što nije u skladu s njihovim svrstavanjem u podrod *Abolaria* (Schwarz, 1938; Schwarz, 1963), a na što su također upozorili ranije spomenuti autori (Holländer i Jäger, 1994).

4.2.4. Lakohlapljive sastavnice

Kemijski sastav eteričnih ulja dobivenih vodenom destilacijom nadzemnih dijelova u cvatu uzoraka različitih populacija vrste *G. cordifolia* (Baške Oštarije, Mostar), *G. meridionalis* (Baške Oštarije, Grobničko polje) i *G. punctata* (Grobničko polje, Vižintini), sabranih 2012. godine tijekom perioda cvatnje, istražen je po prvi puta pomoću spregnutog sustava plinska kromatografija-plamenoionizacijska detekcija (GC-FID) i plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS). Destilacija je provedena unutar šest mjeseci od sakupljanja biljnog materijala. Prinos eteričnog ulja bio je manji od 0,1%.

Ukupno su identificirana 33 spoja, odnosno 90,2-92,8% sadržaja lakohlapljivih sastavnica, pri čemu su najzastupljeniji spojevi bili okt-1-en-3-ol (2,9-47,0%), 6-(1,5-dimetilheks-4-enil)-3-metilcikloheks-2-enon (8,2-10,9%) i fukinanolid (7,4-31,6%) (Tablica XXXIII). Sadržaj pojedinih lakohlapljivih sastavnica nije se samo razlikovao između vrsta, već i između različitih populacija iste vrste. Primjerice, heksadekanska (palmitinska) kiselina nađena je kao glavni spoj u jednom uzorku vrste *G. punctata* (Vižintini), dok je u drugom uzorku iste vrste (Grobničko polje) njezin udio bio deseterostruko manji. S druge strane, udio 6-(1,5-dimetilheks-4-enil)-3-metilcikloheks-2-enona bio je nekoliko puta veći kod populacije s Grobničkog polja. Također, udio alifatskih alkohola u uzorku vrste *G. cordifolia* s područja Mostara bio je nekoliko puta veći nego u drugom uzorku ove vrste (Baške Oštarije). Prisutnost ovih spojeva mogla bi biti posljedica gljivične infekcije, odnosno onečišćenja uzoraka. Okt-1-en-3-ol je glavni lakohlapljivi metabolit koji proizvode plijesni i njegova emisija je zabilježena kod zaraženih biljaka (Kaminski i sur., 1974; Kishimoto i sur., 2007). Uzorak vrste *G. cordifolia* koji je u našem istraživanju imao značajno povišen sadržaj okt-1-en-3-ola sakupljen je u području relativno veće vlažnosti, točnije u koritu rijeke Neretve (Mostar). Iako prilikom uzorkovanja nisu uočeni znakovi koji bi upućivali na gljivičnu infekciju, primijećeno je da su jedinke mostarske *G. cordifolia* bile manjeg rasta u usporedbi s jedinkama drugih populacija iste vrste (Alan, Baške Oštarije, Biokovo, Šestanovac). Nedavno istraživanje na vrsti *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. pokazalo je da ovaj spoj može ograničiti rast klijanaca te inhibirati biljni rast i proizvodnju klorofila (Hung i sur., 2014).

Eterično ulje naknadno je izolirano i iz nadzemnih dijelova u cvatu vrste *G. alypum* sakupljene 2014. godine na području Konavoskih stijena (0,1%). Analizom lakohlapljivih spojeva (ukupno njih 32) utvrđeno je da najveći dio čine oksigenirani spojevi (78,2%), odnosno masne kiseline (71,4%) i esteri (6,4%), dok manji dio čine terpeni (10,8%) (posebno oksigenirani seskviterpeni (9,5%)) i alifatski ugljikovodici (9,0%) (Tablica XXXIV).

Tablica XXXIII. Sastav lakohlapljivih spojeva nadzemnih dijelova uzoraka vrsta roda *Globularia* sakupljenih 2012. godine

Naziv spoja	SN	RI	*Gc1*	*Gc2*	*Gm1*	*Gm2*	*Gp1*	*Gp2*
trans-Heks-2-enal[a]		<900	1,4	0,8	0,8	1,4	1,3	1,0
cis-Heks-3-en-1-ol[b]	C1	<900	10,5	1,3	2,2	-	0,6	-
Oktan-1-ol[b]	C2	<900	1,9	-	0,8	0,2	-	-
Nonan[c]		900	-	-	0,2	-	0,4	-
Benzaldehid[a]	C3	965	0,4	-	-	-	2,6	1,4
Okt-1-en-3-ol[b]	C4	984	47,0	12,3	22,6	9,0	2,9	3,0
2-Pentilfuran[d]		996	-	-	-	0,4	-	0,5
Oktan-3-ol[b]	C5	1000	1,1	0,7	1,0	2,2	-	-
(*E*,*E*)-Hepta-2,4-dienal[a]	C6	1016	3,5	-	-	-	1,1	-
Fenilacetaldehid[a]	C7	1048	3,3	-	-	-	0,4	0,8
Benzofuran[d]*	C8	1081	0,2	1,8	0,6	0,5	1,6	1,8
Linalol[e]	C9	1107	2,8	1,1	3,0	1,8	1,0	1,0
2-Metilbenzofuran[d]*	C10	1180	0,3	9,8	2,9	0,9	4,7	5,5
α-Terpineol[e]	C11	1198	0,7	0,7	1,7	1,2	1,9	3,8
4-Vinil-2-metoksifenol[f]	C12	1314	0,6	5,3	0,3	3,3	-	1,3
Eugenol[f]		1362	-	-	-	0,5	-	0,7
trans-β-Damascenon[g]		1390	0,6	1,5	0,8	0,6	0,5	0,7
Geranil aceton[e]		1461	-	-	-	0,2	0,2	0,5
(*E*)-β-Jonon[g]	C13	1492	1,3	2,2	1,9	1,4	1,1	1,9
γ-Kadinen[h]		1521	-	-	-	0,2	-	0,4
δ-Kadinen[h]		1531	-	1,3	0,7	0,6	0,6	1,1
cis-Heks-3-enil benzoat[i]	C14	1575	-	6,8	2,9	1,4	0,5	0,4
Kariofilen oksid[j]	C15	1589	-	2,0	2,4	0,8	-	-
HHDMMEN[h]*		1635	-	-	0,9	0,8	0,7	0,8
τ-Murolol[j]	C16	1660	-	1,6	2,9	2,9	0,6	1,0
DMHMCH[j]*	C17	1756	8,2	16,5	13,7	19,0	40,9	10,5
Benzil benzoat[i]		1775	-	-	0,9	0,1	-	0,7
Fukinanolid (Bakenolid A)[j]*	C18	1822	7,4	12,5	16,5	31,6	9,7	8,3
Heksahidrofarnezil aceton[j]	C19	1857	1,2	4,7	3,8	3,1	2,6	3,1
(*E*,*E*)-Farnezil aceton[j]		1928	0,1	0,7	0,6	0,8	1,0	1,3
Palmitinska kiselina[k]	C20	1963	0,3	1,4	4,5	6,1	1,7	17,6
Fitol izomer[l]	C21	2122	-	5,2	2,7	-	9,1	13,0
Oleinska kiselina[k]	C22	2181	-	-	-	0,1	3,9	8,1
Ukupno identificirano (%)			**92,8**	**90,2**	**91,3**	**91,1**	**91,6**	**90,2**

SN – skraćeni naziv spojeva uključenih u statističku analizu (sadržaj ≥ 1,6% u najmanje jednom od uzoraka; RI – retencijski indeks određen u odnosu na homologni niz *n*-alkana (C_9-C_{25}) na HP-5ms koloni; *Gc* – *G. cordifolia* (1 – Mostar, 2 – Baške Oštarije), *Gm* – *G. meridionalis* (1 – Baške Oštarije, 2 – Grobničko polje) i *Gp* – *G. punctata* (1 – Grobničko polje, 2 – Vižintini); HHDMMEN – 1,2,3,4,4a,7-heksahidro-1,6-dimetil-4-(1-metiletil)naftalen; DMHMCH – 6-(1,5-dimetilheks-4-enil)-3-metilcikloheks-2-enon; [a] – aldehid, [b] – alifatski alkohol, [c] – alifatski ugljikovodik, [d] – furan, [e] – oksigenirani monoterpen, [f] – fenol, [g] – norizoprenoid, [h] – seskviterpenski ugljikovodik, [i] – ester, [j] – oksigenirani seskviterpen, [k] – masna kiselina, [l] – diterpen; * – okvirna identifikacija temeljena na MS analizi; - – nije detektirano

Istraživanje Ramdanija i sur. (2014) također je pokazalo da su navedene skupine spojeva kod vrste *G. alypum* u prosjeku najviše zastupljene. U našem istraživanju glavne sastavnice bile su uz palmitinsku kiselinu (57,3%), linolna kiselina (13,2%),

heneikozan (6,3%), α-kadinol (5,9%), metil heksanoat (3,0%), etil heksanoat (3,0%), oktadekan (1,2%), heksahidrofarnezil aceton (1,1%) i (*E*,*E*)-farnezil aceton (1,0%), dok je udio ostalih spojeva bio 0,5% ili manji. Palmitinska kiselina (Ramdani i sur., 2014; Ghlissi i sur., 2016) i α-kadinol (Barhouchi i sur., 2014) ubrajaju se u glavne lakohlapljive spojeve vrste *G. alypum* i prema rezultatima nedavnih istraživanja, dok prema drugima glavne lakohlapljive spojeve čine 1-okten-3-ol i eugenol (Llusià i sur., 2006). Primijećeno je da sadržaj pojedinih lakohlapljivih sastavnica može značajno varirati između različitih populacija vrste *G. alypum* (Barhouchi i sur., 2014; Ramdani i sur., 2014). U okviru ovog rada slično je uočeno kod uzoraka drugih vrsta roda *Globularia*.

Glavne lakohlapljive sastavnice kod drugih istraživanih vrsta bili su terpeni (47,4-69,9%) (Slika 84), točnije oksigenirani seskviterpeni (24,2-58,2%), uz iznimku eteričnog ulja uzorka vrste *G. cordifolia* sakupljenog na području Mostara, kod kojeg je udio alifatskih alkohola (60,5%) bio nekoliko puta veći od udjela oksigeniranih seskviterpena (16,9%) (Tablica XXXIV).

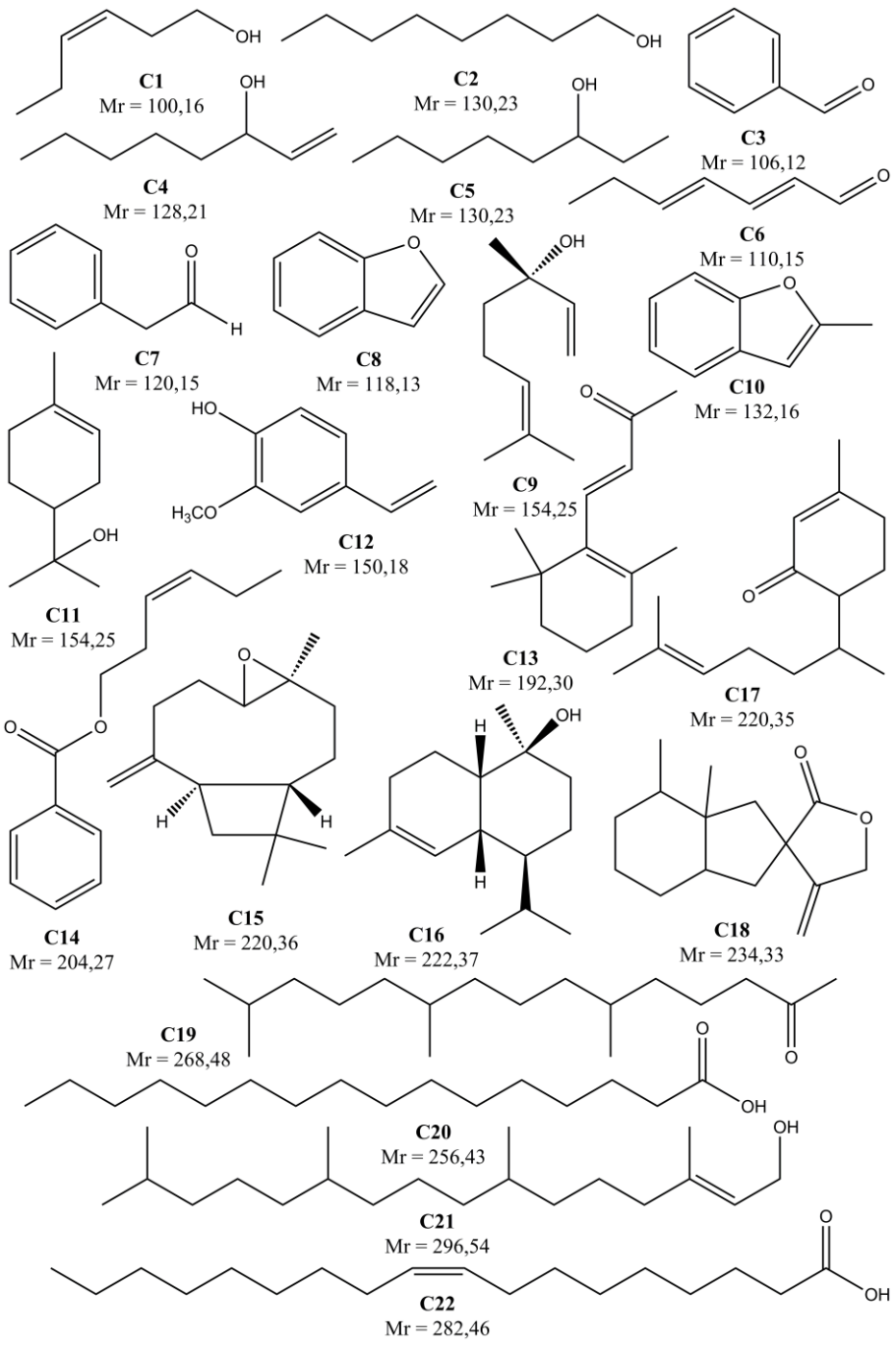
Tablica XXXIV. Udio (%) pojedinih skupina lakohlapljivih spojeva nadzemnih dijelova četiri istraživane vrste roda *Globularia*

Skupina spojeva	*Ga*	*Gc1*	*Gc2*	*Gm1*	*Gm2*	*Gp1*	*Gp2*
Terpeni	**10,8**	**22,3**	**50,0**	**51,6**	**65,0**	**69,9**	**47,4**
Oksigenirani monoterpeni	0,4	3,5	1,8	4,7	3,2	3,1	5,3
Diterpeni	0,1	-	5,2	2,7	-	9,1	13,0
Seskviterpenski ugljikovodici	0,7	-	1,3	1,6	1,6	1,3	2,3
Oksigenirani seskviterpeni	9,5	16,9	38,0	39,9	58,2	54,8	24,2
Norizoprenoidi	0,1	1,9	3,7	2,7	2,0	1,6	2,6
Oksigenirani spojevi	**78,2**	**70,5**	**40,2**	**39,5**	**26,1**	**21,3**	**42,8**
Alifatski alkoholi	-	60,5	14,3	26,6	11,4	3,5	3,0
Aldehidi	0,2	8,6	0,8	0,8	1,4	5,4	3,2
Masne kiseline	71,4	0,3	1,4	4,5	6,2	5,6	25,7
Furani	0,2	0,5	11,6	3,5	1,8	6,3	7,8
Fenolni spojevi	-	0,6	5,3	0,3	3,8	-	2,0
Esteri	6,4	-	6,8	3,8	1,5	0,5	1,1
Ostalo	**9,0**	**-**	**-**	**0,2**	**-**	**0,4**	**-**
Alifatski ugljikovodici	9,0	-	-	0,2	-	0,4	-

Ga – *G. alypum* (Konavoske stijene, 2014), *Gc* – *G. cordifolia* (1 – Mostar, 2012, 2 – Baške Oštarije, 2012), *Gm* – *G. meridionalis* (1 – Baške Oštarije, 2012, 2 – Grobničko polje, 2012), *Gp* – *G. punctata* (1 – Grobničko polje, 2012, 2 – Vižintini, 2012); - – nije detektirano

Boja izoliranih ulja kretala se od bezbojne kod vrste *G. cordifolia* (Mostar) preko blijedo žute kod uzoraka vrste *G. alypum* (Konavoske stijene) i *G. meridionalis* (Baške Oštarije, Grobničko polje) do intenzivno žute kod uzoraka vrste *G. cordifolia* (Baške Oštarije)

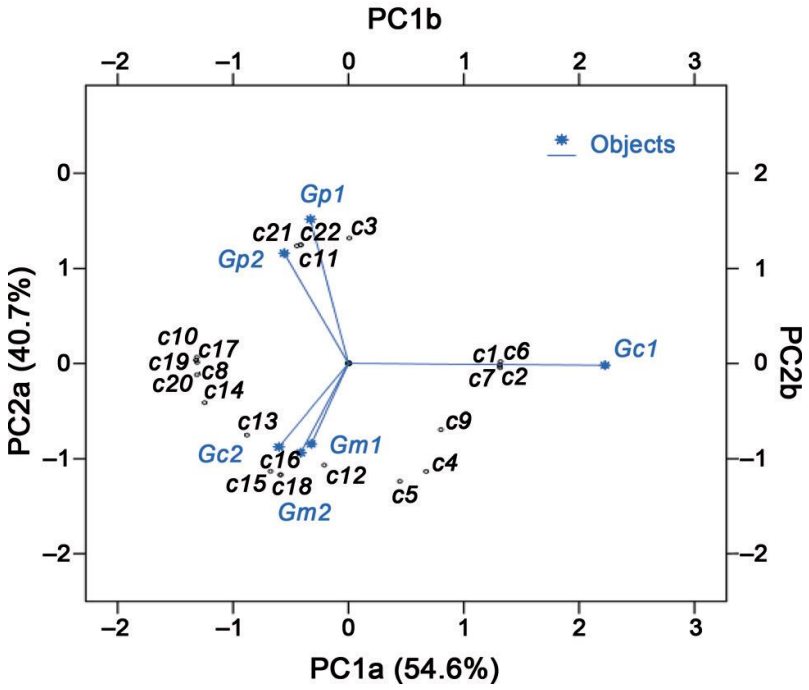
i *G. punctata* (Grobničko polje, Vižintini), a mogla bi se pripisati sadržaju diterpena fitol izomera, s obzirom na njegove povišene vrijednosti u uzorcima koji su bili najintenzivnije obojeni, odnosno njegove smanjene vrijednosti ili odsutnost u slabije obojenim/bezbojnim uzorcima (Tablica XXXIII).



Slika 84. Struktura i relativna molekulska masa glavnih lakohlapljivih sastavnica vrsta *G. cordifolia, G. meridionalis* i *G. punctata*; oznake odgovaraju spojevima koji su navedeni u Tablici XXXIII

4.2.4.1. Kemotaksonomska karakterizacija vrsta s obzirom na lakohlapljive sastavnice

Kako bi se provjerilo mogu li identificirani spojevi poslužiti u procjeni odnosa između vrsta ili lokacija, sastavnice čiji udio je bio najmanje 1,6% u barem jednom od šest uzoraka, a čije strukture su prikazane na Slici 84, podvrgnute su analizi glavnih komponenti. Glavna komponenta 1 (engl. *Principal Component* 1, PC1) i glavna komponenta 2 (PC2) objasnile su 95,3% ukupne varijance podataka i pokazale jasno razdvajanje uzoraka u tri skupine (Slika 85). Prvu skupinu činili su uzorci vrste *G. punctata*, koji su se od drugih uzoraka značajno razlikovali udjelom benzaldehida (C3), α-terpineola (C11), fitola (C21) i oleinske kiseline (C22). Alifatski alkoholi, *cis*-heks-3-en-1-ol (C1) i oktan-1-ol (C2), i aldehidi, (*E*,*E*)-hepta-2,4-dienal (C6) i fenilacetaldehid (C7), bili su karakteristični za mostarsku populaciju vrste *G. cordifolia* (druga skupina). Preostala tri uzorka (*G. cordifolia* s područja Baških Oštarija i uzorci vrste *G. meridionalis*), karakterizirana 4-vinil-2-metoksifenolom (C12), (*E*)-β-jononom (C13), kariofilen oksidom (C15), τ-murololom (C16) i fukinanolidom (C18), činila su treću skupinu.

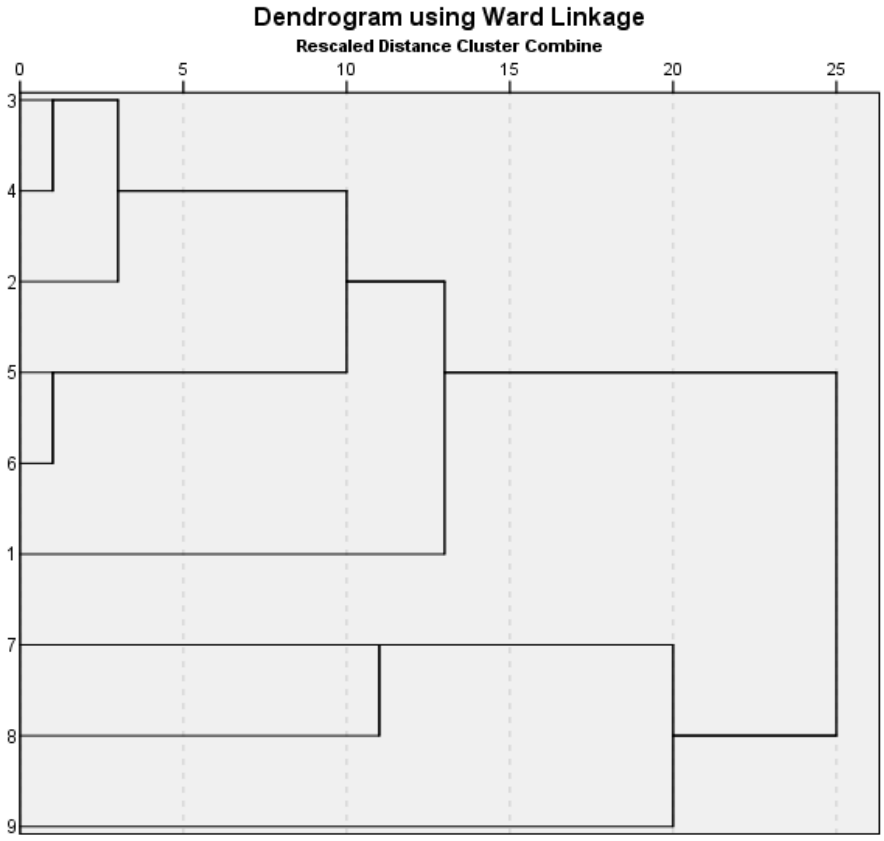


Slika 85. Biplot dobiven analizom glavnih komponenti šest uzoraka vrsta roda *Globularia* u koju su bile uključene 22 lakohlapljive sastavnice čiji udio je bio najmanje 1,6% u barem jednom od uzoraka; *Gc – G. cordifolia* (1 – Mostar, 2012, 2 – Baške Oštarije, 2012), *Gm – G. meridionalis* (1 – Baške Oštarije, 2012, 2 – Grobničko polje, 2012) i *Gp – G. punctata* (1 – Grobničko polje, 2012, 2 – Vižintini, 2012); oznake odgovaraju spojevima koji su navedeni u Tablici XXXIII

Kako bi se dobio bolji uvid u odnose između pojedinih vrsta roda *Globularia* provedena je hijerarhijska klaster analiza koja je uz uzorke vrsta *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* (po dva od svake vrste) uključivala i uzorak vrste *G. alypum* s područja Konavoskih stijena (2014) te uzorke dviju alžirskih populacija iste vrste (Ramdani i sur., 2014). Kao i kod analize glavnih komponenti, u analizu su uključene samo lakohlapljive sastavnice čiji je udio bio najmanje 1,6% u barem jednom od devet uzoraka. Pri tome u analizu nisu bili uključeni esteri benzen-1,2-dikarboksilne (ftalne) kiseline nađeni u uzorcima vrste *G. alypum* (Ramdani i sur., 2014) budući da je pretpostavljeno da je njihova prisutnost u istraživanim uzorcima posljedica zagađenja okoliša (Manayi i sur., 2014), a ne rezultat genetske predodređenosti. Dobiveni dendrogram pokazao je grupiranje u dvije glavne skupine (Slika 86), točnije razdvajanje vrste *G. alypum* od ostalih istraživanih vrsta. Unutar prve skupine dalje su se razdvojili uzorci ažirskih populacija vrste *G. alypum* i uzorak sakupljen na području Hrvatske.

Uzorci ostalih istraživanih vrsta podijeljeni su u tri podskupine, pri čemu se mostarska populacija vrste *G. cordifolia* sastavom lakohlapljivih spojeva značajno razlikovala od svih ostalih uzoraka, slično kao što je primijećeno i kod usporedbe sastavnica ekstrakata. Karakterističan kemijski sastav njezinih lakohlapljivih, ali i nehlapljivih spojeva, mogao bi biti posljedica posebnosti tla i klimatskih uvjeta u kojima ova populacija raste (Abdelmajeed i sur., 2013), točnije posljedica rasta u relativno vlažnom području uz rijeku Neretvu, a možda i rezultat pojave jedinstvenih genetskih karakteristika do kojih je moglo dovesti prostorno odvajanje navedene populacije (Thompson, 1999). Druga podskupina sastojala se od uzoraka vrste *G. meridionalis* (Baške Oštarije, Grobničko polje) i uzorka vrste *G. cordifolia* (Baške Oštarije). Grupiranje ovih uzoraka moglo bi se objasniti kako istim mjestom sabiranja tako i njihovom bliskom srodnošću, odnosno pripadnošću sekciji *Empetron* (Schwarz, 1938). Treća podskupina sastojala se od uzoraka vrste *G. punctata*, široko rasprostranjene europske vrste glavulja (Tutin i sur., 1972).

Grupiranje uzoraka istih vrsta moglo bi biti posljedica utjecaja više genetskih nego okolišnih čimbenika, imajući na umu da su u analizu bili uključeni i uzorci različitih vrsta sabrani s istih lokacija. Istovremena pojava različitih vrsta glavulja na istim staništima zabilježena je i u ranijim istraživanjima (Vitasović Kosić i Britvec, 2006; Ljubičić i sur., 2010), uključujući i pojavu vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* na području Baških Oštarija (Ravnik, 1965), jedne od lokacija uključenih u provedena istraživanja.



Slika 86. Dendrogram dobiven hijerarhijskom klaster analizom lakohlapljivih sastavnica devet uzoraka vrsta roda *Globularia*; 1 – *G. cordifolia* (Mostar, 2012), 2 – *G. cordifolia* (Baške Oštarije, 2012), 3 – *G. meridionalis* (Baške Oštarije, 2012), 4 – *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2012), 5 – *G. punctata* (Grobničko polje, 2012), 6 – *G. punctata* (Vižintini, 2012); 7 – *G. alypum* (Boutaleb, Alžir), 8 – *G. alypum* (Khenchela, Alžir) (Ramdani i sur., 2014); 9 – *G. alypum* (Konavoske stijene, 2014)

Dobiveni rezultati ukazuju na to da bi poznavanje sastava lakohlapljivih spojeva, jednako kao i poznavanje sastava nehlapljivih spojeva, moglo poslužiti u procjeni filogenetskih odnosa između vrsta roda *Globularia*. Kao i u prethodnom slučaju uočena je veća sličnost vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* (sekcija *Empetron*, podrod *Abolaria*) s vrstom *G. punctata* (sekcija *Globularia*, podrod *Globularia*), nego s vrstom *G. alypum* (sekcija *Alypum*, podrod *Abolaria*), odnosno veća sličnost vrste *G. punctata* s vrstom *G. alypum* u usporedbi s druge dvije vrste. Ovakvi rezultati podudaraju se s rezultatima provedene histološko-anatomske i filogenetske analize te idu u prilog opažanjima Holländera i Jägera o tome da podjela roda *Globularia* na prethodno spomenute podrodove ne odgovara prirodnim odnosima između ovih vrsta (1994).*

* – poglavlje sadrži objavljene rezultate (Crkvenčić i sur., 2016) – vidi pod 7. Prilozi

4.3. Biološki učinci odabranih vrsta roda *Globularia*

4.3.1. Antidijabetski učinak

Šećerna bolest ili dijabetes (lat. *diabetes mellitus*) je metabolički poremećaj od kojeg je u 2015. godini u svijetu bolovalo, kako se procijenjuje, oko 415 milijuna ljudi u dobi od 20 do 79 godina, a očekuje se da bi do 2040. godine broj oboljelih mogao porasti na 642 milijuna (International Diabetes Federation, 2015). Udio oboljelih od šećerne bolesti u Republici Hrvatskoj u 2014. godini bio je 6,86% te je ona bila sedmi vodeći uzrok smrti s udjelom od 2,62% u ukupnoj smrtnosti (Poljičanin i sur., 2015). Karakterizira ju kronično povišena koncentracija glukoze u krvi, popraćena manjim ili većim poremećajem metabolizma ugljikohidrata, masti i proteina, do koje dolazi zbog nedovoljnog lučenja inzulina i/ili njegovog smanjenog učinka na periferna tkiva (Baynest, 2015).

Šećerna bolest dijeli se na tip I i tip II šećerne bolesti, gestacijski dijabetes te ostale specifične tipove. Tip I šećerne bolesti (autoimuni ili idiopatski) karakterizira uništenje β-stanica gušterače, odnosno potpuni nedostatak inzulina. Tip II šećerne bolesti je najčešći oblik dijabetesa, koji zahvaća 80 do 90% oboljelih, a karakterizira ga inzulinska rezistencija i relativni nedostatak inzulina. Obično se javlja kod osoba s nasljednom (genetskom) sklonošću te kod pretilih osoba koje se nedovoljno kreću, posebno kod žena starije životne dobi, a često je popraćen hipertenzijom i dislipidemijom (Baynest, 2015). Dijabetesu tipa II (koncentracija glukoze u krvi natašte ≥ 7,0 mmol/L, postprandijalno ≥ 11,1 mmol/L), prethodi predijabetes koji karakterizira oštećenje tolerancije glukoze natašte (vrijednost glikemije ≥ 5,6 mmol/L, < 7,0 mmol/L), postprandijalno (vrijednost glikemije > 7,8 mmol/L, < 11,1 mmol/L) ili kombinirano (Kokić, 2009). Gestacijski dijabetes je šećerna bolest koja se prvi puta javlja ili dijagnosticira u trudnoći, neovisno o uzroku. Ostali specifični tipovi uključuju bolesti kod kojih je oštećenje funkcije β-stanica ili djelovanja inzulina genetski uvjetovano, odnosno kod kojih je oštećena egzokrina funkcija gušterače, kod kojih je prisutna neka endokrinopatija ili je bolest gušterače uzrokovana lijekovima, kemikalijama i infekcijama.

Komplikacije šećerne bolesti mogu biti akutne, koje uključuju hiperglikemiju, dijabetičku ketoacidozu i hiperglikemijsko hiperosmolarno stanje/komu te hipoglikemiju, kronične i ostale. Kronične komplikacije mogu biti mikrovaskularne (dijabetička retinopatija, nefropatija i neuropatija) i makrovaskularne (koronarna bolest srca, cerebrovaskularna bolest i periferna vaskularna bolest). Ostale komplikacije uključuju smanjeni rast i razvoj, autoimuna stanja povezana sa šećernom bolešću, lipodistrofiju, upalne promjene na koži, masnu jetru, infekcije, smanjenu pokretljivost zglobova i pojavu edema (Baynest, 2015).

Uloga oksidativnog stresa u šećernoj bolesti

Razvoj i napredovanje šećerne bolesti te nastanak njezinih komplikacija povezuje se s povećanim oksidativnim stresom, koji nastaje kao posljedica hiperglikemijom uzrokovane povećane proizvodnje slobodnih radikala ili smanjene antioksidativne obrane. Povećana proizvodnja slobodnih radikala povezuje se s oksidacijom glukoze, ne-enzimskom glikacijom proteina i njihovom kasnijom oksidativnom razgradnjom, a uzrokuje oštećenja membranskih lipida, staničnih proteina i nukleinskih kiselina, uslijed reakcije nesparenih elektrona slobodnih radikala s dvostrukim vezama staničnih makromolekula, a u konačnici i staničnu smrt. Oksidativna oštećenja staničnih makromolekula posljedično dovode do inzulinske rezistencije i disfunkcije β-stanica (Maritim i sur., 2003; El-Abhar i Schaalan, 2014).

Glavni izvor oksidativnog stresa kod šećerne bolesti su mitohondriji u kojima se tijekom oksidativne fosforilacije jedan dio kisika reducira do vode, dok se drugi dio pretvara u superoksidni anion radikal (Asmat i sur., 2016). Superoksidni anion radikal, koji se oslobađa oksidacijom glukoze, reakcijom s NO može stvoriti reaktivne peroksinitritne radikale ili potaknuti lipidnu peroksidaciju LDL. Superoksid dismutaza (SOD) je antioksidativni enzim koji prevodi superoksidni anion radikal u vodikov peroksid. Vodikov peroksid, ukoliko se ne razgradi djelovanjem glutation peroksidaze do vode, odnosno djelovanjem katalaze do vode i kisika, u prisutnosti prijelaznih metala može stvoriti reaktivni hidroksilni radikal. Uz ove i druge enzimske antioksidanse, zaštitu od oksidativnih oštećenja osiguravaju i brojni ne-enzimski antioksidansi, vitamini A, C i E, glutation i drugi. Međudjelovanjem glukoze i proteina nastaju prvo Schiffove baze, zatim Amadorijevi produkti te krajnji produkti glikacije proteina (engl. *Advanced Glycation End-products*, AGE) koji dovode do promjene strukture i funkcije enzima, primjerice inaktivacije antioksidativnih enzima, te aktivacije transkripcijskog faktora NF-κB, koji pojačava stvaranje NO. Kao što je prethodno navedeno, NO može reagirati sa superoksidnim anion radikalom te posljedično dovesti do oštećenja β-stanica (Maritim i sur., 2003). Oksidativnom stresu značajno, možda čak i više od kronične hiperglikemije, mogu pridonijeti nagle promjene razine šećera u krvi, kakve se mogu uočiti postprandijalno (Wright Jr i sur., 2006).

Glutation i s njim povezani enzimi

Glutation (γ-glutamilcisteinilglicin) je glavni stanični ne-enzimski antioksidans koji u svom reduciranom obliku (GSH) može izravno hvatati slobodne radikale ili djelovati kao kofaktor, odnosno kosupstrat antioksidativnih enzima glutation peroksidaze (GPx) i glutation S-transferaze (GST) (Masella i sur., 2005). On također sudjeluje u obnavljanju drugih

ne-enzimskih antioksidansa, primjerice askorbinske kiseline iz dihidroaskorbinske kiseline, a time posredno i obnavljanju reduciranog oblika α-tokoferola (Maritim i sur., 2003).

GPx je skupina enzima ovisnih o selenu koji kataliziraju redukciju lipidnih hidroperoksida i vodikovog peroksida, koji nastaju unosom hrane i ksenobiotika, u odgovarajuće hidroksilirane spojeve i/ili vodu, pri čemu koriste GSH i/ili druge reduktivne ekvivalente, čime sudjeluju u zaštiti staničnih membrana od lipidne peroksidacije. Nastali oksidirani oblik glutationa (GSSG) može se ponovno reducirati djelovanjem enzima glutation reduktaze koji kao reducens koristi reducirani oblik nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH), dok pri njegovom prekomjernom nakupljanju u stanici mogu nastati miješani disulfidi s unutarstaničnim proteinima, a može se i izlučiti iz stanice te naknadno razgraditi (Maritim i sur., 2003; Masella i sur., 2005).

GST su tri skupine enzima (citosolna, mitohondrijska i mikrosomalna) koji uklanjaju elektrofilne ksenobiotike (kemijske kancerogene, zagađivače okoliša i citostatike), odnosno inaktiviraju endogene nezasićene aldehide, kinone, epokside i hidroperokside nastale nakon izloženosti zagađivačima na način da kataliziraju njihovu konjugaciju s GSH, pri čemu se nastali GSH adukti aktivno izlučuju iz stanica. Posljedično smanjena razina GSH može se, osim prethodno navedenom redukcijom, nadomjestiti i njegovom ponovnom sintezom pomoću o adenozin trifosfatu (ATP) ovisnih enzima, γ-glutamilcistein sintetaze i glutation sintetaze (Masella i sur., 2005).

Usporedba konvencionalnog liječenja i fitoterapije šećerne bolesti

Cilj liječenja šećerne bolesti je otkloniti simptome vezane uz hiperglikemiju te smanjiti kronične mikrovaskularne i makrovaskularne komplikacije, uz omogućavanje što normalnijeg načina života (Kokić, 2009). Ovisno o uzroku i stadiju šećerne bolesti, ona se može kontrolirati dijabetičkom dijetom, tjelesnom aktivnošću i lijekovima (El-Abhar i Schaalan, 2014). Pri tome se kod šećerne bolesti tipa I normoglikemija postiže primjenom inzulinske terapije (Pavlić Renar, 2009), dok se pri liječenju šećerne bolesti tipa II za ponovno uspostavljanje normalne koncentracije glukoze u krvi primjenjuju oralni hipoglikemici i ostali neinzulinski lijekovi, sami ili u kombinaciji, odnosno zajedno s inzulinskim pripravcima u uznapredovalim stadijima bolesti (Rahelić i sur., 2016).

Oralni hipoglikemici i ostali neinzulinski lijekovi mogu biti β-citotropni lijekovi i ne-β-citotropni lijekovi. Prvi stimuliraju β-stanice gušterače na lučenje inzulina, neovisno o razini glukoze u krvi (derivati sulfonilureje i glinidi), odnosno ovisno o glukozi (agonisti glukagonu sličnog peptida-1 (agonisti GLP-1-receptora) i inhibitori dipeptidil-peptidaze-4

(DPP-4-inhibitori)). Ne-β-citotropni lijekovi hipoglikemijski učinak postižu drugim mehanizmima, primjerice smanjenjem proizvodnje glukoze u jetri inhibicijom glukoneogeneze i glikogenolize te povećanjem unosa i iskorištavanja glukoze u perifernim tkivima aktivacijom nuklearnog transkripcijskog čimbenika (engl. *peroxysome proliferator-activated receptor gamma*, PPAR-γ), koji regulira transkripciju inzulin-odgovarajućih gena (bigvanidi, tiazolidindioni), smanjenjem apsorpcije glukoze u tankom crijevu (inhibitori α-glukozidaze) i smanjenjem reapsorpcije filtrirane glukoze u bubrezima, odnosno povećanjem njezinog izlučivanja (inhibitori suprijenosnika natrija i glukoze 2, engl. *sodium-glucose cotransporter 2,* SGLT-2-inhibitori) (Rahelić i sur., 2016).

Više od 800 biljaka moglo bi posjedovati antidijabetski učinak. Među njih spada i vrsta *G. alypum* (Raj i sur., 2016). Prednost njihove primjene mogla bi biti prisutnost većeg broja aktivnih tvari koje simptome šećerne bolesti mogu ublažiti istovremenim djelovanjem na više različitih meta (El-Abhar i Schaalan, 2014), a pri čemu njihove nuspojave mogu biti manje od nuspojava sintetskih lijekova (Tundis i sur., 2010). Biljni pripravci, kao i sintetski lijekovi, mogu povećati lučenje inzulina ili oponašati njegovo djelovanje (inzulinomimetici), smanjiti apsorpciju glukoze, povećati unos glukoze u masno tkivo i mišiće te smanjiti proizvodnju glukoze u jetri. Također, njihovo moguće antioksidativno djelovanje moglo bi usporiti nastanak kroničnih komplikacija šećerne bolesti (El-Abhar i Schaalan, 2014).

Inhibitori α-glukozidaze

Enzim α-glukozidaza (α-D-glukozid glukohidrolaza) je membranski enzim prisutan u epitelu tankog crijeva pod čijim djelovanjem dolazi do hidrolitičkog cijepanja α-D-glukoze na nereducirajućem kraju oligosaharida (Tundis i sur., 2010; Kumar i sur., 2011). Inhibitori α-glukozidaze smanjuju apsorpciju glukoze u tankom crijevu usporavanjem razgradnje složenih šećera te time smanjuju postprandijalnu hiperglikemiju i odgađaju pojavu dijabetičkih komplikacija (Kumar i sur., 2011). Navedeni lijekovi (akarboza i miglitol) posjeduju i korisno djelovanje na arterijsku hipertenziju i virusne infekcije (Benalla i sur., 2010), a primjenjuju se u ranijim fazama šećerne bolesti (Tundis i sur., 2010). Njihova učinkovitost u monoterapiji je ograničena zbog dodatne razgradnje šećera bakterijskim enzimima u debelom crijevu te ih je potrebno davati u kombinaciji s drugim oralnim hipoglikemicima, a iz istog razloga izazivaju izražene nuspojave probavnog sustava: vjetrove, grčeve i proljev (Rahelić i sur., 2016). Uz spomenute sintetske lijekove, α-glukozidazu mogu inhibirati i različiti biljni metaboliti, pri čemu se svojom brojnošću ističu flavonoidi, fenilpropanoidi i terpeni (Yin i sur., 2014).

4.3.1.1. Antidijabetski učinak odabranih vrsta roda *Globularia*

Procjena antidijabetskog učinka s obzirom na utvrđeni kemijski sastav

Hipoglikemijski učinak vrste *G. alypum*, koji je potvrđen u nekoliko *in vivo* istraživanja (Skim i sur., 1999a; Skim i sur., 1999b; Jouad i sur., 2002, Zennaki i sur., 2009; Djelloulii sur., 2014), ranije je povezan s prisutnošću njezinog glavnog metabolita globularina, estera katalpola i cimetne kiseline (Merghache i sur., 2013). Istraživanja su pokazala da derivati cimetne kiseline mogu poticati lučenje inzulina i djelovati kao inzulinomimetici (Adisakwattana i sur., 2009). Ovim istraživanjem potvrđeno je da globularin, osim vrste *G. alypum*, sadrži i vrsta *G. punctata*, kao što je ranije zabilježeno pod drugim nazivom (*G. aphyllanthes*) (Kirmizibekmez i sur., 2009). Ipak, unatoč tome što je prisutnost globularina zabilježena i u mnogim drugim vrstama roda *Globularia,* uključujući vrste *G. arabica* (Amer i El-Masry, 1988), *G. davisiana* (Çaliş i sur., 2002a), *G. nana* (Chaudhuri i sur., 1981), *G. orientalis* (Çaliş i sur., 2002b), *G. salicina* (Fikenscher i sur., 1969), *G. sintenisii* (Kirmizibekmez i sur., 2004a) i *G. vulgaris* (Heckel i Schlagdenhauffen, 1883), moguće je primijetiti da etnobotanička istraživanja kod njihove ljekovite primjene ne navode antidijabetski učinak (*G. arabica*, *G. nana*, *G. vulgaris*) (Johnson, 1999, Vasisht i Kumar, 2004; Awen i sur., 2010; Afifi-Yazar i sur., 2011; Eissa i sur., 2014), što bi moglo ukazivati na to da su za antidijabetski učinak, uz globularin, zaslužni i neki drugi spojevi.

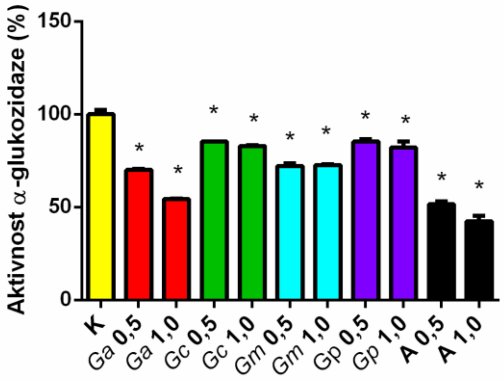
U ekstraktima listova vrsta *G. alypum* i *G. punctata* nađene su manje količine iridoida katalpola. Zabilježeno je da ovaj spoj može smanjiti inzulinsku rezistenciju potiskivanjem signalnog puta JNK i NF-κB u masnom tkivu (Zhou i sur., 2015) te da može povećati sintezu glikogena čime se potiče iskorištavanje glukoze (Huang i sur., 2010). Jedan od mogućih učinaka iridoida koji pogoduje sintezi glikogena je inhibicija glikogen fosforilaze. Veću inhibiciju ovog enzima pokazuju iridoidi koji u svojoj strukturi imaju slobodnu karboksilnu skupinu u položaju *C*-4, nezasićenu vezu *C*-3-*C*-4 te hidroksimetilnu skupinu u položaju *C*-8 ciklopentan[*c*]piranskog prstena s glukozom u položaju *C*-1 (Vaidya i sur., 2013). Većina iridoida, koji su u ekstraktima istraživanih vrsta bili prisutni kao glavni metaboliti, bila je karakterizirana istom osnovnom strukturom s nezasićenom vezom *C*-3-*C*-4 te hidroksimetilnom skupinom u položaju *C*-8. Karboksilna skupina u položaju *C*-4 bila je prisutna kod manjeg broja iridoida (npr. musaenozidinska kiselina, (*epi*)loganinska kiselina, asperulozidinska kiselina), koji su u većoj mjeri bili prisutni kod vrsta *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* nego kod vrste *G. alypum*. Također, pojedini iridoidi, poput aukubina, mogu obnoviti β-stanice gušterače i time poboljšati lučenje inzulina (Vaidya i sur., 2013), a koje je zabilježeno pri intraperitonealnoj primjeni većih doza ekstrakta vrste

G. alypum kod normoglikemijskih štakora (Skim i sur., 1999a; Skim i sur., 1999b). Pojačano lučenje inzulina moglo bi biti i posljedica prisutnosti genipozida (Guo i sur., 2016), iridoida koji je također nađen samo kod ove vrste. Antidijabetskom učinku navedenog iridoida doprinose i dodatni mehanizmi kao smanjenje glukoneogeneze u jetri (Guo i sur., 2016) ili smanjenje prekomjernog nastanka reaktivnih kisikovih spojeva i aktivacije NF-κB (Wang i sur., 2010). Lipopolisaharidima potaknutu aktivaciju NF-κB mogu također smanjiti globularifolin (Sipahi i sur., 2014), glavni iridoid vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*, i verbaskozid (Alipieva i sur., 2014), jedan od glavnih feniletanoida prisutan u sve četiri istraživane vrste. Uz povećano lučenje inzulina, smanjenje aktivacije NF-κB zabilježeno je i za flavonoide apigenin i luteolin. Apigenin također može povećati unos glukoze u stanice, smanjiti hiperglikemiju i nakupljanje lipida te obnoviti razinu antioksidativnih enzima i GSH (Kawser Hossain i sur., 2016). U ovom istraživanju primijećeno je da vrsta *G. alypum* sadrži veću količinu apigenina i njegovih glikozida od vrsta *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata*, dok je najveći sadržaj luteolina zabilježen kod vrste *G. punctata*. Njegova prisutnost, kao i prisutnost luteolin 7-*O*-glukozida, koja je zabilježena u sve četiri istraživane vrste, mogla bi zbog jake inhibicije aldoza reduktaze, usporiti razvoj kroničnih komplikacija šećerne bolesti kao što su periferna neuropatija, retinopatija i katarakta (Matsuda i sur., 2002). U prilog mogućem zaštitnom učinku navedenih spojeva kod šećerne bolesti ide i podatak o povoljnom učinku ekstrakta listova vrste *Marrubium vulgare* L. kod dijabetičkih štakora, a koji je također bogat derivatima verbaskozida, apigenina i luteolina (Boudjelal i sur., 2012).

Pojačano iskorištavanje glukoze u perifernim tkivima moglo bi biti posljedica inzulinom-posredovane translokacije prijenosnika glukoze tipa 4 (GLUT-4) iz citosola u membranu, kakvo je zabilježeno kod primjene ekstrakata vrste *Picrorhiza kurroa* Royle ex Benth. dijabetičkim štakorima (Husain i sur., 2014), koji su bogati esterima katalpola, poput pikrozida I i II te kutkozida (Sah i Varshney, 2013). Vrsta *G. alypum* sadržavala je, također, veći broj estera katalpola u usporedbi s drugim istraživanim vrstama (verminozid, spekiozid, minekozid). S druge strane, pokazalo se da katalpol, kao glavni metabolit ekstrakata vrste *Rehmannia glutinosa* Libosch., nije zaslužan za njihovo inhibitorno djelovanje na α-glukozidazu (Jeong i sur., 2013). Rezultati dobiveni u okviru ovog istraživanja ukazuju na to da bi se tradicionalna primjena vrste *G. alypum* kao antidijabetika jednim dijelom mogla objasniti inhibicijom navedenog enzima.

Inhibicija aktivnosti α-glukozidaze ekstraktima vrsta roda *Globularia*

Metanolni ekstrakti listova sve četiri istraživane vrste statistički značajno su smanjili aktivnost α-glukozidaze u odnosu na negativnu kontrolu ($P < 0,05$) (Slika 87). Pri tome je najučinkovitiji bio ekstrakt vrste *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013), koji je u koncentracijama 0,5 mg/mL i 1,0 mg/mL pokazao 30,0% i 45,7% inhibiciju enzima, dok su inhibitorne aktivnosti ekstrakata vrsta *G. cordifolia* (Alan, 2013), *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013) i *G. punctata* (Grobničko polje, 2013) redom iznosile 14,8/17,1%, 27,8/27,3% i 14,7/18,0%. Akarboza, primijenjena kao pozitivna kontrola, pokazala je najveće inhibitorno djelovanje: 48,4% (0,5 mg/mL) i 57,6% (1,0 mg/mL).



Slika 87. Inhibitorno djelovanje metanolnih ekstrakata listova vrsta roda *Globularia* (c = 0,5 mg/mL i 1,0 mg/mL) na aktivnost α-glukozidaze izraženo kao srednja vrijednost ± standardna devijacija postotka aktivnosti (n = 4); K – 2% (v/v) DMSO (negativna kontrola), *Ga – Globularia alypum* (Konavoske stijene, 2013), *Gc – G. cordifolia* (Alan, 2013), *Gm – G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013), *Gp – G. punctata* (Grobničko polje, 2013), A – akarboza (pozitivna kontrola); * – statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu ($P < 0,05$)

Inhibitorni učinak na α-glukozidazu prethodno je zabilježen za triterpene β-sitosterol i stigmasterol, odnosno za 6-hidroksilirane flavonoide (Benalla i sur., 2010), sastavnice vrste *G. alypum* (Es-Safi i sur., 2005; Athmouni i sur, 2016). Pri tome je prisutnost triterpena β-sitosterola zabilježena i kod vrste *G. meridionalis* (Tundis i sur., 2012a). Prisutnost 6-hidroksiliranih flavonoida potvrđena je u okviru ovog rada u svim istraživanim vrstama. 5,6,7-trihidroksilirani flavoni, kao što su 6-hidroksiapigenin (skutelarein) i 6-hidroksiluteolin, jaki su inhibitori ovog enzima, dok njihovi 7-*O*-glukozidi i acilirani spojevi, kao i apigenin i luteolin imaju slabije inhibitorno djelovanje (Kawabata i sur., 2003). Zabilježeno jače

inhibitorno djelovanje vrste *G. alypum* mogla bi objasniti i prisutnost dodatnih inhibitora α-glukozidaze kao što je, primjerice, flavonoid vicenin-2 (Islam i sur., 2014).

Primijećeno je da su uzorci bogatiji fenolima (Tablica XXXV) jače inhibirali α-glukozidazu te je vjerojatno da uz flavonoide uočenom učinku pridonose i drugi fenolni spojevi. Inhibitorno djelovanje na ovaj enzim jače od djelovanja akarboze pokazali su feniletanoidi čija prisutnost je zabilježena u svim istraživanim ekstraktima, a to su verbaskozid, izoverbaskozid i leukoskeptozid A (Liu i sur., 2014). Ipak, djelovanje navedenih spojeva i luteolina, koji je također pokazao jaču inhibiciju α-glukozidaze od akarboze (Kim i sur., 2000), slabije je od djelovanja 6-hidroksiliranih flavona baikaleina i baikalina (Kuroda i sur., 2012). Učinak feniletanoida mogao bi se pripisati hidroksitirozolu (Hadrich i sur., 2015), koji je sastavni dio njihove strukture. S druge strane, inhibicija α-glukozidaze zabilježena je i za *trans*-cimetnu kiselinu i njezine derivate, posebno kavenu, ferulinsku i izoferulinsku kiselinu (Adisakwattana i sur., 2009). U istraživanim uzorcima, navedene kiseline nađene su u sastavu mnogih feniletanoida (verbaskozida, izoverbaskozida i drugih), od kojih su neki karakteristični samo za vrstu *G. alypum* (kalceolariozid A, kalceolariozid B, galipumozid B), jednostavnih glukozida koji su u relativno manjoj količini bili prisutni u sve četiri vrste, kao i nekih iridoida (primjerice, verminozida i minekozida kod vrste *G. alypum*). Doprinos iridoida navedenoj aktivnosti vjerojatno je zanemariv s obzirom na ograničen broj podataka o njihovoj umjerenoj inhibiciji α-glukozidaze koja je slabija od one akarboze (Yin i sur., 2014), odnosno izostanku djelovanja zabilježenom kod pojedinih neaciliranih iridoida (Yang i sur., 2015). U skladu s ovom pretpostavkom, uzorci vrsta *G. cordifolia* i *G. punctata*, kod kojih je utvrđen manji sadržaj fenola, a veći sadržaj iridoida, slabije su djelovali na α-glukozidazu.

Tablica XXXV. Procijenjena* koncentracija ukupnih fenola, flavonoida, kondenziranih trjeslovina i iridoida u metanolnim ekstraktima listova vrsta roda *Globularia* kojima su tretirane stanice Hep G2 izražena kao srednja vrijednost (n = 3)

Skupina metabolita	***Ga* 0,5 mg/mL**	***Ga* 1,0 mg/mL**	***Gc* 0,5 mg/mL**	***Gc* 1,0 mg/mL**	***Gm* 0,5 mg/mL**	***Gm* 1,0 mg/mL**	***Gp* 0,5 mg/mL**	***Gp* 1,0 mg/mL**
Fenoli[a]	65,23	130,46	55,68	111,35	61,72	123,44	49,25	98,50
Flavonoidi[b]	15,22	30,43	18,27	36,54	19,86	39,72	24,25	48,49
Trjeslovine[c]	1,50	3,00	5,01	10,02	3,11	6,21	2,04	4,07
Iridoidi[d]	13,75	27,49	155,62	311,23	123,69	247,37	171,67	343,33

* – procjena vrijednosti temeljila se na prethodno utvrđenom sadržaju sekundarnih metabolita izraženom u odnosu na masu suhog ekstrakta; *Ga* – *Globularia alypum* (Konavoske stijene, 2013), *Gc* – *G. cordifolia* (Alan, 2013), *Gm* – *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013), *Gp* – *G. punctata* (Grobničko polje, 2013); [a] – koncentracija izražena kao μg ekvivalenta galne kiseline/mL ekstrakta, [b] – koncentracija izražena kao μg ekvivalenta kvercetina/mL ekstrakta, [c] – koncentracija izražena kao μg ekvivalenta katehina/mL ekstrakta, [d] – koncentracija izražena kao μg ekvivalenta aukubina/mL ekstrakta

Zaštitni učinak ekstrakata vrsta roda *Globularia* od oksidativnih oštećenja kao mogućih posljedica hiperglikemije

Stanice jetre, središnjeg organa koji održava stalnu razinu glukoze u krvi, podložne su pojačanom oksidativnom oštećenju u šećernoj bolesti, uslijed pojačanog stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva u mitohondrijima i/ili smanjene razine antioksidativnih enzima i glutationa (Dey, 2013). Dodatna korist primjene pripravaka vrste *G. alypum* u liječenju šećerne bolesti mogla bi uz mogući hipoglikemijski učinak (Zennaki i sur., 2009; Djellouli i sur., 2014) biti i sprječavanje nastanka dijabetičkih komplikacija kroz njihovo izravno antioksidativno djelovanje hvatanjem slobodnih radikala (Es-Safi i sur., 2005c) i/ili neizravno, povećanjem aktivnosti antioksidativnih enzima (Zennaki i sur., 2009; Taleb-Dida i sur., 2011) i koncentracije ne-enzimskih antioksidansa kao što je GSH (Zennaki i sur., 2009).

Iz prethodno navedenih razloga, u okviru ovog rada, istražen je utjecaj metanolnih ekstrakata listova vrsta roda *Globularia* na dva ne-enzimska (sadržaj –SH i GSH) i dva enzimska biljega oksidativnog stresa (aktivnost GPx i GST) u stanicama humanog karcinoma jetre Hep G2 u hiperglikemijskim uvjetima. Provedena su i dva dodatna testa (LDH i MTT) kako bi se osiguralo da primijenjene koncentracije ekstrakata (0,5 mg/mL i 1,0 mg/mL) nemaju negativan utjecaj na integritet stanica tijekom odabranog perioda inkubacije.

Istraživanjem je utvrđeno da povišena koncentracija glukoze smanjuje vrijednosti sva četiri istraživana biljega oksidativnog stresa, kao i da smanjuje vijabilnost stanica Hep G2 ($P < 0,05$) (Tablica XXXVI). Smanjena razina GSH u stanicama Hep G2 nakon inkubacije u mediju s povišenom razinom glukoze, kao i njihova smanjena vijabilnost, zabilježena je i u prethodnim istraživanjima (Bljajić i sur., 2016; Shokrzadeh i sur., 2016). Također, pokazalo se da izloženost stanica Hep G2 hiperglikemijskim uvjetima može izazvati pojačani nastanak reaktivnih kisikovih spojeva i nakupljanje oksidiranih proteina te da može smanjiti funkciju mitohondrija bez smanjenja vijabilnosti stanica (Palmeira i sur., 2007). Imajući na umu da se redukcija MTT reagensa, kojom je u istoimenom testu procijenjena vijabilnost stanica, velikim dijelom odvija u mitohondrijima (Riss i sur., 2016), ovime bi se mogao objasniti naizgled veći pad vijabilnosti stanica u hiperglikemijskim uvjetima uočen u MTT testu u usporedbi s LDH testom. Koncentracija proteina nije se statistički značajno razlikovala između stanica koje su rasle u normalnim i hiperglikemijskim uvjetima, kao ni u stanicama koje su bile obrađene ekstraktima glavulja (Tablica XXXVI). Ipak, moguće je primijetiti da su srednje vrijednosti proteina bile niže u uzorcima vrste *G. cordifolia*, koji su bili najbogatiji kondenziranim trjeslovinama (Tablica XIX), što bi moglo biti povezano s njihovim svojstvom vezanja i taloženja proteina (Adamczyk i sur., 2012).

Tablica XXXVI. Utjecaj metanolnih ekstrakata listova vrsta roda *Globularia* na biljege oksidativnog stresa i vijabilnost stanica Hep G2 u hiperglikemijskim uvjetima; rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 3 ukoliko nije eksponentom drugačije naznačeno)

Istraženi parametri	**K**	**D**	***Ga* 0,5 mg/mL**	***Ga* 1,0 mg/mL**	***Gc* 0,5 mg/mL**	***Gc* 1,0 mg/mL**	***Gm* 0,5 mg/mL**	***Gm* 1,0 mg/mL**	***Gp* 0,5 mg/mL**	***Gp* 1,0 mg/mL**
Koncentracija proteina (mg/mL)	0,88 ± 0,11	0,85 ± 0,09	0,87 ± 0,04	0,89 ± 0,06	0,80 ± 0,09	0,75 ± 0,26	0,83 ± 0,22	0,93 ± 0,09	0,94 ± 0,12	0,88 ± 0,14
Sadržaj –SH (μmol/mg proteina)	1385,73 ± 11,08	1150,70 ± 35,46*	1470,43 ± 24,43**	1516,93 ± 72,35**	1525,17 ± 57,66**	1610,07 ± 16,06**	1427,53 ± 11,60**	1378,90 ± 0,00**	1311,77 ± 56,32**	1999,20 ± 83,33**
Sadržaj GSH (μmol/mg proteina)	83,75 ± 4,28	64,13 ± 0,98*	63,17 ± 1,42	76,05 ± 2,35**	71,62 ± 1,63**	107,80 ± 0,92**	60,34 ± 1,62	65,01 ± 1,95	67,22 ± 1,24	94,54 ± 2,20**
Aktivnost GPx (U/mg proteina)	4,57 ± 0,11	3,61 ± 0,05*	4,17 ± 0,07**	4,30 ± 0,03**	4,65 ± 0,26**	5,20 ± 0,01**	4,43 ± 0,13**	4,09 ± 0,12**	3,94 ± 0,11	4,43 ± 0,01**
Aktivnost GST (U/mg proteina)	49,89 ± 0,72	39,58 ± 0,46*	42,07 ± 0,99	44,90 ± 0,95**	53,25 ± 1,99**	61,17 ± 1,38**	44,10 ± 1,07**	49,58 ± 1,20**	44,57 ± 0,71**	50,60 ± 0,70**
Vijabilnost stanica prema LDH testu (%)	100,00 ± 8,19	68,18 ± 2,27*	85,61 ± 1,31**	115,15 ± 2,62**	84,85 ± 2,62**	99,24 ± 4,73**	83,33 ± 1,31**	112,12 ± 1,31**	100,00 ± 6,01**	120,45 ± 6,01**
Vijabilnost stanica prema MTT testu (%)[a]	100,00 ± 7,45	32,12 ± 5,72*	34,54 ± 3,46	37,82 ± 6,68	37,00 ± 2,99	39,07 ± 4,75**	35,32 ± 1,30	31,34 ± 3,06	40,29 ± 4,47**	39,09 ± 3,64**

K – stanice uzgajane u mediju s 5,56 mM glukoze (negativna kontrola), D – stanice uzgajane u mediju s 20 mM glukoze (pozitivna kontrola), *Ga* – *Globularia alypum* (Konavoske stijene, 2013), *Gc* – *G. cordifolia* (Alan, 2013), *Gm* – *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013), *Gp* – *G. punctata* (Grobničko polje, 2013); –SH – slobodne tiolne skupine, GSH – reducirani glutation, GPx – glutation peroksidaza, GST – glutation S-transferaza, LDH – laktat dehidrogenaza, MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid; [a] – srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 8); * – statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu ($P < 0,05$); ** – statistički značajna razlika u odnosu na pozitivnu kontrolu ($P < 0,05$)

Primjena ekstrakata sve četiri istraživane vrste u obje koncentracije statistički značajno je povećala sadržaj slobodnih tiolnih skupina u stanicama Hep G2, dok su sadržaj GSH značajno povećali ekstrakti vrsta *G. alypum*, *G. cordifolia* i *G. punctata* u koncentraciji 1,0 mg/mL te vrste *G. cordifolia* u koncentraciji 0,5 mg/mL ($P < 0,05$). Također, svi uzorci, osim uzorka vrste *G. punctata* manje koncentracije, statistički značajno su povećali aktivnost GPx ($P < 0,05$), dok je aktivnost GST bila statistički značajno povećana kod svih uzoraka osim manje koncentriranog uzorka vrste *G. alypum* ($P < 0,05$) (Tablica XXXVI). Povoljan učinak na oksidativni status jetrenih stanica uočen je i ranije, kao povećanje antioksidativnih enzima GPx, GRed, SOD i CAT te GSH, kod oralne primjene vrste *G. alypum* u dijabetičkih štakora (Zennaki i sur., 2009). Navedeni rezultati idu u prilog zabilježenoj primjeni vrste *G. alypum* kod jetrenih bolesti (Vokou i sur., 1993; Khabbach i sur., 2013).

Najveći učinak na određivane biljege oksidativnog stresa imali su, u pravilu, uzorci vrste *G. cordifolia*, za koju je ranije zabilježen pozitivan utjecaj na antioksidativni status ljudskih keratinocita (porast SOD, CAT i GSH) (Fournial i sur., 2012). U okviru ovog istraživanja, kod navedene je vrste utvrđen povišeni sadržaj kondenziranih trjeslovina u usporedbi s ostalim istraživanim vrstama. Korelacijskom analizom utvrđena je vrlo dobra pozitivna povezanost između aktivnosti GPx i koncentracije kondenziranih trjeslovina ($r = 0,79$, $P = 0,021$) te izvrsna pozitivna povezanost između aktivnosti GST i koncentracije kondenziranih trjeslovina ($r = 0,94$, $P < 0,001$) (Tablica XXXVII). Očekivano, vrlo dobre povezanosti uočene su i između sadržaja reduciranog glutationa i aktivnosti prethodno navedenih, o njemu ovisnih enzima, GPx ($r = 0,76$, $P = 0,030$) i GST ($r = 0,80$, $P = 0,016$) (nisu tablično prikazane). Nedavnim istraživanjem utvrđeno je da kondenzirane trjeslovine dodane putem obroka mogu poboljšati antioksidativni status eritrocita janjadi, točnije da mogu povećati aktivnost antioksidativnih enzima GPx, GST, CAT, SOD, kao i razinu GSH, ukupnih i proteinskih tiolnih skupina te smanjiti lipidnu peroksidaciju (Pathak i sur., 2017).

U okviru ovog istraživanja uočena je i vrlo dobra pozitivna povezanost između aktivnosti GST i sadržaja iridoida aukubinskog i asperulozidinskog tipa ($r = 0,73$, $P = 0,042$). Iridoidi, poput aukubina, mogu smanjiti lipidnu peroksidaciju i povećati aktivnost antioksidativnih enzima SOD, CAT i GPx (Jin i sur., 2008). U uzorcima vrsta *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* jedan od glavnih iridoida, čiju prisutnost je bilo moguće odrediti primijenjenom spektrofotometrijskom metodom, bio je asperulozid (Trim i Hill, 1952). Navedeni iridoid mogao bi pridonositi antioksidativnom učinku smanjenjem lipopolisaharidima i interferonom-γ potaknute proizvodnje NO (Mahbob i sur., 2014).

Istraživanjem je utvrđeno da primijenjeni ekstrakti ne smanjuju vijabilnost stanica Hep G2 (Tablica XXXVI). Naprotiv, svi uzorci povećali su vijabilnost stanica u LDH testu ($P < 0,05$), dok je u MTT testu statistički značajni reverzibilni učinak na oksidativni stres izazvan hiperglikemijskim uvjetima bio uočen samo kod uzoraka vrsta *G. cordifolia* (1,0 mg/mL) i *G. punctata* (0,5 mg/mL i 1,0 mg/mL). Porast vijabilnosti stanica u LDH testu mogao bi biti povezan sa sadržajem flavonoida ($r = 0,88$, $P = 0,004$) i fenolnih spojeva ($r = 0,75$, $P = 0,031$) (Tablica XXXVII). Prethodna istraživanja pokazala su da su flavonoidi i/ili feniletanoidi sastavnice vrsta roda *Globularia* koje posjeduju najjače izravno antioksidativno djelovanje (Çaliş i sur., 1999; Çaliş i sur., 2002a; Çaliş i sur., 2002b; Es-Safi i sur., 2007c; Tundis i sur., 2012a) te je moguće pretpostaviti da su isti spojevi zaslužni za uočenu zaštitu stanične membrane od oksidativnih oštećenja. S druge strane, zaštitni učinak zabilježen u MTT testu uočen je kod uzoraka koji su imali veći sadržaj iridoida i kondenziranih trjeslovina (*G. cordifolia*), odnosno iridoida i flavonoida (*G. punctata*). Jedan od iridoida koji može ublažiti mitohondrijsku disfunkciju jetrenih stanica uzrokovanu hiperglikemijom, odnosno očuvati integritet mitohondrijske membrane je katalpol (Xu i sur., 2015). Uz iridoide, povoljan učinak na mitohondrijsku funkciju mogli bi imati i neki flavonoidi, proantocijanidini (kondenzirane trjeslovine) i drugi fenoli te ω-3 masne kiseline i prehrambena vlakna (Serrano i sur., 2016).

Tablica XXXVII. Povezanost između istraženih parametara za procjenu antidijabetskog učinka i sadržaja sekundarnih metabolita odabranih vrsta roda *Globularia* (n = 8)

Istraženi parametri	Ukupni fenoli	Flavonoidi	Kondenzirane trjeslovine	Iridoidi
Aktivnost α-glukozidaze	-0,51	0,09	0,33	0,65
Koncentracija proteina	0,05	0,14	-0,61	-0,18
Sadržaj –SH	0,28	0,63	0,21	0,54
Sadržaj GSH	0,45	0,65	0,70	0,67
Aktivnost GPx	0,20	0,17	0,79*	0,42
Aktivnost GST	0,32	0,46	0,94***	0,73*
Vijabilnost stanica prema LDH testu	0,75*	0,88*	0,15	0,44
Vijabilnost stanica prema MTT testu	-0,18	0,13	0,02	0,23

* – statistički značajna povezanost ($P < 0,05$); *** – statistički značajna povezanost ($P < 0,001$)

4.3.2. Antioksidativni učinak

Reaktivni kisikovi spojevi su visoko reaktivni spojevi koji u svojoj strukturi sadrže kisik, a uključuju slobodne radikale (hidroksilni i superoksidni radikal, dušikov oksid) i neradikalne derivate kisika (singletni kisik, vodikov peroksid, peroksinitrit i hipoklorit) (Bhattacharya, 2015). Slobodni radikali su nestabilne i visoko reaktivne molekule ili atomi koji u svojoj vanjskoj ljusci sadrže jedan ili više nesparenih elektrona, a nastaju enzimskim ili ne-enzimskim reakcijama, primjerice reakcijama uključenim u lanac prijenosa elektrona u mitohondrijima, fagocitozu i sintezu prostaglandina, reakcijama ksantin oksidaze i sustava citokroma P450, reakcijama koje uključuju željezo i druge prijelazne metale, reakcijama u peroksisomima, reakcijama do kojih dolazi tijekom vježbanja, upale te ishemije i naknadne reperfuzije, odnosno reakcijama izazvanim ionizirajućim ili ultraljubičastim zračenjem. Iako njihova fiziološka uloga uključuje zaštitu od patogenih mikroorganizama i sudjelovanje u staničnoj signalizaciji, prekomjerno stvaranje slobodnih radikala može dovesti do razvoja oksidativnog stresa, odnosno oksidativnih oštećenja staničnih makromolekula koja dovode do inaktivacije enzima, nastanka mutacija i oštećenja staničnih membrana i LDL te posljedično do razvoja različitih bolesti (Bagchi i Puri, 1998; Bhattacharya, 2015).

Bolesti povezane s oksidativnim stresom

Stanja i bolesti čiji nastanak je povezan s oksidativnim stresom uključuju starenje, aterosklerozu, srčani i moždani udar, rak, šećernu bolest, neurodegenerativne bolesti (npr. Parkinsonovu i Alzheimerovu bolest), autoimune i upalne bolesti (npr. reumatoidni artritis i ulcerozni kolitis), emfizem i druge bolesti pluća, oštećenje jetre, kataraktu, mušku neplodnost i druge (Bagchi i Puri, 1998; Bhattacharya, 2015; Pisoschi i sur., 2016).

Primjena antioksidansa u prevenciji i liječenju bolesti

Antioksidansi su spojevi koji mogu odgoditi, spriječiti ili otkloniti nastanak oksidativnih oštećenja hvatanjem slobodnih radikala i prekidanjem lančanih reakcija oksidacije (primarni antioksidansi) i/ili drugim mehanizmima poput suzbijanja singletnog kisika, razgradnje peroksida do neradikalnih spojeva, inhibicije oksidativnih enzima, apsorpcije UV zračenja i keliranja metala. Antioksidansi mogu biti endogeni i egzogeni. Endogeni antioksidansi uključuju enzimske antioksidanse, od kojih se glutation peroksidaza, katalaza i superoksid dismutaza ubrajaju u primarne, a glutation reduktaza i glukoza-6-fosfat dehidrogenaza u sekundarne antioksidanse, te ne-enzimske antioksidanse: glutation, α-lipoičnu kiselinu, koenzim Q_{10}, feritin, mokraćnu kiselinu, bilirubin, metalotionein,

L-karnitin, melatonin i albumin. Egzogeni antioksidansi mogu biti prisutni u hrani, lijekovima i dodacima prehrani, a uključuju karotenoide, tokoferole, vitamin C, vitamin D, fenolne kiseline, flavonoide, trjeslovine i druge (Mehta i Gowder, 2015; Pisoschi i sur., 2016).

Epidemiološka istraživanja ukazuju na to da bi primjena hrane bogate antioksidansima mogla spriječiti ili usporiti nastanak kroničnih bolesti koje su povezane s oksidativnim stresom. Podupiru ih brojna pretklinička istraživanja u uvjetima *in vitro* i *in vivo*, dok su klinički dokazi u većini slučajeva još uvijek ograničeni. U klinički značajne antioksidanse ubrajaju se edaravon (ishemijski moždani udar), N-acetilcistein (trovanje paracetamolom), α-lipoična kiselina (dijabetička neuropatija), flavonoidi diosmin i hesperidin te sintetski derivati rutina okserutini (kronična venska insuficijencija), kao i baikalein te katehini (osteoartritis) (Mehta i Gowder, 2015).

Antioksidativni potencijal ljekovitih biljaka

Procjenjuje se da približno dvije trećine biljnih vrsta u svijetu imaju ljekovitu vrijednost, a mnoge od njih bogate su antioksidansima. Neki od njih, poput flavonoida, fenolnih kiselina i trjeslovina, kao posljedicu svoje antioksidativne aktivnosti posjeduju i niz drugih bioloških učinaka povoljnih za zdravlje, primjerice protuupalni, antikancerogeni i antiaterosklerotski. S druge strane, široko primjenjivane sintetske antioksidanse, butilhidroksitoluen (BHT) i butilhidroksianisol (BHA), povezuje se s mogućim nepoželjnim učincima na zdravlje, kao što su oštećenje jetre i nastanak tumora (Krishnaiah i sur., 2011).

Neke od ljekovitih biljnih vrsta čiji antioksidativni potencijal je usporediv s onima prethodno spomenutih sintetskih antioksidansa uključuju tršlju (*Pistacia lentiscus* L.), gorku dinju (*Momordica charantia* L.), bijelu mrtvu koprivu (*Lamium album* L.), srčenicu (*Leonurus cardiaca* L.), običnu marulju (*Marrubium vulgare* L.), ljekovitu kadulju (*Salvia officinalis* L.) i običnu koprivu (*Urtica dioica* L.) (Krishnaiah i sur., 2011). Ljekovitim biljnim vrstama s velikim antioksidativnim potencijalom pripada i vrsta *G. alypum* (Djeridane i sur., 2006; Djeridane i sur., 2010; Rached i sur., 2010; Krimat i sur., 2014; Athmouni i sur., 2016).

4.3.2.1. Antioksidativni učinak odabranih vrsta roda *Globularia*

Antioksidativni učinak istražen je na metanolnim ekstraktima različitih biljnih dijelova uzoraka odabranih vrsta roda *Globularia* sakupljenih tijekom 2012. i 2013. godine dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom, odnosno nadzemnih dijelova vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013), *G. cordifolia* (Alan, 2013), *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013) i *G. punctata* (Grobničko polje, 2013) dobivenim različitim metodama ekstrakcije: dekokcijom, ultrazvučnom ekstrakcijom, maceracijom i Soxhlet ekstrakcijom.

Usporedba između različitih biljnih dijelova

Primijenjeni testovi (DPPH i ABTS test) pokazali su da listovi i cvjetovi vrste *G. alypum* posjeduju veći antioksidativni učinak od njezinih stabljika ($P < 0,05$) (Tablica XXXVIII), dok između njih nije uočena statistički značajna razlika kao u prethodnim istraživanjima (Chograni i sur., 2012; Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014b). Pri tome je u oba testa antioksidativni učinak cvjetova navedene vrste bio veći nego kod ostalih istraživanih vrsta, dok je antioksidativni učinak listova bio veći samo u DPPH testu. Imajući na umu da se primijenjeni testovi temelje na istim mehanizmima antiradikalnog djelovanja, točnije na prijenosu elektrona (engl. *single electron transfer*, SET) i prijenosu vodikovog atoma (engl. *hydrogen atom transfer*, HAT) (Prior i sur., 2005), jedno od mogućih objašnjenja za uočene razlike je činjenica da su bili provedeni u različitim otapalima (Pérez-Jiménez i Saura-Calixto, 2006), ABTS test u vodi, a DPPH test u manje polarnom metanolu. Primjena polarnih otapala može, uslijed stvaranja vodikovih veza s molekulama otapala, smanjiti prijenos vodikovog atoma s antioksidansa, odnosno smanjiti njegov antioksidativni kapacitet (Pérez-Jiménez i Saura-Calixto, 2006). Dobiveni rezultati mogli bi ukazivati i na prisutnost veće količine lipofilnih spojeva s potencijalnim antioksidativnim učinkom u listovima vrste *G. alypum*, a koji bi se mogli pripisati prethodno identificiranim diaciliranim feniletanoidima karakterističnim za ovu vrstu (Slika 80).

Statistički značajne razlike nisu uočene između različitih biljnih dijelova vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*, kao ni između ovih dviju vrsta ($P > 0,05$), dok su kod vrste *G. punctata* drvenaste stabljike pokazale najbolji antioksidativni učinak, veći od onog ostalih istraživanih vrsta, a pratili su ih listovi i korijen ($P < 0,05$) (Tablica XXXVIII). Iako usporedbom prosječnih vrijednosti antiradikalne aktivnosti pojedinih biljnih dijelova nije uočena statistički značajna razlika između rezultata DPPH i ABTS testa ($P > 0,05$), usporedba pojedinačnih uzoraka ukazala je na moguće razlike u antioksidativnim sastavnicama između različitih biljnih dijelova. Primjerice, antiradikalna aktivnost drvenastih stabljiki bila je kod

velikog broja uzoraka manja u DPPH testu u usporedbi s ABTS testom, što bi moglo ukazivati na prisutnost veće količine polarnih antioksidansa, dok je suprotan trend uočen kod zelenih stabljiki.

Tablica XXXVIII. Antiradikalna aktivnost metanolnih ekstrakata različitih biljnih dijelova uzoraka odabranih vrsta roda *Globularia* sakupljenih tijekom 2012. i 2013. godine izražena kao srednja vrijednost ± standardna devijacija u mg EGK/g SM (n = 3)

Vrsta	Dio biljke	DPPH test	ABTS test
G. alypum (Konavoske stijene, 2013)	list	$18,29 \pm 2,64^{aA}$	$12,35 \pm 0,81^{aA}$
	cvijet	$20,48 \pm 2,03^{aA}$	$14,41 \pm 0,56^{aA}$
	stabljika = drvenasta stabljika	$11,67 \pm 0,37^{abB}$	$8,09 \pm 0,37^{bB}$
	korijen	n.i.	n.i.
G. cordifolia (Mostar, 2012)	list	10,36 ± 0,49	10,37 ± 0,32
	cvijet	5,44 ± 0,44	5,83 ± 0,15
	stabljika	9,80 ± 0,08	8,73 ± 0,33
	drvenasta stabljika	4,53 ± 1,17	6,24 ± 0,13
	korijen	8,71 ± 0,91	8,30 ± 0,16
G. cordifolia (Baške Oštarije, 2012)	list	11,28 ± 1,90	11,53 ± 0,14
	cvijet	7,22 ± 2,27	7,86 ± 0,28
	stabljika	11,45 ± 0,52	8,95 ± 0,19
	drvenasta stabljika	5,19 ± 0,04	7,27 ± 0,16
	korijen	5,96 ± 0,26	6,47 ± 0,13
G. cordifolia (Alan, 2013)	list	9,98 ± 0,97	8,18 ± 0,02
	cvijet	7,96 ± 0,68	7,52 ± 1,02
	stabljika	14,70 ± 1,43	12,52 ± 1,98
	drvenasta stabljika	9,12 ± 0,96	7,91 ± 0,43
	korijen	9,91 ± 0,22	7,56 ± 0,10
G. cordifolia (prosjek vrste)	list	$10,54 \pm 0,67^{bA}$	$10,03 \pm 1,70^{aA}$
	cvijet	$6,87 \pm 1,30^{bA}$	$7,07 \pm 1,09^{bA}$
	stabljika	$11,98 \pm 2,49^{abA}$	$10,07 \pm 2,13^{bA}$
	drvenasta stabljika	$6,28 \pm 2,48^{bcA}$	$7,14 \pm 0,84^{bA}$
	korijen	$8,19 \pm 2,03^{aA}$	$7,44 \pm 0,92^{bA}$
G. meridionalis (Baške Oštarije, 2012)	list	9,49 ± 1,08	10,02 ± 0,18
	cvijet	6,82 ± 2,20	6,66 ± 0,24
	stabljika	13,19 ± 0,17	9,96 ± 0,92
	drvenasta stabljika	6,59 ± 0,29	7,99 ± 0,30
	korijen	5,25 ± 0,25	5,25 ± 0,22
G. meridionalis (Dinara, 2012)	list	6,04 ± 0,60	10,41 ± 0,30
	cvijet	2,20 ± 0,37	4,72 ± 0,22
	stabljika	7,27 ± 0,31	10,19 ± 0,24
	drvenasta stabljika	5,55 ± 0,34	7,40 ± 0,41
	korijen	n.i.	n.i.
G. meridionalis (Učka, 2012)	list	10,16 ± 0,22	9,47 ± 0,34
	cvijet	9,89 ± 0,08	8,33 ± 0,16
	stabljika	14,07 ± 0,85	11,36 ± 0,11
	drvenasta stabljika	5,76 ± 0,82	7,68 ± 0,07
	korijen	9,91 ± 0,18	10,01 ± 0,28

G. meridionalis (Grobničko polje, 2012)	list	14,02 ± 0,58	13,32 ± 0,11
	cvijet + stabljika	14,16 ± 0,75	12,56 ± 0,32
	drvenasta stabljika	5,62 ± 0,86	7,24 ± 0,14
	korijen	10,47 ± 0,78	11,70 ± 0,32
G. meridionalis (Grobničko polje, 2013)	list	12,08 ± 1,01	9,95 ± 0,67
	cvijet	7,04 ± 0,61	4,62 ± 0,10
	stabljika	8,19 ± 1,06	8,50 ± 0,31
	drvenasta stabljika	6,34 ± 0,10	5,67 ± 0,16
	korijen	5,73 ± 1,20	5,38 ± 0,15
G. meridionalis (prosjek vrste)	list	$10,36 \pm 2,99^{bA}$	$10,63 \pm 1,54^{aA}$
	cvijet	$6,49 \pm 3,18^{bA}$	$6,08 \pm 1,77^{bcB}$
	stabljika	$10,68 \pm 3,45^{abA}$	$10,00 \pm 1,17^{bAB}$
	drvenasta stabljika	$5,97 \pm 0,46^{cA}$	$7,20 \pm 0,90^{bAB}$
	korijen	$7,84 \pm 2,73^{aA}$	$8,09 \pm 3,27^{bAB}$
G. punctata (Grobničko polje, 2012)	list	13,71 ± 1,61	11,91 ± 0,26
	cvijet + stabljika	10,12 ± 0,31	6,75 ± 0,10
	drvenasta stabljika	22,10 ± 2,96	19,88 ± 0,15
	korijen	15,01 ± 0,24	13,08 ± 0,57
G. punctata (Grobničko polje, 2013)	list	11,71 ± 0,23	10,59 ± 0,15
	cvijet	3,44 ± 0,06	2,36 ± 0,12
	stabljika	5,12 ± 0,22	5,50 ± 0,26
	drvenasta stabljika	9,65 ± 0,57	12,05 ± 0,06
	korijen	9,90 ± 0,22	12,07 ± 0,18
G. punctata (Vižintini, 2012)	list	15,32 ± 1,04	12,22 ± 0,24
	cvijet	4,18 ± 0,42	4,34 ± 0,01
	stabljika	12,91 ± 0,57	7,53 ± 0,29
	drvenasta stabljika	16,94 ± 1,09	18,95 ± 0,50
	korijen	11,38 ± 0,77	12,53 ± 0,47
G. punctata (Vižintini, 2013)	list	8,05 ± 1,07	11,97 ± 0,37
	cvijet	3,73 ± 0,08	2,70 ± 0,08
	stabljika	6,44 ± 0,45	5,20 ± 0,29
	drvenasta stabljika	11,57 ± 0,34	13,43 ± 0,33
	korijen	9,35 ± 0,34	13,24 ± 0,50
G. punctata (Vugrovec, 2012)	list	13,17 ± 0,83	12,98 ± 0,44
	cvijet + stabljika	3,37 ± 0,66	3,95 ± 0,23
	drvenasta stabljika	12,60 ± 0,63	18,55 ± 0,32
	korijen	n.i.	n.i.
G. punctata (Slapnica, 2013)	list	10,33 ± 0,71	13,24 ± 1,40
	cvijet	3,38 ± 0,54	2,20 ± 0,14
	stabljika	8,92 ± 0,08	5,45 ± 0,96
	drvenasta stabljika	18,33 ± 1,05	16,24 ± 1,37
	korijen	12,88 ± 0,89	9,39 ± 0,50
G. punctata (prosjek vrste)	list	$12,05 \pm 2,60^{bAB}$	$12,15 \pm 0,94^{aB}$
	cvijet	$3,68 \pm 0,37^{bC}$	$2,90 \pm 0,98^{cC}$
	stabljika	$8,35 \pm 3,43^{abBC}$	$5,92 \pm 1,08^{cC}$
	drvenasta stabljika	$15,20 \pm 4,72^{aA}$	$16,52 \pm 3,19^{aA}$
	korijen	$11,70 \pm 2,30^{aAB}$	$12,06 \pm 1,56^{aB}$

EGK – ekvivalent galne kiseline, SM – suhi biljni materijal; DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina); n.i. – nije ispitano; vrijednosti koje su u eksponentu naznačene različitim malim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju između vrsta ($P < 0,05$): a > b > c; vrijednosti koje su u eksponentu naznačene različitim velikim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju između biljnih dijelova ($P < 0,05$): A > B > C

Usporedba između različitih metoda ekstrakcije

U oba testa najveća antiradikalna aktivnost uočena je za ekstrakte dobivene dekokcijom, a u slučaju vrste *G. alypum* i maceracijom ($P < 0,05$) (Tablica XXXIX).

Tablica XXXIX. Antiradikalna aktivnost metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova odabranih populacija istraživanih vrsta roda *Globularia* dobivenih različitim metodama ekstrakcije izražena kao srednja vrijednost ± standardna devijacija u mg ET/g SM (n = 3)

Priprema ekstrakata	*G. alypum* (Konavoske stijene, 2013)	*G. cordifolia* (Alan, 2013)	*G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013)	*G. punctata* (Grobničko polje, 2013)
DPPH test				
Dekokcija	$37,20 \pm 6,00^{bA}$	$36,13 \pm 3,82^{bA}$	$51,98 \pm 8,08^{aA}$	$43,79 \pm 1,38^{bA}$
Ultrazvučna ekstrakcija	$27,68 \pm 3,70^{abB}$	$23,92 \pm 1,68^{bB}$	$32,18 \pm 0,42^{aB}$	$27,22 \pm 2,16^{abB}$
Maceracija	$32,39 \pm 2,21^{aAB}$	$20,31 \pm 1,49^{bB}$	$16,10 \pm 1,62^{bC}$	$22,60 \pm 1,40^{bB}$
Soxhlet ekstrakcija*	17,25	22,68	20,41	24,19
ABTS test				
Dekokcija	$20,89 \pm 4,24^{bA}$	$22,90 \pm 3,42^{bA}$	$37,81 \pm 1,97^{aA}$	$38,62 \pm 1,53^{aA}$
Ultrazvučna ekstrakcija	$10,82 \pm 2,02^{aB}$	$15,56 \pm 2,19^{aB}$	$15,77 \pm 2,28^{aB}$	$14,38 \pm 2,42^{aB}$
Maceracija	$17,66 \pm 2,90^{aA}$	$7,44 \pm 2,67^{bC}$	$8,38 \pm 2,64^{bC}$	$12,36 \pm 3,21^{abB}$
Soxhlet ekstrakcija*	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.

ET – ekvivalent troloksa, SM – suhi biljni materijal; * – antiradikalna aktivnost izražena kao IC_{50} (μg/mL); n.i. – nije ispitano; vrijednosti u eksponentu naznačene različitim malim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju između vrsta ($P < 0,05$): a > b; vrijednosti u eksponentu naznačene različitim velikim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju između metoda ekstrakcije ($P < 0,05$): A > B > C

Procijenjene IC_{50} vrijednosti za Soxhlet ekstrakte nadzemnih dijelova čija je antiradikalna aktivnost istražena DPPH testom iznosile su 17,25 μg/mL (*G. alypum*), 22,68 μg/mL (*G. cordifolia*), 20,41 μg/mL (*G. meridionalis*) i 24,19 μg/mL (*G. punctata*) (Tablica XXXIX). Pri tome su kao pozitivna kontrola primijenjeni galna kiselina (IC_{50} = 0,64 μg/mL) i troloks (IC_{50} = 2,71 μg/mL). Vrijednosti dobivene za istraživane uzorke vrsta roda *Globularia* bile su usporedive s onima drugih ljekovitih vrsta koje su bogate antioksidansima (Krishnaiah i sur., 2011), dok je vrijedost za vrstu *G. alypum* u skladu s ranije utvrđenim vrijednostima inhibicije DPPH radikala za metanolne ekstrakte njezinih listova (IC_{50} = 15,58-27,54 μg/mL) (Rached i sur., 2010; Khlifi i sur., 2011; Taghzouti i sur., 2016) te stabljika (IC_{50} = 22,11 μg/mL) (Taghzouti i sur., 2016), odnosno nalazi se između vrijednosti utvrđenih za metanolne ekstrakte cvjetova (IC_{50} = 4 μg/mL) i listova (IC_{50} = 31 μg/mL) iste vrste (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014b). Rezultat utvrđen za vrstu

G. meridionalis podudara se s literaturnim vrijednostima antioksidativnog učinka metanolnih ekstrakata njezinih nadzemnih dijelova (IC_{50} = 21,0-22,0 μg/mL) (Tundis i sur., 2012a).

Povezanost između antioksidativnog učinka i sadržaja sekundarnih metabolita

Dobra, odnosno vrlo dobra pozitivna povezanost uočena je između antioksidativnog učinka u DPPH testu i sadržaja ukupnih fenola različitih biljnih dijelova uzoraka sakupljenih tijekom 2012. i 2013. godine (r = 0,67, P < 0,001), odnosno između antioksidativnog učinka u ABTS testu i sadržaja ukupnih fenola istih uzoraka (r = 0,77, P < 0,001), dok je u slučaju ekstrakata nadzemnih dijelova dobivenih dekokcijom, ultrazvučnom ekstrakcijom i maceracijom između istih parametara uočene izvrsna (r = 0,92, P < 0,001, DPPH test) ili vrlo dobra povezanost (r = 0,81, P < 0,01, ABTS test) (Tablica XL). Također, kod ovih je uzoraka uočena i vrlo dobra pozitivna povezanost između antioksidativnog učinka i sadržaja flavonoida (r = 0,74, P < 0,01, DPPH test; r = 0,84, P < 0,01, ABTS test). Slični rezultati dobiveni su u ranijim istraživanjima antioksidativnog učinka vrste *G. alypum* (Djeridane i sur., 2006; Khlifi i sur., 2011; Chograni i sur., 2012; Taghzouti i sur., 2016). Djeridane i sur. (2006) uočili su veću antioksidativnu aktivnost kod ove vrste i drugih vrsta kod kojih fenolne kiseline prevladavaju u usporedbi s flavonoidima. Izostanak povezanosti antioksidativnog učinka sa sadržajem flavonoida u prvom slučaju mogao bi se objasniti velikom razlikom između udjela navedenih spojeva u pojedinim biljnim dijelovima, primjerice njihovim nekoliko puta nižim udjelom u drvenastim stabljikama i korijenu (Tablica XIX). Konačno, izvrsna negativna povezanost dobivena je između IC_{50} vrijednosti Soxhlet ekstrakata utvrđenih DPPH testom i sadržaja ukupnih fenola (r = -0,96, P = 0,044) (nije prikazano).

Tablica XL. Povezanost između istraženih parametara za procjenu antioksidativnog učinka i sadržaja sekundarnih metabolita odabranih vrsta roda *Globularia*

Istraženi parametri	Ukupni fenoli	Flavonoidi	Kondenzirane trjeslovine	Iridoidi
Usporedba između različitih biljnih dijelova[a]				
DPPH test	0,67***	0,20	0,09	0,16
ABTS test	0,77***	0,09	0,05	0,15
Usporedba između različitih metoda ekstrakcije[b]				
DPPH test	0,92***	0,74**	n.i.	n.i.
ABTS test	0,81**	0,84**	n.i.	n.i.

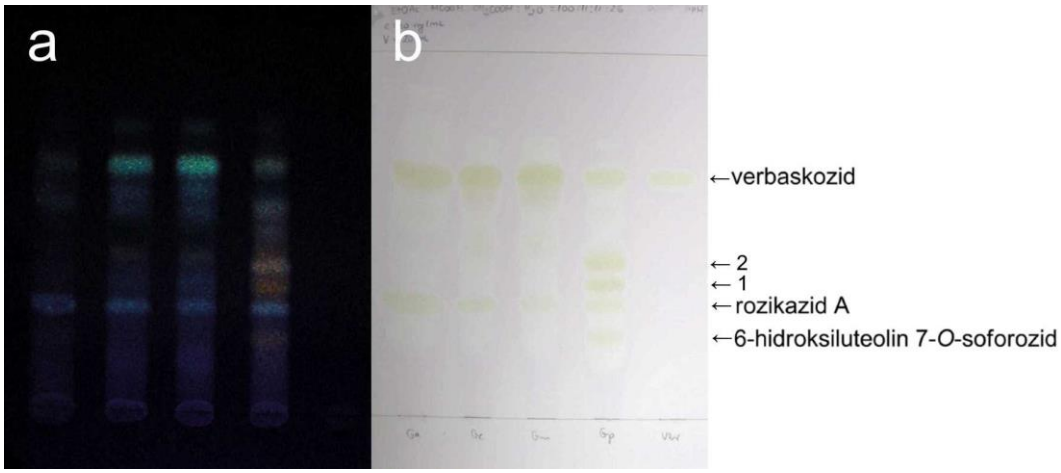
[a] – uključuje ekstrakte različitih biljnih dijelova (list, cvijet, stabljika, drvenasta stabljika, korijen) uzoraka sakupljenih tijekom 2012. i 2013. godine (n = 68); [b] – uključuje ekstrakte nadzemnih dijelova vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013), *G. cordifolia* (Alan, 2013), *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013) i *G. punctata* (Grobničko polje, 2013) dobivene dekokcijom, ultrazvučnom ekstrakcijom i maceracijom (n = 12); ** – statistički značajna povezanost (P < 0,01); *** – statistički značajna povezanost (P < 0,001)

U svrhu identifikacije spojeva koji su zaslužni za uočeni antioksidativni učinak provedena je i tankoslojna kromatografija uz detekciju DPPH reagensom, koji je stabilniji u usporedbi s ABTS reagensom i daje homogenije obojene zone (Dewanjee i sur., 2015). S obzirom na rezultate provedenih korelacijskih analiza, koji su ukazivali na mogući doprinos flavonoida i drugih fenolnih spojeva antioksidativnom učinku, kao i prethodno objavljene vrijednosti antioksidativnog učinka izoliranih spojeva vrste *G. alypum* (Es-Safi i sur., 2005c; Es-Safi i sur., 2007c), razdvajanje sastavnica ekstrakata provedeno je u pokretnoj fazi primjerenoj za razdvajanje glikozida flavonoida zajedno s derivatima fenolnih kiselina (sustav 4) (Wagner i Bladt, 1996). Glavnim antioksidativnim sastavnicama u sve četiri vrste odgovarale su dvije dominantne žućkaste zone koje su na temelju usporedbe sa standardom verbaskozida i detekcije NP/PEG reagensom (svjetloplavo obojenje pri 365 nm), kao i usporedbe s prethodno dobivenim rezultatima tankoslojne kromatografije i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnute s tandemskom masenom spektrometrijom pripisane feniletanoidima rozikazidu A (R_f = 0,29) i verbaskozidu (R_f = 0,66). Prema većoj površini detektirane zone (Slika 88), ali i prethodno prikazanim rezultatima usporedbe odnosa glavnih sastavnica između različitih populacija (Tablica XXX), prvi od njih posebno je zastupljen kod vrste *G. alypum*, što bi moglo objasniti uočenu nižu IC_{50} vrijednost antioksidativnog učinka njezinog Soxhlet ekstrakta (Tablica XXXIX). Analiza fitokemijskog sastava provedena tekućinskom kromatografijom ukazala je na to da su oba feniletanoida zastupljenija u dekoktima istraživanih vrsta roda *Globularia* u usporedbi s maceratima (Slika 71), što objašnjava njihovu bolju antiradikalnu aktivnost. Isto objašnjava i nešto veću antiradikalnu aktivnost dekokta vrste *G. alypum* (Tablica XXXIX), unatoč uočenom većem sadržaju ukupnih fenola u maceratu iste vrste (Slika 71; Tablica XXIII). S druge strane, povećana prisutnost fenolnih spojeva u maceratu vrste *G. alypum* (Slika 71) objašnjava njegovo jače antioksidativno djelovanje u usporedbi s maceratima ostalih istraživanih vrsta.

Kod uzorka vrste *G. punctata* u dobivenom kromatogramu istaknule su se i tri dodatne zone R_f vrijednosti 0,23, 0,37 i 0,42, a koje su odgovarale narančastim zonama flavonoida vidljivim nakon prskanja NP/PEG reagensom pri 365 nm. Na temelju usporedbe sa spojevima prethodno identificiranim tankoslojnom kromatografijom u sustavu 3 (Tablica XXXI), a čija polarnost je usporediva s onom ovdje primijenjenog sustava 4 (Tablica XXVIII), prve dvije zone mogle bi se pripisati 6-hidroksiluteolin 7-*O*-soforozidu i 6-hidroksiluteolin 7-*O*-(6'''-*O*-kafeoil)-soforozidu (1, Slika 88). Veće R_f vrijednosti svih identificiranih spojeva u usporedbi s onima dobivenim prilikom usporedbe uzoraka vrsta roda *Globularia* sakupljenih 2015. godine (Slika 76) mogle bi se objasniti većom visinom startne linije (2,5 cm) te većom

duljinom putovanja pokretne faze (15 cm). Treća zona, koja je s NP/PEG reagensom dala nešto svjetlije narančasto obojenje (2, Slika 88), mogla bi se pripisati prisutnosti još jednog flavonoida karakterističnog za vrstu *G. punctata*, 6-hidroksiluteolin 7-*O*-(6'''-*O*-*p*-kumaroil)-soforozida (Slika 78), ali i njoj karakterističnog feniletanoida trihosantozida A (Slika 78; Tablica XXX). Antiradikalna aktivnost na slobodni radikal DPPH ranije je na temelju tankoslojne kromatografije zabilježena za njega, kao i za druge feniletanoide, uključujući verbaskozid i rozikazid A, koji su bili izolirani iz vrste *G. trichosantha* (Çaliş i sur., 1999), a koja je kao pripadnica sekcije *Globularia* (Holländer i Jäger, 1994) svojim kemijskim sastavom bliska vrsti *G. punctata*.

Imajući na umu povezanost oksidativnog stresa i pojedinih bolesti i stanja (Bagchi i Puri, 1998; Bhattacharya, 2015; Pisoschi i sur., 2016), primjena vrste *G. alypum* kod šećerne bolesti (Eddouks i sur., 2002; Katiri i sur., 2017), bolesti jetre (Vokou i sur., 1993; Khabbach i sur., 2013), reumatoidnog artritisa (Khabbach i sur., 2012) i moždanog udara (El-Mokasabi, 2014a) mogla bi se djelomično objasniti njezinim potencijalnim antioksidativnim učinkom.



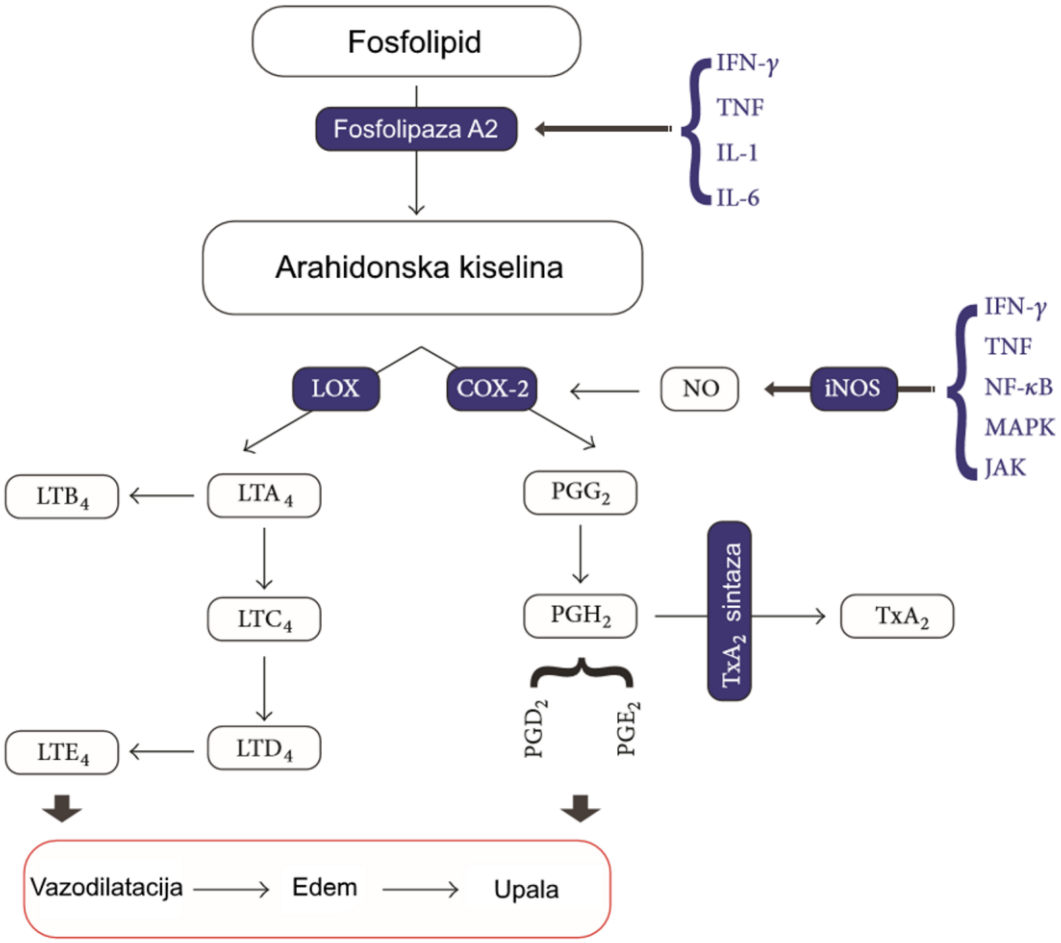
Slika 88. TLC kromatogram fenolnih i flavonoidnih sastavnica Soxhlet ekstrakcijom dobivenih metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova odabranih populacija istraživanih vrsta roda *Globularia* koje posjeduju antioksidativni učinak (sustav 4):

Nepokretna faza:	TLC silikagel 60 F_{254} ploče (staklene)
Pokretna faza:	etil acetat-mravlja kiselina-ledena octena kiselina-voda (100:11:11:26, *V*/*V*/*V*/*V*)
Detekcija:	NP/PEG, UV 365 nm (a), DPPH, dnevno svjetlo (b)
Uzorci:	*Ga* – *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013), *Gc* – *G. cordifolia* (Alan, 2013), *Gm* – *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013), *Gp* – *G. punctata* (Grobničko polje, 2013)
Referentni standard:	verbaskozid

* – 1 – 6-hidroksiluteolin 7-*O*-(6'''-*O*-kafeoil)-soforozid, 2 – 6-hidroksiluteolin 7-*O*-(6'''-*O*-*p*-kumaroil)-soforozid

4.3.3. Protuupalni učinak

Upala je odgovor imunološkog sustava na infekciju i oštećenje tkiva, čija svrha je ponovna uspostava normalne strukture i fiziološke funkcije tkiva. S obzirom na trajanje upala može biti akutna ili kronična. Simptomi akutne upale su pojava crvenila, topline, otekline i boli, a njezini su glavni posrednici prostaglandini, među kojima su najvažniji prostaglandini E_2, I_2, D_2 i $F_{2\alpha}$, koji nastaju iz prostaglandina H_2. Oni osim proupalnih mogu posjedovati i protuupalne učinke. Kronična upala povezuje se s razvojem mnogih bolesti kao što su artritis, rak, moždani udar te neurodegenerativne i krvožilne bolesti (Ricciotti i FitzGerald, 2011). Putevi upalnog odgovora prikazani su na Slici 89.



Slika 89. Putevi upalnog odgovora: IFN-γ – interferon-γ, TNF – faktor tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor*), IL – interleukin, LOX – lipooksigenaza, LT – leukotrien, COX – ciklooksigenaza, NO – dušikov oksid, iNOS – inducibilna sintaza NO, NF-κB – nuklearni faktor-κB, MAPK – mitogenom aktivirana protein kinaza, JAK – janus kinaza, PG – prostaglandin, Tx - tromboksan (preuzeto i prilagođeno iz Ghasemian i sur., 2016)

Fitoterapija upalnih bolesti

Mnoge biljne vrste primjenjuju se u liječenju upalnih bolesti. Neke od njih čiji protuupalni učinak je i klinički istražen/dokazan uključuju kurkumu (*Curcuma longa* L.), đumbir (*Zingiber officinale* Roscoe), ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.), noćurak (*Oenothera biennis* L.), vražju kandžu (*Harpagophytum procumbens* (Burch.) DC. ex Meisn.), koprivu (*Urtica dioica* L.), kadulju (*Salvia officinalis* L.), borovnicu (*Vaccinium myrtillus* L.) i maslinu (*Olea europaea* L.) (Ghasemian i sur., 2016). Mehanizmi protuupalnog djelovanja biljnih sastavnica uključuju: antioksidativni učinak i hvatanje slobodnih radikala, izmjenu aktivnosti upalnih stanica (mastocita, makrofaga, limfocita i neutrofila) i proupalnih enzima (fosfolipaze A_2, ciklooksigenaze, lipooksigenaze i sintaze dušikovog oksida) te izmjenu proizvodnje proupalnih molekula (kinina, faktora aktivacije trombocita (engl. *platelet-activating factor*, PAF), prostaglandina, leukotriena, purina, citokina, kemokina i adhezijskih molekula) i ekspresije proupalnih gena. Među aktivnim spojevima prevladavaju fenolni spojevi, alkaloidi i terpenoidi (Bellik i sur., 2013), od kojih su ili bi mogli biti klinički značajni kurkumin, kolhicin, resveratrol, kapsaicin, epigalokatehin-3-galat i kvercetin (Fürst i Zündorf, 2014). Vrstama čiji je protuupalni učinak posredovan inhibicijom ciklooksigenaze pripada i vrsta *G. alypum* (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014b).

Ciklooksigenaza

Ciklooksigenaza (prostaglandin G/H sintaza, COX) je enzim koji katalizira početne korake u biosintezi prostaglandina, *bis*-dioksigenaciju arahidonske kiseline do prostaglandina G_2 (ciklooksigenazna aktivnost) i posljedičnu redukciju u prostaglandin H_2 (peroksidazna aktivnost). Izoformni oblici ovog enzima, COX-I i COX-II, služe kao mete za nesteroidne protuupalne lijekove, koji njihovom kompetitivnom inhibicijom smanjuju bol, povišenu temperaturu i upalu. COX-I je normalno prisutna u većini tkiva, posebno u krvnim žilama, glatkim mišićima, intersticijskim stanicama, trombocitima i mezotelnim stanicama te se obično smatra konstitutivnim oblikom enzima, čije su glavne uloge zaštita želučane sluznice i sudjelovanje u hemostazi. S druge strane, moguća je i njegova indukcija tijekom upalnog odgovora posredovanog lipopolisaharidima. COX-II je najčešće prisutna u parenhimskim stanicama, a smatra se inducibilnim oblikom enzima, koji glavnu ulogu pokazuje u upalnim stanjima i razvoju tumora. Normalno je prisutan u mozgu, bubrezima i ženskom reproduktivnom sustavu. Pojava kardiotoksičnosti selektivnih COX-II inhibitora upućuje na to da bi ovaj oblik enzima mogao posjedovati i određenu homeostatsku funkciju u krvožilnom sustavu (Rouzer i Marnett, 2009).

4.3.3.1. Protuupalni učinak odabranih vrsta roda *Globularia*

Procjena protuupalnog učinka s obzirom na utvrđeni kemijski sastav

Rezultati istraživanja kemijskog sastava odabranih vrsta roda *Globularia* pokazuju da sve četiri vrste sadrže velik broj sekundarnih metabolita s potencijalnim protuupalnim učinkom, od kojih su najzastupljeniji glikozidi iridoida, feniletanoida i flavonoida.

Protuupalno djelovanje zabilježeno je za mnoge iridoide, od kojih su neki poput aukubina, katalpola i genipozida bili prisutni i u istraživanim uzorcima. Istraživanja su također pokazala da aukubin zacjeljuje oralne rane kod miševa (Viljoen i sur., 2012) i smanjuje edem izazvan karagenanom (Tundis i sur., 2008), dok katalpol, koji je u vrstama *G. alypum* i *G. punctata* prisutan u samostalnom i esterificiranom obliku, posjeduje neuroprotektivno djelovanje koje je povezano sa smanjenjem proupalnih čimbenika kao što su TNF-α, ROS, NO i iNOS (Tundis i sur., 2008; Viljoen i sur., 2012). Inhibicija ekspresije iNOS i otpuštanja NO zabilježena je i za verminozid (Viljoen i sur., 2012) (*G. alypum*).

Protuupalno djelovanje iridoida pripisuje se bicikličkom aglikonskom dijelu sastavljenom od *cis*-fuzioniranog piranskog i ciklopentanskog prstena, a pojačava se hidrolizom glikozidne veze (Viljoen i sur., 2012). Većina iridoida prisutnih u istraživanim uzorcima posjeduje dvostruku vezu između atoma *C*-7 i *C*-8, koja se smatra jednom od najvažnijih strukturnih karakteristika za njihovu protuupalnu aktivnost. Smanjena aktivnost primijećena je kod spojeva koji na mjestu ove veze imaju epoksidni prsten (npr. katalpol u usporedbi s aukubinom) (Viljoen i sur., 2012). Prema drugim autorima važna je cjelovitost ciklopentanskog prstena u kombinaciji s elektron-akceptorskom skupinom u položaju *C*-4 i hidroksilnom skupinom u položaju *C*-10, dok je dvostruka veza *C*-7-*C*-8 manje važna (Carrillo-Ocampo i sur., 2013).

Hidroksilacija na položaju *C*-5, kakvu imaju harpagid i harpagozid, povećava topičku aktivnost (Viljoen i sur., 2012). Ista strukturna karakteristika uočena je kod nekoliko glavnih sastavnica vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* (derivati monomelitozida). Topičku aktivnost pojačava i metilacija karboksilne skupine vezane u položaju *C*-4 (Viljoen i sur., 2012), kakva je prisutna kod genipozida, iridoida karakterističnog za vrstu *G. alypum*. S druge strane, protuupalno djelovanje harpagozida (8-*O*-estera harpagida i cimetne kiseline) moguće je pripisati i prisutnosti cimetne kiseline (Tundis i sur., 2008; Viljoen i sur., 2012). Ova je kiselina, također, sastavni dio globularina (10-*O*-estera katalpola), najzastupljenijeg iridoida vrste *G. alypum,* a čija prisutnost je utvrđena i kod vrste *G. punctata,* kao i kod globularinu srodnih iridoida (globularinina, globularimina i globulariozida), te litantosalina (10-*O*-estera aukubina), iridoida karakterističnog za vrstu *G. alypum*.

Protuupalno djelovanje pokazao je i asperulozid, jedan od glavnih iridoidnih sastavnica koje su nađene u vrstama *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata*. Primijećeno je da 100 μM otopina asperulozida za 63% smanjuje LPS/IFN-γ induciranu produkciju NO u stanicama makrofaga RAW264.7, uz istovremeno smanjenje vijabilnosti stanica za 55% (Mahbob i sur., 2014). Također, u drugom se istraživanju pokazalo da ovaj iridoid inhibira otpuštanje TNF-α (IC_{50} = 0,52 μg/mL), koji je jedan od glavnih proupalnih čimbenika kod reumatoidnog artritisa (Li i sur., 2006).

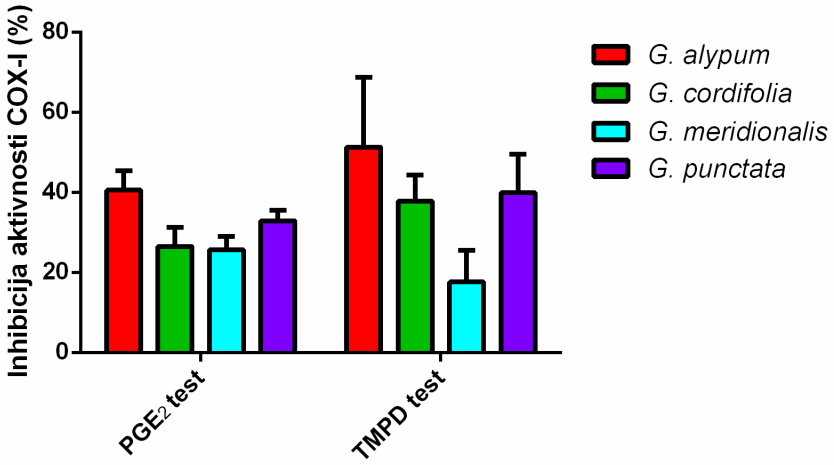
Protuupalni učinak moguće je pripisati i spojevima iz skupine feniletanoida, koji su često prisutni u kombinaciji s iridoidima (Viljoen i sur., 2012). Rezultati istraživanja fitokemijskog sastava pokazali su da je verbaskozid jedan od glavnih spojeva u sve četiri istraživane vrste roda *Globularia.* Protuupalno djelovanje verbaskozida pripisuje se djelovanju na signalne puteve NF-κB i MAPK te inhibiciji otpuštanja različitih proupalnih čimbenika, kao što su histamin, arahidonska kiselina, NO (preko smanjene ekspresije i aktivnosti iNOS), TNF-α i IL-12 (Alipieva i sur., 2014). Verbaskozid smanjuje lipopolisaharidima izazvanu aktivaciju transkripcijskog faktora AP-1, koja, kao i aktivacija transkripcijskog faktora NF-κB, dovodi do povećanja ekspresije iNOS (He i sur., 2011). Također, na miševima je dokazano i analgetsko djelovanje verbaskozida kod njegove peroralne (100, 300 i 500 mg/kg), subkutane (300 mg/kg) i intravenske primjene (2, 10 i 50 mg/kg). Metilacija pojedinih hidroksilnih skupina (npr. leukoskeptozid A) i zamjena ramnoze s glukozom (npr. plantamajozid) nisu značajno smanjile analgetski učinak za razliku od promjene mjesta vezanja ramnoze (npr. forzitiazid) i njezinog izostanka (npr. kalceolariozid A). Do smanjene aktivnosti doveo je i manjak hidroksilnih skupina u aglikonu, izostanak feniletilnog ili kafeoilnog dijela molekule te promjena mjesta vezanja kavene kiseline (npr. izoverbaskozid) (Nakamura i sur., 1997). Analgetski učinak kod miševa utvrđen za pripravak dobiven od vrsta roda *Plantago*, koje su blisko srodne s vrstama roda *Globularia*, bio je također povezan s visokim sadržajem verbaskozida (Radu i sur., 2010).

Flavonoidi mogu smanjiti upalu inhibicijom enzima iNOS, citosolne i tirozin kinaze, protein kinaze C, inhibicijom neutrofilne degranulacije ili poticanjem sinteze IFN (Ribeiro i sur., 2015). Luteolin je pokazao i dobru inhibitornu aktivnost na mnoge proupalne citokine, kao što su IL-6, IFN-γ i TNF-α (Sandhar i sur., 2011).

Jedan od mehanizama koji je zajednički spojevima iz sve tri navedene skupine, a moguće ga je povezati i s protuupalnim i s analgetskim učincima, je inhibicija ciklooksigenaze (COX), koja je istražena u okviru ovog rada, a koja je dosad ispitana samo na uzorku vrste *G. alypum* (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014b).

Inhibicija aktivnosti ciklooksigenaze-I (COX-I) ekstraktima vrsta roda *Globularia*

Protuupalni učinak vrsta roda *Globularia* uspoređen je pomoću dvije spektrofotometrijske metode, od kojih se jedna temeljila na inhibiciji ciklooksigenazne (PGE_2 test), a druga na inhibiciji peroksidazne aktivnosti COX-I (TMPD test). Istraživanje provedeno na metanolnim ekstraktima nadzemnih dijelova vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013), *G. cordifolia* (Alan, 2013), *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013) i *G. punctata* (Grobničko polje, 2013) pokazalo je da sve četiri vrste posjeduju spojeve koji mogu inhibirati COX-I, a rezultati dobiveni dvjema metodama nisu se međusobno statistički značajno razlikovali ($P > 0,05$) (Slika 90).



Slika 90. Inhibitorno djelovanje metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013), *G. cordifolia* (Alan, 2013), *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013) i *G. punctata* (Grobničko polje, 2013) (c = 50 μg/mL), dobivenih Soxhlet ekstrakcijom, na ciklooksigenaznu i peroksidaznu aktivnost ciklooksigenaze-I (COX-I) izraženo kao srednja vrijednost ± standardna devijacija postotka inhibicije utvrđenog PGE_2 testom (n = 4) i TMPD testom (n = 3); PGE_2 – prostaglandin E_2, TMPD – *N*,*N*,*N'*,*N'*-tetrametil-*p*-fenilendiamin

Inhibitorna aktivnost ekstrakata (c = 50 μg/mL) u PGE_2 testu iznosila je 40,6% za vrstu *G. alypum*, 26,5% za vrstu *G. cordifolia*, 25,7% za vrstu *G. meridionalis* i 32,9% za vrstu *G. punctata*, uz IC_{50} indometacina od 1,03 μM, koji je odgovarao literaturnim vrijednostima (Fiebich i sur., 2005; Reiniger i Bauer, 2006). Inhibitorna aktivnost istih ekstrakata u TMPD testu iznosila je 51,3% za vrstu *G. alypum*, 37,8% za vrstu *G. cordifolia*, 17,6% za vrstu *G. meridionalis* i 39,9% za vrstu *G. punctata*, uz IC_{50} indometacina od 2,9 μM. Ranije zabilježeno inhibitorno djelovanje ekstrakata listova i cvjetova vrste

G. alypum (c = 33 μg/mL) u TMPD testu iznosilo je 5,33% i 61,05% (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014b). Prednosti prvog testa su izravno određivanje inhibicije COX-I, potrebna manja količina enzima te veća osjetljivost metode zbog mogućnosti detekcije niskih koncentracija prostaglandina u uzorcima (Cuendet i sur., 2006). S druge strane, njegovi nedostaci uključuju visoku cijenu primijenjenog kompleta te provođenje dvije uzastopne enzimske reakcije umjesto jedne, što produžuje vrijeme trajanja testa, ali i povećava mogućnost pogreške. Također, u obzir treba uzeti i mogućnost dobivanja lažno negativnih rezultata s obzirom na zabilježenu inhibiciju aktivnosti acetilkolinesteraze vrsta *G. alypum* (Benamar i sur., 2010; Khlifi i sur., 2013; Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014b) i *G. meridionalis* (Tundis i sur., 2012a). Nedostaci drugog testa, koji je jednostavniji i brži za provođenje, su njegova manja preciznost te mogućnost da oksidacija TMPD bude spriječena i zbog antioksidativnog učinka pojedinih sastavnica, a ne samo zbog inhibicije COX (lažno pozitivni rezultati) (Cuendet i sur., 2006).

Zabilježeno je da feniletanoidi koji posjeduju dva i tri šećerna prstena, kao što su verbaskozid (prisutan kod sve četiri vrste) i arenariozid (prisutan kod vrste *G. punctata*), jače inhibiraju COX-II u usporedbi sa spojevima koji imaju manji/veći broj šećera u strukturi. Pri tome je djelovanje verbaskozida na COX-I bilo slabije (IC_{50} > 1 mM) od djelovanja na COX-II (IC_{50} = 0,69 mM) (Sahpaz i sur., 2002). Selektivno inhibitorno djelovanje verbaskozida na COX-II uočeno je i kao izostanak nastanka čira na želucu koji je uočen kod drugih feniletanoida i flavonoida koji su pokazali protuupalno djelovanje (Akcos i sur., 1999).

Flavonoidi također posjeduju inhibitorno djelovanje na COX-I i COX-II. Flavoni apigenin i luteolin, koji su se uz 6-hidroksiluteolin pokazali kao karakteristični aglikoni flavonoida prisutnih u sve četiri istraživane vrste, mogu inhibirati COX-II. Jače inhibitorno djelovanje na COX-I primijećeno je kod flavonoida s manjim brojem hidroksilnih skupina i dvostrukom vezom *C*-2-*C*-3, a smanjuje ga prisutnost hidroksilne skupine na položaju *C*-3. Suprotno tome, inhibicija COX-II značajno je povećana kod flavonoida koji u svojoj građi na mjestu B prstena imaju katehol, kao što su luteolin (Ribeiro i sur., 2015) te u uzorcima zastupljeniji 6-hidroksiluteolin.

Korelacijskom analizom nije utvrđena povezanost između rezultata provedenih testova i sadržaja ukupnih fenola i flavonoida (P > 0,05, n = 4), što bi moglo biti posljedica prethodno navedenih ograničenja provedenih spektrofotometrijskih testova (lažno pozitivni i/ili lažno negativni rezultati). Glavni feniletanoidni i flavonoidni spojevi vrste *G. alypum* posjeduju snažan antioksidativni učinak (Es-Safi i sur., 2005c; Es-Safi i sur., 2007c), što je potvrđeno i istraživanjima provedenim u okviru ovog rada. Također, snažna antiacetilkolinesterazna

aktivnost zabilježena je za dekafeoilverbaskozid (IC_{50} = 16,1 μM), verbaskozid (IC_{50} = 19,9 μM) i izoverbaskozid (IC_{50} = 21,9 μM) (Bae i sur., 2014), feniletanoide koji su bili prisutni u uzorcima sve četiri istraživane vrste. Istraživanje provedeno na izoliranim sastavnicama vrste *G. meridionalis* ukazalo je, doduše, na drugačije rezultate, značajni antiacetilkolinesterazni učinak primijećen je za luteolin (IC_{50} = 25,2 μg/mL), dok verbaskozid i izoverbaskozid nisu inhibirali navedeni enzim (IC_{50} > 500 μg/mL) (Tundis i sur., 2012a).

Iridoidi su treća skupina biološki aktivnih spojeva koji su prevladavali u istraživanim uzorcima. Pokazalo se da neki glukozidi iridoida, primjerice aukubina i genipozida, od kojih su oba prisutna kod vrste *G. alypum*, mogu inhibirati aktivnost COX-I i COX-II, nakon što su hidrolizirani u prisutnosti β-glukozidaze. Pri tome je aukubin jače inhibirao COX-II (IC_{50} = 8,83 μM) u usporedbi s COX-I (IC_{50} = 68,9 μM), dok je genipozid pokazao jači inhibitorni učinak na COX-I (IC_{50} = 5,37 μM) (Park i sur., 2010) te bi jednim dijelom mogao biti zaslužan za nešto jaču inhibiciju COX-I vrste *G. alypum*. S druge strane, anticiklooksigenazna aktivnost hidroliziranog oblika katalpola, još jednog od iridoida vrste *G. alypum*, u prethodno spomenutom istraživanju nije zabilježena (Park i sur., 2010). Vezanje na COX-II primijećeno je i za β-glukozidazom hidrolizirani oblik harpagozida i harpagida, iridoida koji su glavne sastavnice vražje kandže, biljke koja se tradicionalno primjenjuje u liječenju reumatoidnog artritisa, rana i čireva, a povezuje se sa sličnošću njihove strukture s prostaglandinom E_2 i selektivnim inhibitorima COX-II kakav je celekoksib (Viljoen i sur., 2012).

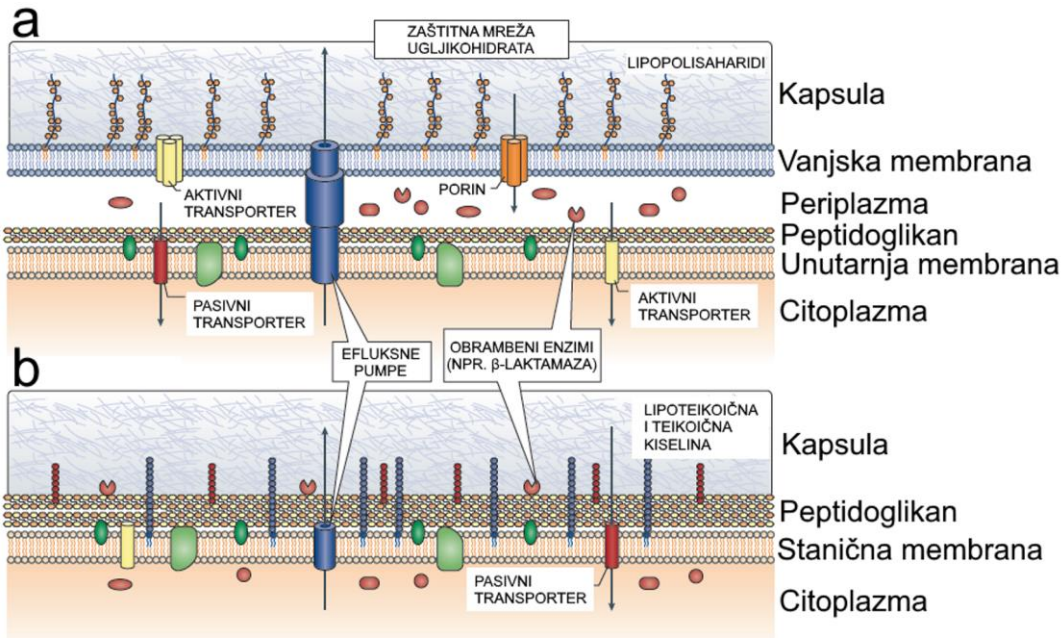
Prisutnost spojeva koji imaju inhibitorni učinak na COX-I mogla bi jednim dijelom objasniti zabilježenu primjenu vrste *G. alypum* kod bolova i različitih upalnih stanja (Arnold i sur., 1997; Leporatti i Ghedira, 2009; Benderradji i sur., 2014; El-Mokasabi, 2014a; Teixidor-Toneu i sur., 2016), imajući na umu da pojedine sastavnice, poput dominantno prisutnog verbaskozida, jače inhibiraju COX-II (Sahpaz i sur., 2002).

4.3.4. Antimikrobni učinak

Gram-pozitivne (G(+)) i Gram-negativne (G(-)) bakterije

Većinu bakterija moguće je, s obzirom na svojstva bojenja po Gramu, podijeliti u dvije velike skupine, Gram-pozitivne (G(+)), primjerice *S. aureus* i *B. subtilis*, i Gram-negativne (G(-)) bakterije, primjerice *E. coli* i *P. aeruginosa*, pri čemu su razlike u bojenju uvjetovane građom njihove stanične stijenke (Silhavy i sur., 2010). Kao što je prikazano na Slici 91, staničnu membranu G(+) bakterija okružuje debeli sloj peptidoglikana s vezanom teikoičnom i lipoteikoičnom kiselinom, dok staničnu membranu G(-) bakterija okružuje tanki sloj peptidoglikana te vanjska membrana s vezanim lipopolisaharidima, molekulama odgovornim za nastanak endotoksičnog šoka, koji je često povezan sa sepsom. Uz to, mnoge bakterije mogu stvarati i dodatni vanjski sloj građen od proteina, takozvani S-sloj, odnosno kapsulu građenu od polisaharida.

Nastanku otpornosti na antibiotike obje skupine bakterija može pridonijeti stvaranje kapsule te rad efluksnih pumpi koje iz stanice izbacuju toksične tvari, kao i rad enzima koji ih mogu neutralizirati, poput β-laktamaze (Tommasi i sur., 2015). Složenija građa stanične ovojnice G(-) bakterija često je uzrok njihove veće otpornosti (Silhavy i sur., 2010). Kod njih, ali i kod G(+) bakterija poput penicilin-rezistentnih pneumokoka, meticilin-rezistentnog *S. aureus* i vankomicin-rezistentnih enterokoka, sve veći klinički problem postaje i pojava višestruke otpornosti na antibiotike (engl. *multi-drug resistance*, MDR) (Cornaglia, 2009).



Slika 91. Građa stanične ovojnice Gram-negativnih (a) i Gram-pozitivnih bakterija (b) (preuzeto i prilagođeno iz Tommasi i sur., 2015)

Zlatni stafilokok (*Staphylococcus aureus*) i meticilin-rezistentni *S. aureus* (MRSA)

Zlatni stafilokok (*Staphylococcus aureus*) jedan je od glavnih ljudskih patogena, ali i komenzal prisutan kod 30% ljudske populacije. Vodeći je uzrok bakterijemije, infektivnog endokarditisa te osteoartikularnih i pleuropulmonalnih infekcija, infekcija kože i mekih tkiva te infekcija povezanih s uporabom/ugradnjom medicinskih pomagala i uređaja (stvaranje biofilma). *S. aureus* može izazvati i sljedeća stanja: epiduralni apces, meningitis, sindrom toksičnog šoka, infekcije mokraćnog sustava i septički tromboflebitis (Tong i sur., 2015). Također, bolesti izazvane ovom bakterijom mogu biti i neizravno izazvane, primjerice konzumacijom hrane koja sadrži njezine toksine (Kalenić i sur., 2008).

Meticilin-rezistentni *S. aureus* (MRSA) jedan je od najčešćih uzročnika bolničkih infekcija, koji uzrokuje 40 do 70% stafilokoknih infekcija u jedinicama intenzivnog liječenja (Kalenić i sur., 2008). MRSA može izazvati iste vrste infekcija kao i *S. aureus* osjetljiv na meticilin (MSSA), a često izaziva dodatne infekcije na infekcije MSSA. Infekcije MRSA često prati veći mortalitet, produženje boravka u bolnici i skuplje liječenje. Karakterizira ga otpornost na sve beta-laktamske antibiotike, a često i na druge skupine antibiotika, primjerice makrolide, linkozamide i aminoglikozide (Budimir i sur., 2012), koja je rezultat aktivnosti β-laktamaza, odnosno promjene ribosoma i rada efluksnih pumpi (Kalenić i sur., 2008).

Infekcije izvanbolničkim MRSA mnogo su rjeđe, a obično je riječ o teškim kožnim infekcijama (celulitis, nekrotizirajući fasciitis) i nekrotizirajuća pneumonija (Kalenić i sur., 2008). U većini europskih zemalja prisutan je, uz izvanbolnički MRSA, i MRSA kod domaćih životinja (stoke), koji također može izazvati infekcije u ljudi (Budimir i sur., 2012).

Fitoterapija bakterijskih infekcija

Mnoge ljekovite biljne vrste posjeduju antimikrobni potencijal. Među njih se ubraja i vrsta *G. alypum* (Bogdadi i sur., 2007). Prednost primjene spojeva izoliranih iz biljaka u terapiji bakterijskih infekcija mogla bi biti smanjena pojava otpornosti zbog istovremenog djelovanja na više različitih meta, a moguće i smanjene nuspojave u usporedbi sa sintetskim lijekovima. Mehanizmi antimikrobnog učinka mogu biti: oštećenje stanične membrane, anti-biofilm učinak, inhibicija stvaranja kapsule, smanjenje ekspresije virulentnih gena, smanjenje proizvodnje toksina te izmjene bakterijske otpornosti na antibiotike, primjerice smanjenjem enzimske razgradnje inhibicijom β-laktamaza, promjenom mjesta djelovanja antibiotika i inhibicijom efluksnih pumpi, odnosno povoljni učinak na imunološki sustav i želučano-crijevnu mikrofloru domaćina. Navedeni spojevi mogu pripadati fenolima i polifenolima, alkaloidima, terpenoidima, lektinima i polipeptidima (Upadhyay i sur., 2014).

4.3.4.1. Antimikrobni učinak odabranih vrsta roda *Globularia*

Metoda difuzije

U metodi difuzije, sve četiri vrste roda *Globularia* pokazale su dobar učinak na *S. aureus* ATCC 6538, pri čemu je najveća zona inhibicije uočena za uzorak vrste *G. alypum* (25,0 mm), a najmanja za uzorak vrste *G. punctata* (21,3 mm) (Tablica XLI). Također, sve četiri vrste pokazale su slabi učinak na *B. cereus* ATCC 11778 (8,3-9,7 mm), dok su samo vrste *G. alypum* (7,7 mm) i *G. cordifolia* (8,3 mm) pokazale i slabi učinak na *B. subtilis* ATCC 6633. Vrsta *G. alypum* pokazala je još i slabu inhibiciju rasta *P. aeruginosa* ATCC 27853 (9,7 mm), dok je vrsta *G. punctata* umjereno odnosno dobro inhibirala rast *E. faecalis* ATCC 29212 (13,0 mm) i *E. coli* ATCC 10536 (24,0 mm). Antimikrobno djelovanje na iste sojeve u metodi difuzije, točnije na *B. subtilis* ATCC 6633 (Krimat i sur., 2014; Taghzouti i sur., 2016) i *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Boussoualim i sur., 2014), i ranije je zabilježeno za metanolne ekstrakte vrste *G. alypum*. Također, ista je vrsta i u prethodnim istraživanjima pokazala najbolji učinak na *S. aureus* (Bouabdelli i sur., 2012; Boussoualim i sur., 2014).

Tablica XLI. Antimikrobni učinak metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova odabranih populacija istraživanih vrsta roda *Globularia* dobivenih Soxhlet ekstrakcijom izražen kao srednja vrijednost ± standardna devijacija zona inhibicije u mm (n = 3)

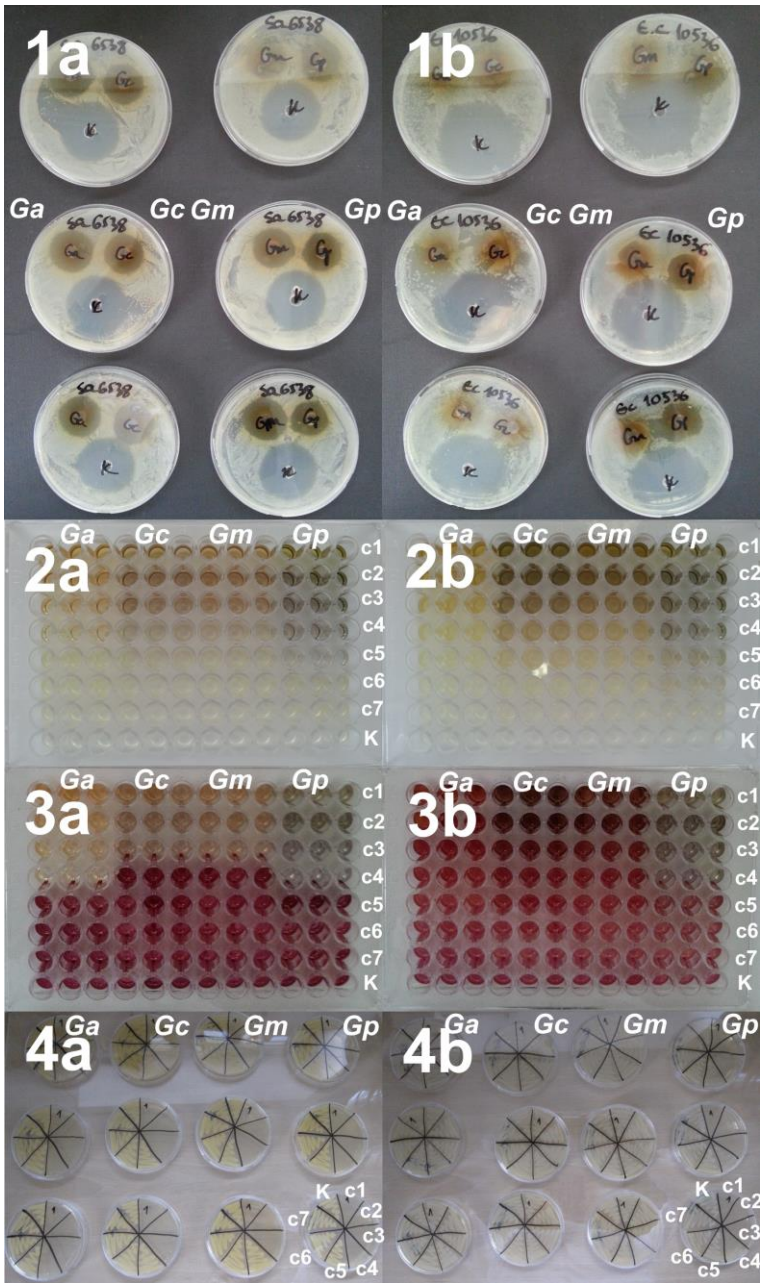
Bakterijski soj	*Ga*	*Gc*	*Gm*	*Gp*	Gentamicin*	Norfloksacin**
G(+) bakterije						
B. cereus ATCC 11778	8,3 ± 0,6	9,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	9,3 ± 1,2	22,3 ± 0,6	26,6 ± 0,9
B. subtilis ATCC 6633	7,7 ± 0,6	8,3 ± 1,5	-	-	24,7 ± 0,6	41,0 ± 0,0
E. faecalis ATCC 29212	-	-	-	13,0 ± 0,0	15,0 ± 0,0	23,8 ± 0,8
S. aureus ATCC 6538	25,0 ± 0,0	23,0 ± 0,0	23,7 ± 1,5	21,3 ± 0,6	24,0 ± 0,0	33,8 ± 0,8
S. aureus ATCC 29213	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	25,3 ± 0,6	n.i.
G(-) bakterije						
E. coli ATCC 10536	-	-	-	24,0 ± 1,7	23,3 ± 0,6	44,7 ± 1,0
K. pneumoniae MFBF-10402	-	-	-	-	21,0 ± 0,0	7,3 ± 0,5
P. aeruginosa ATCC 27853	9,7 ± 0,6	-	-	-	24,3 ± 0,6	30,7 ± 2,8

Ga – *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013); *Gc* – *G. cordifolia* (Alan, 2013); *Gm* – *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013); *Gp* – *G. punctata* (Grobničko polje, 2013); * – pozitivna kontrola, aminoglikozidni antibiotik širokog spektra (c = 0,2 mg/mL, n = 3); ** – pozitivna kontrola, fluorokinolonski antibiotik širokog spectra (c = 0,2 mg/mL, n = 6); G(+) – Gram-pozitivne bakterije, G(-) – Gram-negativne bakterije; - – inhibicija bakterijskog rasta nije detektirana s primijenjenom koncentracijom ekstrakta (c = 50 mg/mL); n.i. – nije ispitano

Metoda mikrodilucije

Iako se metoda difuzije pokazala kao dobra za brzi početni uvid u antimikrobni potencijal istraživanih vrsta, u svrhu relativno brzog i jeftinog određivanja MIK istraživanih ekstrakata (Luber i sur., 2003), provedena je i metoda mikrodilucije u bujonu, koja u obzir uzima i doprinos manje hidrofilnih sastavnica, a koji ne mora biti vidljiv kod prethodne metode uslijed njihove smanjene topljivosti i difuzije u hidrofilnom mediju (agaru) (Volk, 2008). Subjektivnost prilikom vizualne procjene (izostanka) bakterijskog rasta u obliku zamućenja (Lee i sur., 2007a), kao mogući nedostatak druge metode, u većini je slučajeva zaobiđena ili barem značajno umanjena primjenom reagensa TTC koji se u prisutnosti metabolički aktivnih bakterija pretvara u crveno obojeni produkt (Lee i sur., 2007a) (Slika 92). Ipak, u nekim je slučajevima, posebno kod većih koncentracija ekstrakata, zbog njihove veće obojenosti bilo teško zasigurno procijeniti prisutnost/odsutnost crvenog obojenja, dok je navedena promjena potpuno izostala kod vrste *E. faecalis* ATCC 29212 (Tablica XLII). Iz ovih je razloga provedena i vremenski duža subkultivacija na agarne ploče. Njome su dobivene vrijednosti najnižih koncentracija ekstrakata koje djeluju baktericidno (MBK), a koje su bile jednake ili veće u usporedbi s vrijednostima MIK utvrđenih mikrodilucijom u bujonu (Tablica XLII). Sve navedene metode prikazane su na Slici 92 na primjeru jedne G(+) (*S. aureus* ATCC 6538) i jedne G(-) bakterije (*E. coli* ATCC 10536), a njihova kombinacija omogućila je pouzdaniju procjenu antimikrobnog učinka istraživanih vrsta roda *Globularia*.

Rezultati dobiveni metodom mikrodilucije velikim su se dijelom podudarali s rezultatima dobivenim metodom difuzije (Tablica XLI). Sve četiri vrste pokazale su dobar antibakterijski učinak na *S. aureus* ATCC 6538 (MIK = 1,42 mg/mL za vrste *G. alypum* i *G. punctata*, MIK = 2,84 mg/mL za vrste *G. cordifolia* i *G. meridionalis*), dok je na *S. aureus* ATCC 29213 primijećeno slabije inhibitorno djelovanje, koje je bilo najbolje za vrstu *G. alypum*. Ista je vrsta slabo inhibirala rast *P. aeruginosa* ATCC 27853 (MIK = 22,73 mg/mL), dok je vrsta *G. punctata* umjereno do dobro inhibirala rast *E. faecalis* ATCC 29212 (MBK = 5,68 mg/mL) i *E. coli* ATCC 10536 (MIK = 1,42 mg/mL). Suprotno rezultatima dobivenim metodom difuzije, vrsta *G. punctata* pokazala je dobro antibakterijsko djelovanje na *B. cereus* ATCC 11778 (MIK = 2,84 mg/mL) i *B. subtilis* ATCC 6633 (MIK = 1,89 mg/mL), dok su ostale istraživane vrste slabo inhibirale samo rast *B. cereus* ATCC 11778 (MIK = 11,36 mg/mL). Usporediv antimikrobni učinak metanolnih ekstrakata vrste *G. alypum* na *S. aureus* u metodi mikrodilucije, kao i slabije inhibitorno djelovanje na *B. cereus* i *P. aeruginosa*, zabilježeni su i u drugim istraživanjima (Bogdadi i sur., 2007; Taghzouti i sur., 2016).



Slika 92. Prikaz rezultata* istraživanja antimikrobnog učinka metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova odabranih populacija istraživanih vrsta roda *Globularia* dobivenih Soxhlet ekstrakcijom na *S. aureus* ATCC 6538 (a) i *E. coli* ATCC 10536 (b), a koji su dobiveni metodom difuzije iz bunarića (1), metodom mikrodilucije u bujonu (2), metodom mikrodilucije u bujonu uz inkubaciju s 1% (w/v) TTC (3) te subkultivacijom na agarnim pločama (4); *Ga – G. alypum* (Konavoske stijene, 2013), *Gc – G. cordifolia* (Alan, 2013), *Gm – G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013) i *Gp – G. punctata* (Grobničko polje, 2013); c1-c7 – dvostruka serijska razrjeđenja ekstrakata u rasponu od c1 = 11,36 do c7 = 0,18 mg/mL; K – kontrola rasta bakterijske kulture; * – sve oznake istraživanih vrsta odnose se na mjerenja u triplikatu (okomito)

Tablica XLII. Antimikrobni učinak metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova odabranih populacija istraživanih vrsta roda *Globularia* dobivenih Soxhlet ekstrakcijom izražen kao srednja vrijednost minimalnih inhibitornih i baktericidnih koncentracija u mg/mL (n = 3)

Bakterijski soj	*Ga*	*Gc*	*Gm*	*Gp*	Gentamicin*	Verbaskozid**
G(+) bakterije						
B. cereus	11,36[a]	11,36	11,36	2,84	1,52	-
ATCC 11778	11,36[b]	11,36	-	2,84	1,52	-
B. subtilis	-	-	-	1,89	0,02	-
ATCC 6633	-	-	-	2,84	0,21	-
E. faecalis	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ATCC 29212	-	-	-	5,68	4,55	-
MSSA						
S. aureus	1,42	2,84	2,84	1,42	0,57	227,20
ATCC 6538	1,89	3,79	2,84	1,42	0,76	-
S. aureus	4,73	7,57	11,36	11,36	0,28	227,20
ATCC 29213	4,73	11,36	11,36	11,36	0,66	227,20
S. aureus	2,37	2,84	2,84	1,42	n.i.	n.i.
MFBF-505	2,37	2,84	2,84	1,42		
S. aureus	1,42	1,89	1,42	1,42	n.i.	n.i.
MFBF-10661	1,42	2,37	1,89	1,42		
S. aureus	1,42	1,89	1,42	1,89	n.i.	n.i.
MFBF-10666	1,42	1,89	1,42	1,89		
MRSA						
MRSA	1,89	2,84	2,84	1,42	n.i.	n.i.
MFBF-101	2,84	2,84	2,84	1,42		
MRSA	2,84	3,31	2,84	2,84	n.i.	n.i.
MFBF-124	2,84	3,79	2,84	2,84		
MRSA	2,84	2,84	2,84	1,89	n.i.	n.i.
MFBF-154	2,84	2,84	2,84	2,37		
MRSA	2,84	2,84	3,79	1,42	n.i.	n.i.
MFBF-164	2,84	2,84	3,79	1,89		
MRSA	2,84	3,79	2,84	2,37	n.i.	n.i.
MFBF-177	2,84	3,79	2,84	2,84		
G(-) bakterije						
E. coli	-	-	-	1,42	0,14	227,20
ATCC 10536	-	-	-	2,84	1,51	-
K. pneumoniae	-	-	-	-	0,28	-
MFBF-10402	-	-	-	-	0,76	-
P. aeruginosa	22,73	-	-	-	1,14	227,20
ATCC 27853	22,73	-	-	-	3,03	-

Ga – *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013); *Gc* – *G. cordifolia* (Alan, 2013); *Gm* – *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013); *Gp* – *G. punctata* (Grobničko polje, 2013); * – pozitivna kontrola, aminoglikozidni antibiotik širokog spektra (c = 0,07-36,36 μg/mL, odnosno c = 0,02-9,09 μg/mL za vrstu *B. subtilis*, n = 3); ** – pozitivna kontrola, glavna feniletanoidna sastavnica zajednička svim istraživanim vrstama (c = 0,44-227,20 μg/mL, n = 3); G(+) – Gram-pozitivne bakterije, MSSA – *S. aureus* osjetljiv na meticilin, MRSA – meticilin-rezistentni *S. aureus*, G(-) – Gram-negativne bakterije; - – inhibicija bakterijskog rasta nije detektirana s primijenjenim koncentracijama ekstrakata (c = 0,18-11,36 mg/mL, odnosno c = 0,36-22,73 mg/mL za vrstu *P. aeruginosa*); n.d. – nije detektirana promjena boje; n.i. – nije ispitano; [a] – vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) utvrđene na temelju mikrodilucije u bujonu nakon inkubacije s 1% (w/v) TTC; [b] – vrijednosti minimalnih baktericidnih koncentracija (MBK) utvrđene na temelju subkultivacije na agarnim pločama

Imajući na umu da bi rezultati dobiveni metodom difuzije mogli ovisiti ne samo o antimikrobnom učinku istraživanih spojeva, već i o njihovoj sposobnosti difuzije u agar (Volk, 2008), uočene razlike između dvije primijenjene metode, točnije jače inhibitorno djelovanje vrste *G. punctata* na predstavnike roda *Bacillus* u metodi mikrodilucije, moglo bi ukazivati na to da su za njega zaslužne neke manje hidrofilne sastavnice prisutne samo kod navedene vrste. S obzirom na to da je uočena izvrsna povezanost (r = 0,998, P = 0,002) između MIK vrijednosti za vrstu *B. cereus* koje su dobivene metodom mikrodilucije u bujonu i sadržaja flavonoida (Tablica XLIII), za izraženiji antimikrobni učinak vrste *G. punctata* mogli bi biti zaslužni njoj karakteristični acilirani derivati 6-hidroksiluteolin 7-*O*-soforozida.

S druge strane, pretpostavljeno je da bi inhibitorno djelovanje sve četiri vrste na *S. aureus* ATCC 6538 moglo biti povezano s prisutnošću njihovih glavnih zajedničkih spojeva, poput verbaskozida, izoverbaskozida, rozikazida A, 6-hidroksiluteolin 7-*O*-glukozida ili apigenina. Ranije se pokazalo da luteolin 7-*O*-glukozid može inhibirati rast G(+) bakterija (*B. cereus*, *B. subtilis* i *S. aureus*), s rasponom vrijednosti MIK od 50 do 90 μg/mL, dok apigenin dodatno djeluje i na G(-) bakterije *E. coli* i *P. aeruginosa* (Akroum i sur., 2009). Verbaskozid, također, može inhibirati rast *S. aureus* i *K. pneumoniae* (MIK = 62,5 μg/mL) te *B. subtilis* i *E. coli* (MIK = 125,0 μg/mL) (Pendota i sur., 2013). Ovim istraživanjem utvrđen je njegov antimikrobni učinak na *S. aureus*, *E. coli* i *P. aeruginosa* (Tablica XLII).

Antimikrobni učinak na G(+) i G(-) bakterije posjeduju i drugi feniletanoidi, poput desramnoziliranih derivata verbaskozida, kalceolariozida A i kalceolariozida B (Radev, 2010), čija prisutnost je u okviru naših istraživanja bila zabilježena samo kod vrste *G. alypum*. Prisutnost ovih i sličnih spojeva mogla bi objasniti pojavu slabog inhibitornog djelovanja navedene vrste na *P. aeruginosa*, a koje je uočeno u obje primijenjene metode, kao i njezin snažniji učinak na *S. aureus* ATCC 29213. S druge strane, antimikrobni učinak vrste *G. punctata* na *E. faecalis* i *E. coli* mogao bi se uz prethodno spomenute spojeve, uključujući njoj karakteristične flavonoide, pripisati i drugim (hidrofilnijim) spojevima karakterističnim za ovu vrstu, poput ksiloziliranih derivata verbaskozida, trihosantozida A i trihosantozida B, budući da je navedeni bio uočen i u metodi difuzije.

Tablica XLIII. Povezanost između istraženih parametara za procjenu antimikrobnog učinka i sadržaja sekundarnih metabolita odabranih vrsta roda *Globularia* (n = 4)

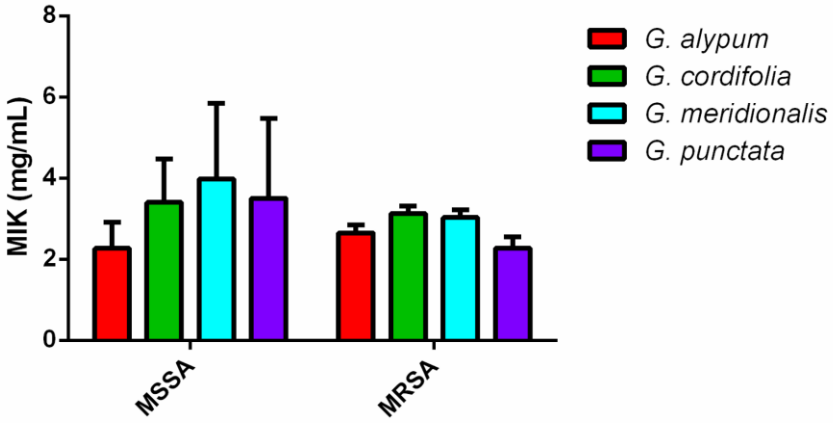
Istraženi parametri	Ukupni fenoli	Flavonoidi
MIK (*B. cereus*)	0,839	-0,998**
MIK (*S. aureus*)	0,048	-0,623

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija; ** – statistički značajna povezanost (P < 0,01)

Antistafilokokna aktivnost istraživanih vrsta

Budući da je istraživanje antimikrobnog učinka na odabrane ATCC sojeve pokazalo da bi sve četiri vrste glavulja mogle posjedovati dobar učinak na *S. aureus*, istraživanje je prošireno na kliničke izolate koji su uključivali sojeve *S. aureus* osjetljive na meticilin (MSSA) te meticilin-rezistentne sojeve *S. aureus* (MRSA), kako bi se uvidjelo mogu li istraživani ekstrakti podjednako dobro inhibirati rast obje skupine bakterija. Prema popisu prioritetnih patogena za koje je potrebno istraživati i razvijati nove antibiotike, koji je ranije ove godine objavila Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization,* WHO), MRSA spada u patogene visokog prioriteta (WHO, 2017).

Dobivenim rezultatima potvrđena je antistafilokokna aktivnost istraživanih vrsta roda *Globularia* (Tablica XLII), a statističkom obradom vrijednosti dobivenih metodom mikrodilucije u bujonu potvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika između vrsta, kao ni između skupina MSSA i MRSA ($P > 0,05$) (Slika 93). Vrijednosti MIK za sve vrste i bakterijske sojeve kretale su se između 1,42 i 11,36 mg/mL, što je, očekivano, bilo mnogostruko više od vrijednosti dobivenih za aminoglikozidni antibiotik gentamicin (MIK = 0,28-0,57 μg/mL), koji je služio kao pozitivna kontrola, a moglo se povezati s uočenim antistafilokoknim djelovanjem verbaskozida (MIK = 227,20 μg/mL), kao jedne od glavnih sastavnica istraživanih vrsta.



Slika 93. Antimikrobni učinak metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013), *G. cordifolia* (Alan, 2013), *G. meridionalis* (Grobničko polje, 2013) i *G. punctata* (Grobničko polje, 2013), dobivenih Soxhlet ekstrakcijom, na sojeve *S. aureus* osjetljive na meticilin (MSSA) (n = 5) i metilin-rezistentne sojeve *S. aureus* (MRSA) (n = 5), koji je utvrđen na temelju mikrodilucije u bujonu nakon inkubacije s 1% (w/v) TTC-, izražen kao MIK u mg/mL; MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

Prema ranijim istraživanjima, verbaskozid dobro djeluje na sojeve *S. aureus* koji posjeduju višestruku otpornost na antibiotike, pri čemu su vrijednosti MIK (64-256 μg/mL) (Nazemiyeh i sur., 2008) bile usporedive s vrijednostima dobivenim u ovom istraživanju. Jedan od mogućih mehanizama njegovog djelovanja na *S. aureus* je inhibicija unosa leucina u stanicu te posljedična inhibicija sinteze proteina (Avila i sur., 1999).

Iste vrijednosti MIK kao u slučaju verbaskozida, kao i sinergistički učinak s antibioticima oksacilinom, ampicilinom i vankomicinom, uočene su za flavonoid baikalein (5,6,7-trihidroksiflavon) (Lee i sur., 2015). Podjednaka aktivnost na sojeve MSSA i MRSA zabilježena je i za luteolin (MIK = 31,25-125 μg/mL) (Su i sur., 2014). Nedavno se također pokazalo da luteolin može povećati osjetljivost sojeva MSSA i MRSA na aminoglikozidne i β-laktamske antibiotike (Joung i sur., 2016). Preklapanjem strukturnih značajki navedenih flavonoida dobiva se 6-hidroksiluteolin, glavni flavonoidni aglikon istraživanih vrsta roda *Globularia*.

Iridoidi su treća skupina spojeva koji su mogli pridonijeti uočenom antistafilokoknom učinku. Inhibitorni učinak na *S. aureus* i druge bakterijske sojeve (*B. subtilis* i *E. coli*), sličan učinku kloramfenikola, uočen je za neke neglikozilirane iridoide (Tundis i sur., 2008). Nedavno se pokazalo da navedeni antibiotik dobro djeluje na sojeve MRSA (Fayyaz i sur., 2013). Pokazalo se i da primjena aukubina u prisutnosti β-glukozidaze pozitivno utječe na inhibiciju *S. aureus* (Tundis i sur., 2008). Isti enzim, pod čijim bi utjecajem mogli nastati aglikoni koji posjeduju jako antibakterijsko djelovanje, proizvodi i sam *S. aureus* (Berger, 2017).

Imajući na umu da *S. aureus* najčešće izaziva lokalne kožne infekcije te da je postkirurška kolonizacije rana i opeklina sojem MRSA također česta pojava (Kalenić i sur., 2008), primjena vrste *G. alypum* kod kožnih bolesti, uključujući zacjeljivanje rana, apcesa i opeklina (El Rhaffari i Zaid, 2002; Leporatti i Ghedira, 2009; Saadi i sur., 2013; Eissa i sur., 2014; El Abbouyi i sur., 2014; Messaoudi Moussi i sur., 2015), mogla bi se jednim dijelom objasniti njezinim potencijalnim antistafilokoknim djelovanjem, koje je uočeno u okviru provedenih istraživanja.

4.3.5. Citotoksični učinak

Tumorske bolesti među vodećim su uzrocima smrtnosti svjetskog stanovništva. Njihova pojava u stalnom je porastu uslijed povećanja i starenja stanovništva te je procijenjeno da bi se samo u 2030. godini moglo pojaviti 21,6 milijuna novih tumorskih oboljenja koja će uzrokovati smrt 13 milijuna ljudi (American Cancer Society, 2017). U Republici Hrvatskoj, tumorske su bolesti drugi vodeći uzrok smrti nakon bolesti srca i krvnih žila (Šekerija, 2016). Karakterizirane su nekontroliranim rastom i širenjem abnormalnih stanica, a mogu biti izazvane različitim vanjskim (pušenje, prekomjerna tjelesna težina) i unutarnjim čimbenicima (genske mutacije, hormonalni poremećaji i poremećaji imunološkog sustava) ili njihovim zajedničkim utjecajem (American Cancer Society, 2017).

Karcinom dojke

Karcinom dojke najčešći je rak koji se javlja kod žena (American Cancer Society, 2017). U Republici Hrvatskoj, on je ujedno i vodeći uzrok smrti kod žena oboljelih od raka (Šekerija, 2016). Liječenje najčešće uključuje kirurški zahvat u kombinaciji s radioterapijom, a moguća je i primjena kemoterapije te hormonske i/ili ciljane terapije (American Cancer Society, 2017). Prema molekularnoj klasifikaciji karcinom dojke dijelimo na podtipove koji su pozitivni na hormonske receptore (luminal A i luminal B) i podtipove koji su negativni na estrogenske i progesteronske receptore (HER2, bazalni i klaudin-sniženi). Stanice MDA-MB-231 primjer su invazivnog, klaudin-sniženog (trostruko negativnog) karcinoma dojke, koji je umjereno osjetljiv na kemoterapiju te ga često prati loša prognoza (Holliday i Speirs, 2011).

Glioblastom

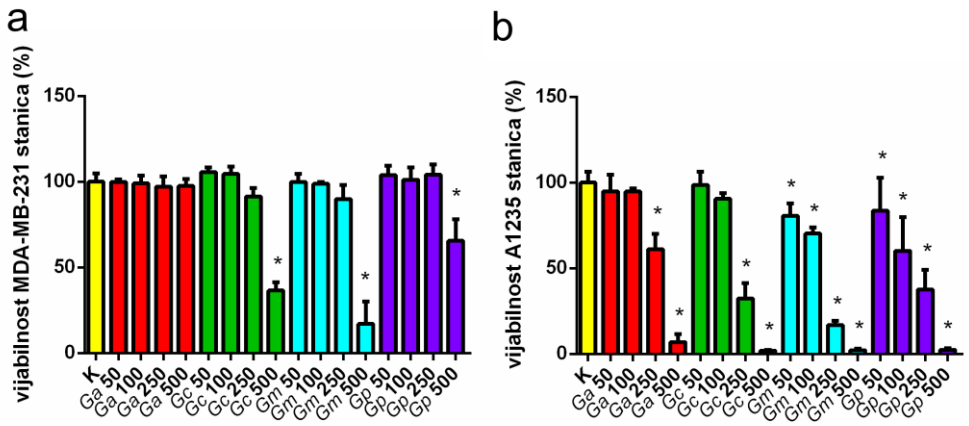
Glioblastom ili multiformni glioblastom (lat. *glioblastoma multiforme*) je tumor iz skupine glioma (tumora glija stanica, točnije astrocita). Najčešći je primarni tumor mozga i jedan je od najagresivnijih tumora središnjeg živčanog sustava. Unatoč liječenju, koje može uključivati kirurški zahvat, radioterapiju i kemoterapiju, prosječno vrijeme preživljavanja nakon dijagnoze je 14 mjeseci, dok je petogodišnje preživljenje samo 10% (Porter, 2012).

Fitoterapija tumorskih bolesti

Više od 3350 biljnih vrsta sadrži aktivne sastavnice s potencijalnim antitumorskim učinkom. Među njih spada i vrsta *G. alypum* (Graham i sur., 2000). U liječenju tumorskih bolesti (npr. raka kože, dojke i kolorektalnog karcinoma) najčešće se koriste listovi, dok među aktivnim sastavnicama prevladavaju fenoli, terpenoidi, glikozidi i drugi (Tariq i sur., 2017).

4.3.5.1. Citotoksični učinak odabranih vrsta roda *Globularia*

Citotoksični učinak metanolnih ekstrakata listova vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene, 2013), *G. cordifolia* (Baške Oštarije, 2012), *G. meridionalis* (Baške Oštarije, 2012) i *G. punctata* (Grobničko polje, 2012) istražen je na dvije vrste ljudskih tumorskih stanica; stanicama karcinoma dojke MDA-MB-231 i stanicama glioblastoma A1235. Vrsta *G. alypum* nije imala citotoksični učinak na stanicama MDA-MB-231, dok su vrste *G. cordifolia, G. meridionalis* i *G. punctata* smanjile njihovu vijabilnost u najvećoj primijenjenoj koncentraciji (500 μg/mL) za 63,41%, 82,96% i 34,48% u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) (Slika 94). Sve četiri vrste djelovale su citotoksično na stanice A1235 (Slika 94). Vrste *G. alypum* i *G. cordifolia* statistički su značajno smanjile vijabilnost navedenih stanica za 38,77% i 67,69% (250 μg/mL), odnosno 93,09% i 98,12% (500 μg/mL). Preostale dvije vrste pokazale su statistički značajno smanjenje vijabilnosti u svim primijenjenim koncentracijama ($P < 0,05$). Smanjenje vijabilnosti uzrokovano ekstraktima vrste *G. meridionalis* iznosilo je između 19,31% (50 μg /mL) i 97,79% (500 μg/mL), a za vrstu *G. punctata* između 16,28% (50 μg/mL) i 97,59% (500 μg/mL). Procijenjene IC_{50} vrijednosti iznosile su 231,43 μg/mL (*G. alypum*), 180,42 μg/mL (*G. cordifolia*), 129,40 μg/mL (*G. meridionalis*) i 140,54 μg/mL (*G. punctata*).



Slika 94. Inhibitorni učinak metanolnih ekstrakata listova vrsta roda *Globularia* (c = 50, 100, 250 i 500 μg/mL) na vijabilnost stanica ljudskog karcinoma dojke MDA-MB-231 (a) i ljudskog glioblastoma A1235 (b) izražen kao srednja vrijednost ± standardna devijacija postotka vijabilnosti stanica (n = 4); K – metanol (negativna kontrola), *Ga – Globularia alypum* (Konavoske stijene, 2013), *Gc – G. cordifolia* (Baške Oštarije, 2012), *Gm – G. meridionalis* (Baške Oštarije, 2012), *Gp – G. punctata* (Grobničko polje, 2012); * – statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu ($P < 0,05$)

Tablica XLIV. Procijenjena* koncentracija ukupnih fenola, flavonoida, kondenziranih trjeslovina i iridoida u metanolnim ekstraktima listova vrsta roda *Globularia* kojima su tretirane stanice MDA-MB-231 i A1235 izražena kao srednja vrijednost (n = 3)

Skupina metabolita	c (μg/mL)	*G. alypum* (Konavoske stijene, 2013)	*G. cordifolia* (Baške Oštarije, 2012)	*G. meridionalis* (Baške Oštarije, 2012)	*G. punctata* (Grobničko polje, 2012)
Fenoli[a]	50	6,57	7,87	7,99	7,64
	100	13,14	15,73	15,98	15,27
	250	32,85	39,33	39,96	38,17
	500	65,70	78,66	79,91	76,35
Flavonoidi[b]	50	1,61	2,11	2,18	3,15
	100	3,23	4,22	4,36	6,30
	250	8,07	10,56	10,89	15,76
	500	16,13	21,12	21,79	31,52
Trjeslovine[c]	50	0,13	0,44	0,44	0,39
	100	0,27	0,88	0,89	0,77
	250	0,67	2,19	2,22	1,93
	500	1,33	4,38	4,44	3,86
Iridoidi[d]	50	0,60	14,54	15,51	22,00
	100	1,21	29,08	31,03	44,00
	250	3,02	72,71	77,56	110,01
	500	6,04	145,41	155,13	220,02

* – procjena vrijednosti temeljila se na prethodno utvrđenom sadržaju sekundarnih metabolita izraženom u odnosu na masu suhog ekstrakta; c – koncentracija ekstrakta; [a] – koncentracija izražena kao μg ekvivalenta galne kiseline/mL ekstrakta, [b] – koncentracija izražena kao μg ekvivalenta kvercetina/mL ekstrakta, [c] – koncentracija izražena kao μg ekvivalenta katehina/mL ekstrakta, [d] – koncentracija izražena kao μg ekvivalenta aukubina/mL ekstrakta

Rezultati su pokazali da su stanice ljudskog karcinoma dojke MDA-MB-231 otpornije na citotoksično djelovanje primijenjenih ekstrakata glavulja od stanica ljudskog glioblastoma A1235. Slično opažanje zabilježeno je i kod istraživanja citotoksičnog učinka vrsta roda *Hypericum* (Madunić i sur., 2016). Smanjenje vijabilnosti kod stanica MDA-MB-231 izazvale su samo vrste *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* što bi moglo upućivati na citotoksično djelovanje spojeva koji su karakteristični za ove vrste, primjerice iridoida aukubinskog, odnosno asperulozidinskog tipa (Tablica XLIV). Istraživanje kemizma pokazalo je da navedene vrste, u usporedbi s vrstom *G. alypum*, sadrže mnogo veću količinu asperulozida, ali i njemu srodne spojeve kao što su deacetilasperulozid i asperulozidinska kiselina, koje vrsta *G. alypum* ne sadrži. Navedeni spojevi prisutni su i u drugim biljnim vrstama koje su pokazale citotoksični učinak na stanicama MDA-MB-231 i drugim tumorskim stanicama. Pri tome je asperulozidinska kiselina značajno smanjila vijabilnost stanica kolorektalnog karcinoma HT-29 (IC_{50} = 6,1 μg/mL) (Mahibalan i sur., 2016). Citotoksični učinak asperulozida nedavno je zabilježen na stanicama ljudskog karcinoma

dojke YMB-1 (IC_{50} = 0,7 μg/mL) i stanicama ljudske promijelocitne leukemije HL-60 (IC_{50} = 11,0 μg/mL) (Artanti i sur., 2015). Također, istraživanja su pokazala da 100 μM otopina asperulozida može smanjiti vijabilnost stanica makrofaga RAW 264.7 na 44,95% (Mahbob i sur., 2014). Jedan od mogućih mehanizama djelovanja asperulozida je inhibicija fosfatidilinozitol 3-kinaza (PI3K) (IC_{50} = 2,0 μM) (Frew i sur., 1994), imajući na umu njihovu ključnu fiziološku ulogu u regulaciji staničnog ciklusa, apoptoze, popravka DNA, angiogeneze, staničnog metabolizma i pokretljivosti stanica preko signalnog puta PI3K/Akt/mTOR, kao i njihovu prekomjernu aktivnost, karakterističnu za trećinu ljudskih tumora (Akinleye i sur., 2013).

Korelacijskom analizom utvrđena je vrlo dobra negativna povezanost između vijabilnosti stanica MDA-MB-231 i koncentracije iridoida (r = -0,75, P < 0,001), ukupnih fenola (r = -0,81, P < 0,001) i flavonoida (r = -0,72, P = 0,002) te izvrsna negativna povezanost između vijabilnosti stanica MDA-MB-231 i koncentracije kondenziranih trjeslovina (r = -0,90, P < 0,001) (Tablica XLV). Citotoksično djelovanje kondenziranih trjeslovina, ovisno o koncentraciji (0,24-24 μM), uočeno je ranije na stanicama ljudskog karcinoma dojke MCF-7 i Hs 578T, karcinoma kolona Caco-2 i karcinoma prostate DU 145 bez istovremenog citotoksičnog djelovanja na normalne ljudske fibroblaste pluća HEL 299 (Bawadi i sur., 2005). Slično djelovanje primijećeno je i na stanicama MCF-7 (IC_{50} = 38,33 μg/mL), uz smanjenu toksičnost na netumorske stanice embrionalnih fibroblasta švicarskih miševa 3T3 F442A (IC_{50} = 88,00 μg/mL) (Zarin i sur., 2016).

Na vijabilnost stanica MDA-MB-231 djeluju i fenolne sastavnice plodova masline, od kojih je verbaskozid (Ramos i sur., 2013) ujedno i jedan od glavnih fenolnih spojeva istraživanih vrsta glavulja. Istraživanje citotoksične aktivnosti vrste *Callicarpa nudiflora* Hook. & Arn. na stanicama ljudskog karcinoma vrata maternice HeLa, adenokarcinoma pluća A549 i karcinoma dojke MCF-7 dovelo je do izolacije nekoliko flavonoida, feniletanoida i iridoida (Ma i sur., 2014), od kojih su 6-hidroksiluteolin 7-*O*-glukozid, verbaskozid i katalpol sastavnice nađene i u istraživanim vrstama roda *Globularia*. Pri tome je povišena citotoksična aktivnost zabilježena kod 6-hidroksiluteolin 7-*O*-glukozida (Ma i sur., 2014), koji je bio prisutan u ekstraktima listova sve četiri istraživane vrste. Izraženo citotoksično djelovanje na različite stanične linije ljudskog karcinoma dojke, uključujući stanice MDA-MB-231, pokazali su i njemu srodni flavonoidi, apigenin (IC_{50} = 14 μM) i luteolin (IC_{50} = 16 μM). Ono bi moglo biti povezano s njihovim toksičnim djelovanjem na mitohondrije, zaustavljanjem staničnog ciklusa u fazi G_2 i s poticanjem apoptoze (Yadegarynia i sur., 2014).

Isti flavonoidi mogu smanjiti vijabilnost stanica ljudskog glioblastoma (Tsai i sur., 2013; Stump i sur., 2017). Korelacijskom analizom utvrđena je izvrsna negativna povezanost između vijabilnosti stanica ljudskog glioblastoma A1235 i koncentracije ukupnih fenola (r = -0,95, P < 0,001), flavonoida (r = -0,90, P < 0,001) i kondenziranih trjeslovina (r = -0,87, P < 0,001), kao i vrlo dobra negativna povezanost između vijabilnosti stanica ljudskog glioblastoma A1235 i koncentracije iridoida (r = -0,74, P < 0,001) (Tablica XLV).

Tablica XLV. Povezanost između koncentracije sekundarnih metabolita i vrijednosti istraženih parametara za procjenu citotoksičnog učinka odabranih vrsta roda *Globularia* (n = 16)

Istraženi parametri	Ukupni fenoli	Flavonoidi	Kondenzirane trjeslovine	Iridoidi
Vijabilnost stanica MDA-MB-231	-0,81***	-0,72**	-0,90***	-0,75***
Vijabilnost stanica A1235	-0,95***	-0,90***	-0,87***	-0,74***

** – statistički značajna povezanost između parametara (P < 0,01); *** – statistički značajna povezanost između parametara (P < 0,001)

Dominantni fenolni spojevi u metanolnim ekstraktima listova istraživanih vrsta bili su brojni feniletanoidi koji u svojoj strukturi imaju prisutnu dihidroksifeniletilnu skupinu, koja je važna za citotoksično djelovanje (Fu i sur., 2008). Pri tome su verbaskozid, izoverbaskozid, rozikazid A, leukoskeptozid A i globusintenozid izomer nađeni u sve četiri vrste. U ekstraktima koji su pokazali jači citotoksični učinak bili su prisutni i dodatni feniletanoidi, primjerice metoksiverbaskozid i izomer benzoilrozikazida A (*G. cordifolia, G. meridionalis*) te trihosantozid A i trihosantozid B (*G. punctata*). Verbaskozid, kao dominantni spoj prisutan u ekstraktima sve četiri vrste, mogao bi biti djelomično zaslužan za opaženi citotoksični učinak navedenih ekstrakata na stanice MDA-MB-231 i A1235. Dosad je zabilježeno njegovo citotoksično djelovanje na stanice ljudskog karcinoma dojke MCF-7 (IC_{50} = 7,7 μg/mL), uz istovremeni slabi učinak na zdrave stanice bubrega afričkog zelenog majmuna Vero (IC_{50} = 249,7 μg/mL) (Vinayagam i Sudha, 2014). Citotoksični učinak verbaskozida zabilježen je i na stanicama mišjeg melanoma B16 (IC_{50} = 200 μM) (Ohno i sur., 2002), stanicama hepatoma štakora dRLh-84 (IC_{50} = 61,98 μg/mL), stanicama mišje limfoidne neoplazme S-180 (IC_{50} = 29,6 μg/mL) i stanicama sarkoma štakora P-388 (IC_{50} = 221,0 μg/mL), bez istovremenog učinka na zdrave hepatocite štakora, kao i na stanicama ljudskog karcinoma vrata maternice HeLa (IC_{50} = 7,8 μg/mL) (Saracoglu i sur.,

1995). Tretman verbaskozidom smanjio je i vijabilnost stanica kolorektalnog karcinoma HCT-116 (IC_{50} = 63,51 μM), HT-29 (IC_{50} = 66,68 μM), LoVo (IC_{50} = 43,96 μM) i SW-620 (IC_{50} = 29,05 μM) (Zhou i sur., 2014).

Zabilježeno je i citotoksično djelovanje verbaskozida na stanice Lewisovog mišjeg karcinoma pluća 3LL (IC_{50} = 62,5 μM), ljudskog histocitnog limfoma U-937 (IC_{50} = 42,5 μM), ljudske promijelocitne leukemije HL-60 (IC_{50} = 38,3 μM), ljudskog karcinoma kolona SNU-C5 (IC_{50} = 73,6 μM) i ljudskog karcinoma jetre Hep G2 (IC_{50} = 53,1 μM). Izoverbaskozid i leukoskeptozid pokazali su nešto slabije citotoksično djelovanje na prethodno navedene stanice. Kalceolariozid A i kalceolariozid B, spojevi karakteristični za vrstu *G. alypum,* pokazali su slabije djelovanje samo na stanice HL-60 (IC_{50} = 91,2 μM; IC_{50} = 109,3 μM) i U-937 (IC_{50} = 105,4 μM; IC_{50} = 120,1 μM) (Lee i sur., 2007b). Usporedba djelovanja različitih feniletanoida ukazala je na to da bi za citotoksični učinak ovih spojeva mogla biti važna prisutnost kavene kiseline, mjesto njezinog vezanja na glukozi te prisutnost ramnoze (Saracoglu i sur., 1995; Lee i sur., 2007b). Ekstrakt listova vrste *G. alypum* bio je bogat feniletanoidima koji nemaju ramnozu u svojoj strukturi (kalceolariozid A, kalceolariozid B, 6'-*O*-feruloil-1'-*O*-hidroksitirozil glukozid, desramnozil 6'-*O*-kafeoilverbaskozid, desramnozil galipumozid B), što bi moglo objasniti njegov slabiji citotoksični učinak u usporedbi s vrstama *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata*, koje ne sadrže ovakve feniletanoide.

Jedan od mogućih mehanizama citotoksičnog djelovanja verbaskozida je aktivacija signalnog puta HIPK2 (engl. *homeodomain-interacting protein kinase* 2)-p53, koja vodi do povećanja ekspresije pro-apoptotskih proteina HIPK2, p53 i Bax te smanjenja ekspresije anti-apoptotskog proteina Bcl-2 (Zhou i sur., 2014). Poticanje apoptoze moglo bi biti i posljedica inhibicije telomerazne aktivnosti, koja je zabilježena kod stanica ljudskog karcinoma želuca MKN45 (Zhang i sur., 2002). Istraživanje na stanicama HL-60 pokazalo je da verbaskozid može zaustaviti stanični ciklus u fazi G_1 smanjenjem aktivnosti kinaza povezanih s CDK-4 i CDK-6, odnosno indukcijom ekspresije proteina $p21^{CIP1/WAF1}$ i $p27^{KIP1}$, kao i indukcijom stanične diferencijacije putem povećane signalizacije TGF-β1 (Lee i sur., 2007b). Nedavno se pokazalo da bi verbaskozid mogao posjedovati i antiangiogeno djelovanje, važno za liječenje tumorskih bolesti, kao i bolesti oka poput makularne degeneracije i dijabetičke retinopatije (Seo i sur., 2013).

4.3.6. Ostali biološki učinci i toksičnost

Razmatranja s obzirom na utvrđeni kemijski sastav i utvrđene biološke učinke

Vrsta *G. alypum* često se primjenjuje u laksativne i/ili purgativne svrhe (Bellakhdar i sur., 1991; Fresquet Febrer, 1996; Jaradat, 2005; Awen i sur., 2010; Benderradji i sur., 2014). Navedeno djelovanje najčešće se pripisivalo iridoidima, točnije razgradnom produktu globularina, globularetinu (Merck, 1921). Laksativno djelovanje iridoida slabije je od djelovanja senozida (Planchon, 1859), a pojačava ga metilacija karboksilne skupine na položaju *C*-4 (npr. genipozid i dafilozid), dok hidroksilacija na položaju *C*-6 dovodi do odgođenog djelovanja (npr. aukubin, katalpol i asperulozid) (Inouye i sur., 1974). U ovom se istraživanju pokazalo da vrsta *G. alypum*, kao i ostale istraživane vrste, kojima se ranije također pripisivao laksativni učinak (Dragendorff, 1898), osim navedenih iridoida sadrže i visok udio manitola, koji djeluje kao osmotski laksativ (Kumar i Kishore, 2013). Isti spoj mogao bi biti i jedna od sastavnica koja doprinosi diuretskom učinku vrste *G. alypum* (Leporatti i Ghedira, 2009; Benderradji i sur., 2014; El-Mokasabi, 2014a) i njoj srodnih vrsta (Eissa i sur., 2014; Johnson, 1999; Vasisht i Kumar, 2004).

Uzevši u obzir da verbaskozid nije samo dominantni spoj kod istraživanih vrsta roda *Globularia*, već i kod drugih vrsta, poput vrste *Verbena officinalis* L., koja posjeduje anksiolitički, antikonvulzivni i sedativni učinak (Khan i sur., 2016), isti spoj mogao bi biti povezan i sa zabilježenom, iako rijetkom primjenom vrste *G. alypum* kod anksioznosti (Khabbach i sur., 2012; Boukhira i sur., 2013) i nervoze (Chermat i Gharzouli, 2015) te vrste *G. arabica* kod epilepsije i nesanice (Eissa i sur., 2014).

S obzirom na važnost prostaglandina za ovulaciju i implantaciju zametka (Rouzer i Marnett, 2009), moguće je pretpostaviti povezanost primijećene reproduktivne toksičnosti vrsta roda *Globularia* u ženskih štakora (Elbetieha i sur., 2000) s inhibicijom COX-II. Istraživanja na trudnicama pokazala su da primjena nesteroidnih protuupalnih lijekova i acetilsalicilne kiseline u trudnoći mogu značajno povećati rizik od pobačaja, posebno ako se oni primjenjuju oko vremena začeća i/ili kroz duži period. Navedeni rizik povezuje se sa smanjenom biosintezom prostaglandina potrebnih za implantaciju zametka (Li i sur., 2003). Ovakvo djelovanje moglo bi objasniti zašto se u libijskoj narodnoj medicini vrsta *G. alypum*, osim u brojnim upalnim stanjima (ekcem, psorijaza, dermatitis, gastritis, vaginitis, metritis), primjenjuje i kao abortivno sredstvo (El-Mokasabi, 2014a). S druge strane, istraživanja na štakorima pokazala su da vrsta *G. alypum* posjeduje i androgeno te laksativno djelovanje (Fehri i sur., 2012) pa nije isključeno da i ova djelovanja pridonose njezinom abortivnom učinku.

5. ZAKLJUČCI

U okviru ovog doktorskog rada po prvi je put provedeno opsežno usporedno istraživanje botaničkih obilježja, fitokemijskog profila i bioloških učinaka četiri vrste roda *Globularia*: *G. alypum, G. cordifolia, G. meridionalis* i *G. punctata*, koje je uključivalo uzorke većeg broja populacija istraživanih vrsta sabrane u vrijeme cvatnje kroz više različitih sezona. Na temelju provedenih ispitivanja, dobivenih rezultata i rasprave moguće je donijeti sljedeće zaključke:

BOTANIČKA OBILJEŽJA

1. Populacija vrste *G. alypum* s područja Konavoskih stijena, jedina zabilježena populacija ove vrste u Hrvatskoj, a ujedno i najjužnija i najistočnija te najniže položena istraživana populacija vrsta roda *Globularia,* cvala je već u ožujku, što je ranije od ostalih vrsta koje su bile uključene u ovo istraživanje. Najsjeverniju i najzapadniju populaciju istraživanih vrsta činile su populacije vrste *G. punctata,* najbolje rasprostranjene predstavnice roda *Globularia* na području Hrvatske, čiji se areal na području Jadranske Hrvatske preklapa s arealima vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*. Navedene dvije vrste rasle su na nešto većim nadmorskim visinama od vrste *G. punctata,* dok je na najširem rasponu nadmorskih visina zabilježena vrsta *G. cordifolia*. Period cvatnje preostalih triju vrsta kretao se između travnja i lipnja, pri čemu su populacije smještene na manjim nadmorskim visinama cvale ranije.
2. Sve četiri istraživane vrste rasle su na pretežito suhim i sunčanim terenima. Pri tome je, iznimno, vrsta *G. alypum* rasla u blizini morske obale, a mostarska populacija vrste *G. cordifolia* neposredno uz rijeku Neretvu (rastom najmanja populacija). Vrsta *G. alypum* rasla je na kamenitom terenu. Tereni na kojima je rasla vrsta *G. cordifolia* bili su u pravilu kamenitiji od onih na kojima je primijećen rast vrste *G. meridionalis* (iznimka: populacija s područja Učke, rastom najveća). Vrsta *G. punctata* rasla je uglavnom na travnatim terenima (iznimka: populacija s područja Slapnice), pri čemu je vegetacija bila posebno bujna kod populacije s područja Vižintina (rastom najveća).
3. Vrsta *G. alypum* najveća je od svih istraživanih vrsta te ima najveće i najmirisnije cvatne glavice smještene na vrhu potpuno odrvenjele stabljike prekrivene sjedećim listovima. Vrste *G. cordifolia* i *G. meridionalis* imaju djelomično odrvenjele puzajuće stabljike s listovima smještenim u rozeti i pokojim sjedećim listićem na zelenim stabljikama koje nose cvatne glavice. Vrsta *G. punctata* odrvenjela je samo pri bazi te ima najmanje cvatne glavice. Veličinom se nalazi između prethodno navedenih vrsta te sadrži oba tipa za njih karakterističnih listova (sjedeće listove i listove u rozeti).

4. Sjedeći listovi vrsta *G. alypum* i *G. punctata* imaju najčešće lagano ušiljeni vrh, dok su listovi u rozeti istraživanih vrsta zaobljenog, nazubljenog ili usječenog, odnosno ušiljenog vrha te često mogu biti istovremeno prisutni kod iste jedinke. Imajući na umu da veličina vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* može varirati s obzirom na nadmorsku visinu i druge okolišne čimbenike, kao temeljno svojstvo raspoznavanja vrste *G. cordifolia* služila je prisutnost zubića ili usjeka na manjem ili većem broju listova pojedine jedinke. Kod vrste *G. meridionalis* oni su bili samo iznimno prisutni. Listovi sve četiri vrste bili su glatki, dok su na lapovima i ovojnim listovima cvata uočene dlake, koje su bile posebno dugačke kod vrste *G. alypum*. Također, utvrđeno je da su latice vrste *G. punctata* kovrčave i uže te jače usječene od latica ostalih vrsta, dok su njezini lapovi širi od onih vrste *G. alypum*, a uži od lapova vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*. U građi ovojnih listova cvata, čaške ili vjenčića nisu uočene karakteristike koje bi jednoznačno ukazivale na vrstu *G. cordifolia* ili *G. meridionalis*.
5. Prisutnost žlijezda, građenih od dvostanične glavice sa smeđim sekretom i jednostaničnog drška, u epidermi listova i mladih stabljika karakteristična je za sve istraživane vrste. Također, u epidermskim i/ili parenhimskim stanicama listova, cvjetova, stabljika i korijena sve četiri vrste prisutne su masne kapljice, koje mogu biti žućkasto, a kod vrsta *G. cordifolia, G. meridionalis* te *G. punctata* i plavičasto obojene. One se boje crvenkasto sa Sudanom III, dok s kalijevim hidroksidom i vanilinom poprimaju, kao i vakuole pojedinih stanica, sivoplavo i crvenosmeđe obojenje te bi se mogle pripisati njihovim glavnim sekundarnim metabolitima, iridoidima i fenolnim spojevima. Kod posljednje tri vrste, a posebno kod mostarske populacije vrste *G. cordifolia*, primijećena je i prisutnost smeđeg sekreta u nekim epidermskim stanicama listova. Ona bi mogla biti rezultat hidrolize i posljedične polimerizacije asperulozida, jednog od njihovih glavnih metabolita, a čiji je udio bio značajno snižen upravo kod mostarske populacije, i/ili povećane sinteze kondenziranih trjeslovina u uvjetima relativno veće vlažnosti, imajući na umu da su stabljike vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis,* u čijim je parenhimskim stanicama također uočen smeđi sekret, bile posebno bogate ovom skupinom spojeva.
6. Histološko-anatomske značajke listova, mladih i drvenastih stabljika te korijena utvrđene svjetlosnom mikroskopijom nisu ukazale na značajne razlike u građi vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis,* dok je na temelju histološko-anatomskih značajki listova utvrđenih svjetlosnom i okolišnom skenirajućom elektronskom mikroskopijom primijećena njihova veća sličnost s vrstom *G. punctata*, nego s vrstom G. *alypum*.

7. Protočnom citometrijom nakon bojanja jezgara fluorescentnom bojom DAPI utvrđeno je da su sve istraživane jedinke vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* tetraploidne, dok su sve jedinke vrste *G. punctata* bile diploidne. Isto je potvrđeno protočnom citometrijom nakon bojanja jezgara etidijevim bromidom, odnosno fluorescentnom mikroskopijom nakon bojanja bojom DAPI, kojom je utvrđeno da tjelesne stanice vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* sadrže 2*n* = 32 kromosoma, a vrste *G. punctata* 2*n* = 16 kromosoma. Prema autoru koji je vrstu *G. meridionalis* izdvojio kao posebnu vrstu (Schwarz, 1938), njezine bi populacije u pravilu trebale biti diploidne, dok je tetraploidnost značajka vrste *G. cordifolia* (Schwarz, 1963).
8. Prosječna veličina genoma (2C-vrijednost) iznosila je 1,45 ± 0,02 pg za vrstu *G. cordifolia*, 1,49 ± 0,01 pg za vrstu *G. meridionalis* te 0,84 ± 0,01 pg za vrstu *G. punctata*. Manje prosječne 2C-vrijednosti utvrđene za vrstu *G. cordifolia* u usporedbi s vrstom *G. meridionalis* mogle bi biti posljedica interferencije s fenolnim spojevima i trjeslovinama čiji sadržaj je bio povišen kod istraženih populacija ove vrste (Šestanovac, Mostar). Najveća 2C-vrijednost utvrđena je za populaciju vrste *G. meridionalis* s područja Učke, koja je bila najsiromašnija navedenim spojevima.
9. Analizom sljedova dušičnih baza jezgrinog ITS područja metodom maksimalne parsimonije utvrđeno je izdvajanje vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* uz 99% podržanosti te njihovo grupiranje s vrstom *G. punctata* uz 84% podržanosti, dok je analizom sljedova dušičnih baza kloroplastnih područja *rbc*L i *trn*L-*trn*F utvrđeno izdvajanje vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* uz 100% podržanosti te grupiranje s vrstom *G. punctata* uz 94% podržanosti. U drugom se slučaju sa svim navedenim vrstama grupirala i vrsta *G. alypum* uz 100% podržanosti.
10. Kod uzoraka vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* uključenih u ovo istraživanje nisu uočene karakteristične ekološke, morfološke, histološko-anatomske, citološke ili molekularne značajke koje bi podupirale predloženo razdvajanje na vrste (Schwarz, 1938). Ovo je u skladu s opažanjima Ravnika (1965) i Milletti (1987). Usporedba histološko-anatomskih i molekularnih značajki ukazuje na veću sličnost navedenih vrsta iz sekcije *Empetron* (podrod *Abolaria*) s vrstom *G. punctata* iz sekcije *Globularia* (podrod *Globularia*), nego s vrstom *G. alypum* iz sekcije *Alypum* (podrod *Abolaria*), što također nije u skladu s ranije predloženom podjelom (Schwarz, 1938), a odgovara opažanjima Holländera i Jägera (1994). Vrsta *G. punctata* prema nekim se ekološkim (npr. nadmorska visina i period cvatnje) i morfološkim značajkama (npr. veličina biljke i tip listova) nalazi između spomenutih vrsta iz drugih dviju sekcija.

FITOKEMIJSKI PROFIL

1. Preliminarna fitokemijska istraživanja ukazala su na to da su zeleni nadzemni dijelovi istraživanih vrsta bogati fenolnim spojevima, flavonoidima i iridoidima te kondenziranim trjeslovinama i triterpenima, kao i na moguću prisutnost male količine antocijana i saponina. Fenolnim spojevima bili su bogati i drvenasti dijelovi te korijen vrste *G. punctata*. Na temelju usporedbe prosječnog sadržaja ukupnih fenola, flavonoida, kondenziranih trjeslovina i iridoida u različitim biljnim dijelovima (list, cvijet, stabljika, drvenasta stabljika i korijen) nisu uočene značajne razlike između vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*. Iznimno, mostarska populacija vrste *G. cordifolia* istaknula se povišenim sadržajem kondenziranih trjeslovina u svim biljnim dijelovima, a posebno u stabljikama.
2. Listovi istraživanih vrsta bili su bogati svim određivanim sekundarnim metabolitima. Pokazalo se da bi sadržaj ukupnih fenola mogao biti povezan s prosječnim mjesečnim temperaturama zraka na lokacijama s kojih su sakupljeni istraživani uzorci (r = 0,63, P = 0,016), a na temelju višegodišnjeg praćenja istraživanih vrsta utvrđene su njegove prosječne vrijednosti: 36,35 ± 5,32 mg EGK/g SM za vrstu *G. alypum*, 24,63 ± 5,99 mg EGK/g SM za vrstu *G. cordifolia*, 24,46 ± 7,18 mg EGK/g SM za vrstu *G. meridionalis* i 25,59 ± 6,20 mg EGK/g SM za vrstu *G. punctata*. Prosječni sadržaj flavonoida u istim uzorcima iznosio je 7,41 ± 1,87 mg EKV/g SM za vrstu *G. alypum*, 6,26 ± 2,11 mg EKV/g SM za vrstu *G. cordifolia*, 6,26 ± 2,80 mg EKV/g SM za vrstu *G. meridionalis* i 9,79 ± 4,68 mg EKV/g SM za vrstu *G. punctata*.
3. Detaljnom analizom fitokemijskog sastava metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova vrsta *G. alypum* (Konavoske stijene), *G. cordifolia* (Alan), *G. meridionalis* (Grobničko polje) i *G. punctata* (Grobničko polje) dobivenih dekokcijom, koja je provedena pomoću sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnutog s fotodiodnom detekcijom i tandemskom masenom spektrometrijom (LC-PDA-ESI-MS^n) pri negativnom načinu rada, identificirano je 85 sastavnica, među kojima su prevladavali iridoidi (32), feniletanoidi (21) i flavonoidi (18) te su utvrđeni karakteristični spojevi za pojedine vrste. Ovime je, između ostalog, razjašnjen prethodno utvrđen povišeni udio fenolnih spojeva kod vrste *G. alypum* (prisutnost 6-*O*-estera katalpola s različitim fenolnim kiselinama te feniletanoida kalceolariozida A, galipumozida B i drugih), odnosno flavonoida kod vrste *G. punctata* (prisutnost aciliranih derivata 6-hidroksiluteolin 7-*O*-soforozida).

Identifikacija manjeg broja sastavnica provedena je na temelju usporedbe kromatografskih i spektralnih podataka s podacima 29 standardnih tvari, dok se identifikacija ostalih sastavnica temeljila na usporedbi njihovih vremena zadržavanja, UV i masenih spektara te načina MS/MS fragmentacije s literaturnim podacima i utvrđenim značajkama MS^1 i MS/MS fragmentacija drugih identificiranih spojeva.

4. Macerat nadzemnih dijelova vrste *G. alypum* sadržavao je više fenolnih spojeva (primjerice verminozida, kalceolariozida A, 6′-*O*-feruloil-1′-*O*-hidroksitirozil glukozida i drugih) u usporedbi s dekoktom i ultrazvučnim ekstraktom, dok su kod preostale tri vrste dekokti bili najbogatiji fenolima. U usporedbi s maceratima, dekokti sve četiri vrste sadržavali su više njihovih dominantnih spojeva; feniletanoida verbaskozida, rozikazida A (sve vrste), trihosantozida A i B (*G. punctata*), odnosno iridoida globularina (*G. alypum*, *G. punctata*), globularifolina (*G. cordifolia*, *G. meridionalis*), asperulozida i besperulozida (*G. punctata*). Dekokti sve četiri vrste sadržavali su i najveću količinu flavonoida. S druge strane, macerati su sadržavali više iridoida genipozida, globularinina, globulariozida i globulozida A, liriodendrina (*G. alypum*), alpinozida, izomera globusintenozida i oksidacijskih produkata masnih kiselina (sve vrste), izomera benzoilrozikazida A (*G. cordifolia*, *G. meridionalis*) i apigenina (*G. punctata*). U usporedbi s dekoktima, Soxhlet ekstrakti sadržavali su još veću količinu glavnih biološki aktivnih sastavnica poput globularina, globularifolina i verbaskozida. Sadržaj ukupnih fenola u Soxhlet ekstraktima iznosio je 112,34 ± 2,17 mg EGK/g SE kod vrste *G. alypum*, 95,59 ± 1,62 mg EGK/g SE kod vrste *G. cordifolia*, 98,90 ± 3,93 mg EGK/g SE kod vrste *G. meridionalis* i 79,92 ± 2,18 mg EGK/g SE kod vrste *G. punctata* te je utvrđen sljedeći sadržaj flavonoida: 26,85 ± 0,46 mg EKV/g SE kod vrste *G. alypum*, 26,19 ± 0,40 mg EKV/g SE kod vrste *G. cordifolia*, 25,42 ± 0,24 mg EKV/g SE kod vrste *G. meridionalis* i 43,25 ± 0,31 mg EKV/g SE kod vrste *G. punctata*.
5. Usporedba fitokemijskog profila različitih populacija vrsta *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* provedena je analizom macerata njihovih nadzemnih dijelova pomoću LC-PDA-ESI-MS^n tehnike.
    a. Mostarska populacija vrste *G. cordifolia* bila je izrazito bogata globularifolinom i izoverbaskozidom i jedina je sadržavala 10-*O*-cinamoilmonomelitozid, melampirozid (10-*O*-benzoilaukubin) i 10-*O*-cinamoilaukubin (litantosalin) te je u usporedbi s ostalim istraživanim populacijama sadržavala značajno manje asperulozida. Populacije s područja

Biokova i Šestanovca istaknule su se povišenim udjelom asperulozida i besperulozida, dok su one s područja Alana i Baških Oštarija sadržavale više 6'-*O*-benzoilmonomelitozida, 6'-*O*-benzoildeacetilasperulozidinske kiseline i njezinog glukozida te izomera benzoilrozikazida A.

b. Sve populacije vrste *G. meridionalis* sadržavale su visoku količinu globularifolina (posebno Grobničko polje i Učka), asperulozida (posebno Učka i Dinara), 6'-*O*-benzoilmonomelitozida (posebno Učka), verbaskozida (posebno Dinara) i izoverbaskozida. Populacija s područja Grobničkog polja sadržavala je najviše monomelitozida, izomera globusintenozida i rozikazida A, a populacija s područja Baških Oštarija najviše 6'-*O*-benzoildeacetilasperulozidinske kiseline, izomera benzoilrozikazida A i apigenina. Populacija s područja Učke sadržavala je najviše nepolarnih spojeva, a bila je najsiromašnija verbaskozidom i apigeninom.

c. U usporedbi s drugim populacijama vrste *G. punctata*, populacija s područja Slapnice sadržavala je više globularina, 10-*O*-*p*-kumaroildeacetilasperulozida, rozikazida A i trihosantozida A, a manje asperulozida, besperulozida, verbaskozida i 6-hidroksiluteolin 7-*O*-(6'''-*O*-kafeoil)-soforozida, populacije s područja Grobničkog polja, Vižintina i Dinare sadržavale su najviše asperulozida i 6-hidroksiluteolin 7-*O*-(6'''-*O*-kafeoil)-soforozida, dok je dinarska populacija sadržavala najmanje globularina.

6. Hijerarhijskom klaster analizom sastavnica metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova utvrđeno je razdvajanje uzoraka vrsta *G. alypum* i *G. punctata* od uzoraka vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*, a unutar kojih su se dalje izdvojile vrsta *G. alypum*, odnosno mostarska populacija vrste *G. cordifolia*. Populacija s područja Slapnice izdvojila se unutar svoje podskupine od ostalih populacija vrste *G. punctata*, dok su se unutar podskupine koju su činili preostali uzorci vrste *G. cordifolia* i uzorci vrste *G. meridionalis* izdvojili uzorci vrste *G. meridionalis* s područja Grobničkog polja i Dinare. Daljnja podjela uključivala je izdvajanje uzorka vrste *G. meridionalis* s područja Učke od skupine koju su činili međusobno razdvojeni uzorci vrste *G. cordifolia* s biokovskog (Biokovo i Šestanovac) i velebitskog područja (Alan i Baške Oštarije) te uzorak *G. meridionalis* s velebitskog područja (Baške Oštarije).
7. Razlike u kemijskom sastavu između vrsta *G. alypum, G. cordifolia*/*G. meridionalis* i *G. punctata*, ali i posebnosti pojedinih populacija navedenih vrsta, moguće je uočiti i brzim i jednostavnim tehnikama, primjerice detekcijom zona karakterističnih boja i/ili

R_f vrijednosti sastavnica ekstrakata razdvojenih tankoslojnom kromatografijom ili određivanjem sadržaja sekundarnih metabolita UV/Vis spektrofotometrijom. Posebnosti fitokemijskog sastava mogle bi biti posljedica specifičnih okolišnih uvjeta kojima su na svojim prirodnim staništima izložene pojedine populacije, primjerice *G. cordifolia* s područja Mostara, *G. meridionalis* s područja Učke i *G. punctata* s područja Slapnice.

8. Nadzemni dijelovi istraživanih vrsta sadržavali su malu količinu eteričnog ulja, pri čemu su kod vrste *G. alypum* te mostarske populacije vrste *G. cordifolia* prevladavali oksigenirani spojevi, točnije masne kiseline (71,4%) kod prve, posebno palmitinska kiselina (57,3%), odnosno alifatski alkoholi (60,5%) kod druge vrste, posebno okt-1-en-3-ol (47,0%). Kod ostalih istraživanih vrsta prevladavali su terpeni, točnije oksigenirani seskviterpeni (24,2-58,2%). Uz palmitinsku kiselinu, glavne lakohlapljive sastavnice vrste *G. alypum* bile su linolna kiselina (13,2%), heneikozan (6,3%), α-kadinol (5,9%), metil heksanoat (3,0%), etil heksanoat (3,0%), oktadekan (1,2%), heksahidrofarnezil aceton (1,1%) i (*E*,*E*)-farnezil aceton (1,0%), dok su kod ostalih istraživanih vrsta uz okt-1-en-3-ol (2,9-47,0%) prevladavali 6-(1,5-dimetilheks-4-enil)-3-metilcikloheks-2-enon (8,2-10,9%) i fukinanolid (7,4-31,6%).
9. Hijerarhijskom klaster analizom lakohlapljivih sastavnica utvrđeno je razdvajanje vrste *G. alypum* od ostalih istraživanih vrsta, među kojima se posebno izdvojila mostarska populacija vrste *G. cordifolia*. Preostali uzorci grupirani su u dvije podskupine, od kojih su jednu činili uzorci vrste *G. meridionalis* (Baške Oštarije, Grobničko polje) grupirani s vrstom *G. cordifolia* (Baške Oštarije), a drugu uzorci vrste *G. punctata* (Grobničko polje, Vižintini).
10. Kod uzoraka vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* uključenih u ovo istraživanje nisu uočene kemijske značajke koje bi podupirale predloženo razdvajanje na vrste (Schwarz, 1938). Preklapanja u njihovom kemijskom sastavu zabilježena su i ranije (Milletti, 1987; Tundis i sur., 2012b). Iznimno, karakterističnim sastavom i sadržajem hlapljivih i nehlapljivih spojeva istaknula se mostarska populacija vrste *G. cordifolia*. Usporedba fitokemijskog profila navedenih dviju vrsta ukazuje na veću sličnost s vrstom *G. punctata*, nego s vrstom *G. alypum*. Osim što vrsta *G. punctata* dijeli pojedine glavne sastavnice s vrstama *G. cordifolia* i *G. meridionalis* (npr. asperulozid i njegovi derivati), ona ih također dijeli i s vrstom *G. alypum* (npr. globularin i njegovi derivati te 6-hidroksiluteolin 7-*O*-soforozid) što ukazuje na to da se na fitokemijskoj razini navedena vrsta nalazi između spomenutih vrsta iz drugih dviju sekcija.

BIOLOŠKI UČINCI

1. Ultrazvučni ekstrakti listova sve četiri istraživane vrste statistički značajno su smanjili aktivnost α-glukozidaze ($P < 0,05$) u koncentracijama 0,5 i 1,0 mg/mL, pri čemu su akarbozi najsličniju inhibiciju enzima (48,8-57,6%) pokazali uzorci vrste *G. alypum* (30,0-45,7%), koji su bili najbogatiji fenolnim spojevima. Navedeni enzim slabije su inhibirali uzorci vrsta *G. cordifolia* (14,8-17,1%), *G. meridionalis* (27,8-27,3%) i *G. punctata* (14,7-18,0%). Neki od spojeva koji bi mogli pridonositi navedenom učinku uključuju glikozide flavonoida 6-hidroksiluteolina, luteolina i apigenina, odnosno feniletanoide verbaskozid, izoverbaskozid, leukoskeptozid A i druge.
2. Zaštitni učinak od oksidativnih oštećenja kao mogućih posljedica hiperglikemije zabilježen je kao povećanje sadržaja slobodnih tiolnih skupina i GSH, odnosno povećanje aktivnosti GPx i GST u stanicama Hep G2 za ekstrakte listova svih istraživanih vrsta, a posebno za ekstrakt vrste *G. cordifolia*, koji je bio najbogatiji kondenziranim trjeslovinama. Korelacijskom analizom utvrđena je vrlo dobra pozitivna povezanost između aktivnosti GPx i koncentracije kondenziranih trjeslovina ($r = 0,79$, $P = 0,021$) te izvrsna pozitivna povezanost između aktivnosti GST i koncentracije kondenziranih trjeslovina ($r = 0,94$, $P < 0,001$), odnosno vrlo dobra pozitivna povezanost između aktivnosti GST i koncentracije iridoida aukubinskog i asperulozidinskog tipa ($r = 0,73$, $P = 0,042$).
3. Svi istraživani uzorci povećali su u koncentracijama 0,5 mg/mL i 1,0 mg/mL vijabilnost stanica Hep G2 u hiperglikemijskim uvjetima u LDH testu ($P < 0,05$), što bi moglo biti rezultat izravnog antioksidativnog učinka flavonoida ($r = 0,88$, $P = 0,004$) i fenolnih spojeva ($r = 0,75$, $P = 0,031$), dok je vijabilnost stanica u MTT testu bila statistički značajno povećana samo kod uzoraka vrsta *G. cordifolia* i *G. punctata*, koji su bili bogatiji iridoidima, odnosno kondenziranim trjeslovinama i flavonoidima.
4. Usporedba ultrazvučnih ekstrakata različitih biljnih dijelova pokazala je da listovi i cvjetovi vrste *G. alypum* posjeduju veći antioksidativni učinak od njezinih stabljika ($P < 0,05$), kao i veći antioksidativni učinak od istih organa ostalih istraživanih vrsta u DPPH testu, odnosno od njihovih cvjetova u ABTS testu, a pri čemu je uočena vrlo dobra pozitivna povezanost sa sadržajem ukupnih fenola ($r = 0,67$, $P < 0,001$, DPPH test; $r = 0,77$, $P < 0,001$, ABTS test). Veće vrijednosti dobivene u DPPH testu mogle bi biti posljedica povišenog sadržaja diaciliranih feniletanoida u listovima ove vrste.

5. Procijenjene IC_{50} vrijednosti za antioksidativni učinak Soxhlet ekstrakata u DPPH testu pokazale su izvrsnu negativnu povezanost sa sadržajem ukupnih fenola *(r* = -0,96, P = 0,044), a iznosile su 17,25 μg/mL za vrstu *G. alypum*, 22,68 μg/mL za vrstu *G. cordifolia*, 20,41 μg/mL za vrstu *G. meridionalis* i 24,19 μg/mL za vrstu *G. punctata*. Primjenom tankoslojne kromatografije utvrđeno je da su glavne antioksidativne sastavnice svih istraživanih vrsta njihovi dominantni feniletanoidi verbaskozid i rozikazid A, što objašnjava zabilježeno bolje djelovanje njima bogatih ekstrakata pripremljenih dekokcijom u usporedbi s ekstraktima dobivenim maceracijom i ultrazvučnom ekstrakcijom.
6. Soxhlet ekstrakti nadzemnih dijelova sve četiri istraživane vrste smanjili su ciklooksigenaznu i peroksidaznu aktivnost COX-I u koncentraciji 50 μg/mL. Inhibitorna aktivnost ekstrakata kretala se između 40,6% i 51,3% kod vrste *G. alypum,* 26,5% i 37,8% kod vrste *G. cordifolia,* 25,7% i 17,6% kod vrste *G. meridionalis* te 32,9% i 39,9% kod vrste *G. punctata,* a mogla bi biti povezana s prisutnošću feniletanoida poput verbaskozida te flavonoida poput 6-hidroksiluteolina. Prethodna istraživanja ukazala su da navedeni spojevi posjeduju jači inhibitorni učinak na COX-II (Sahpaz i sur., 2002; Ribeiro i sur., 2015), čime bi se mogla objasniti ranije utvrđena reproduktivna toksičnost vrste *G. alypum* u ženskih štakora (Elbetieha i sur., 2000).
7. Metodom difuzije iz bunarića i metodom mikrodilucije u bujonu utvrđeno je da Soxhlet ekstrakti nadzemnih dijelova svih istraživanih vrsta dobro inhibiraju rast *S. aureus* ATCC 6538 (MIK = 1,42 mg/mL za vrste *G. alypum* i *G. punctata,* MIK = 2,84 mg/mL za vrste *G. cordifolia* i *G. meridionalis*), što bi jednim dijelom moglo biti posljedica visokog udjela verbaskozida (MIK = 227,20 μg/mL). Ispitivanjem provedenim na kliničkim izolatima sojeva *S. aureus* koji su osjetljivi na meticilin (MSSA) i meticilin-rezistentnih sojeva *S. aureus* (MRSA) utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika između dviju skupina, kao ni između pojedinih vrsta roda *Globularia* (P > 0,05).
8. Vrsta *G. alypum* slabo je inhibirala rast *P. aeruginosa* ATCC 27853 (MIK = 22,73 mg/mL), dok je vrsta *G. punctata* pokazala dobro antibakterijsko djelovanje na *E. coli* ATCC 10536 (MIK = 1,42 mg/mL), *B. cereus* ATCC 11778 (MIK = 2,84 mg/mL) i *B. subtilis* ATCC 6633 (MIK = 1,89 mg/mL) te umjereno antibakterijsko djelovanje na *E. faecalis* ATCC 29212 (MBK = 5,68 mg/mL). Ostale istraživane vrste slabo su inhibirale rast *B. cereus* ATCC 11778

(MIK = 11,36 mg/mL), kod kojeg je utvrđena izvrsna povezanost između dobivenih MIK vrijednosti i sadržaja flavonoida (r = 0,998, P = 0,002). Većem antimikrobnom učinku vrste *G. punctata* mogli bi pridonositi njoj karakteristični acilirani derivati 6-hidroksiluteolin 7-*O*-soforozida.

9. Ultrazvučni ekstrakti listova vrsta *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* smanjili su u koncentraciji 500 μg/mL vijabilnost stanica MDA-MB-231 za 63,41%, 82,96% i 34,48% (P < 0,05). Ekstrakti sve četiri istraživane vrste smanjili su vijabilnost stanica A1235, pri čemu su procijenjene IC_{50} vrijednosti iznosile 231,43 μg/mL za vrstu *G. alypum*, 180,42 μg/mL za vrstu *G. cordifolia*, 129,40 μg/mL za vrstu *G. meridionalis* i 140,54 μg/mL za vrstu *G. punctata*. Korelacijskom analizom utvrđena je vrlo dobra do izvrsna negativna povezanost citotoksičnog učinka s različitim skupinama sekundarnih metebolita, uključujući ukupne fenole, flavonoide, kondenzirane trjeslovine i iridoide (P < 0,05). Neki od spojeva koji bi mogli pridonositi navedenom učinku uključuju 6-hidroksiluteolin 7-*O*-glukozid, apigenin, luteolin, verbaskozid i njemu slične feniletanoide te katalpol. Veći citotoksični učinak vrsta *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* mogao bi biti povezan s njima zajedničkim iridoidima, asperulozidom, deacetilasperulozidom i asperulozidinskom kiselinom.
10. Vrste *G. alypum, G. cordifolia, G. meridionalis* i *G. punctata* posjeduju antidijabetski, antioksidativni, protuupalni, antimikrobni i citotoksični učinak u uvjetima *in vitro*, a koje je moguće povezati s njihovim utvrđenim kemijskim sastavom. Za spomenute biološke učinke mogao bi biti djelomično zaslužan verbaskozid, jedan od glavnih zajedničkih metabolita istraživanih vrsta. Antidijabetski, antioksidativni i protuupalni učinak bili su nešto izraženiji kod vrste *G. alypum*, što ide u prilog njezinoj čestoj tradicionalnoj primjeni u liječenju šećerne bolesti, bolova i različitih upalnih stanja, dok zabilježena antistafilokokna aktivnost dodatno podupire eksternu primjenu navedene vrste kod kožnih bolesti, uključujući zacjeljivanje rana, apcesa i opeklina. U usporedbi s vrstom *G. alypum*, vrste *G. cordifolia, G. meridionalis* i *G. punctata* pokazale su veći antitumorski potencijal, koji bi mogao biti povezan s prisutnošću njima zajedničkih iridoida, asperulozida i njegovih derivata. Posljednja vrsta pokazala je i najbolji antibakterijski potencijal, a koji bi mogao biti povezan s njoj svojstvenim spojevima poput aciliranih derivata 6-hidroksiluteolin 7-*O*-soforozida.

6. LITERATURA

Aastrup S, Outtrup H, Erdal K. Location of the proanthocyanidins in the barley grain. Carlsberg Res Commun 1984; 49(1): 105-109.

Abbas MN, Rana SA, Shahid M, Rana N, Mahmood-ul-Hassan M, Hussain M. Chemical evaluation of weed seeds mixed with wheat grains at harvest. J Anim Plan Sci 2012; 22(2): 283-288.

Abdelmajeed NA, Danial EN, Ayad HS. The effect of environmental stress on qualitative and quantitative essential oil of aromatic and medicinal plants. Arch Sci 2013; 66(4):100-120.

Abouri M, El Mousadik A, Msanda F, Boubaker H, Saadi B, Cherifi K. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in the Tata Province, Morocco. Int J Med Plants 2012; 1(7): 99-123.

Adamczyk B, Salminen JP, Smolander A, Kitunen V. Precipitation of proteins by tannins: effects of concentration, protein/tannin ratio and pH. Int J Food Sci Technol 2012; 47(4): 875-878.

Adisakwattana S, Chantarasinlapin P, Thammarat H, Yibchok-Anun S. A series of cinnamic acid derivatives and their inibitory activity on intestinal α-glucosidase. J Enzyme Inhib Med Chem 2009; 24(5): 1194-1200.

Afifi-Yazar FU, Kasabri V, Abu-Dahab R. Medicinal plants from Jordan in the treatment of cancer: Traditional uses vs. *in vitro* and *in vivo* evaluations – Part 1. Planta Med 2011; 77(11): 1203-1209.

Akcos Y, Ezer N, Çaliş İ, Demirdamar R, Tel BC. Polyphenolic compounds of *Sideritis lycia* and their anti-inflammatory activity. Pharm Biol 1999; 37(2): 118-122.

Akinleye A, Avvaru P, Furqan M, Song Y, Liu D. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics. J Hematol Oncol 2013; 6: 88. DOI: 10.1186/1756-8722-6-88.

Akroum S, Bendjeddou D, Satta D, Lalaoui K. Antibacterial activity and acute toxicity effect of flavonoids extracted from *Mentha longifolia*. Am-Eur J Sci Res 2009; 4(2): 93-96.

Albach DC, Meudt HM, Oxelman B. Piecing together the „new“ Plantaginaceae. Am J Bot 2005; 92(2): 297-315.

Al-Idrissi M, Sbeita A, Jebriel A, Zintani A, Shreidi A, Ghawawi H. Libya: Country report to the FAO International Conference on Plant Genetic Resources (Leipzig, 1996), Tripoli, 1996.

Alipieva K, Korkina L, Orhan IE, Georgiev MI. Verbascoside – A review of its occurence, (bio)synthesis and pharmacological significance. Biotechnol Adv 2014; 32(6): 1065-1076.

Allali H, Benmehdi H, Dib MA, Tabti B, Ghalem S, Benabadji N. Phytotherapy of diabetes in West Algeria. Asian J Chem 2008; 20(4): 2701-2710.

Alsabri SG, Zetrini AE, Ermeli NB, Mohamed SB, Bensaber SM, Hermann A, Gbaj A. Study of eight medicinal plants for antioxidant activities. J Chem Pharm Res 2012; 4(8): 4028-4031.

Altundag E, Ozturk M. Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. Procedia Soc Behav Sci 2011; 19: 756-777.

Amer M, El-Masry S. Iridoids from *Globularia arabica* Jaub et sp. Alex J Pharm Sci 1988; 2(2): 153-155.

American Cancer Society. Cancer facts & figures 2017. Atlanta: American Cancer Society, 2017.

Amessis-Ouchemoukh N, Abu-Reidah IM, Quirantes-Piné R, Rodríguez-Pérez C, Madani K, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A. Tentative characterisation of iridoids, phenylethanoid glycosides and flavonoid derivatives from *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) leaves by LC-ESI-QTOF-MS. Phytochem Anal 2014a; 25(5): 389-398.

Amessis-Ouchemoukh N, Madani K, Falé PLV, Serralheiro ML, Araújo MEM. Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. Ind Crop Prod 2014b; 53: 6-15.

Andrzejewska-Golec E. The occurence of iridoids in plants. Acta Soc Bot Pol 1995; 64(2): 181-186.

Anyasor GN, Ogunwenmo KO, Oyelana OA, Akpofunure BE. Phytochemical constituents and antioxidant activities of aqueous and methanol stem extracts of *Costus afer* Ker Gawl. (Costaceae). Afr J Biotechnol 2010; 9(31): 4880-4884.

APG. An ordinal classification for the families of flowering plants. Ann Missouri Bot Gard 1998; 85(4): 531-553.

APG II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Bot J Linn Soc 2003; 141(4): 399-436.

APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Bot J Linn Soc 2009; 161(2): 105-121.

Argue CL. Pollen morphology in the Selegineae, Manuleae (Scrophulariaceae), and selected Globulariaceae, and its taxonomic significance. Am J Bot 1993; 80(6): 723-733.

Arnold N, Valentini G, Bellomaria B, Hocine L. Comparative study of the essential oils from *Rosmarinus eriocalyx* Jordan & Fourr. from Algeria and *R. officinalis* from other countries. J Essent Oil Res 1997; 9(2): 167-175.

Artanti N, Hanafi M, Andriyani R, Saraswati V, Udin Z, Lotulung PD, Fujita KI, Usuki Y. Isolation of an anti-cancer asperuloside from *Hedyotis corymbosa* L. J Trop Life Sci 2015; 5(2): 88-91.

Arumuganathan K, Earle ED. Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Mol Biol Rep 1991; 9(3): 208-218.

Arvouet-Grand A, Vennat B, Pourrat A, Legret P. Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. J Pharm Belg 1994; 49(6): 462-468.

Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress – A concise review. Saudi Pharm J 2016; 24(5): 547-553.

Athmouni K, Belghith T, El Fek A, Ayadi H. Phytochemical composition and antioxidant activity of extracts of some medicinal plants in Tunisia. Int J Pharmacol Toxicol 2016; 4(2): 159-168.

Avila JG, de Liverant JG, Martínez A, Martínez G, Muñoz JL, Arciniegas A, Romo de Vivar A. Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. J Ethnopharmacol 1999; 66(1): 75-78.

Awen BZ, Unnithan CR, Kermagi A, Ekreem WL, Abaida SA, Rashed HB, Murshed H, Ghanody LA, Shoaip S, Mohammed ZS, Mahamody MA, Saied WM, Abouamer K. Chemical composition of some Libyan medicinal plants. Lib J Med Res 2010; 7(2): 20-26.

Azzi R, Djaziri R, Lahfa F, Sekkal FZ, Benmehdi H, Belkacem N. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. J Med Plants Res 2012; 6(10): 2041-2050.

Bae YH, Cuong TD, Hung TM, Kim JA, Woo MH, Byeon JS, Choi JS, Min BS. Cholinesterase inhibitors from the roots of *Harpagophytum procumbens*. Arch Pharm Res 2014; 37(9): 1124-1129.

Bagchi K, Puri S. Free radicals and antioxidants in health and disease. East Mediterr Health J 1998; 4(2): 350-360.

Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. Anal Biochem 1990; 190(2): 360-365.

Barhouchi B, Aouadi S, Abdi A. Determination of eugenol and its derivative isoeugenol in *Globularia alypum* using solvent system extraction and comparative study of their antioxidant activities with various oxidation conditions. J Chem Pharm Res 2014; 6(12): 776-784.

Barreno E, Bramwell D, Cabezudo B, Cardona MA, Costa M, Fernández-Casas FJ, Fernández-Galiano E, Fernández Prieto JA, Gómez Campo C, Hernández Bermejo JE, Heywood VH, Izco J, Llorens L, Molero Mesa J, Montserrat Recorder P, Rivas Martínez S, Sáenz C, Santos Guerra A, Valdés Castrillón B, Wildpret de la Torre W. Listado de plantas endémicas, raras o amenazadas de España. Informa Ambiental 1984; 3: 48-71.

Bate-Smith EC. The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. I. Dicotyledons. Bot J Linn Soc 1962; 58(371): 95-173.

Bawadi HA, Bansode RR, Trappey A 2nd, Truax RE, Losso JN. Inhibition of Caco-2 colon, MCF-7 and Hs578T breast, and DU 145 prostatic cancer cell proliferation by water-soluble black bean condensed tannins. Cancer Lett 2005; 218(2): 153-162.

Baynest HW. Classification, pathophysiology, diagnosis and management of diabetes mellitus. J Diabetes Metab 2015; 6(5): 541. DOI: 10.4172/2155-6156.1000541.

Baytop T. Therapy with medicinal plants in Turkey (Past and present). Istanbul: Istanbul University Publications, 1984, str. 419.

Beghalia M, Ghalem S, Allali H. Comparison of the inhibitory capacity of two groups of pure natural extract on the crystallization of two types of material compound urinary stones *in vitro* study. IOP Conf Ser: Mater Sci Eng 2015; 92(1): 1-8.

Beghalia M, Ghalem S, Allali H, Belouatek A, Marouf A. Inhibition of calcium oxalate monohydrate crystal growth using Algerian medicinal plants. J Med Plants Res 2008; 2(3): 66-70.

Bellakhdar J, Claisse R, Fleurentin J, Younos C. Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea. J Ethnopharmacol 1991; 35(2): 123-143.

Bellik Y, Boukraâ L, Alzahrani HA, Bakhotmah BA, Abdellah F, Hammoudi SM, Iguer-Ouada M. Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals: an update. Molecules 2013; 18(1): 322-353.

Bello R, Moreno L, Primo-Yúfera E, Esplugues J. *Globularia alypum* L. extracts reduced histamine and serotonin contraction *in vitro*. Phytother Res 2002; 16(4): 389-392.

Ben Haj Jilani I, Ghrabi Z, Zouaghi M. Valorisation de la biodiversité en plantes médicinales et étude ethnobotanique de la flore du sud-ouest du Kef. Ethnopharmacologia 2007; 39: 36-43.

Ben Haj Jilani IBH, Zouaghi M, Ghrabi Z. Ethnobotanical survey of medicinals plants in Northwest Tunisia. Curare J Med Anthropol 2011; 34(1-2): 63-78.

Ben Hassine B, Bui A, Mighri Z. Contribution a l'etude des plantes medicinales Tunisiennes. Identification des acides phenols de *Globularia alypum* L. par C.C.M. bidimensionnelle et H.P.L.C. J Soc Chem Tunisie 1982a; 7: 3-10.

Ben Hassine B, Bui AM, Mighri Z, Cavé A. Flavonoïdes et anthocyanes de *Globularia alypum* L. Plantes Méd Phytothér 1982b; 16(3): 197-205.

Benalla W, Bellahcen S, Bnouham M. Antidiabetic medicinal plants as a source of alpha glucosidase inhibitors. Curr Diabetes Rev 2010; 6(4): 247-254.

Benamar H, Rached W, Derdour A, Marouf A. Screening of Algerian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. J Biol Sci 2010; 10(1): 1-9.

Benarba B. Medicinal plants used by traditional healers from South-West Algeria: An ethnobotanical study. J Intercult Ethnopharmacol 2016; 5(4): 320-330.

Benderradji L, Rebbas K, Ghadbane M, Bounar R, Brini F, Bouzerzour H. Ethnobotanical study of medicinal plants in Djebel Messaad region (M'Sila, Algeria). Global J Res Med Plants Indigen Med 2014; 3(12): 445-459.

Benkhnigue O, Akka FB, Salhi S, Fadli M, Douira A, Zidane L. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète dans la région d'Al Haouz-Rhamna (Maroc). J Anim Plant Sci 2014; 23(1): 3539-3568.

Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. Nucleic Acids Res 2017; 45(D1): D37-D42.

Berger SA. GIDEON guide to medically important bacteria. Los Angeles: GIDEON Informatics Inc, 2017, str. 1722.

Berkowitz WF, Choudhry SC, Hrabie JA. Conversion of asperuloside to optically active prostaglandin intermediates. J Org Chem 1982; 47: 824-829.

Bernard P, Lallemand M, Balansard G. A propos des hétérosides chromogéniques type iridoïde dans les feuilles de globulaire *Globularia alypum* L. Plantes Méd Phytothér 1974a; 8(3): 180-187.

Bernard P, Lallemand M, Balansard G. Étude des acides aromatiques et des composés flavoniques des feuilles globulaire (*Globularia alypum* L.). Plantes Méd Phytothér 1974b; 8(3): 174-179.

Bernáth J, Németh É. Perspectives and achievements in genetic conservation of medicinal and aromatic plants in Hungary. U: Baričevič D, Bernáth J, Maggioni L, Lipman E, compilers. 2004. Report of a working group on medicinal and aromatic plants. First Meeting, 12-14 September 2002, Gozd Martuljek, Slovenia, str. 50.

Bhattacharya S. Reactive oxygen species and cellular defense system. U: Rani V, Yadav UCS (ur.). Free radicals in human health and disease. New Delhi: Springer, 2015, str. 17-29.

Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 1958; 181: 1199-1200.

Bljajić K, Šoštarić N, Petlevski R, Vujić L, Brajković A, Fumić B, de Carvalho IS, Zovko Končić M. Effect of *Betula pendula* leaf extract on α-glucosidase and glutathione level in glucose-induced oxidative stress. Evid Based Complement Alternat Med 2016; 2016: 8429398. DOI: 10.1155/2016/8429398.

Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A, Ziyyat A. Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. Int J Diabetes & Metabolism 2002; 10(1): 33-50.

Bogdadi HAA, Kokoska L, Havlik J, Kloucek P, Rada V, Vorisek K. *In vitro* antimicrobial activity of some Libyan medicinal plant extracts. Pharm Biol 2007; 45(5): 386-391.

Bohanec B. Ploidy determination using flow cytometry. U: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (ur.). Doubled haploid production in crop plants: A manual. Dordrecht-Boston-London: Kluwer Academic Publishers, 2003, str. 397-403.

Bonet MA, Parada M, Selga A, Vallès J. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the regions of L'Alt Empordà and Les Guilleries (Catalonia, Iberian Peninsula). J Ethnopharmacol 1999; 68(1-3): 145-168.

Bostock J, Riley RT. The Natural History. Pliny the Elder. Chapter 7. London: Taylor and Francis, 1855.

Bouabdelli F, Djelloul A, Kaid-Omar Z, Semmoud A, Addou A. Antimicrobial activity of 22 plants used in urolithiasis medicine in Western Algeria. Asian Pac J Trop Dis 2012; 2(1): 530-535.

Boudjelal A, Henchiri C, Sari M, Sarri D, Hendel N, Benkhaled A, Ruberto G. Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): An ethnopharmacology survey. J Ethnopharmacol 2013; 148(2): 395-402.

Boudjelal A, Henchiri C, Siracusa L, Sari M, Ruberto G. Compositional analysis and *in vivo* anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. Fitoterapia 2012; 83(2): 286-292.

Boukef K, Souissi HR, Balansard G. Contribution à l'étude des plantes utilisées en médecine traditionnelle tunisienne. Plant Med Phytother 1982; 16(4): 260-279.

Boukhira S, El Mansouri L, Bousta D. Ethnobotanical studies of some medicinal and cosmetic plants used in the province of Sefrou, Middle Atlas of Morocco. J Ethnobiol Tradit Med 2013; 120: 661-670.

Boussoualim N, Krache I, Baghiani A, Trabsa H, Aouachria S, Arrar L. Human xanthine oxidase inhibitory effect, antioxidant *in vivo* of Algerian extracts (*Globularia alypum* L.). Int J Pharmacogn Phytochem Res 2016a; 8(4): 645-650.

Boussoualim N, Trabsa H, Krache I, Arrar L, Baghiani A. Anti-bacterial and β-lactamase inhibitory effects of *Anchusa azurea* and *Globularia alypum* extracts. Res J Pharm Biol Chem Sci 2014; 5(1): 742-749.

Boussoualim N, Trabsa H, Krache I, Arrar L, Baghiani A. Kinetics of inhibition of xanthine oxidase by *Globularia alypum* and its protective effect against oxonate-induced hyperuricemia and renal dysfunction in mice. J Appl Pharm Sci 2016b; 6(4): 159-164.

Bousta D, Boukhira S, Aafi A, Ghanmi M, el Mansouri L. Ethnopharmacological study of anti-diabetic medicinal plants used in the Middle-Atlas region of Morocco (Sefrou region). Int J Pharm Res Health Sci 2014; 2(1): 75-79.

Boutemak K, Safta B, Ayachi N. Study of the anti-inflammatory activity of flavonic extract of *Globularia alypum* L. Acta Phys Pol A 2015; 128(2): 239-240.

Boutiti A, Benguerba A, Kitouni R, Bouhroum M, Benayache S, Benayache F. Secondary metabolites from *Globularia alypum*. Chem Nat Compd 2008; 44(4): 543-544.

Bouzabata A. Traditional treatment of high blood pressure and diabetes in Souk Ahras District. J Pharmacogn Phytother 2013; 5(1): 12-20.

Bramwell D, Kunkel G. A new species of *Globularia* (Globulariaceae) from the Canary Islands. Cuad Bot Canar 1974; 22: 15-17.

Bräuchler C, Meimberg H, Heubl G. Molecular phylogeny of the genera *Digitalis* L. and *Isoplexis* (Lindley) Loudon (Veronicaceae) based on ITS- and *trn*L-F sequences. Plant Syst Evol 2004; 248(1-4): 111-128.

Bremer K, Backlund A, Sennblad B, Swenson U, Andreasen K, Hjertson M, Lundberg J, Backlund M, Bremer B. A phylogenetic analysis of 100+ genera and 50+ families of

euasterids based on morphological and molecular data with notes on possible higher level morphological synapomorphies. Plant Syst Evol 2001; 229(3): 137-169.

Bremer B, Bremer K, Heidari N, Erixon P, Olmstead RG, Anderberg AA, Källersjö M, Barkhordarian E. Phylogenetics of asterids based on 3 coding and 3 non-coding chloroplast DNA markers and the utility of non-coding DNA at higher taxonomic levels. Mol Phylogenet Evol 2002; 24(2): 274-301.

Briggs LH, Cain BF. Chemistry of the *Coprosma* genus. Part IX. The constitution of asperuloside. J Chem Soc 1954; 0: 4182-4193.

Broadhurst RB, Jones WT. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. J Sci Food Agric 1978; 29(9): 788-794.

Brúder P, Macášek F, Búriová E. Electrospray ioization mass spectra of pentoses, hexoses, and 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. Chem Pap 2008; 62(6): 547-552.

Budimir A, Bošnjak Z, Kalenić S. Meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) u Hrvatskoj. Infektol Glas 2012; 32(2): 59-66.

Caldes G, Prescott B, King JR. A potential antileukemic substance present in *Globularia alypum*. Planta Med 1975; 27(1): 72-76.

Çaliş İ, Kirmizibekmez H, Rüegger H, Sticher O. Phenylethanoid glycosides from *Globularia trichosantha*. J Nat Prod 1999; 62(8): 1165-1168.

Çaliş İ, Kirmizibekmez H, Sticher O. Iridoid glycosides from *Globularia trichosantha*. J Nat Prod 2001; 64(1): 60-64.

Çaliş İ, Kirmizibekmez H, Taşdemir D, Ireland CM. Iridoid glycosides from *Globularia davisiana*. Chem Pharm Bull 2002a; 50(5): 678-680.

Çaliş İ, Kirmizibekmez H, Taşdemir D, Sticher O, Ireland CM. Sugar esters from *Globularia orientalis*. Z Naturforsch 2002b; 57c(7-8): 591-596.

Cambessèdes MJ. Monographie des Globulaires. Ann Sci Nat Bot 1826; 9: 15-31.

Cardona MA, Contandriopoulos J. Números cromosómicos para la flora Española. 121-182. Lagascalia 1980; 9(2): 249-284.

Carović-Stanko K, Liber Z, Besendorfer V, Javornik B, Bohanec B, Kolak I, Satovic Z. Genetic relations among basil taxa (*Ocimum* L.) based on molecular markers, nuclear DNA content, and chromosome number. Plant Syst Evol 2009; 285(1-2): 13-22.

Carrillo-Ocampo D, Bazaldúa-Gómez S, Bonilla-Barbosa JR, Aburto-Amar R, Rodríguez-López V. Anti-inflammatory activity of iridoids and verbascoside isolated from *Castilleja tenuiflora*. Molecules 2013; 18(10): 12109-12118.

Carrió E, Vallès J. Ethnobotany of medicinal plants used in Eastern Mallorca (Balearic Islands, Mediterranean Sea). J Ethnopharmacol 2012; 141(3): 1021-1040.

Chaslot M. Sur l'aucuboside, chromogène glycosidique (disertacija). Univ Paris, 1955.

Chaudhuri RK, Salama O, Sticher O. Iridoid and aryl glucosides from *Globularia nudicaulis* and *Globularia nana*. Helv Chim Acta 1981; 64(7): 2401-2404.

Chaudhuri RK, Sticher O. Globularifolin, a new acyl iridoid glucoside from *Globularia cordifolia*. Helv Chim Acta 1980; 63(1): 117-120.

Chaudhuri RK, Sticher O. New iridoid glucosides and a lignan diglucoside from *Globularia alypum* L. Helv Chim Acta 1981; 64(1): 3-15.

Cheriti A, Rouissat A, Sekkoum K, Balansard G. Plantes de la pharmacopée traditionnelle dans la région d'El-Bayadh (Algérie). Fitoterapia 1995; 66(6): 525-538.

Chermat S, Gharzouli R. Ethnobotanical study of medicinal flora in the North East of Algeria – an empirical knowledge in Djebel Zdimm (Setif). J Mater Sci Eng 2015; 5(1-2): 50-59.

Chevolleau S, Mallet JF, Debal A, Ucciani E. Antioxidant activity of Mediterranean plant leaves: occurence and antioxidative importance of α-tocopherol. J Am Oil Chem Soc 1993; 70(8): 807-809.

Chevolleau S, Mallet JF, Ucciani E, Gamisans J, Gruber M. Antioxidant activity in leaves of some Mediterranean plants. J Am Oil Chem Soc 1992; 69(12): 1269-1271.

Chograni H, Riahi L, Zaouali Y, Boussaid M. Polyphenols, flavonoids, antioxidant activity in leaves and flowers of Tunisian *Globularia alypum* L. (Globulariaceae). Afr J Ecol 2012; 51(2): 343-347.

Chokri A, Doukali R, El Abida K, Ben Cheikh R. Myorelaxant and spasmolytic effects of *Globularia alypum* L. extract on rabbit jejunum. Int J Pharmacol 2010; 6(5): 608-615.

Chokri A, El Abida K, Zegzouti YF, Ben Cheikh R. Endothelium-dependent vascular relaxation induced by *Globularia alypum* extract is mediated by EDHF in perfused rat mesenteric arterial bed. Can J Physiol Pharmacol 2012; 90(5): 607-616.

Chowdhury SK, Katta V, Beavis RC, Chait BT. Origin and removal of adducts (molecular mass = 98 u) attached to peptide and protein ions in electrospray ionization mass spectra. J Am Soc Mass Spectrom 1990; 1(5): 382-388.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved guideline. CLSI document M26-A. Wayne: CLSI, 1999.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard-Ninth edition. CLSI document M07-A9. Wayne: CLSI, 2012.

Clusius C. Rariorum aliquot stirpium per Hispanias observatorum historia. Antwerp: Christophori Plantinus, 1576, str. 179-181.

Coblentz V. The newer remedies, including their synonyms, sources, methods of preparation, tests, solubilities, incompatibles, medicinal properties, and doses as far as known, together with sections on organo-therapeutic agents and indifferent compounds of iron. A reference manual for physicians, pharmacists and students. 3. izd. Philadelphia: P. Blakiston's son & Co., 1899, str. 65, 110.

Comes HP, Kadereit JW. Spatial and temporal patterns in the evolution of the flora of the European Alpine System. Taxon 2003; 52(3): 451-462.

Comes HP, Kadereit JW. Tests of Pleistocene speciation among alpine and montane species of *Globularia* (Globulariaceae) from the European high mountains. Bauhinia 2001; 15: 76.

Contandriopoulos J. Contribution a l'etude cytobiogeographique du genre *Globularia* L. J Ann Univ Provence 1978; 5(1): 3-14.

Coombes AJ. The Collingridge dictionary of plant names. 3. izd. London: The Hamlyn Publishing Group Limited, 1989, str. 94.

Copeland RA, Williams JM, Giannaras J, Nurnberg S, Covington M, Pinto D, Pick S, Trzaskos JM. Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91(23): 11202-11206.

Cornaglia G. Fighting infections due to multidrug-resistant Gram-positive pathogens. Clin Microbiol Infect 2009; 15(3): 209-211.

Costa R, Pereira G, Garrido I, Tavares-de-Sousa MM, Espinosa F. Comparison of RAPD, ISSR, and AFLP molecular markers to reveal and classify orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) germplasm variations. PLoS One 2016; 11(4): e0152972. DOI: 10.1371/journal.pone.0152972.

Coste H, Flahault C. Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse, et des contrées limitrophes. Vol. 3. Paris: Paul Klincksieck, 1906, str. 166-168.

Council of Europe. European Pharmacopoeia, 5. izd. Strasbourg: Council of Europe, 2006, str. 188-191.

Crkvenčić M, Dudaš S, Jerković I, Marijanović Z, Poljuha D, Hazler Pilepić K. Essential oil composition of three *Globularia* species. Chem Biodivers 2016; 13(2): 219-223.

Cronquist A. An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press, 1981.

Cuendet M, Mesecar AD, DeWitt DL, Pezzuto JM. An ELISA method to measure inhibition of the COX enzymes. Nat Protoc 2006; 1(4): 1915-1921.

Cuyckens F, Claeys M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. J Mass Spectrom 2004; 39(1), 1-15.

Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules 2010; 15(10): 7313-7352.

Dal Cero M, Saller R, Weckerle CS. The use of the local flora in Switzerland: A comparison of past and recent medicinal plant knowledge. J Ethnopharmacol 2014; 151(1): 253-264.

Danişman B. Türkiye'de yayılış gösteren *Globularia orientalis* L. *Globularia trichosantha* Fisch. & Mey. ssp. *trichosantha*, *Globularia sintenisii* Hausskn. & Wettst ve *Globularia alypum* L. (Globulariaceae)'un polen morfolojileri üzerinde bir çalışma [A study of pollen morphology of *Globularia orientalis* L. *Globularia trichosantha* Fisch. & Mey. ssp. *trichosantha*, *Globularia sintenisii* Hausskn. & Wettst and *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) distributed in Turkey] (magistarski rad). Nevşehir Hacı Bektaş Veli University, 2015.

Debat J, Lemoine J, Longuet M. 1981. *Globularia* extract, its method of preparation and its use as pharmaceutical. US4263285 A.

Degen A. Flora Velebitica. Budapest: Verlag der Ungar, Akademie der Wissenschaften, 1938, str. 44-46.

Delipetrou P. *Globularia stygia*. The IUCN red list of threatened species, 2011; e.T161884A5508688.http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T161884A5508688.en, pristupljeno 29. 8. 2017.

De Natale A, Pollio A. A forgotten collection: the Libyan ethnobotanical exhibits (1912-14) by A. Trotter at the Museum O. Comes at the University Federico II in Naples, Italy. J Ethnobiol Ethnomed 2012; 8(4): 1-19.

Deng S, West BJ, Jensen CJ. UPLC-TOF-MS characterization and identification of bioactive iridoids in *Cornus mas* fruit. J Anal Methods Chem 2013; 2013: 1-7.

Dewanjee S, Gangopadhyay M, Bhattacharya N, Khanra R, Dua TK. Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. J Pharm Anal 2015; 5(2): 75-84.

Dey A. Role of liver in glucose metabolism. Emergency Med 2013; 3(5): e133. DOI: 10.4172/2165-7548.1000e133.

Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sci 1999; 65(4): 337-353.

Di Maio G, Panizzi L. Struttura della globularina. Ric Sci 1966; 36(9): 845-850.

Dietrich FG. Vollständiges Lexicon der Gärtnerei und Botanik oder alphabetische Beschreibung vom Bau, Wartung und Nutzen aller in- und ausländischen, ökonomischen, officinellen und zur Zierde dienenden Gewächse. 4. Band, *Erodium* bis *Hyssopus*. Weimar: Gebrüder Gädicke 1804, str. 382-385.

Dinan L, Savchenko T, Whiting P. On the distribution of phytoecdysteroids in plants. Cell Mol Life Sci 2001; 58(8): 1121-1132.

Ding X, Hu J, Wen C, Ding Z, Yao L, Fan Y. Rapid resolution liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry-based metabolomics approach to study the effects of jieduquyuziyin prescription on systemic lupus erythematosus. PLoS One 2014; 9(2):e88223. DOI: 10.1371/journal.pone.0088223.

Djellouli F, Krouf D, Bouchenak M, Lacaille-Dubois MA. Favorable effects of *Globularia alypum* L. liophilized methanolic extract on the reverse cholesterol transport and lipoprotein peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. Int J Pharmacogn Phytochem Res 2014-2015; 6(4): 758-765.

Djeridane A, Yousfi M, Brunel JM, Stocker P. Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the *in vitro* antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. Food Chem Toxicol 2010; 48(10): 2599-2606.

Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chem 2006; 97(4): 654-660.

Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Vidal N, Lesgards JF, Stocker P. Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. Eur Food Res Technol 2007; 224(6): 801-809.

Doležel J, Binarová P, Lucretti S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. Biol Plant 1989; 31(2): 113-120.

Doležel J, Greilhuber J, Suda J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. Nat Protoc 2007; 2(9): 2233-2244.

Domac R. Flora za određivanje i upoznavanje bilja. Zagreb: Izdavački zavod Jugoslavenske akademije znanosti i umjetnosti, 1950, str. 340.

Domac R. Mala flora Hrvatske i susjednih područja. Zagreb: Školska knjiga, 1973, str. 340-341.

Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 1990; 12(1): 13-15.

Dragendorff G. Die Heilpflanzen der verschiedenen Völker und Zeiten, ihre Anwendung, wesentlichen Bestandtheile und Geschichte. Ein Handbuch für Ärzte, Apotheker, Botaniker, und Droguisten. Stuttgart: Verlag von Ferdinand Enke, 1898, str. 614.

Duman H. A new species of *Globularia* L. (Globulariaceae) from South Anatolia. Bot J Linn Soc 2001; 137(4): 425-428.

Duran A, Çetin Ö, Öztürk M. *Globularia anatolica* sp. nov. (Globulariaceae) from the Honaz Mountain National Park, southwest Turkey. Nord J Bot 2009; 27(3): 232-237.

Eck RV, Dayhoff MO. Atlas of protein sequence and structure. Silver Springs: National Biomedical Research Foundation, 1966.

Eddouks M, Maghrani M, Lemhadri ML, Ouahidi ML, Jouad OH. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). J Ethnopharmacol 2002; 82(2-3): 97-103.

Edmondson JR. *Globularia* Linnaeus. U: Cullen J, Alexander JCM, Brickell CD, Edmondson JR, Green PS, Heywood VH, Jørgensen PM, Jury SL, Knees SG, Maxwell HS, Miller DM, Robson NKB, Walters SM, Yeo PF. The european garden flora, a manual for the identification of plants cultivated in Europe, both out-of-doors and under grass. Vol. 6. Reprinted. Dicotyledons (Part IV): Loganiaceae to Compositae. Cambridge: Cambridge University Press, 2004, str. 341-343.

EFSA authors. Compendium of botanicals reported to contain naturally occuring substances of possible concern for human health when used in food and food supplements. EFSA J 2012; 10(5): 2663. DOI: 10.2903/j.efsa.2012.2663.

Egwaikhide PA, Gimba CE. Analysis of the phytochemical content and anti-microbial activity of *Plectranthus glandulosis* whole plant. Middle-East J Sci Res 2007; 2(3-4): 135-138.

Ehrendorfer F. Liste der Gefäßpflanzen Mitteleuropas, Stuttgart: Gustav Fisher Verlag, 1973, str. 126.

Eissa TAF, Palomino OM, Carretero ME, Gómez-Serranillos MP. Ethnopharmacological study of medicinal plants used in the treatment of CNS disorders in Sinai Peninsula, Egypt. J Ethnopharmacol 2014; 151(1): 317-332.

El Abbouyi PA, Filali- Ansari N, EL Khyari PS, Loukili H. Inventory of medicinal plants prescribed by traditional healers in El Jadida city and suburbs (Morocco). Int J Green Pharm 2014; 8(4): 242-251.

El-Abhar HS, Schaalan MF. Phytotherapy in diabetes: Review on potential mechanistic perspectives. World J Diabetes 2014; 5(2): 176-197.

El Amrani F, Rhallab A, Alaoui T, El Badaoui K, Chakir S. Étude ethnopharmacologique de quelques plantes utilisées dans le traitement du diabète dans la région de Meknès-Tafilalet (Maroc). Phytothérapie 2010; 8(3): 161-165.

El Guiche R, Tahrouch S, Amri O, El Mehrach K, Hatimie A. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of 30 medicinal and aromatic plants located in the South of Morocco. Int J New Technol Res 2015; 1(3): 7-11.

Elbetieha A, Oran SA, Alkofahi A, Darmani H, Raies AM. Fetotoxic potentials of *Globularia arabica* and *Globularia alypum* (Globulariaceae) in rats. J Ethnopharmacol 2000; 72(1-2): 215-219.

Ellman GL. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. Arch Biochem Biophys 1958; 74(2): 443-450.

Elmezogi JS, Elzetrini AA, Mohamed SB, Ibrahem AA, Benhusein GM. Evaluation of anti-inflammatory activity of Libyan traditional plants. Libyan J Med Res 2010; 7(2): 32-34.

El-Mokasabi FM. Floristic composition and traditional uses of plant species at Wadi Alkuf, Al-Jabal, Al-Akhder, Libya. American-Eurasian J Agric & Environ Sci 2014a; 14(8): 685-697.

El-Mokasabi FM. The state of the art of traditional herbal medicine in the Eastern Mediterranean coastal region of Libya. Middle-East J Sci Res 2014b; 21(4): 575-582.

El Rhaffari L, Zaid A. Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. U: Fleurentin J (ur.), Pelt JM (ur.), Mazars G (ur.), Lejosne JC (trad.), Cabalion Pierre (sur.). Des sources du savoir aux médicaments du futur: actes du 4e congrès europèen d'ethnopharmacologie. Paris: Metz IRD, SFE, 2002, str. 293-318.

El Youbi AEH, Ouahidi I, El Mansouri L, Daoudi A, Bousta D. Ethnopharmacological survey of plants used for immunological diseases in four regions of Morocco. Eur J Med Plants 2016; 13(1): 1-24.

Es-Safi NE, Kerhoas L, Ducrot PH. Application of positive and negative electrospray ionization, collision-induced dissociation and tandem mass spectrometry to a study of

the fragmentation of 6-hydroxyluteolin 7-*O*-glucoside and 7-*O*-glucosyl-(1→3)-glucoside. Rapid Commun Mass Spectrom 2005a; 19(19): 2734-2742.

Es-Safi NE, Kerhoas L, Ducrot PH. Fragmentation study of globularin through positive and negative ESI/MS, CID/MS, and tandem MS/MS. Spectrosc Lett 2007a; 40(5): 695-714.

Es-Safi NE, Kerhoas L, Ducrot PH. Fragmentation study of iridoid glucosides through positive and negative electrospray ionization, collision-induced dissociation and tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 2007b; 21(7): 1165-1175.

Es-Safi NE, Kerhoas L, Einhorn J, Ducrot PH. Application of ESI/MS, CID/MS and tandem MS/MS to the fragmentation study of eriodictyol 7-*O*-glucosyl-(1→2)-glucoside and luteolin 7-*O*-glucosyl-(1→2)-glucoside. Int J Mass Spectrom 2005b; 247(1-3): 93-100.

Es-Safi NE, Khlifi S, Kerhoas L, Kollmann A, El Abbouyi A, Ducrot PH. Antioxidant constituents of the aerial parts of *Globularia alypum* growing in Morocco. J Nat Prod 2005c; 68(8): 1293-1296.

Es-Safi NE, Khlifi S, Kollmann A, Kerhoas L, El Abbouyi A, Ducrot PH. Iridoid glucosides from the aerial parts of *Globularia alypum* L. (Globulariaceae). Chem Pharm Bull 2006; 54(1): 85-88.

Es-Safi NE, Kollmann A, Khlifi S, Ducrot PH. Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L. structure-activity relationship. LWT Food Sci Technol 2007c; 40(7): 1246-1252.

El-Seedi HR, Burman R, Mansour A, Turki Z, Boulos L, Gullbo J, Göransson U. The traditional medicinal uses and cytotoxic activities of sixty-one Egyptian plants: Discovery of an active cardiac glycoside from *Urginea maritima*. J Ethnopharmacol 2013; 145(3): 746-757.

Fabre N, Rustan I, de Hoffmann E, Quetin-Leclerq J. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom 2001; 12(6): 707-715.

Fakchich J, Elachouri M. Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. J Ethnopharmacol 2014; 154(1): 76-87.

Farré Armengol G. Changes in floral bouquets from compound-specific responses to increasing temperatures. Glob Change Biol 2014; 20(12): 3660-3669.

Faure R, Babadjamian A, Balansard G, Elias R, Maillard C. Concerted use of two-dimensional NMR spectroscopy in the complete assignment of the ^{13}C and ^{1}H NMR spectra of globularin. Magn Reson Chem 1987; 25(4): 327-330.

Fayyaz M, Mirza IA, Ahmed Z, Abassi SA, Hussain A, Ali S. *In vitro* susceptibility of chloramphenicol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Coll Physicians Surg Pak 2013; 23(9): 637-640.

Fehri B, Aiache JM. Effects of *Globularia alypum* L. on the gastrointestinal tract. J Nat Prod 2010; 3: 141-146.

Fehri B, Aiache JM, Ahmed KKM. Active spermatogenesis induced by a reiterated administration of *Globularia alypum* L. aqueous leaf extract. Pharmacognosy Res 2012; 4(3): 138-147.

Fehri B, Tebbett IR, Freiburger B, Karlix J. The immunosuppresive effects of *Globularia alypum* extracts. Phytother Res 1996; 10(6): 539-540.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 1985; 39(4): 783-791.

Feriani A, del Mar Contreras M, Talhaoui N, Gómez-Caravaca AM, Taamalli A, Segura-Carretero A, Ghazouani L, El Feki A, Allagui MS. Protective effect of *Globularia alypum* leaves against deltamethrin-induced nephrotoxicity in rats and determination of its bioactive compounds using high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. J Funct Foods 2017; 32: 139-148.

Fiebich BL, Grozdeva M, Hess S, Hüll M, Danesch U, Bodensieck A, Bauer R. *Petasites hybridus* extracts *in vitro* inhibit COX- 2 and PGE2 release by direct interaction with the enzyme and by preventing p42/44 MAP kinase activation in rat primary microglial cells. Planta Med 2005; 71(1): 12–19.

Fikenscher LH, Hegnauer R, Rujigrok HWL. Iridoide Pflanzenstoffe (Pseudoindikane) als systematische Merkmale. Pharm Weekbl 1969; 104(26): 561-566.

Fiori A. Nuova flora analitica d'Italia, contenente la descrizione delle piante vascolari indigene inselvatichite e largamente coltivate in Italia. Vol. 2. Firenze: Tipografia di M. Ricci, 1925-1929, str. 474-475.

Forenbacher S. Velebit i njegov biljni svijet. Zagreb: Školska knjiga 1990, str. 616-617.

Fournial A, Grizaud CM, Mondon P, Le Moigne C. 2012. New use of an extract of plant origin of *Globularia* and method for obtaining said extract by *in vitro* plant culture. Sederma. WO 2012104774 A1.

Fresquet Febrer JL. Inventario de plantas medicinales de uso popular en la ciudad de Valencia. Universitat de València, 1996, str. 45.

Frew T, Powis G, Berggren M, Abraham RT, Ashendel CL, Zalkow LH, Hudson C, Qazia S, Gruszecka-Kowalik E, Merriman R, Bonjouklian R. A multiwell assay for inhibitors of phosphatidylinositol-3-kinase and the identification of natural product inhibitors. Anticancer Res 1994; 14(6B): 2425-2428.

Friščić M, Bucar F, Hazler Pilepić K. LC-PDA-ESI-MS^n analysis of phenolic and iridoid compounds from *Globularia* spp. J Mass Spectrom 2016; 51(12): 1211-1236.

Fritsch K. Exkursionsflora für Österreich und die ehemals österreichischen Nachbargebiete. Wien-Leipzig: Carl Gerold's Sohn, 1922, str. 498.

Fu GM, Pang H, Wong YH. Naturally occurring phenylethanoid glycosides: potential leads for new therapeutics. Curr Med Chem 2008; 15(25): 2592-2613.

Fürst R, Zündorf I. Plant-derived anti-inflammatory compounds: hopes and dissapointments regarding the translation of preclinical knowledge into clinical progress. Mediators Inflamm 2014; Article ID 146832: 1-9. DOI: 10.1155/2014/146832.

Gasmi-Boubaker A, Mosquera-Losada R, Kayouli C, Rigueiro-Rodríguez A, Najar T. Nutrient composition of native vegetation growing in the pastures of central Tunisia. Opt Medit Ser A 2008; 79: 439-442.

Geiger PL. Handbuch der Pharmacie zum Gebrauche bei Vorlesungen und zum selbstunterrichte für Ärzte, Apotheker und Droguisten. 2. Band. Heidelberg: August Osswald, 1829, str. 431-432.

Ghasemian M, Owlia S, Owlia MB. Review of anti-inflammatory herbal medicines. Adv Pharmacol Sci 2016; Article ID 9130979: 1-11. DOI: 10.1155/2016/9130979.

Ghasemzadeh A, Ghasemzadeh N. Flavonoids and phenolic acids: role and biochemical activity in plants and human. J Med Plants Res 2011; 5(31): 6697-6703.

Ghlissi Z, Kallel R, Sila A, Harrabi B, Atheymen R, Zeghal K, Bougatef A, Sahnoun Z. *Globularia alypum* methanolic extract improves burn wound healing process and inflammation in rats and possesses antibacterial and antioxidant activities. Biomed Pharmacother 2016; 84: 1488-1495.

Ghourri M, Zidane L, Douira A. Usage des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Sahara marocain (Tan-Tan). J Anim Plant Sci 2013; 17(1): 2388-2411.

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. J Natl Cancer Inst 1973; 51(5): 1417–1423.

Gomes AR, Vasconcelos T, Almeida MHG. Plantas na medicina tradicional de Cabo Verde. U radionici: Plantas medicinais e fitoterapêuticas nos Trópicos. Macau: Instituto de Investigação Científica Tropical/Centro Científico e Cultural de Macau, 2008, str. 1-13.

Gomes I, Leyens T, Da Luz B, Costa J, Gonçalves F. New data on the distribution and conservation status of some angiosperms of the Cape Verde Islands, W Africa. Willdenowia 1999; 29(1-2), 105-114.

González González R, Reyes Betancort JA. *Globularia sarcophylla*. The IUCN red list of threatened species, 2011; e.T162365A5580040.http://dx.doi.org/10.2305/IUCN. UK.2011- 2.RLTS.T162365A5580040.en, pristupljeno 29. 8. 2017.

González-Tejero MR, Casares-Porcel M, Sánchez-Rojas CP, Ramiro-Gutiérrez JM, Molero-Mesa J, Pieroni A, Giusti ME, Censorii E, de Pasquale C, Della A, Paraskeva-Hadijchambi D, Hadjichambis A, Houmani Z, El-Demerdash M, El-Zayat M, Hmamouchi M, ElJohrig S. Medicinal plants in the Mediterranean area: Synthesis of the results of the project Rubia. J Ethnopharmacol 2008; 116(2): 341-357.

Graham JG, Quinn ML, Fabricant DS, Farnsworth NR. Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell. J Ethnopharmacol 2000; 73(3): 347-377.

Greilhuber J. "Self-tanning" – a new and important source of stoichiometric error in cytophotometric determination of nuclear DNA content in plants. Plant Syst Evol 1988; 158(2-4): 87-96.

Guo L, Zheng X, Liu J, Yin Z. Geniposide suppresses hepatic glucose production *via* AMPK in HepG2 cells. Biol Pharm Bull 2016; 39(4): 484-491.

Habig WH, Jakoby WB. Assay for differentiation of glutathione S-transferases. Methods Enzymol 1981; 77: 398-405.

Haddad PS, Dépôt M, Settaf A, Chabli A, Cherrah Y. Comparative study on the medicinal plants most recommended by traditional practitioners in Morocco and Canada. J Herbs Spices Med Plants 2003; 10(3): 25-45.

Hadrich F, Bouallagui Z, Junkyu H, Isoda H, Sayadi S. The α-glucosidase and α-amylase enzyme inhibitory of hydroxytyrosol and oleuropein. J Oleo Sci 2015; 64(8): 835-843.

Hammiche V, Maiza K. Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. J Ethnopharmacol 2006; 105(3): 358-367.

Hammiche V, Merad R, Azzouz M. Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen. Globulaire. Paris: Springer-Verlag, 2013, str. 133-136.

Hänsel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Band 5. Drogen E-O. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag, 1993, str. 296-299.

Haračić A. L'isola di Lussin, il suo clima e la sua vegetazione. Mali Lošinj: I. R. Scuola nautica di Lussinpiccolo, 1905.

Harborne JB. Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. 3. izd. London: Chapman & Hall, 1998, str. 119-120.

Harborne JB, Williams CA. 6-hydroxyluteolin and scutellarein as phyletic markers in higher plants. Phytochemistry 1971; 10(2): 367-378.

Hartwich C. Die neuen Arzneidrogen aus dem Pflanzenreiche. Berlin-Heidelberg: Springer, 1897, str. 162.

Harvey DJ. Fragmentation of negative ions from carbohydrates: Part 1. Use of nitrate and other anionic adducts for the production of negative ion electrospray spectra from *N*-linked carbohydrates. J Am Soc Mass Spectrom 2005; 16(5): 622-630.

Harzallah HJ, Neffati A, Skandrani I, Maaloul E, Chekir-Ghedira L, Mahjoub T. Antioxidant and antigenotoxic activities of *Globularia alypum* leaves extracts. J Med Plants Res 2010; 4(19): 2048-2053.

Hasanagić E. Ljekovito bilje i jetra (4. izdanje). Sarajevo: Svjetlost, 1984, str. 191.

Hasebe M, Omori T, Nakazawa M, Sano T, Kato M, Iwatsuki K. *rbcL* gene sequences provide evidence for the evolutionary lineages of leptosporangiate ferns. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91(12): 5730–5734.

Hayek A. Prodromus florae peninsulae Balcanicae. Band 2. Berlin-Dahlem: Verlag des Repertoriums, 1927, str. 400-402.

Hazler Pilepić K. Izdvajanje genomske DNA iz biljnog tkiva. U: Ambriović Ristov A, Brozović A, Bruvo Mađarić B, Ćetković H, Herak Bosnar M, Hranilović D, Katušić Hećimović S, Meštrović Radan N, Mihaljević S, Slade N, Vujaklija D (ur.). Metode u molekularnoj biologiji. Zagreb: Institut Ruđer Bošković, 2007, str. 163-165.

Hazler Pilepić K, Friščić M, Duran A, Maslo S, Garić R, Čuljak S, Šutalo K. Contribution to *Globularia* phylogeny based on nuclear ribosomal spacer and two chloroplast DNA regions. Period Biol 2016; 118(4): 417-424.

He J, Hu XP, Zeng Y, Li Y, Wu HQ, Qiu RZ, Ma WJ, Li T, Li CY, He ZD. Advanced research on acteoside for chemistry and bioactivities. J Asian Nat Prod Res 2011; 13(5): 449-464.

Heckel E, Schlagdenhauffen F. Étude chimique des Globulaires. Ann Chim Phys 1883; 28(5): 67-81; J Pharm Chim 1883; 7: 361-366.

Heckel E. Étude monographique de la famille des Globulariées au point de vue botanique, chimique et thérapeutique. Paris: G. Masson, 1894.

Hegi G. Alpenflora. Die verbreitetsten Alpenpflanzen von Bayern, Österreich und der Schweiz. 5. izd. München: J.H. Lehmanns Verlag, 1922, str. 59-60.

Hegi G. Alpenflora. Die verbreitetsten Alpenpflanzen von Bayern, Österreich und der Schweiz. 15. izd. München: Carl Hanser Verlag, 1959, str. 71-72.

Hegi G. Illustrierte Flora von Mittel-Europa. Vol VI/1: Dicotyledones 4 (Scrophulariaceae, Orobanchaceae, Lentibulariaceae, Globulariaceae, Plantaginaceae). 1. izd. München: Carl Hanser Verlag, 1918, str. 171-175.

Hegi G. Illustrierte Flora von Mitteleuropa. Vol. VI/1: Scrophulariaceae, Orobanchaceae, Lentibulariaceae, Globulariaceae, Plantaginaceae. 2. izd. München: Carl Hanser Verlag, 1974, str. 551-558.

Hegnauer R. Chemotaxonomie der Pflanzen: Eine Übersicht über die Verbreitung und die systematische Bedeutung der Pflanzenstoffe. Band 4. Dicotyledoneae: Daphniphyllaceae-Lythraceae. Basel und Stuttgart: Birkhäuser Verlag, 1966, str. 207-209.

Hegnauer R. Chemotaxonomie der Pflanzen: Eine Übersicht über die Verbreitung und die systematische Bedeutung der Pflanzenstoffe. Band 6. Dicotyledoneae: Rafflesiaceae-Zygophyllaceae. Basel: Springer, 1973, str. 364.

Hegnauer R. Chemotaxonomie der Pflanzen: Eine Übersicht über die Verbreitung und die systematische Bedeutung der Pflanzenstoffe. Band 8. Nachträge zu Band 3 und Band 4 (Acanthaceae bis Lythraceae). Basel: Springer, 1989, str. 520-522.

Hegnauer R, Kooiman P. Die systematische Bedeutung von iridoiden Inhaltsstoffen im Rahmen von Wettstein's Tubiflorae. Planta Med 1978; 33(1): 1-33.

Helmstädter A. Ethnopharmacology in the work of Melville William Hilton-Simpson (1881-1938) – historical analysis and current research opportunities. Pharmazie 2016; 71(6): 352-360.

Hermann F. Flora von Nord- und Mitteleuropa. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1956, str. 905-906.

Heywood V. Plant resources and their diversity in the Near East. U: Medicinal, culinary and aromatic plants in the Near East – Proceedings of the International Expert Meeting

organized by the Forest Products Division FAO Forestry Department and the FAO Office for the Near East, 1999, str. 10.

Holländer K, Jäger EJ. Morphologie, Biologie und ökogeographische Differenzierung von *Globularia*. Flora 1994; 189(3): 223-254.

Holländer K, Jäger EJ. Wuchsform und Lebensgeschichte von *Globularia bisnagarica* L. (*G. punctata* Lapeyr., Globulariaceae). Hercynia 1998; 31(2): 143-171.

Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. Breast Cancer Res 2011; 13(4): 215. DOI: 10.1186/bcr2889.

Hong JL, Qin XY, Shu P, Wu G, Wang Q, Qin MJ. Analysis of catalpol derivatives by characteristic neutral losses using liquid chromatography combined with electrospray ionization multistage and time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 2010; 24(17): 2680-2686.

Honnay O, Adriaens D, Coart E, Jacquemyn H, Roldan-Ruiz I. Genetic diversity within and between remnant populations of the endangered calcareous grassland plant *Globularia bisnagarica* L. Conserv Genet 2007; 8(2): 293-303.

Hoppe HA. Drogen kunde. Band 1. Angiospermen. 8. izd. Berlin-New York: Walter de Gruyter, 1975, str. 537.

Horikoshi M, Tang Y. ggfortify: Data visualization tools for statistical analysis results, 2016, https://CRAN.R-project.org/package=ggfortify.

Horvatić S. Ilustrirani bilinar - Priručnik za određivanje porodica i rodova višega bilja. Zagreb: Tisak grafičkog zavoda Hrvatske, 1954, str. 566.

Huang WJ, Niu HS, Lin MH, Cheng JT, Hsu FL. Antihyperglycemic effect of catalpol in streptozotocin-induced diabetic rats. J Nat Prod 2010; 73(6): 1170-1172.

Hung R, Lee S, Rodriguez-Saona C, Bennett JW. Common gas phase molecules from fungi affect seed germination and plant health in *Arabidopsis thaliana*. AMB Express 2014; 4(53): 1-7. DOI: 10.1186/s13568-014-0053-8.

Husain GM, Rai R, Rai G, Singh HB, Thakur AK, Kumar V. Potential mechanism of anti-diabetic activity of *Picrorhiza kurroa*. Tang 2014; 4(4): e27. DOI: 10.5667/tang.2014.0013.

Innocenti M, la Marca G, Malvagia S, Giaccherini C, Vincieri FF, Mulinacci N. Electrospray ionisation tandem mass spectrometric investigation of phenylpropanoids and secoiridoids from solid olive residue. Rapid Commun Mass Spectrom 2006; 20(13): 2013-2022.

Inouye H, Takeda Y, Uobe K, Yamauchi K, Yabuuchi N, Kuwano S. Purgative activities of iridoid glucosides. Planta Med 1974; 25(3): 285-288.

International Conference on Harmonization (ICH). Validation of analytical procedures: text and methodology ICH-Q2 (R1), Geneva, 2005.

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 7. izd. Brussels: International Diabetes Federation, 2015. http://www.idf.org/diabetesatlas.

Islam MN, Ishita IJ, Jung HA, Choi JS. Vicenin 2 isolated from *Artemisia capillaris* exhibited potent anti-glycation properties. Food Chem Toxicol 2014; 69: 55-62.

IUCN Centre for Mediterranean Cooperation. A guide to medicinal plants in North Africa. Málaga: IUCN Centre for Mediterranean Cooperation, 2005, str. 127-128, 142.

Jacini G. Acidi et alcoli superiori in *Globularia alypum*. Gazz Chim Ital 1947; 77: 247-251.

Jaradat NA. Medical plants utilized in Palestinian folk medicine for treatment of diabetes mellitus and cardiac diseases. J Al-Aqsa Unv 2005; 9: 1-28.

Jensen SR. Plant iridoids, their biosynthesis and distribution in angiosperms. U: Harborne JB, Tomás-Barberán FA (ur.). Proceedings of the Phytochemical Society of Europe. Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids. Oxford: Oxford University Press, 1991, str. 133-158.

Jensen SR, Albach DC, Ohno T, Grayer RJ. *Veronica*: Iridoids and cornoside as chemosystematic markers. Biochem Syst Ecol 2005; 33(10): 1031-1047.

Jeong HJ, Kim JS, Hyun TK, Yang J, Kang HH, Cho JC, Yeom HM, Kim MJ. *In vitro* antioxidant and antidiabetic activities of *Rehmannia glutinosa* tuberous root extracts. ScienceAsia 2013; 39(6): 605-609.

Jerković I, Marijanović Z. Volatile composition screening of *Salix* spp. nectar honey: benzenecarboxylic acids, norisoprenoids, terpenes, and others. Chem Biodivers 2010; 7(9): 2309-2325.

Jerković I, Šuste M, Maleš Ž, Hazler Pilepić K. Essential oil composition of *Prasium majus* from Croatia. Nat Prod Commun 2012; 7(7): 931-932.

Jin L, Xue HY, Jin LJ, Li SY, Xu YP. Antioxidant and pancreas-protective effect of aucubin on rats with streptozotocin-induced diabetes. Eur J Pharmacol 2008; 582(1-3): 162-167.

Johnson T. CRC ethnobotany desk reference. Boca Raton: CRC Press, 1999, str. 378.

Josifović M. Flora SR Srbije. Vol. 6. Beograd: Srpska akademija nauka i umetnosti, 1974, str. 313-315.

Jouad H, Haloui M, Rhiouani H, El Hilaly J, Eddouks M. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane). J Ethnopharmacol 2001; 77(2-3): 175-182.

Jouad H, Maghrani M, Eddouks M. Hypoglycaemic effect of *Rubus fructicosis* L. and *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. J Ethnopharmacol 2002; 81(3): 351-356.

Joung DK, Kang OH, Seo YS, Zhou T, Lee YS, Han SH, Mun SH, Kong R, Song HJ, Shin DW, Kwon DY. Luteolin potentiates the effect of aminoglycoside and β-lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus in vitro*. Exp Ther Med 2016; 11(6): 2597-2601.

Kadereit JW, Griebeler EM, Comes HP. Quaternary diversification in European alpine plants: pattern and process. Philos Trans R Soc Lond Biol Sci 2004; 359(1442): 265-274.

Kalenić S, Payerl Pal M, Vlahović Palčevski V, Horvatić J, Meštrović T, Baršić B, Stamenić V, Aleraj B, Buljan M, Gržalja N, Burcar I, Korušić A, Vučić M, Čivljak R, Stančić M, Budimir A. Smjernice za prevenciju, kontrolu i liječenje infekcija koje uzrokuje meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA). Liječ Vjesn 2008; 130: 1-32.

Kamari G, Felber F, Garbari F. Mediterranean chromosome number reports - 5. Flora Mediterranea 1995; 5: 352-353 (261-373).

Kaminski E, Stawicki S, Wasowicz E. Volatile flavor compounds produced by molds of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fungi imperfecti*. Appl Microbiol 1974; 27(6): 1001-1004.

Kara Ali W, Ihoual S, Abidli N. The combination therapy of medicinal plant *Globularia alypum*, with adriamycin limits free radical mediated cardiac injury in rats. Int J Pharm Sci Rev Res 2016; 36(1): 1-8.

Karagiannakidou V, Kokkini S. The flora of Mount Menikion in North East Greece. Phyton 1987; 27(2): 267-283.

Katiri A, Barkaoui M, Msanda F, Boubaker H. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes in the Tizi n' Test Region (Taroudant Province, Morocco). J Pharmacogn Nat Prod 2017; 3(1): 1-10. DOI: 10.4172/2472-0992.1000130.

Kawabata J, Mizuhata K, Sato E, Nishioka T, Aoyama Y, Kasai T. 6-hydroxyflavonoids as α-glucosidase inhibitors from marjoram (*Origanum majorana*) leaves. Biosci Biotechnol Biochem 2003; 67(2): 445-447.

Kawser Hossain M, Abdal Dayem A, Han J, Yin Y, Kim K, Kumar Saha S, Yang GM, Choi HY, Cho SG. Molecular mechanisms of the anti-obesity and anti-diabetic properties of flavonoids. Int J Mol Sci 2016; 17(4): 569. DOI: 10.3390/ijms17040569.

Khabbach A, Libiad M, Ennabili A. Melliferous flora and apiculture in the pre-rif of the province of Taza (North of Morocco). Luna Azul 2013; 36: 78-90.

Khabbach A, Libiad M, Ennabili A. Plant resources use in the province of Taza (North of Morocco). Proenvironment 2011; 4(8): 347-356.

Khabbach A, Libiad M, Ennabili A, Bousta D. Medicinal and cosmetic use of plants from the province of Taza, Northern Morocco. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 2012; 11(1): 46-60.

Khan AW, Khan AU, Ahmed T. Anticonvulsant, anxiolytic, and sedative activities of *Verbena officinalis*. Front Pharmacol 2016; 7: 499. DOI: 10.3389/fphar.2016.00499.

Khantouche L, Motri S, Mejri M, Ben Abderabba M. Evaluation of polyphenols and antioxidant properties of extracts *Globularia alypum* leaves. J New Sci 2015; 24(1): 1086-1090.

Khlifi D, Hamdi M, El Hayouni A, Cazaux S, Souchard JP, Couderc F, Bouajila J. Global chemical composition and antioxidant and anti-tuberculosis activities of various extracts of *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) leaves. Molecules 2011; 16(12): 10592-10603.

Khlifi D, Sghaier RM, Laouni D, Hayouni AA, Hamdi M, Bouajila J. Anti-inflammatory and acetylcholinesterase inhibition activities of *Globularia alypum*. J Med Bioeng 2013; 2(4): 232-237.

Khlifi S, El Hachimi Y, Khalil A, Es-Safi N, El Abbouyi A. *In vitro* antioxidant effect of *Globularia alypum* L. hydromethanolic extract. Indian J Pharmacol 2005; 37(4): 227-231.

Kim JS; Kwon CS, Son KH. Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. Biosci Biotechnol Biochem 2000; 64(11): 2458-2461.

Kinzel H, Stummerer-Schmid H. Verbindungen aus der Aucubin-Gruppe bei *Globularia cordifolia*. Phytochemistry 1970; 9(10): 2237-2239.

Kirmizibekmez H, Akbay P, Sticher O, Çaliş İ. Iridoids from *Globularia dumulosa*. Z Naturforsch 2003a; 58c(3-4): 181-186.

Kirmizibekmez H, Bassarello C, Piacente S, Akaydin G, Çaliş İ. Flavonoid, phenylethanoid and iridoid glycosides from *Globularia aphyllanthes*. Z Naturforsch 2009; 64b(2): 252-256.

Kirmizibekmez H, Bassarello C, Piacente S, Çaliş İ. Phenylethyl glycosides from *Globularia alypum* growing in Turkey. Helv Chim Acta 2008; 91(8): 1525-1532.

Kirmizibekmez H, Çaliş İ, Akbay P, Sticher O. Iridoid and bisiridoid glycosides from *Globularia cordifolia*. Z Naturforsch 2003b; 58c(5-6): 337-341.

Kirmizibekmez H, Çaliş İ, Piacente S, Pizza C. Iridoid and phenylethyl glycosides from *Globularia sintenisii*. Helv Chim Acta 2004a; 87(5): 1172-1179.

Kirmizibekmez H, Çaliş İ, Piacente S, Pizza C. Phenolic compounds from *Globularia cordifolia*. Turk J Chem 2004b; 28(4): 455-460.

Kishimoto K, Matsui K, Ozawa R, Takabayashi J. Volatile 1-octen-3-ol induces a defensive response in *Arabidopsis thaliana*. J Gen Plant Pathol 2007; 73(1): 35-37.

Klimek B. Acylated 6-hydroxyluteolin diglucosides from *Globularia elongata*. Phytochemistry 1988; 27(1): 255-258.

Kliphuis E, Wieffering JH. Chromosome numbers of some angiosperms from the south of France. Plant Biol 1972; 21(6): 598-604.

Kokić S. Dijagnostika i liječenje šećerne bolesti tipa 2. Medix 2009; 15(80-81): 90-98.

Kooiman P. Ein phytochemischer Beitrag zur Lösung des Verwandtschaftsproblems der Theligonaceae. Österr Bot Z 1971; 119(4-5): 395-398.

Korkmaz M, Alpaslan Z. [Ethnobotanical properties of Ergan Mountain (Erzincan--Turkey)]. Bağbahçe Bilim Dergisi 2014; 1(3): 1-31.

Kraus TEC, Dahlgren RA, Zasoski RJ. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems – a review. Plant Soil 2003; 256(1): 41-66.

Krimat S, Dob T, Lamari L, Boumeridja S, Chelghourn C, Metidji H. Antioxidant and antimicrobial activities of selected medicinal plants from Algeria. J Coast Life Med 2014; 2(6): 478-483.

Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food Bioprod Process 2011; 89(3): 217-233.

Kröber AF. Folia Alypi – die Austauschdroge für Sennesblätter. Deutsche Drogistenschaft 1942; 11.

Kumar N, Kishore K. Chemical and herbal remedies for constipated patients: A review. Ind J Drugs 2013; 1(2): 23-37.

Kumar S, Narwal S, Kumar V, Prakash O. α-glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. Pharmacogn Rev 2011; 5(9): 19-29.

Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. Sci World J 2013; Article ID 162750: 1-16. DOI: 10.1155/2013/162750.

Kumar V, Sood H, Sharma M, Chauhan RS. A proposed biosynthetic pathway of picrosides linked through the detection of biochemical intermediates in the endangered medicinal herb *Picrorhiza kurroa*. Phytochem Anal 2013; 24(6): 598-602.

Kuroda M, Iwabuchi K, Mimaki Y. Chemical constituents of the aerial parts of *Scutellaria lateriflora* and their alpha-glucosidase inhibitory activities. Nat Prod Commun 2012; 7(4): 471-474.

Kušan F. Biljni pokrov Biokova (Flora i vegetacija). Zagreb: JAZU, 1969, str. 159.

Kušan F. Folia Alypi i vrste roda *Globularia* u Hrvatskoj. Vjestnik Ljekarnika 1943; 25: 29-32; 43-46.

Kušan F. Ljekovito bilje. Sistematski prikaz najvažnijeg ljekovitog, otrovnog i industrijskog (tehničkog) bilja čitavog svijeta. Zagreb: Izdano u vlastitoj nakladi, 1938, str. 341-342.

Kušan F. Ljekovito i drugo korisno bilje. Zagreb: Poljoprivredni nakladni zavod, 1956, str. 486.

Kuzmanov B. Chromosome numbers of bulgarian angiosperms: An introduction to a chromosome atlas of the Bulgarian flora. Flora Mediterranea 1993; 3: 19-163.

Lamarck JB, De Candolle AP. Flore française, ou Descriptions succinctes de toutes les plantes qui croissent naturellement en France, disposées selon une nouvelle méthode d'analyse, et précédées par un exposé des principes élémentaires de la botanique. 3. izd. Vol. 3. Paris: Chez Desray, 1815, str. 427-429.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 2007; 23(21): 2947-2948.

Larsen K. Cytological observations on some species of *Globularia.* Bot Not 1957; 110(2): 265-270.

Le Floc'h E. Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne. Programme 'Flore et végétation tunisiennes'. Tunis: Imprimerie officielle de la République Tunisienne, 1983.

Lee DD, Lee EY, Jeong SH, Chang CL. Evaluation of a colorimetric broth microdilution method for antimicrobial susceptibility testing using 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. Korean J Clin Microbiol 2007a; 10(1): 49-53.

Lee KW, Kim HJ, Lee YS, Park HJ, Choi JW, Ha J, Lee KT. Acteoside inhibits human promyelocytic HL-60 leukemia cell proliferation via inducing cell cycle arrest at G_0/G_1 phase and differentiation into monocyte. Carcinogenesis 2007b; 28(9): 1928-1936.

Lee YS, Jung EK, Cha JD. Synergistic effect between baicalein and antibiotics against clinic methicillin and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. Chemo Open Access 2015; 4(1): 141. DOI: 10.4172/2167-7700.1000141.

Leporatti ML, Ghedira K. Comparative analysis of medicinal plants used in traditional medicine in Italy and Tunisia. J Ethnobiol Ethnomed 2009; 5:31: 1-8.

Li B, Zhang DM, Luo YM, Chen XG. Three new and antitumor anthraquinone glycosides from *Lasianthus acuminatissimus* Merr. Chem Pharm Bull 2006; 54(3): 297-300.

Li CM, Zhang XL, Xue XY, Zhang FF, Xu Q, Liang XM. Structural characterization of iridoid glucosides by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 2008; 22(12): 1941-1954.

Li DK, Liu L, Odouli R. Exposure to non-steroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy and risk of miscarriage: population based cohort study. BMJ 2003; 327(7411): 368-372.

Licata M, Tuttolomondo T, Leto C, Virga G, Bonsangue G, Cammalleri I, Gennaro MC, La Bella S. A survey of wild plant species for food use in Sicily (Italy) – results of a 3-year study in four Regional Parks. J Ethnobiol Ethnomed 2016; 12(12): 1-24. DOI: 10.1186/s13002-015-0074-7.

Lin LZ, Mukhopadhyay S, Robbins RJ, Harnly JM. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. J Food Comp Anal 2007; 20(5): 361-369.

Liu Q, Hu HJ, Li PF, Yang YB, Wu LH, Chou GX, Wang ZT. Diterpenoids and phenylethanoid glycosides from the roots of *Clerodendrum bungei* and their inhibitory effects against angiotensin converting enzyme and α-glucosidase. Phytochemistry 2014; 103: 196-202.

Lindley J. A natural system of botany, or, a systematic view of the organization, natural affinities, and geographical distribution of the whole vegetable kingdom; together with the uses of the most important species in medicine, the arts, and rural or domestic economy. 2. izd. London: Longman, Rees, Orme, Brown, Green, and Longman, 1836, str. 268.

Linné C. Species Plantarum: exhibentes plantas rite cognitas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas. Vol 1. Holmiae: Impensis Laurentii Salvii, 1753, str. 95-97.

Llorent-Martinez EJ, Spinola V, Gouveia S, Castilho PC. HPLC-ESI-MS^n characterization of phenolic compounds, terpenoid saponins, and other minor compounds in *Bituminaria bituminosa*. Ind Crop Prod 2015; 69: 80-90.

Llusià J, Peñuelas J, Alessio GA, Estiarte M. Seasonal contrasting changes of foliar concentrations of terpenes and other volatile organic compound in four dominant species of a Mediterranean shrubland submitted to a field experimental drought and warming. Physiol Plant 2006; 127(4): 632-649.

L'Obel M, Pena P. Stirpium adversaria nova. Londini: Thomae Purfoetii ad Lucretiae symbolum, 1571, str. 158-159.

Loiseleur-Deslongshamps JLA. Recherches et observations sur l'emploi de Plusieurs plantes de France, qui, dans la pratique de la médecine, peuvent remplacer un certain nombre de substances exotiques; pour servir a la matière médicale indigène. Paris: Chez Méquignon aîné, 1819, str. 30-37.

López González G. Aportaciones a la flora de la provincia de Cuenca. Nota III: Algunas plantas nuevas o poco conocidas. An Jard Bot Madr 1980; 37(1): 95-99.

López Udias S, Fabregat Llueca C, Mateo Sanz G. Acerca de *Globularia repens* Lam. subsp. *borjae* G. López (Globulariaceae), endemismo del Sistema Ibérico. Fl Montiberica 2000; 16: 33-36.

Louis S, Dargouth-Kesraoui F, Baghdikian B, Elias R, Boukef K, Balansard G. High performance liquid chromatographic determination of globularin in *Globularia alypum* L. Pharmazie 1999; 54(4); 309-310.

Löve A, Löve D. Cytotaxonomic studies on boreal plants III, some new chromosome numbers in Scandinavian plants. Arkiv Bot 1944; 31 A: 1-22.

Luber P, Bartelt E, Genschow E, Wagner J, Hahn H. Comparison of broth microdilution, E test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J Clin Microbiol 2003; 41(3): 1062-1068.

Luhan M. Über das Vorkommen von Sklerenhym-Idioblasten bei *Globularia*-Arten. Ber Deutsch Bot Ges 1954; 67(9): 346-355.

Ljubičić I, Britvec M, Plazibat M, Vitasović Kosić I. Flora of the south-western part of the national park "Northern Velebit". Agric Consp Sci 2010; 75(2): 67-73.

Ma YC, Zhang M, Xu WT, Feng SX, Lei M, Yi B. [Chemical constituents from *Callicarpa nudiflora* and their cytotoxic activities]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2014; 39(16): 3094-3101.

Madunić J, Matulić M, Friščić M, Hazler Pilepić K. Evaluation of the cytotoxic activity of *Hypericum* spp. on human glioblastoma A1235 and breast cancer MDA MB-231 cells. J Environ Sci Health A 2016; 51(13): 1157-1163.

Maechler M, Rousseeuw P, Struyf A, Hubert M, Hornik K. cluster: Cluster analysis basics and extensions, 2017, R package version 2.0.6.

Mahbob ENM, Ahmad R, Ahmad S. Nitric oxide (NO) radical inhibitory of *Hedyotis philippinensis* and its marker compound, asperuloside. Mal J Fund Appl Sci 2014; 10(1): 7-11.

Mahibalan S, Rao PC, Khan R, Basha A, Siddareddy R, Masubuti H, Fujimoto Y, Begum AS. Cytotoxic constituents of *Oldenlandia umbellata* and isolation of a new symmetrical coumarin dimer. Med Chem Res 2016; 25(3): 466-472.

Mammen D, Daniel M. A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. Food Chem 2012; 135(3): 1365-1368.

Mamoucha S, Christodoulakis N. Ανατομική και ιστοχημική μελέτη του φύλλου του φυτού *Globularia alypum* L. [Anatomical and histochemical study of *G. alypum* leaves]. Proceedings of the 9th National Conference "Environment and Man". Athens: Biomedical Research Foundation Academy of Athens, 2014, str. 90-100.

Mamta S, Jyoti S. Phytochemical screening of *Acorus calamus* and *Lantana camara*. Int Res J Pharm 2012; 3(5): 324-326.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr 2004; 79(5): 727-747.

Manayi A, Kurepaz-Mahmoodabadi M, Gohari AR, Ajani Y, Saeidnia S. Presence of phthalate derivatives in the essential oils of a medicinal plant *Achillea tenuifolia*. DARU J Pharm Sci 2014; 22(1): 78. DOI: 10.1186/s40199-014-0078-1.

Mansour RB, Gargouri B, Gargouri B, Elloumi N, Ben Haj Jilani I, Ghrabi-Grammar Z, Lassoued S. Investigation of antioxidant activity of alcoholic extract of *Globularia alypum* L. J Med Plants Res 2012; 6(25): 4193-4199.

Marak HB, Biere A, Van Damme JMM. Systemic, genotype-specific induction of two herbivore-deterrent iridoid glycosides in *Plantago lanceolata* L. in response to fungal infection by *Diaporthe adunca* (Rob.) Niessel. J Chem Ecol 2002; 28(12): 2429-2448.

Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. J Biochem Mol Toxicol 2003; 17(1): 24-38.

Marrero Rodriguez A, Almeida Pérez RS. *Globularia ascanii*. The IUCN red list of threatened species, 2011;e.T162225A5560690.http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK. 2011-1.RLTS. T162225A5560690.en, pristupljeno 29. 8. 2017.

Maryama H, Benkhnigue O, Touria H, El Bouhaddioui M, Bouabadi I, Rochdi A, Lahcen Z. Contribution to the ethnobotanical study of antidiabetic medicinal plants of the Central Middle Atlas region (Morocco). Lazaroa 2016; 37: 135-144.

Martinčić A, Sušnik F. Mala flora Slovenije. Ljubljana: Cankarjeva založba, 1969, str. 297.

Martius C. On wild senna. Pharm J Trans 1857; 16: 426-427.

Masella R, Di Benedetto R, Varì R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. J Nutr Biochem 2005; 16(10): 577-586.

Mateos MA, Valdés B. A new species of *Globularia* (Globulariaceae) from the Talassemtane National Park, N Morocco. Willdenowia 2006; 36(1): 409-412.

Matsuda H, Morikawa T, Yoshikawa M. Antidiabetogenic constituents from several natural medicines. Pure Appl Chem 2002; 74(7): 1301-1308.

Meddah B, Tir touil A, Leke A, Nahnouh N, Canarelli JP, Krim G. Alternative treatment of infection by compounds isolated from *Globularia eriocephala* leaves. Adv Environ Biol 2011; 5(2): 227-230.

Mehdioui R, Chattou Z, Zaid EH. Interrelation between socio-economic factors of the nearby populations and plant resources of the Amsittene forest (Essaouira-Morocco). Arxius Univ Valencia 2009; 20: 71- 83.

Mehdioui R, Kahouadji A. Etude ethnobotanique auprès de la population riveraine de la forêt d'Amsittène: cas de la Commune d'Imi n'Tlit (Province d'Essaouira). Bull Inst Sci Rabat Sect Sci Vie 2007; 29: 11-20.

Mehta SK, Gowder SJT. Members of antioxidant machinery and their functions. U: Gowder SJT (ur.). Basic principles and clinical significance of oxidative stress. InTech, 2015, str. 59-85. DOI: 10.5772/61884.

Merck E. E. Merck's wissenschaftliche Abhandlungen aus den Gebieten der Pharmakotherapie, Pharmazie und verwandter Disziplinen Nr. 36 Glykoside. Darmstadt: E. Merck, 1921, str. 64-67.

Merghache S, Zerriouh M, Merghache D, Tabti B, Djaziri R, Ghalem S. Evaluation of hypoglycaemic and hypolipidemic activities of globularin isolated from *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. J Appl Pharm Sci 2013; 3(4): 1-7.

Meriah S. Contribution à l'étude chimique et biologique de *Globularia alypum* L. et *Ruta chalepensis* L., deux plantes de la flore de la région de Tlemcen utilisées en médecine traditionnelle (disertacija). Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, 2007.

Merzouki A, Ed-derfoufi F, Molero Mesa J. Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine. II: Folk medicine in Ksar Lakbir district (NW Morocco). Fitoterapia 2000; 71(3): 278-307.

Messaoudi Moussi I, Filali H, Tazi A, Hakkou F. Ethnobotanical survey of healing medicinal plants traditionally used in the main Moroccan cities. J Pharmacogn Phytother 2015; 7(8): 164-182.

Miara MD, Ait Hammou M, Hadjadj Aoul S. Phytothérapie et taxonomie des plantes médicinales spontanées dans la région de Tiaret (Algérie). Phytothérapie 2013; 11(4): 206-218.

Mickisch G, Fajta S, Keilhauer G, Schlick E, Tschada R, Alken P. Chemosensitivity testing of primary human renal cell carcinoma by a tetrazolium based microculture assay (MTT). Urol Res 1990; 18(2): 131–136.

Milletti N. Revisione sistematica del genere *Globularia* L. (Globulariaceae) in Italia (disertacija). Università degli Studi di Firenze, 1987.

Milletti N, Jarvis CE. Linnaean names in the genus *Globularia* L. (Globulariaceae) and their typification. Taxon 1987; 36(3): 635-639.

Milletti N, Mori B. Números chromosomáticos de plantas occidentales. An Jard Bot Madrid 1988; 45(1): 267-272.

Milletti N, Strid A. Globulariaceae. U: Strid A, Tan K. Mountain flora of Greece. Vol. 2. Edinburgh: Edinburgh University Press, 1991, str. 257-259.

Milovanović D. Atlas lekovitog bilja. Beograd: IP „Velarta", 2005, str. 15.

Mindes J. Manuale der neuen Arzneimittel für Apotheker, Ärzte und Drogisten. Zürich: Art Institut Orell Füssli, 1902, str. 118.

Moco S, Bino RJ, Vorst O, Verhoeven HA, de Groot J, van Beek TA, Vervoort J, Ric de Vos CH. A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. Plant Physiol 2006; 141(4): 1205-1218.

Molisch H, Fulling EH. The longevity of plants. New York: The translator, 1938, str. 74.

Montanari B. A critical analysis of the introduction of essential oil distillation in the High Atlas of Morocco with reference to the role of gendered traditional knowledge (disertacija). School of Anthropology and Conservation, University of Kent, 2012, str. 130.

Montanari B. Aromatic, medicinal plants and vulnerability of traditional herbal knowledge in a Berber community of the High Atlas mountains of Morocco. Plant Diversity Resour 2014; 36(3): 388-402.

Nakamura T, Okuyama E, Tsukada A, Yamazaki M, Satake M, Nishibe S, Deyama T, Moriya A, Maruno M, Nishimura H. Acteoside as the analgesic principle of Cedron (*Lippia triphylla*), a Peruvian medicinal plant. Chem Pharm Bull 1997; 45(3): 499-504.

Nazemiyeh H, Rahman MM, Gibbons S, Nahar L, Delazar A, Ghahramani MA, Talebpour AH, Sarker SD. Assessment of the antibacterial activity of phenylethanoid glycosides from *Phlomis lanceolata* against multiple-drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. J Nat Med 2008; 62(1): 91-95.

Nei M, Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. New York: Oxford University Press, 2000, str. 126.

Nikolić T. Flora Croatica, Index florae Croaticae Pars 3. Nat Croat 2000; 9(1): 1-324.

Nikolić T, Topić J. Crvena knjiga vaskularne flore Hrvatske. Zagreb: Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Republika Hrvatska, 2005, str. 551.

Noirot M, Barre P, Duperray C, Louarn J, Hamon S. Effects of caffeine and chlorogenic acid on propidium iodide accessibility to DNA: consequences on genome size evaluation in coffee tree. Ann Bot 2003; 92(2): 259-264.

Nyman CF. Conspectus florae Europaeae: seu Enumeratio methodica plantarum phanerogamarum Europae indigenarum, indicatio distributionis geographicae singularum etc. Örebro Sueciae: Typis Officinae Bohlinianae, 1878-1882, str. 608-609.

Ohno T, Inoue M, Ogihara Y, Saracoglu I. Antimetastatic activity of acteoside, a phenylethanoid glycoside. Biol Pharm Bull 2002; 25(5): 666-668.

Okhale SE, Egharevba HO, Ona EC, Kunle OF. Phytochemical and proximate analyses and thin layer chromatography fingerprinting of the aerial part of *Chenopodium ambrosioides* Linn. (Chenopodiaceae). J Med Plants Res 2012; 6(12): 2289-2294.

Olmstead RG, DePamphilis CW, Wolfe AD, Young ND, Elisons WJ, Reeves PA. Disintegration of the Scrophulariaceae. Am J Bot 2001; 88(2): 348-361.

Omar GO, El Fituri O, Abouseif AS, El Debani AKA, Saeed S, Elshaari F, Abdellatif AG. Antihyperlipidemic activities of the endogenous plant *Globularia alypum* extract (GAE) in experimental animals. J Basic Med Allied Sci 2013; 26566.

Oran SA. Potato dics bioassay for some Jordanian medicinal plants. Pharm Biol 1999; 37(4): 296-299.

Oran SA, Kochkar N, Raies A. Biosystematics of two species of the genus *Globularia* L. in Jordan and Tunisia. Dirasat Pure Sci 1999; 26(2): 203-210.

Oran SA, Raies A. Antimicrobial activity of *Globularia arabica* Jaub. and Spach and *G. alypum* L. (Globulariaceae). Dirasat Pure Sci 2000; 27(1): 71-73.

Orch H, Douira A, Zidane L. Étude ethnobotanique des plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète, et des maladies cardiaques dans la région d'lzarène (Nord du Maroc). J Appl Biosci 2015; 86: 7940-7956.

Otto F. High resolution DNA-flow cytometry using DAPI. Partec, protocol 1. Münster, Arlesheim: Partec, 1988, str. 6.

Ouelbani R, Bensari S, Mouas TN, Khelifi D. Ethnobotanical investigations on plants used in folk medicine in the regions of Constantine and Mila (North-East of Algeria). J Ethnopharmacol 2016; 194: 196-218.

Ouhaddou H, Boubaker H, Msanda F, El Mousadik A. An ethnobotanical study of medicinal plants of the Agadir Ida Ou Tanane Province (Southwest Morocco). J Appl Biosci 2014; 84: 7707-7722.

Oxelman B, Backlund M, Bremer B. Relationships of the Buddlejaceae s.l. investigated using parsimony jackknife and branch support analysis of chloroplast *ndh*F and *rbc*L sequence data. Syst Bot 1999; 24(2): 164-182.

Oxelman B, Kornhall P, Olmstead RG, Bremer B. Further disintegration of Scrophulariaceae. Taxon 2005; 54(2): 411-425.

Özkan G. Türkiye' de yayılış gösteren bazı *Globularia* L. (Globulariaceae) türlerinin polen morfolojisi [Pollen morphology of some *Globularia* L. (Globulariaceae) species distributed in Turkey] (magistarski rad). Nevşehir Hacı Bektaş Veli University, 2015.

Palmeira CM, Rolo AP, Berthiaume J, Bjork JA, Wallace KB. Hyperglycemia decreases mitochondrial function: The regulatory role of mitochondrial biogenesis. Toxicol Appl Pharmacol 2007; 225(2): 214-220.

Panckoucke CLF. Dictionaire des sciences médicales par une société de médecins et de chirurgiens. Vol. 18. Paris: C. L. F. Panckoucke, 1817, str. 474-481.

Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxid Med Cell Longev 2009; 2(5): 270-278.

Paris R. Sur le noircissement des feuilles de Globulaire Turbith (*Globularia alypum* L.). Bull Soc Bot France 1946; 93(5-6): 159-162.

Paris R, Chaslot M. Characterisation et determination de l'aucuboside dans les dicotyledons. Ann Pharm Fr 1955; 13(11): 648-657.

Park KS, Kim BH, Chang IM. Inhibitory potencies of several iridoids on cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2 enzymes activities, tumor necrosis factor-α and nitric oxide production *in vitro*. Evid Based Complement Alternat Med 2010; 7(1): 41-45.

Pathak AK, Dutta N, Pattanaik AK, Sharma K, Banerjee PS, Goswami TK. The effect of condensed tannins supplementation through *Ficus infectoria* and *Psidium guajava* leaf meal mixture on erythrocytic antioxidant status, immune response and gastrointestinal nematodes in lambs (*Ovis aries*). Vet Arhiv 2017; 87(2): 139-156.

Pavlić Renar I. Dijagnostika i liječenje šećerne bolesti tipa 1. Medix 2009; 15(80-81): 100-106.

Pellicer J, Estiarte M, Garcia S, Garnatje T, Peñuelas J, Sardans J, Vallès J. Genome size unaffected by moderate changes in climate and phosphorus availability in Mediterranean plants. Afr J Biotechnol 2010; 9(37): 6070-6077.

Pendota SC, Aderogba MA, Ndhlala AR, Van Staden J. Antimicrobial and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Buddleja salviifolia* (L.) Lam. leaf extracts and isolated compounds. J Ethnopharmacol 2013; 148(2): 515-520.

Petrussa E, Braidot E, Zancani M, Peresson C, Bertolini A, Patui S, Vianello A. Plant flavonoids – Biosynthesis, transport and involvement in stress responses. Int J Mol Sci 2013; 14(7), 14950–14973.

Peyer W. Folia Alypi. Süddtsch Apoth Ztg 1942; 82(59-60): 253.

Pignatti S. Flora d'Italia. Vol. 2. Bologna: Edagriculture, 1982, str. 620-623.

Piskernik A. Ključ za določanje cvetnic in praprotnic. Ljubljana: Banovinska zaloga šolskih knjig in učil, 1941, str. 84.

Pisoschi AM, Pop A, Cimpeanu C, Predoi G. Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review. Oxid Med Cell Longev 2016; Article ID 9130976, 1-36. DOI: 10.1155/2016/9130976.

Planchon G. Des Globulaires au point de vue botanique et médical. Montpellier: Typographie de Boehm, 1859.

Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. BMC Bioinformatics 2010; 11: 395. DOI: 10.1186/1471-2105-11-395.

Podpěra J. Ein Beitrag zu den Vegetationsverhäaltnissen von Südbulgarien (Ostrumelien). Verh Zool Bot Ges Wien 1902; 52(10): 608-694.

Poljičanin T, Smirčić Duvnjak L, Vinković M, Kolarić V. Šećerna bolest u Republici Hrvatskoj 2005.-2014. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2015.

Porter A. A dead end: a review of glioblastoma multiforme. Eukaryon 2012; 8: 64-68.

Praglowski J, Gyllander K. Globulariaceae. U: Erdtman G. World pollen flora 4. Copenhagen: Munksgaard, 1970, str. 1-21.

Praprotnik N. Henrik Freyer in njegov seznam slovanskih rastlinskih imen (Verzeichniß ſlavischen Pflanzen-Namen) iz leta 1836. Scopolia 2007; 61: 1-99.

Praprotnik N. Prof. dr. Vlado Ravnik – devetdesetletnik. Folia Biol Geol 2015; 56(3): 7-9.

Prieto P, Peñuelas J, Ogaya R, Estiarte M. Precipitation-dependent flowering of *Globularia alypum* and *Erica multiflora* in Mediterranean shrubland under experimental drought and warming, and its inter-annual variability. Ann Bot 2008; 102(2): 275-285.

Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. J Agric Food Chem 2005; 53(10): 4290-4302.

Punt W, Marks A. The northwestern European pollen flora, 49. Globulariaceae. Rev Palaeobot Palynol 1991; 69(1-3): 109-112.

Qi LW, Chen CY, Li P. Structural characterization and identification of iridoid glycosides, saponins, phenolic acids and flavonoids in Flos Lonicerae Japonicae by a fast liquid chromatography method with diode-array detection and time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 2009; 23(19): 3227-3242.

Quennoz M. Medicinal and aromatic plants in Switzerland. U: Lipman E (ur.). Report of a working group on medicinal and aromatic plants. Second Meeting, 16–18 December 2004, Strumica, Macedonia FYR, Third Meeting, 26–28 June 2007, Olomouc, Czech Republic, str. 214.

Quezel P, Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Vol. 2. Paris: Centre National de la Recherche Scientifique, 1963, str. 860.

R Development Core Team. A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2014. URL http://www.R-project.org.

Rached W, Benamar H, Bennaceur M, Marouf A. Screening of the antioxidant potential of some Algerian indigenous plants. J Biol Sci 2010; 10(4): 316-324.

Radev R. Pharmacological effects of phenylethanoid glycosides. J Clin Med 2010; 3(2): 20-23.

Radić J. Bilje Biokova. Makarska: Institut Planina i more, Malakološki muzej: SIZ za kulturu općine; Zagreb: Grafički zavod Hrvatske, 1976, str. 140-141.

Radu N, Ghita I, Rau I. Therapeutic effect of irridoidic compounds from *Plantago* species. Mol Cryst Liq Cryst 2010; 523(1): 289-296.

Rahelić D, Altabas V, Bakula M, Balić S, Balint I, Bergman Marković B, Bičanić N, Bjelinski I, Božikov V, Canecki Varžić S, Car N, Cigrovski Berković M, Crnčević Orlić Ž, Deškin M, Drvodelić Šunić E, Gojo Tomić N, Goldoni V, Gradišer M, Herman Mahečić D, Jandrić Balen M, Jurišić Eržen D, Klobučar Majanović S, Kokić S, Krnić M, Kruljac I, Liberati-Čižmek AM, Lukšić M, Marušić S, Matić T, Metelko Ž, Mirošević G, Mlinarić Vrbica S, Pavlić Renar I, Petric D, Prašek M, Prpić-Križevac I, Radman M, Soldo D, Šarić T, Tešanović S, Tičinović Kurir T, Turk Wensveen T, Vrca Botica M, Vrkljan M, Zjačić Rotkvić V, Zorić Č, Krznarić Ž. Hrvatske smjernice za farmakološko liječenje šećerne bolesti tipa 2. Liječ Vjesn 2016; 138(1-2): 1-21.

Raj R, Sahay S, Tripathi J. Medications of diabetes mellitus and antidiabetic medicinal plants: A review. Int J Ind Herbs Drugs 2016; 1(1): 19-28.

Ramdani M, Lograda T, Ounoughi A, Chalard P, Figueredo G, Laidoudi H, ElKolli M. Chemical composition, antimicrobial activity and chromosome number of *Globularia alipum* from Algeria. Int J Curr Microbiol Appl Sci 2014; 3(7): 306-318.

Ramos P, Santos SAO, Guerra AR, Guerreiro O, Felício L, Jerónimo E, Silvestre AJD, Pascoal Neto C, Duarte M. Valorization of olive mill residues: antioxidant and breast cancer antiproliferative activities of hydroxytyrosol-rich extracts derived from olive oil by-products. Ind Crop Prod 2013; 46: 359-368.

Raszka B, Zienkiewicz A, Kalbarczyk R, Kalbarczyk E. Revitalization of urban courtyards in Wrocław (Southwestern Poland). Pol J Nat Sci 2014; 29(3): 225-237.

Rauh W. Alpenpflanzen. Vol. 3. Heidelberg: Carl Winter, Universitätsverlag, 1952, str. 22-23.

Ravnik V. Morfološko-sistematska in horološka problematika vrste *Globularia cordifolia* L. s. lat. Ljubljana: SAZU, Razr prir med vede, Odd prir vede, Razprave 1965; 8: 5-41.

Ravnik V. Zur morphologischen und taxonomischen Problematik von *Globularia cordifolia* L. im Bereiche der südöstlichen Kalkalpen und des illyrischen Übergangsgebietes. Jahrb Ver Schutz Alpenpfl u -Tiere 1962; 27: 119-121.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 1999; 26(9-10): 1231-1237.

Reiniger EA, Bauer R. Prostaglandin-H-synthase (PGHS)-1 and -2 microtiter assays for the testing of herbal drugs and *in vitro* inhibition of PGHS-isoenzyms by polyunsaturated fatty acids from Platycodi radix. Phytomedicine 2006; 13(3): 164-169.

Ren L, Xue X, Zhang F, Wang Y, Liu Y, Li C, Liang X. Studies of iridoid glycosides using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 2007; 21(18): 3039-3050.

Ribeiro D, Freitas M, Tomé SM, Silva AMS, Laufer S, Lima JLFC, Fernandes E. Flavonoids inhibit COX-I and COX-II enzymes and cytokine/chemokine production in human whole blood. Inflammation 2015; 38(2): 858-870.

Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2011; 31(5): 986-1000.

Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell viability assays. U: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, Grossman A, Arkin M, Auld D, Austin C, Baell J, Bejcek B, Chung TDY, Dahlin JL, Devanaryan V, Foley TL, Glicksman M, Hall MD, Hass JV, Inglese J, Iversen PW, Kahl SD, Lal-Nag M, Li Z, McGee J, McManus O, Riss T, Trask OJ Jr., Weidner JR, Xia M, Xu X. Assay guidance manual. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. objavljeno 01.05.2013. [ažurirano 01.07.2016.].

Rohn S, Buchner N, Driemel G, Rauser M, Kroh LW. Thermal degradation of onion quercetin glucosides under roasting conditions. J Agric Food Chem 2007; 55(4): 1568-1573.

Romeiras MM, Monteiro F, Duarte MC, Schaefer H, Carine M. Patterns of genetic diversity in three plant lineages endemic to the Cape Verde Islands. AoB Plants 2015; plv051. DOI: 10.1093/aobpla/plv051.

Rønsted N, Franzyk H, Mølgaard P, Jaroszewski JW, Jensen SR. Chemotaxonomy and evolution of *Plantago*. Plant Syst Evol 2003; 242(1-4): 63-82.

Rønsted N, Göbel E, Franzyk H, Jensen SR, Olsen CE. Chemotaxonomy of *Plantago*. Iridoid glucosides and caffeoyl phenylethanoid glycosides. Phytochemistry 2000; 55(4): 337-348.

Rønsted N, Jensen SR. Iridoid glucosides and caffeoyl phenyethanoid glycosides from *Campylanthus salsaloides* and *Campylanthus glaber*. Biochem Syst Ecol 2002; 30(11): 1091-1095.

Rossi LJ. Floristička istraživanja po jugoistočnoj Hrvatskoj. Poseban otisak iz „Glasnika Hrvatskoga prirodoslovnoga društva“ godišta XXVII. Zagreb: Tisak Kr. zemaljske tiskare, 1915.

Rouached H. Multilevel coordination of phosphate and sulfate homeostasis in plants. Plant Signal Behav 2011; 6(7): 952-955.

Rouy MG. Herborisations a Lus la Croix-Haute (Drôme) et a Peyruis (Baases-Alpes), les 13 et 14 septembre 1882. Bull Soc Bot Fr 1882; 29(9): 341-352.

Rouzer CA, Marnett LJ. Cyclooxygenases: structural and functional insights. J Lipid Res 2009; 50: 29-34.

Saadi B, Msanda F, Boubaker H. Contributions of folk medicine knowledge in South-western Morocco: The case of rural communities of Imouzzer Ida Outanane Region. Int J Med Plant Res 2013; 2(1): 135-145.

Sağlam H, Akay S, Kivçak B. Quantitative determination of α-tocopherol in *Globularia alypum* using high-performance liquid chromatography with UV detection. Pharm Biol 2004; 42(7): 519-520.

Sah JN, Varshney VK. Chemical constituents of *Picrorhiza* genus: a review. Am J Essent Oil Nat Prod 2013; 1(2): 22-37.

Sahpaz S, Garbacki N, Tits M, Bailleul F. Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. J Ethnopharmacol 2002; 79(3): 389-392.

Sales F, Hedge IC. Globularia. U: Paiva J, Sales F, Hedge IC, Aedo C, Aldasoro JJ, Castroviejo S, Herrero A, Velayos M. Flora iberica. Plantas vasculares de la Peninsula Ibérica e Islas Baleares. Vol. XIV Myoporaceae-Campanulaceae. Madrid: Real Jardín Botánico, Consejo Superior de Investigationes Científicas, 2001, str. 7-20.

Sambamurty AVSS. Taxonomy of angiosperms. New Delhi-Bangalore: I.K. International Pvt. Ltd., 2005, str. 682, 834.

Sampaio-Santos MI, Kaplan MAC. Biosynthesis significance of iridoids in chemosystematics. J Braz Chem Soc 2001; 12(2): 144-153.

Sandhar HK, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P. A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. Int Pharma Sci 2011; 1(1): 25-41.

Saracoglu I, Inoue M, Calis I, Ogihara Y. Studies on constituents with cytotoxic and cytostatic activity of two Turkish medicinal plants *Phlomis armeniaca* and *Scutellaria salviifolia*. Biol Pharm Bull 1995; 18(10): 1396-1400.

Sari M, Sarri D, Hendel N, Boudjelal A. Ethnobotanical study of therapeutic plants used to treat arterial hypertension in the Hodna region of Algeria. Global J Res Med Plants & Indigen Med 2012; 1(9): 411-417.

Sarri M, Boudjelal A, Hendel N, Sarri D, Benkhaled A. Flora and ethnobotany of medicinal plants in the southeast of the capital of Hodna (Algeria). Arab J Med Aromat Plants 2015; 1(1): 24-30.

Sass JE. Botanical microtechnique. 2. izd. Ames: The Iowa State College Press, 1951, str. 97-98.

Savithramma N, Linga Rao M, Suhrulatha D. Screening of medicinal plants for secondary metabolites. Middle-East J Sci Res 2011; 8(3): 579-584.

Savolainen V, Chase MW, Hoot SB, Morton CM, Soltis DE, Bayer C, Fay MF, De Bruijn AY, Sullivan S, Qiu YL. Phylogenetics of flowering plants based on combined anaylsis of plastid *atp*B and *rbc*L gene sequences. Syst Biol 2000; 49(2): 306-362.

Scharfetter R. Biographien von Pflanzensippen. Wien: Springer-Verlag, 1953, str. 307-312.

Schlosser JCK, Vukotinović LJ. Flora Croatica. Zagrebie: Apud Fr. Župan (Albrecht et Fiedler), 1869, str. 720-721.

Schneider W. Lexikon zur Arzneimittelgeschichte, Band V/2, Pflanzliche Drogen D-O: Sachwörterbuch zur Geschichte der pharmazeutischen Botanik. Frankfurt: Govi-Verlag, 1974, str.135.

Schwarz O. A new Anatolian *Globularia*. Kew Bull 1949; 4(3): 309-310.

Schwarz O. Chromosomenzahlen, Lebensformen und Evolution der Gattung *Globularia* L. Drudea 1963; 3: 5-16.

Schwarz O. Die Gattung *Globularia*. Bot Jahrb Syst 1938; 69(345): 318-373.

Schwarz O. Über die Nomenklatur von *Globularia vulgaris*. Feddes Repert 1944; 53(2): 112-113.

Schweingruber FH. Wood structure and environment. Berlin-Verlag: Berlin-Heidelberg, 2007, str. 121, 123.

Schweingruber FH, Börner A, Schulze ED. Atlas of stem anatomy in herbs, shrubs and trees. Vol. 2. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2013, str. 226-230, 360-361.

Seo EJ, Kuete V, Kadioglu O, Krusche B, Schröder S, Greten HJ, Arend J, Lee IS, Efferth T. Antiangiogenic activity and pharmacogenomics of medicinal plants from traditional Korean medicine. Evid Based Complement Alternat Med 2013; 2013: 131306. DOI: 10.1155/2013/131306.

Serrano JCE, Cassanye A, Martín-Gari M, Belen Granado-Serrano A, Portero-Otín M. Effect of dietary bioactive compounds on mitochondrial and metabolic flexibility. Diseases 2016; 4(1): 1-15. DOI: 10.3390/diseases4010014.

Sertić M, Crkvenčić M, Mornar A, Hazler Pilepić K, Nigović B, Maleš Ž. Analysis of aucubin and catalpol content in different plant parts of four *Globularia* species. J Appl Bot Food Qual 2015; 88: 209-214.

Sezik E, Tabata M, Yeşilada E, Honda G, Goto K, Ikeshiro Y. Traditional medicine in Turkey I. Folk medicine in Northeast Anatolia. J Ethnopharmacol 1991; 35(2): 191-196.

Shim KM, Choi SH, Jeong MJ, Kang SS. Effects of aucubin on the healing of oral wounds. In vivo 2007; 21(6): 1037-1041.

Shokrzadeh M, Abdi H, Asadollah-Pour A, Shaki F. Nanoceria attenuated high glucose-induced oxidative damage in HepG2 cells. Cell J 2016; 18(1): 97-102.

Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010; 2(5): a000414. DOI: 10.1101/cshperspect.a000414.

Siljak-Yakovlev S, Pustahija F, Šolić EM, Bogunić F, Muratović E, Bašić N, Catrice O, Brown SC. Towards a genome size and chromosome number database of Balkan flora: C-values in 343 taxa with novel values for 242. Adv Sci Lett 2010; 3(2): 190-213.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods Enzymol 1999; 299: 152-178.

Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic 1965; 16(3): 144-158.

Sipahi H, Becker K, Gostner JM, Charehsaz M, Kirmizibekmez H, Schennach H, Aydin A, Fuchs D. Effects of globularifolin on cell survival, nuclear factor-κB activity, neopterin production, tryptophan breakdown and free radicals *in vitro*. Fitoterapia 2014; 92: 85-92.

Sipahi H, Gostner JM, Becker K, Charehsaz M, Kirmizibekmez H, Schennach H, Aydin A, Fuchs D. Bioactivities of two common polyphenolic compounds: verbascoside and catechin. Pharm Biol 2016; 54(4): 712-719.

Skim F, Kaaya A, Jaouhari JT, Lazrek HB, Jana M, El Amri H. Hypoglycaemic activity of *Globularia alypum* leaves in rats. Fitoterapia 1999a; 70(4): 382-389.

Skim F, Lazrek BH, El Amri H, Kaaya A, Jana M. Toxicological studies on *Globularia alypum* and *Zygophyllum gaetulum* in rats. Phytother Res 1998; 12(8): 592-594.

Skim F, Lazrek HB, Kaaya A, El Amri H, Jana M. Pharmacological studies of two antidiabetic plants: *Globularia alypum* and *Zygophyllum gaetulum*. Thérapie 1999b; 54(6): 711-715.

Soltan MM, Zaki AK. Antiviral screening of forty-two Egyptian medicinal plants. J Ethnopharmacol 2009; 126(1): 102-107.

Spínola V, Pinto J, Castilho PC. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD-ESI-MS^n and screening for their antioxidant activity. Food Chem 2015; 173: 14-30.

Steinmetz EF. Materia medica vegetabilis. Vol. 1, 78. Folia Alypi. Amsterdam: E. F. Steinmetz, 1954.

Stocker P, Yousfi M, Djerridane O, Perrier J, Amziani R, El Boustani S, Moulin A. Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. Biochimie 2004; 86(12): 919-925.

Stojanov N, Stefanov B. Flora na Bălgarija. 3. izd. Sofia: University Press, 1948, str. 1062.

Stump TA, Santee BN, Williams LP, Kunze RA, Heinze CE, Huseman ED, Gryka RJ, Simpson DS, Amos S. The antiproliferative and apoptotic effects of apigenin on glioblastoma cells. J Pharm Pharmacol 2017; 69(7): 907-916.

Su Y, Ma L, Wen Y, Wang H, Zhang S. Studies of the *in vitro* antibacterial activities of several polyphenols against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Molecules 2014; 19(8): 12630-12639.

Suda J, Kyncl T, Jarolímová V. Genome size variation in Macaronesian angiosperms: forty percent of the Canarian endemic flora completed. Plant Syst Evol 2005; 252(3-4): 215-238.

Sugiura T. Studies on the chromosome numbers in higher plants, with special reference to cytokinesis, II. Cytologia 1937; 2: 845-849.

Sun B, Ricardo-da-Silva JM, Spranger I. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. J Agric Food Chem 1998; 46(10): 4267-4274.

Sweet R. Sweet's Hortus britannicus; or, A catalogue of plants, indigenous, or cultivated in the gardens of Great Britain, arranged according to their natural orders, with references to the Linnean class and order to which each genus belongs; the whole brought up to the present time, and contains above 34,000 plants. 2nd ed. London: James Ridgway, 1830, str. 426.

Šekerija M. Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2014. Bilten 39, Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2016.

Šoljan D, Muratović E, Abadžić S. Biljke planina Bosne i Hercegovine. Sarajevo: Šahinpašić, 2009, str. 67-68.

Šugar I. Crvena knjiga biljnih vrsta Republike Hrvatske. Zagreb: Ministarstvo graditeljstva i zaštite okoliša, Zavod za zaštitu prirode, 1994, str. 231-232.

Šugar I. Hrvatski biljni imenoslov. Zagreb: Matica hrvatska, 2008, str. 541, 564.

Šulek B. Jugoslavenski imenik bilja. Zagreb: Dionička tiskara, 1879, str. 302, 521.

Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Mol Biol 1991; 17(5): 1105-1109.

Taghzouti OK, Balouiri M, Ouedrhiri W, Ech chahad A, Romane A. *In vitro* evaluation of the antioxidant and antimicrobial effects of *Globularia alypum* L. extracts. J Mater Environ Sci 2016; 7(6): 1988-1995.

Taleb-Dida N, Krouf D, Bouchenak M. *Globularia alypum* aqueous extract decreases hypertriglyceridemia and ameliorates oxidative status of the muscle, kidney, and heart in rats fed a high-fructose diet. Nutr Res 2011; 31(6): 488-495.

Taleb-Dida N, Krouf D, Bouchenak M. *Globularia alypum* aqueous extract prevents lipoproteins lipid peroxidation and enhances catalase activity in red blood cells of rats fed a high-fructose diet. Int J Pharm Technol 2014; 6(1): 6249-6261.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol 2013; 30(12): 2725-2729.

Tang Y, Horikoshi M, Li W. ggfortify: Unified interface to visualize statistical results of popular R packages. The R Journal, 2016; 8(2): 474-485.

Tariq A, Sadia S, Pan K, Ullah I, Mussarat S, Sun F, Abiodun OO, Batbaatar A, Li Z, Song D, Xiong Q, Ullah R, Khan S, Basnet BB, Kumar B, Islam R, Adnan M. A systematic review on ethnomedicines of anti-cancer plants. Phytother Res 2017; 31(2): 202-264.

Tashev AN, Tsavkov EI. Medicinal plants of the Bulgarian dendroflora. Phytol Balcan 2008; 14(2): 269-278.

Taskova R, Evstatieva LJ, Handjieva N, Popov S. Iridoid patterns of genus *Plantago* L. and their systematic significance. Z Naturforsch 2002; 57c(1-2): 42-50.

Taskova RM, Gotfredsen CH, Jensen SR. Chemotaxonomy of Veroniceae and its allies in the Plantaginaceae. Phytochemistry 2006; 67(3): 286-301.

Teixidor-Toneu I, Martin GJ, Ouhammou A, Puri RK, Hawkins JA. Comprehensive dataset of the medicinal plants used by a Tashelhit speaking community in the High Atlas, Morocco. Data Brief 2016; 8: 516-519.

Tenore M. Flora Napolitana. Vol. 3. Napoli: Stamperia Francese, 1824-1829, str. 116-118.

Testiati E, Parinet J, Massiani C, Laffont-Schwob I, Rabier J, Pfeifer HR, Lenoble V, Masotti V, Prudent P. Trace metal and metalloid contamination levels in soils and in two native plant species of a former industrial site: Evaluation of the phytostabilization potential. J Hazard Mater 2013; 248-249: 131-141.

Thetsrimuang C, Khammuang S, Sarnthima R. Antioxidant activity of crude polysaccharides from edible fresh and dry mushroom fruiting bodies of *Lentinus* sp. strain RJ-2. Int J Pharmacol 2011; 7(1): 58-65.

Thompson JD. Population differentiation in Mediterranean plants: insights into colonization history and the evolution and conservation of endemic species. Heredity 1999; 82(3): 229-236.

Tiemann R. Ueber die chemischen Bestandteile von *Globularia alypum*. Arch Pharm 1903; 241(4): 289-306.

Tiwari AK, Swapna M, Ayesha SB, Zehra A, Agawane SB, Madhusudana K. Identification of proglycemic and antihyperglycemic activity in antioxidant rich fraction of some common food grains. International Food Res J 2011; 18(3): 915-923.

Toda S. Antioxidative effects of polyphenols from leaves of *Artemisia princeps* Pamp. on lipid peroxidation *in vitro*. J Food Biochem 2005; 29(3), 305-312.

Tomás-Barberán FA, Grayer-Barkmeijer RJ, Gil MI, Harborne JB. Distribution of 6-hydroxy-, 6-methoxy- and 8-hydroxyflavone glycosides in the Labiatae, the Scrophulariaceae and related families. Phytochemistry 1988; 27(8): 2631-2645.

Tommasi R, Brown DG, Walkup GK, Manchester JI, Miller AA. ESKAPEing the labyrinth of antibacterial discovery. Nat Rev Drug Discov 2015; 14(8): 529-542.

Tong H, Bell D, Tabei K, Siegel MM. Automated data massaging, interpretation, and e-mailing modules for high throughput open access mass spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom 1999; 10(11): 1174-1187.

Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin Microbiol Rev 2015; 28(3): 603-661.

Topić J, Ilijanić LJ, Tvrtković N, Nikolić T. Staništa – priručnik za inventarizaciju, kartiranje i praćenje stanja. Zagreb, Državni zavod za zaštitu prirode, 2006.

Touaibia M, Chaouch FZ. Global chemical composition and antioxidative effect of the ethanol extracts prepared from *Globularia alypum* leaves. Nature Technol 2016; 14: 2-6.

Trim AR, Hill R. The preparation and properties of aucubin, asperuloside and some related glycosides. Biochem J 1952; 50(30): 310-319.

Trpin D, Vreš B. Register flore Slovenije. Praprotnice in cvetnice = Register of the flora of Slovenia. Ferns and vascular plants. Ljubljana: Znanstvenoraziskovalni center SAZU, 1995, str. 49, 115.

Tsai YD, Chen HJ, Hsu HF, Lu K, Liang CL, Liliang PC, Wang KW, Wang HK, Wang CP, Houng JY. Luteolin inhibits proliferation of human glioblastoma cells *via* induction of cell cycle arrest and apoptosis. J Taiwan Inst Chem Eng 2013; 44(6): 837-845.

Tucakov J. Lečenje biljem. Fitoterapija. Beograd: Rad, 1984, str. 550-551.

Tundis R, Bonesi M, Menichini F, Loizzo MR, Conforti F, Statti G, Pirisi FM, Menichini F. Antioxidant and anti-cholinesterase activity of *Globularia meridionalis* extracts and isolated constituents. Nat Prod Commun 2012a; 7(8): 1015-1020.

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.

Tundis R, Loizzo MR, Menichini F, Statti GA, Menichini F. Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments. Mini-Rev Med Chem 2008; 8(4): 399-420.

Tundis R, Peruzzi L, Colica C, Menichini F. Iridoid and bisiridoid glycosides from *Globularia meridionalis* (Podp.) O. Schwarz aerial and underground parts. Biochem Syst Ecol 2012b; 40: 71-74.

Tutin TG. Globulariaceae. U: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (ur.). Flora Europaea, Vol. 3. Cambridge: Cambridge University Press, 1972, str. 282-283.

Tuttolomondo T, Licata M, Leto C, Gargano ML, Venturella G, La Bella S. Plant genetic resources and traditional knowledge on medicinal use of wild shrub and herbaceous plant species in the Etna Regional Park (Eastern Sicily, Italy). J Ethnopharmacol 2014; 155(2): 1362-1381.

Upadhyay A, Upadhyaya I, Kollanoor-Johny A, Venkitanarayanan K. Combating pathogenic microorganisms using plant-derived antimicrobials: a minireview of the mechanistic basis. Biomed Res Int 2014; Article ID 761741: 1-18. DOI: 10.1155/2014/761741.

Vaidya HB, Ahmed AA, Goyal RK, Cheema SK. Glycogen phosphorylase-a is a common target for anti-diabetic effect of iridoid and secoiridoid glycosides. J Pharm Pharm Sci 2013; 16(4): 530-540.

Valares Masa C, Sosa Díaz T, Alías Gallego JC, Chaves Lobón N. Quantitative variation of flavonoids and diterpenes in leaves and stems of *Cistus ladanifer* L. at different ages. Molecules 2016; 21(3): 275. DOI: 10.3390/molecules21030275.

Valiakos E, Marselos M, Sakellaridis N, Constantinidis T, Skaltsa H. Ethnopharmacological approach to the herbal medicines of the „Antidotes“ in Nikolaos Myrepsos' Dynameron. J Ethnopharmacol 2015; 163: 68-82.

Van Loon JC, Gadella TWJ, Kliphuis E. Cytological studies in some flowering plants from southern France. Plant Biol 1971; 20(1): 157-166.

Vasisht K, Kumar V. Compendium of medicinal and aromatic plants. Vol. 1: Africa. Trieste: United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology (ICS-UNIDO), 2004, str. 8, 15, 18.

Vasquez Sanchez J. Contribucion al estudio quimico de la *Globularia alypum*. Anales Real Soc Españ Fis Quim 1933; 31: 361-363.

Verardo G, Duse I, Callea A. Analysis of underivatized oligosaccharides by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry with post-column addition of formic acid. Rapid Commun Mass Spectrom 2009; 23(11): 1607-1618.

Viladomat F, Codina C, Llabrés JM, Bastida J. Alkaloid screening of plants of Catalonia (Spain) III. Int J Crude Drug Res 1986; 24(3): 123-130.

Viljoen A, Mncwangi N, Vermaak I. Anti-inflammatory iridoids of botanical origin. Curr Med Chem 2012; 19(14): 2104-2127.

Villar Pérez L, Sesé Franco JA, Ferrández JV. Sobre *Globularia gracilis* y su híbrido con *G. repens* subsp. *repens* en el Pirineo: *G. x losae* hybr. nov. Collect Bot 1997; 23: 137-142.

Vinayagam A, Sudha PN. *In vitro* cytotoxicity activity of acteoside from *Leucas indica* flowers. Indian J Appl Res 2014; 4(2): 1-3.

Vincken JP, Heng L, de Groot A, Gruppen H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. Phytochemistry 2007; 68(3): 275-297.

Visiani R. Stirpium Dalmaticarum Specimen. Padova, 1826. Pretisak, prijevod Radić J. Ogled dalmatinskog bilja. Split: Čakavski sabor, 1978, str. 73.

Vitasović Kosić I, Britvec M. Taxonomic composition of pasture flora on Ćićarija (Istria, Croatia). Agric Conspec Sci 2006; 71(1): 1-9.

Vizgirdas RS, Rey-Vizgirdas EM. Wild plants of the Sierra Nevada. Reno-Las Vegas: University of Nevada Press, 2006, str. 110.

Vižintin L, Javornik B, Bohanec B. Genetic characterization of selected *Trifolium* species as revealed by nuclear DNA content and ITS rDNA region analysis. Plant Sci 2006; 170(4): 859-866.

Vokou D, Katradi K, Kokkini S. Ethnobotanical survey of Zagori (Epirus, Greece), a renowned centre of folk medicine in the past. J Ethnopharmacol 1993; 39(3): 187-196.

Volk RB. A newly developed assay for the quantitative determination of antimicrobial (anticyanobacterial) activity of both hydrophilic and lipophilic test compounds without any restriction. Microbiol Res 2008; 163(2): 161-167.

Wagenitz G. Globulariaceae. U: Kubitzki K (gl. ur.). The families and genera of vascular plants. Kadereit JW (ur. vol.). Vol. 7. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 2004, str. 159-162.

Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas. 2. izd. Dordrecht-Heidelberg-London-New York: Springer, 1996, str. 196, 350-354, 359-364.

Walz GF. Ueber die Abstammung und die Bestandtheile einer falschen Senna. U: Walz GF. Neues Jahrbuch für Pharmacie und verwandte Fächer: Eine Zeitschrift des allgemeinen deutschen Apotheker-Vereins, Abtheilung Süddeutschland), Vol. 7, Speyer: F.L. Winckler, 1857, str. 1-7.

Wang GF, Wu SY, Xu W, Jin H, Zhu ZG, Li ZH, Tian YX, Zhang JJ, Rao JJ, Wu SG. Geniposide inhibits high glucose-induced cell adhesion through the NF-κB signalling pathway in human umbilical vein endothelial cells. Acta Pharmacol Sin 2010; 31(8): 953-962.

Wang J, Yue YD, Tang F, Sun J. TLC screening for antioxidant activity of extracts from fifteen bamboo species and identification of antioxidant flavone glycosides from leaves of *Bambusa textilis* McClure. Molecules 2012; 17(10): 12297-12311.

Watson L, Dallwitz MJ. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. 1992 onwards. Verzija: 20. 7. 2017. delta-intkey.com, pristupljeno 31. 8. 2017.

Weber U. Folia Alypi im alten Schrifttum. Süddtsch Apoth Ztg 1942; 82(37-38): 171-172.

Wettstein R. Beitrag zur Flora Albaniens. Bearbeitung der von J. Dörfler im Jahre 1890 in Gebiete des Sar-Dagh gesammelten Pflanzen. Biblioth bot 1892; 26: 1-103.

Wettstein R. Globulariaceae. U: Engler A, Prantl K. Die natürlichen Pflanzenfamilien. IV. Teil 3. Abteilung b. Leipzig: Verlag von Wilhem Engelmann, 1895a, str. 270-273.

Wettstein R. Globulariaceen-Studien. Bull Herb Boiss 1895b; 3: 271-290.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics U: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (ur.). PCR protocols: A guide to methods and applications. London: Academic Press, 1990, str. 315-322.

Wieffering JH. Aucubinartige Glucoside (Pseudoindikane) und verwandte Heteroside als systematische Merkmale. Phytochemistry 1966; 5(6): 1053-1064.

Will H. Folia Alypi, ein Surrogat für Folia Sennae. Deutsche Apoth Ztg 1942; S59.

Willkomm M. Forstliche Flora von Deutschland und Oesterreich; oder, Forstbotanische und pflanzengeographische Beschreibung aller im Deutschen Reich und Oesterreichischen Kaiserstaat heimischen und im Freien angebauten oder anbauungswürdigen Holzgewächse. Leipzig: C.F. Winter, 1887, str. 617-619.

Willkomm M. Recherches sur l'organographie et la classification des Globulariées. Leipzig: Gustave Mayer, 1850.

Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. Phytochemistry 2003; 64(1): 3-19.

World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017; 1-7.

Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. Food Res Int 2006; 39(7): 791-800.

Wright E Jr, Scism-Bacon JL, Glass LC. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. Int J Clin Pract 2006; 60(3): 308-314.

Wunderlich A. Notiz über die Ramnoside von *Capparis spinosa* und *Globularia Alypum*. Arch Pharm 1908; 246(4-5): 256-259.

Xu Z, Zhang L, Li X, Jiang Z, Sun L, Zhao G, Zhou G, Zhang H, Shang J, Wang T. Mitochondrial fusion/fission process involved in the improvement of catalpol on high glucose-induced hepatic mitochondrial dysfunction. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2015; 47(9): 730-740.

Yadegarynia S, Pham A, Ng A, Nguyen D, Lialiutska T, Bortolazzo A, Sivryuk V, Bremer M, White JB. Profiling flavonoid cytotoxicity in human breast cancer cell lines: determination of structure-function relationships. Nat Prod Commun 2014; 9(5): 597-606.

Yang UJ, Park TS, Shi SM. Protective effect of chlorophyllin and lycopene from water spinach extract on cytotoxicity and oxidative stress induced by heavy metals in human hepatoma cells. J Toxicol Environ Health A 2013; 76(23): 1307-1315.

Yang Y, Gu L, Xiao Y, Liu Q, Hu H, Wang Z, Chen K. Rapid identification of α-glucosidase inhibitors from *Phlomis tuberosa* by Sepbox chromatography and thin-layer chromatography bioautography. PLoS One 2015; 10(2): e0116922. DOI: 10.1371/journal.pone.0116922.

Yin Z, Zhang W, Feng F, Zhang Y, Kang W. α-Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. Food Sci Hum Wellness 2014; 3(3-4): 136-174.

Zahariev D, Taneva L, Racheva K. Medicinal plants in Rhodope Mts (South Bulgaria). Acta Sci Naturalis 2015; 2: 99-109.

Zarin MA, Wan HY, Isha A, Armania N. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic potential of condensed tannins from *Leucaena leucocephala* hybrid-Rendang. Food Sci Human Wellness 2016; 5(2): 65-75.

Zeghada FZ. Activité allélopathique et analyse phytochimique (magistarski rad). Université d'Oran Es-Sénia, 2008-2009.

Zellner J. Studien über die chemischen Bestandteile hemischer Arzneipflanzen. Arch Pharm 1934; 272(39-43): 601-607.

Zennaki S, Krouf D, Taleb-Senouci D, Bouchenak M. *Globularia alypum* L. lyophilized methanolic extract decreases hyperglycemia and improves antioxidant status in various tissues of streptozotocin-induced diabetic rats. J Compl Integr Med 2009; 6(1): article 34.

Zhang F, Jia Z, Deng Z, Wei Y, Zheng R, Yu L. *In vitro* modulation of telomerase activity, telomere length and cell cycle in MKN45 cells by verbascoside. Planta Med 2002; 68(2): 115-118.

Zhou J, Xu G, Ma S, Li F, Yuan M, Xu H, Huang K. Catalpol ameliorates high-fat diet-induced insulin resistance and adipose tissue inflammation by suppressing the JNK and NF-κB pathways. Biochem Biophys Res Commun 2015; 467(4): 853-858.

Zhou L, Feng Y, Jin Y, Liu X, Sui H, Chai N, Chen X, Liu N, Ji Q, Wang Y, Li Q. Verbascoside promotes apoptosis by regulating HIPK2-p53 signaling in human colorectal cancer. BMC Cancer 2014; 14: 747. DOI: 10.1186/1471-2407-14-747.

Zhou T, Liu H, Wen J, Fan G, Chai Y, Wu Y. Fragmentation study of iridoid glycosides including epimers by liquid chromatography-diode array detection/electrospray ionization mass spectrometry and its application in metabolic fingerprint analysis of *Gardenia jasminoides* Ellis. Rapid Commun Mass Spectrom 2010; 24(17): 2520-2528.

Zhu J, Cole RB. Formation and decomposition of chloride adduct ions, $[M+ Cl]^-$, in negative ion electrospray ionization mass spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom 2000; 11(11): 932-941.

Zhu J, Cole RB. Ranking of gas-phase acidities and chloride affinities of monosaccharides and linkage specificity in collision-induced decompositions of negative ion electrospray-generated chloride adducts of oligosaccharides. J Am Soc Mass Spectrom 2001; 12(11): 1193-1204.

Ziyyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli A, Serhrouchni M, Benjelloun W. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. J Ethnopharmacol 1997; 58(1): 45-54.

Mrežne stranice

Globularia. http://actaplantarum.org/flora/flora.php, pristupljeno 18. 8. 2017.

Globularia. http://ccdb.tau.ac.il, pristupljeno 31. 8. 2017.

Globularia. http://hirc.botanic.hr/fcd, pristupljeno 25. 6. 2017.

Globularia. http://luirig.altervista.org, pristupljeno 18. 8. 2017.

Globularia. http://www.emplantbase.org/home.html, pristupljeno 26. 6. 2017.

Globularia. http://www.tela-botanica.org/site:botanique, pristupljeno 18. 8. 2017.

Globularia. http://www.theplantlist.org, pristupljeno 25. 6. 2017.

Globularia alypum. http://www.lactacyd.eu/products/lactacyd-pharma/lactacyd-pharma-soothing, pristupljeno 17. 8. 2017.

Globularia alypum (Blue daisy). http://www.mychelle.com/Ingredients-Glossary, pristupljeno 17. 8. 2017.

Globularia alypum (Blue daisy). http://www.nutritionaloutlook.com/beauty/natural-ingredients-skin-care, pristupljeno 17. 8. 2017.

7. PRILOZI

Ovaj dodatak sadrži pet znanstvenih radova objavljenih u časopisima zastupljenim u bazama Current Contents i/ili Science Citation Index - Expanded koji obrađuju problematiku iznesenu u ovom doktorskom radu:

1. Sertić M, **Crkvenčić M**, Mornar A, Hazler Pilepić K, Nigović B, Maleš Ž. Analysis of aucubin and catalpol content in different plant parts of four *Globularia* species. J Appl Bot Food Qual 2015; 88: 209-214.
2. **Crkvenčić M**, Dudaš S, Jerković I, Marijanović Z, Poljuha D, Hazler Pilepić K. Essential oil composition of three *Globularia* species. Chem Biodivers 2016; 13(2): 219-223.
3. Hazler Pilepić K, **Friščić M**, Duran A, Maslo S, Garić R, Čuljak S, Šutalo K. Contribution to *Globularia* phylogeny based on nuclear ribosomal spacer and two chloroplast DNA regions. Period biol 2016; 118(4): 417-424.
4. **Friščić M**, Bucar F, Hazler Pilepić K. LC-PDA-ESI-MS^n analysis of phenolic and iridoid compounds from *Globularia* spp. J Mass Spectrom 2016; 51(12): 1211-1236.
5. **Friščić M**, Maslo S, Garić R, Maleš Ž, Hazler Pilepić K. Comparative analysis of specialized metabolites and antioxidant capacity *in vitro* of different natural populations of *Globularia* spp. Acta Bot Croat, DOI: 10.1515/botcro-2017-0017.

Journal of Applied Botany and Food Quality 88, 209 - 214 (2015), DOI: 10.5073/JABFQ.2015.088.030

[1]Department of Analytics and Control of Medicines, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia
[2]Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

Analysis of aucubin and catalpol content in different plant parts of four *Globularia* species

Miranda Sertić[1], Maja Crkvenčić[2]*, Ana Mornar[1], Kroata Hazler Pilepić[2], Biljana Nigović[1], Željan Maleš[2]

(Received May 7, 2015)

Summary

Iridoids are plant secondary metabolites that are gaining more scientific interest due to the wide range of their observed biological activities such as neuroprotective, anti-inflammatory, immunomodulatory, hepatoprotective and cardioprotective. The presence and content of aucubin and catalpol, two iridoid glucosides frequently present in iridoid-containing plants, was studied in methanolic extracts of leaves, flowers, woody stems and underground parts of four *Globularia* L. species, including the medicinal plant *Globularia alypum* L., using a specific and reliable HPLC-DAD-ESI/MS method. Aucubin was found in all four species, while catalpol was found only in *G. alypum* and *G. punctata*. Flowers contained the highest amounts of investigated iridoids, with catalpol content reaching 1.6% in *G. punctata* flowers. Comparing to the medicinal plant *G. alypum*, related species contained higher amounts of investigated iridoids, which makes them interesting candidates for further biological activity investigations.

Introduction

Medicinal plants produce various phytochemicals that are responsible for their preventive and/or healing properties. Along with different phenolic compounds, such as phenolic acids, flavonoids and tannins, which represent the largest part of plant secondary metabolites (DAI and MUMPER, 2010), more attention considering biological activity and possible applications of plant extracts is recently given to iridoid-containing plants (VILJOEN et al., 2012; WEST et al., 2014). Iridoids are a large group of monoterpenoid compounds (ANDRZEJEWSKA-GOLEC, 1995), whose role in plants is mainly defence (WINK, 2003). They possess a wide range of biological activities, such as neuroprotective, anti-inflammatory, immunomodulatory, hepatoprotective, cardioprotective, anticancer, antioxidant, antimicrobial, hypoglycaemic, hypolipidemic, choleretic, antispasmodic and purgative (TUNDIS et al., 2008). However, the distribution of iridoids is with few exceptions limited to the plant orders Lamiales, Gentianales and Cornales (JENSEN, 1991), which makes these compounds interesting as potential chemotaxonomic markers (TASKOVA et al., 2006).

Globularia L. is a small angiosperm genus recently included in the Plantaginaceae family (ALBACH et al., 2005). One of the members of this genus, namely *Globularia alypum* L., is a medicinal plant traditionally used in Mediterranean countries for some of the aforementioned activities attributed to iridoid compounds (CARRIÓ and VALLÈS, 2012; BOUDJELAL et al., 2013; BOUSTA et al., 2014). Its hypoglycaemic, anti-ulcer and anti-inflammatory activity were confirmed by different studies (ZENNAKI et al., 2009; FEHRI and AIACHE, 2010; AMESSIS-OUCHEMOUKH et al., 2014b). Recent findings suggest that related species, such as *G. cordifolia* L. and *G. meridionalis* (Podp.) O. Schwarz, could also have potentially useful biological activities (TUNDIS et al., 2012a; SIPAHI et al., 2014). The amount and type of iridoids present in these species might serve as an indicator of their potential health benefits, especially since these compounds were recognized as one of the main secondary metabolites of *Globularia* (CHAUDHURI and STICHER, 1981; KIRMIZIBEKMEZ et al., 2003; TUNDIS et al., 2012b).

Aucubin is the most widespread compound belonging to the group of iridoid glycosides (ANDRZEJEWSKA-GOLEC, 1995). Aucubin is also a precursor of catalpol (RØNSTED et al., 2000), one of the main secondary metabolites of *G. alypum* (CHAUDHURI and STICHER, 1981), whose presence frequently accompanies the presence of aucubin in species of the Plantaginaceae (TASKOVA et al., 2006). Having in mind that medicinal use of different plant parts of *G. alypum* has been reported (CARRIÓ and VALLÈS, 2012; BOUSTA et al., 2014), one of the aims of the present study was to investigate the content of aucubin and catalpol in leaves, flowers and woody stems of the medicinal plant to see if they could be connected to its recorded medicinal applications. Moreover, the study included three related species from the same genus, namely *G. cordifolia*, *G. meridionalis* and *G. punctata*, to try to predict their medicinal potential based on the comparison of the found amounts of investigated iridoids and known uses of the medicinal plant. Underground parts of the three less investigated species were also included in the analysis, while *G. alypum* was harvested without underground parts, due to its near threatened status in Croatia. The analysis was performed using a rapid method coupling high-performance liquid chromatography with diode array detector and electrospray ionization/mass spectrometry (HPLC-DAD-ESI/MS), which was optimized and validated in our laboratory.

Materials and methods

Chemicals

Aucubin was obtained from Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland) and catalpol from Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA). HPLC-grade acetonitrile and formic acid were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water used in the mobile phase and for the preparation of sample and standard solutions was obtained by a Milli-Q water 140 purification system (Millipore, Bedford, USA). Methanol was obtained from T.T.T. d.o.o. (Sveta Nedelja, Croatia) and was of analytical grade.

Plant material

Aerial and underground plant parts of *G. cordifolia*, *G. meridionalis* and *G. punctata* were collected during the flowering period in May 2012 and *G. alypum* in March 2013 from natural populations growing in Croatia and Bosnia and Herzegovina. Geographical coordinates for localities of *G. alypum*, *G. cordifolia*, *G. meridionalis* and *G. punctata* were: 42° 30´ 50˝ N/18° 19´ 07˝ E, 43° 21´ 41˝ N/17° 48´ 20˝ E, 44° 31´ 41˝ N/15° 08´ 38˝ E and 45° 23´ 36˝ N/13° 51´ 20˝ E, respectively. Voucher specimens are deposited in the Herbarium of the Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Croatia (Voucher No. 16 020, 16 030, 16 043, 16 051). The identity of each species was verified by Prof. Kroata Hazler Pilepić, Department of Pharma-

* Corresponding author

ceutical Botany, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Croatia.

Preparation of sample and standard solutions

Dry powdered plant parts (leaves, flowers, woody stems and underground parts) (2.5 g) of each of the four *Globularia* species were extracted twice with methanol (25 mL) in a Bandelin SONOREX™ SUPER ultrasonic extractor (30 min, room temperature) (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany), filtered and their volume was adjusted to 50 mL with methanol. Prior to analysis the extracts were diluted two times with water and filtered through an Acrodisc® GHP syringe filter (diameter 26 mm, pore size 0.20 μm) (Gelman, Ann Arbor, USA).

Stock solutions of aucubin and catalpol were prepared by dissolving each of the standards separately in water (0.2 mg/mL). All stock solutions were stored in a refrigerator at 4 °C for no longer than four weeks and were stable during that time. Working standard solutions used for method optimization and validation were prepared daily by serial dilutions with water just before measurements.

HPLC-DAD- ESI/MS analysis of aucubin and catalpol

Contents of aucubin and catalpol were analyzed by Agilent 1100 Series LC-MSD Trap system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Separation was performed on a Zorbax SB-C_{18} column (250 mm x 4.6 mm i.d.; 5 μm particle size) (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) under isocratic elution conditions using a mixture of ACN:H_2O:HCOOH (5:95:0.1, v:v:v) as the mobile phase, with a flow rate 0.5 mL/min, 25.0 °C column temperature and UV detection at λ 210 nm. Prior to use, the mobile phase was filtered through a cellulose nitrate filter (diameter 47 mm, pore size 0.45 μm) (Sartorius, Göttingen, Germany). Electrospray ionization (ESI) was performed in negative ionization mode. Nitrogen was used both as drying gas (5.0 L/min) and as nebulizer gas (15.0 psi). Electrospray source temperature was optimized at 325 °C and the capillary voltage was set at 3.5 kV. The UV detection was set at λ 210 nm. The full scan mass spectra were acquired over a range *m/z* 100 – 500. Data acquision and processing were done using ChemStation for LC 3D and LC/MSD Trap v.5.2 software. All samples were injected in triplicate (10 μL, splitless mode). The contents of aucubin and catalpol were calculated from calibration curves obtained by the use of MS detector and the results were presented as mg/g dry plant material.

Method validation

The method was validated for linearity, precision, accuracy and limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) according to guidelines of International Conference on Harmonization (ICH, 2005). Linearity was evaluated by least squares linear regression using seven different concentrations of standard solutions (10, 25, 50, 75, 100, 150 and 200 μg/mL). LOD and LOQ were evaluated by using the same dilutions of standard solutions as for linearity and were defined as the signal-to-noise ratio equal to 3:1 and 10:1, respectively. Accuracy of the method was determined using three different known concentrations (25, 50 and 100 μg/mL) of aucubin and catalpol, each analyzed individually three times. The intra- and inter-day precision of the method was validated with 100 μg/mL standard solution of aucubin and catalpol. For intra-day precision measurements were conducted six times within the same day, while for inter-day precision measurements were performed three times a day on three consecutive days. Relative standard deviation (RSD) for retention time and RSD for peak area, defined as the percentage ratio of standard deviation to the mean, were taken as measures of precision. All data were evaluated using Microsoft Office Excel 2007 (12.0.6683.5002).

Statistical analysis

The results are presented as means ± standard deviations of triplicate measurements. Exceptionally, reported retention times of aucubin and catalpol were based on six different analyses. A two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni *post-hoc* test was carried out to determine significant differences between results. Significance level α was set at 0.05. The statistical analysis was carried out using GraphPad Prism 5.03 for Windows (GraphPad Software, San Diego, USA).

Results and discussion

In the present study, amounts of aucubin and catalpol in different plant parts of *G. alypum*, *G. cordifolia*, *G. meridionalis* and *G. punctata* were evaluated using a specific and reliable HPLC-DAD-ESI/MS method. The method provided good separation of analytes, with retention times being 7.56 ± 0.01 min for catalpol and 12.23 ± 0.01 min for aucubin (n = 6). The presence of aucubin and catalpol was determined by comparison of their retention times together with UV and mass spectra with those of standard compounds. Final quantification of analytes was based on the results obtained from the MS detector, which in comparison to a diode array detector provided better selectivity with obtained good sensitivity of the used method. After testing electrospray ionization in both positive and negative mode, much higher peaks were observed in negative ionization mode, similar as in some previous studies considering iridoid glycosides (Li et al., 2008; Deng et al., 2013). The observed fragmentation pattern of aucubin was similar to that of catalpol (Tab. 1). Deprotonated pseudo-molecular ions $[M-H]^-$ were present at *m/z* 345 for aucubin and at *m/z* 361 for catalpol. Also, characteristic fragment ions of $[M-H-162]^-$ due to loss of a dehydroglucose residue were observed at *m/z* 183 for aucubin and *m/z* 199 for catalpol. A similar fragmentation pattern was observed previously (Kumar et al., 2013). In the mass spectrum of aucubin, an additional peak was present at *m/z* 137, most likely obtained by loss of glucose and CO $[M-H-180-28]^-$. Peaks at *m/z* 381 and 383 observed for aucubin and at *m/z* 397 and 399 for catalpol, having a height ratio of about 3:1, indicated the presence of chlorine adducts (Zhu and Cole, 2000). The major ion observed for both compounds was a formic acid adduct of the pseudo-molecular ion $[M-H+46]^-$. The formation of adducts with formic acid present in the mobile phase was reported previously for some other iridoid glycosides (Li et al., 2008; Deng et al., 2013). High peaks appearing at *m/z* 443 and 459 might be a result of adduct formation with phosphoric/sulfuric acid as possible residual contamination of the used system, leading to a rise of pseudo-molecular ion mass for approximately 98 Da (Tong et al., 1999).

Tab. 1: Peak identification for aucubin and catalpol mass spectra

m/z		
Auc	Cat	Peak identification
136.9	-	$[M-H-\text{glucose}-CO]^-$
182.8	198.8	$[M-H-\text{dehydroglucose}]^-$
344.9	360.9	$[M-H]^-$
381.0	396.9	$[M+Cl]^-$
391.0	406.9	$[M-H+HCOOH]^-$
442.9	458.9	$[M-H+H_3PO_4/H_2SO_4]^-$

Auc, aucubin; Cat, catalpol.

The developed method was validated for linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), accuracy, intra- and inter-day precision. Validation parameters are presented in Tab. 2. The calibration curves for both analytes were linear over the concentration range used (10 – 200 µg/mL) ($R > 0.99$). The recovery values were between 98.11% and 102.09% indicating excellent accuracy of the method.

The results of the analysis showed that aucubin was present in all four investigated species, while catalpol was only found in *G. alypum* and *G. punctata* (Tab. 3). In a similar study done on different *Plantago* species, aucubin was also found to be more frequently present than catalpol (JURIŠIĆ et al., 2004), which could be connected with the fact that aucubin is a biosynthetic precursor of catalpol (RØNSTED et al., 2000).

Our results confirm the presence of aucubin in *G. alypum*, which was earlier reported by WIEFFERING (1966). This disproves the claims of CHAUDHURI and STICHER (1981), reporting its presence to be questionable in *G. alypum*, which were probably based on the fact that aucubin was never isolated from this species. Previous studies primarily reported aucubin and its derivatives as typical for *G. cordifolia* (KIRMIZIBEKMEZ et al., 2003), while for *G. alypum* mostly catalpol and catalpol derivatives were observed (CHAUDHURI and STICHER, 1981; AMESSIS-OUCHEMOUKH et al., 2014a).

When comparing plant parts of *G. punctata* it can be seen that flowers were richest in both aucubin and catalpol, followed by leaves ($p < 0.05$) (Fig. 1). The same iridoid distribution pattern was observed in all investigated species (Tab. 3). Recently, aerial parts of *G. meridionalis* were reported to contain higher amounts of iridoids than underground parts (TUNDIS et al., 2012a), as well. Similar observations were reported in other species belonging to the Plantaginaceae family, such as *Linaria dalmatica* (L.) P. Mill. (JAMIESON and BOWERS, 2010). Our findings and cited data are in accordance with the crucial ecological roles of secondary metabolites for plants, especially when having in mind that organs important for survival and reproduction usually have more potent compounds and higher amounts thereof (WINK, 2003).

Tab. 2: Validation parameters for the applied HPLC-DAD-ESI/MS method (linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), accuracy, intra- and inter-day precision)

Validation parameters		Aucubin	Catalpol
Linearity range (µg/mL)		10-200	10-200
Regression equation		y = 23618x – 249491	y = 13700x – 25381
R		0.993	0.995
LOD (µg/mL)		1	2.5
LOQ (µg/mL)		3	7
Accuracy (%)	low	102.09	98.11
	medium	100.87	101.32
	high	101.21	99.48
Intra-day precision	RSD (%) for retention time	0.51	0.72
	RSD (%) for peak area	3.87	3.25
Inter-day precision	RSD (%) for retention time	0.54	0.87
	RSD (%) for peak area	4.92	4.85

LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; RSD, relative standard deviation.

Tab. 3: Aucubin and catalpol contents in different plant parts of four *Globularia* species

Aucubin	Content/(mg/g dry plant material)			
	G. alypum	*G. cordifolia*	*G. meridionalis*	*G. punctata*
Leaves	0.58 ± 0.01	0.96 ± 0.03	1.53 ± 0.03	0.77 ± 0.01
Flowers	0.92 ± 0.00	1.65 ± 0.02	2.00 ± 0.01	1.29 ± 0.01
Woody stems	0.58 ± 0.01	0.59 ± 0.00	0.61 ± 0.01	0.66 ± 0.01
Underground parts	n.m.	0.81 ± 0.00	0.76 ± 0.01	0.57 ± 0.01
Catalpol	Content/(mg/g dry plant material)			
	G. alypum	*G. cordifolia*	*G. meridionalis*	*G. punctata*
Leaves	1.79 ± 0.03	ND	ND	2.52 ± 0.06
Flowers	12.58 ± 0.03	ND	ND	15.97 ± 0.63
Woody stems	1.47 ± 0.02	ND	ND	0.51 ± 0.01
Underground parts	n.m.	ND	ND	0.66 ± 0.01

Values are means ± SD, n = 3; n.m., not measured; ND, not detected.

In our study higher amounts of aucubin were found in leaves and flowers of the three related species comparing to those of *G. alypum* ($p < 0.05$). Catalpol concentrations found in *G. alypum* and *G. punctata* were generally higher than aucubin concentrations. They were especially high in flowers, with the content reaching almost 1.6% in *G. punctata*. A similar relationship between aucubin and catalpol was observed in *Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) DC., one of the fundamental herbs used in traditional Chinese medicine (WON et al., 2010; XU et al., 2012). Catalpol content was also seen to be higher than aucubin content in some *Plantago* species where both iridoids were present (JURIŠIĆ et al., 2004). From an ecological point of view these observations could be explained by the greater toxicity of catalpol to generalist herbivores (NIEMINEN et al., 2003).

According to different ethnobotanical studies flowers of *G. alypum* are usually used for treatment of diabetes, digestive disorders and eczema (BOUDJELAL et al., 2013; BOUSTA et al., 2014). The use of leaves and aerial parts of the same plant was reported for similar indications (MERZOUKI et al., 2000; HAMMICHE and MAIZA, 2006), but also for some additional purposes, such as treatment of arterial hypertension (CARRIÓ and VALLÈS, 2012; SARI et al., 2012). Based on data from previous studies considering biological activities of iridoids and the results presented in this study, it can be assumed that some of these activities could be attributed to aucubin and/or catalpol. However, it should be noted that this species contains a large number of compounds with medicinal potential (AMESSIS-OUCHEMOUKH et al., 2014a). Recently, the study of MERGHACHE et al. (2013) confirmed hypoglycaemic and hypolipidemic activity of globularin, a cinnamoyl ester of catalpol isolated from *G. alypum*.

In *G. punctata* both investigated iridoids were present in higher amounts than in *G. alypum*, which makes it an interesting plant for further analysis, especially due to the fact that it is a well-distributed species of the genus (TUTIN et al., 1972). However, one should bear in mind that besides genetic predisposition, other factors (internal and external) could have also contributed to the production of secondary metabolites in these plants (JAMIESON and BOWERS, 2010). For example, observed differences might be a consequence of different plant age (ANDRZEJEWSKA-GOLEC, 1995) and/or reaction to damage caused by insect herbivores and pathogenic microorganism infections (MARAK et al., 2002). It wasn't possible to eliminate all of these factors, due to the fact that harvesting was done from wild populations. However, all samples were collected in the same phenological period (flowering).

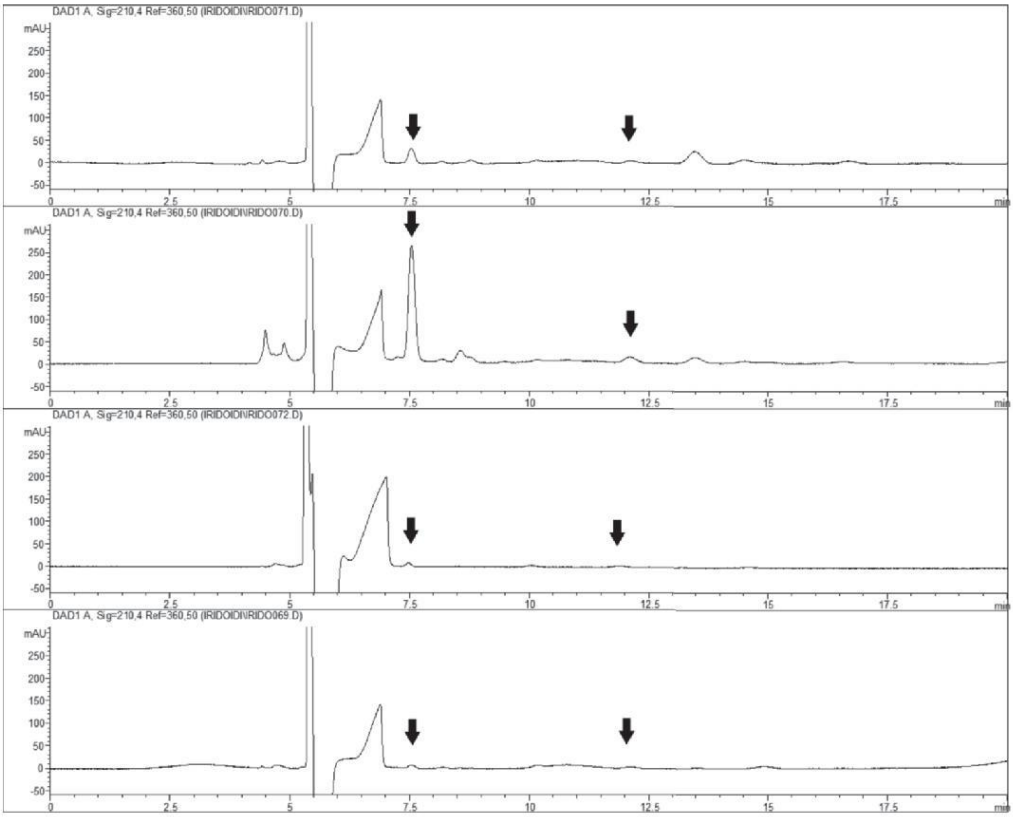


Fig. 1: Chromatograms of *G. punctata* leaves, flowers, woody stems and underground parts obtained by diode array detector (arrows indicating the presence of catalpol and aucubin, respectively).

Conclusions

Comparing aucubin and catalpol content of *G. cordifolia*, *G. meridionalis* and *G. punctata* to amounts of these iridoids found in the medicinal plant *G. alypum*, it can be assumed that the three species might have some potential for medicinal use. Certainly, possible biological activity investigations in the future should be accompanied by more detailed analyses of their chemical composition. These studies are currently in progress. So far the results show a greater similarity between the phytochemical composition of *G. punctata* and *G. alypum* than that between *G. cordifolia*/*G. meridionalis* and *G. alypum*. With regard to its wider distribution in Europe, *G. punctata* shows the highest potential for further investigations.

Acknowledgements

This research was supported by the Ministry of Science, Education and Sports of the Republic of Croatia (project No. 006-0061117-1239 and 006-0061117-1240).

We would like to thank S. Maslo for his help in collecting plant material from Mostar.

References

ALBACH, D.C., MEUDT, H.M., OXELMAN, B., 2005: Piecing together the "new" Plantaginaceae. Am. J. Bot. 92, 297-315.

AMESSIS-OUCHEMOUKH, N., ABU-REIDAH, I.M., QUIRANTES-PINÉ, R., RODRÍGUEZ-PÉREZ, C., MADANI, K., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A., SEGURA-CARRETERO, A., 2014a: Tentative characterisation of iridoids, phenylethanoid glycosides and flavonoid derivatives from *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) leaves by LC-ESI-QTOF-MS. Phytochem. Anal. 25, 389-398.

AMESSIS-OUCHEMOUKH, N., MADANI, K., FALÉ, P.L.V., SERRALHEIRO, M.L., ARAÚJO, M.E.M., 2014b: Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. Ind. Crop. Prod. 53, 6-15.

ANDRZEJEWSKA-GOLEC, E., 1995: The occurrence of iridoids in plants. Acta Soc. Bot. Pol. 64, 181-186.

BOUDJELAL, A., HENCHIRI, C., SARI, M., SARRI, D., HENDEL, N., BENKHALED, A., RUBERTO, G., 2013: Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): An ethnopharmacology survey. J. Ethnopharmacol. 148, 395-402.

BOUSTA, D., BOUKHIRA, S., AAFI, A., GHANMI, M., EL MANSOURI, L., 2014: Ethnopharmacological study of anti-diabetic medicinal plants used in the Middle-Atlas region of Morocco (Sefrou region). Int. J. Pharma Res. Health Sci. 2, 75-79.

CARRIÓ, E., VALLÈS, J., 2012: Ethnobotany of medicinal plants used in Eastern Mallorca (Balearic Islands, Mediterranean Sea). J. Ethnopharmacol. 141, 1021-1040.

CHAUDHURI, R.K., STICHER, O., 1981: New iridoid glucosides and a lignan diglucoside from *Globularia alypum* L. Helv. Chim. Acta 64, 3-15.

DAI, J., MUMPER, R.J., 2010: Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules 15, 7313-7352.

DENG, S., WEST, B.J., JENSEN, C.J., 2013: UPLC-TPF-MS characterization and identification of bioactive iridoids in *Cornus mas* fruit. J. Anal. Methods Chem. 2013, 1-7.

FEHRI, B., AIACHE, J.M., 2010: Effects of *Globularia alypum* L. on the gastrointestinal tract. J. Nat. Prod. 3, 141-146.

HAMMICHE, V., MAIZA, K., 2006: Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. J. Ethnopharmacol. 105, 358-367.

ICH, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005: ICH-Q2 (R1), International Conference on Harmonization: Geneva.

JAMIESON, M.A., BOWERS, M.D., 2010: Iridoid glycoside variation in the invasive plant Dalmatian toadflax, *Linaria dalmatica* (Plantaginaceae) and sequestration by the biological control agent, *Calophasia lunula*. J. Chem. Ecol. 36, 70-79.

JENSEN, S.R., 1991: Plant iridoids, their biosynthesis and distribution in angiosperms. In: Harborne, J.B., Tomas-Barberan, F.A. (Eds.), Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids, 133-158. Clarendon Press, Oxford.

JURIŠIĆ, R., DEBELJAK, Ž., VLADIMIR-KNEŽEVIĆ, S., VUKOVIĆ, J., 2004: Determination of aucubin and catalpol in *Plantago* species by micellar electrokinetic chromatography. Z. Naturforsch. C 59, 27-31.

KIRMIZIBEKMEZ, H., ÇALIŞ, İ., AKBAY, P., STICHER, O., 2003: Iridoid and bisiridoid glycosides from *Globularia cordifolia*. Z. Naturforsch. C 58, 337-341.

KUMAR, V., SOOD, H., SHARMA, M., CHAUHAN, R.S., 2013: A proposed biosynthetic pathway of picrosides linked through the detection of biochemical intermediates in the endangered medicinal herb *Picrorhiza kurroa*. Phytochem. Anal. 24, 598-602.

LI, C.M., ZHANG, X.L., XUE, X.Y., ZHANG, F.F., XU, Q., LIANG, X.M., 2008: Structural characterization of iridoid glucosides by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 22, 1941-1954.

MARAK, H.B., BIERE, A., VAN DAMME, J.M.M., 2002: Systemic, genotype-specific induction of two herbivore-deterrent iridoid glycosides in *Plantago lanceolata* L. in response to fungal infection by *Diaporthe adunca* (Rob.) Niessel. J. Chem. Ecol. 28, 2429-2448.

MERGHACHE, S., ZERRIOUH, M., MERGHACHE, D., TABTI, B., DJAZIRI, R., GHALEM, S., 2013: Evaluation of hypoglycaemic and hypolipidemic activities of globularin isolated from *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. J. App. Pharm. Sci. 3, 1-7.

MERZOUKI, A., ED-DERFOUFI, F., MOLERO MESA, J., 2000: Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine. II: Folk medicine in Ksar Lakbir district (NW Morocco). Fitoterapia 71, 278-307.

NIEMINEN, M., SUOMI, J., VAN NOUHUYS, S., SAURI, P., RIEKKOLA, M.L., 2003: Effect of iridoid glycoside content on oviposition host plant choice and parasitism in a specialist herbivore. J. Chem. Ecol. 29, 823-844.

RØNSTED, N., GÖBEL, E., FRANZYK, H., JENSEN, S.R., OLSEN, C.E., 2000: Chemotaxonomy of *Plantago*. Iridoid glucosides and caffeoyl phenylethanoid glycosides. Phytochemistry 55, 337-348.

SARI, M., SARRI, D., HENDEL, N., BOUDJELAL., A., 2012: Ethnobotanical study of therapeutic plants used to treat arterial hypertension in the Hodna region of Algeria. Global J. Res. Med. Plants & Indigen. Med. 1, 411-417.

SIPAHI, H., BECKER, K., GOSTNER, J.M., CHAREHSAZ, M., KIRMIZIBEKMEZ, H., SCHENNACH, H., AYDIN, A., FUCHS, D., 2014: Effects of globularifolin on cell survival, nuclear factor-κB activity, neopterin production, tryptophan breakdown and free radicals *in vitro*. Fitoterapia 92, 85-92.

TASKOVA, R.M., GOTFREDSEN, C.H., JENSEN, S.R., 2006: Chemotaxonomy of Veroniceae and its allies in the Plantaginaceae. Phytochemistry 67, 286-301.

TONG, H., BELL, D., TABEI, K., SIEGEL, M.M., 1999: Automated data massaging, interpretation, and E-mailing modules for high throughput open access mass spectrometry. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 10, 1174-1187.

TUNDIS, R., LOIZZO, M.R., MENICHINI, F., STATTI, G.A., MENICHINI, F., 2008: Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments. Mini Rev. Med. Chem. 8, 399-420.

TUNDIS, R., BONESI, M., MENICHINI, F., LOIZZO, M.R., CONFORTI, F., STATTI, G., PIRISI, F.M., MENICHINI, F., 2012a: Antioxidant and anti-cholinesterase activity of *Globularia meridionalis* extracts and isolated constituents. Nat. Prod. Commun. 7, 1015-1020.

TUNDIS, R., PERUZZI, L., COLICA, C., MENICHINI, F., 2012b: Iridoid and bisiridoid glycosides from *Globularia meridionalis* (Podp.) O. Schwarz aerial and underground parts. Biochem. Syst. Ecol. 40, 71-74.

TUTIN, T.G., HEYWOOD, V.H., BURGES, N.A., MOORE, D.M., VALENTINE, D.H., WALTERS, S.M., WEBB, D.A., 1972: Flora Europaea (Vol. 3). Cambridge University Press.

VILJOEN, A., MNCWANGI, N., VERMAAK, I., 2012: Anti-inflammatory iridoids

of botanical origin. Curr. Med. Chem. 19, 2104-2127.

West, B.J., Uwaya, A., Isami, F., Deng, S., Nakajima, S., Jensen, C.J., 2014: Antiglycation activity of iridoids and their food sources. Int. J. Food Sci. Article ID 276950. http://dx.doi.org/10.1155/2014/276950.

Wieffering, J.H., 1966: Aucubinartige Glucoside (Pseudoindikane) und verwandte Heteroside als systematische Merkmale. Phytochemistry 5, 1053-1064.

Wink, M, 2003: Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. Phytochemistry 64, 3-19.

Won, T.H., Ryu, S.K., Kang, S.S., Shin, J., 2010: Simultaneous analysis of bioactive metabolites from *Rehmannia glutinosa* by HPLC-DAD-MS/MS. Nat. Prod. Sci. 16, 116-122.

Xu, J., Wu, J., Zhu, L.Y., Shen, H., Xu, J.D., Jensen, S.R., Jia, X.B., Zhang, Q.W., Li, S.L., 2012: Simultaneous determination of iridoid glycosides, phenethylalcohol glycosides and furfural derivatives in Rehmanniae Radix by high performance liquid chromatography coupled with triple-quadrupole mass spectrometry. Food Chem. 135, 2277-2286.

Zennaki, S., Krouf, D., Taleb-Senouci, D., Bouchenak, M., 2009: *Globularia alypum* L. lyophilized methanolic extract decreases hyperglycemia and improves antioxidant status in various tissues of streptozotocin-induced diabetic rats. J. Complement Integr. Med. 6, Article 34.

Zhu, J., Cole, R.B., 2000: Formation and decompositions of chloride adduct ions, $[M + Cl]^-$, in negative ion electrospray ionization mass spectrometry. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 11, 932-941.

Address of the corresponding author:
Maja Crkvenčić, Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Schrottova 39, HR-10000 Zagreb, Croatia.
E-mail: mcrkvencic@pharma.hr

© The Author(s) 2015.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Share-Alike License (http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

Chem. Biodiversity **2016**, *13*, 219 – 223

FULL PAPER

Essential Oil Composition of Three *Globularia* Species

by **Maja Crkvenčić**[a]), **Slavica Dudaš**[b]), **Igor Jerković**[c]), **Zvonimir Marijanović**[d]), **Danijela Poljuha**[e]), and **Kroata Hazler Pilepić***[a])

[a]) Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Schrottova 39, HR-10000 Zagreb (phone: +385-1-4622896; fax: +385-1-4622895; e-mail: khazler@pharma.hr)
[b]) Agricultural Department, Polytechnic of Rijeka, Karla Huguesa 6, HR-52440 Poreč
[c]) Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry and Technology, University of Split, N. Tesle 10/V, HR-21000 Split
[d]) 'Marko Marulić' Polytechnic of Knin, P. Krešimira IV 30, HR-22300 Knin
[e]) Department of Agriculture and Nutrition, Institute of Agriculture and Tourism, Karla Huguesa 8, HR-52440 Poreč

The chemical composition of the essential oils obtained by hydrodistillation from the aerial parts of *Globularia cordifolia* L., *G. meridionalis* (Podp.) O.Schwarz, and *G. punctata* Lapeyr. was characterized by GC-FID and GC/MS analyses. Among the 33 identified compounds, the most abundant present in all investigated samples were oct-1-en-3-ol (2.9 – 47.0%), 6-(1,5-dimethylhex-4-enyl)-3-methylcyclohex-2-enone (8.2 – 40.9%), and fukinanolid (7.4 – 31.6%). Multivariate statistical analyses (PCA and HCA) of the hitherto studied *Globularia* volatile compounds confirmed to some extent the assumed phylogenetic relationships of the *Globularia* species studied, including the close relationship between the morphologically similar species *G. cordifolia* and *G. meridionalis*, but also evidenced several discrepancies in the current classification of *Globularia* species.

Introduction. – Essential oils are complex mixtures of volatile compounds, mainly terpenes and oxygenated aromatic and aliphatic compounds, such as phenols, alcohols, aldehydes, ketones, esters, lactones, coumarins, ethers, and oxides, biosynthesized and accumulated in many plants. These naturally occurring mixtures of volatile compounds have been gaining increasing interest because of their wide range of applications in pharmaceutical, sanitary, cosmetics, perfume, food, and agricultural industries [1].

Globularia L., a small angiosperm genus, comprises *ca.* 30 species of mostly evergreen perennials and small shrubs distributed in Central and Southern Europe, Macaronesia, Northern Africa, and Southwestern Asia [2]. *Globularia* species usually grow in dry places, such as mountain rocks, grasslands and stony slopes. Most of them possess simple leaves, either alternate or in rosettes, and blue flowers assembled in round capitula, by which the genus was given its name. Flowers are pentamerous, two-lipped, and hermaphrodite, with mostly four stamens and a one-locular ovary [3].

Several members of the genus are known for their medicinal properties [4][5]. Iridoids and phenolic compounds such as flavonoids and phenylethanoids are the main secondary metabolites of the species from the genus *Globularia*, which are probably responsible for the majority of their biological activities [6] and also suggested to be potential chemotaxonomic markers [7][8]. The chemistry of volatile compounds in *Globularia* has not been studied in many details. Recently, the essential oils of two Algerian *G. alypum* L. populations were compared [9]. Earlier, the influence of drought and warming on the production of volatile compounds and their seasonal changes in *G. alypum* L. had been investigated [10].

As far as we know, there are no reports on the volatile oil composition of *G. cordifolia* L., *G. meridionalis* (Podp.) O.Schwarz, and *G. punctata* Lapeyr. Hence, the objective of this study was to qualitatively and quantitatively investigate the composition of their essential oils. Given that the essential-oil composition can be useful in finding chemotaxonomic markers supporting the elucidation of phylogenetic relationships [11][12], the chemotaxonomic potential of the obtained *Globularia* volatile composition was evaluated.

Results and Discussion. – *Composition of Volatile Compounds.* The volatile composition of six populations of three *Globularia* species (two populations per species) were investigated. The codes, voucher numbers, harvesting locations, geographic coordinates, and habitat types of the investigated samples are given in *Table 1.*

A total of 33 constituents were identified in the essential oils, accounting for 90.2 – 92.8% of the total oil composition. Their contents are shown in *Table 2*, with the oil constituents listed in order of their elution from a *HP-5ms* column. Terpenes were the major constituents in five of the *Globularia* oils (47.4 – 69.9%), whereas aliphatic alcohols predominated in the oil of *G. cordifolia* from Mostar (*Gc1*; 60.5%). Moreover, the terpenes were mostly represented by oxygenated sesquiterpenes (16.9 – 58.2%), followed by oxygenated monoterpenes in the *Gc1* oil and both *G. meridionalis* samples (*Gm1* and *Gm2*) and by a phytol isomer (diterpenoid) in the three remaining samples (*G. cordifolia* from Baške Oštarije (*Gc2*), *G. punctata* from

DOI: 10.1002/cbdv.201500062 © 2016 Verlag Helvetica Chimica Acta AG, Zürich

Table 1. *Species, Sample Code, Voucher Number, Harvesting Location, Geographic Coordinates, and Habitat Type of the Six Investigated* Globularia *Samples*

Species	Code (Voucher No)	Location	Latitude (N)	Longitude (E)	Elevation [m.a.s.l.]	Habitat type
G. cordifolia	*Gc1* (16 030)	Mostar	43°21′41″	17°48′20″	57	Rocky grasslands along a river
G. cordifolia	*Gc2* (16 031)	Baške Oštarije	44°31′41″	15°08′38″	917	Calcareous grasslands
G. meridionalis	*Gm1* (16 043)	Baške Oštarije	44°31′41″	15°08′38″	917	Calcareous grasslands
G. meridionalis	*Gm2* (16 040)	Grobnik field	45°22′39″	14°30′53″	308	Karst field
G. punctata	*Gp1* (16 052)	Grobnik field	45°22′39″	14°30′53″	308	Karst field
G. punctata	*Gp2* (16 051)	Vižintini	45°23′36″	13°51′20″	386	Calcareous grasslands

Vižintini (*Gp2*), and *G. punctata* from Grobnik field (*Gp1*)). Oct-1-en-3-ol, 6-(1,5-dimethylhex-4-enyl)-3-methylcyclohex-2-enone, and fukinanolid were the most abundant constituents present in all samples (2.9 – 47.0, 8.2 – 40.9, and 7.4 – 31.6%, resp.).

In total, eleven compounds found in the present samples were also observed previously in two Algerian *G. alypum* samples [9]. Hexadecanoic (palmitic) acid was the major constituent identified in both *G. alypum* samples, similarly as in one *G. punctata* sample of the present study. Moreover, oct-1-en-3-ol was present in high amounts in one of the two *G. alypum* samples [9], which is also comparable to the results obtained here. Other studies also reported oct-1-en-3-ol and/or eugenol as the major volatile compounds of *G. alypum* [10][13].

Multivariate Statistical Analyses. Intra- and interspecific diversity in the qualitative and quantitative composition of volatile compounds among the six *Globularia* samples was noticed. To evaluate whether the identified volatile components could be useful in reflecting the relationships between taxa or stands, 22 compounds showing a content of at least 1.6% in at least one of the oils isolated from the six samples were subjected to principal component analysis (PCA).

The biplot constructed by the two first principal components and showing the distribution of populations and essential-oil constituents is presented in *Fig. 1*. Principal component 1 (PC1) and principal component 2 (PC2) accounted for 95.3% of the total variance in the data and showed a clear separation of the samples into three groups. The first group consisted of the two *G. punctata* samples, and benzaldehyde (*c3*), α-terpineol (*c11*), phytol (*c21*), and oleic acid (*c22*) were the four oil components that contributed significantly to the distinction of this group. Four compounds including the two aliphatic alcohols *cis*-hex-3-en-1-ol (*c1*) and octan-1-ol (*c2*) and the two aldehydes (*E*,*E*)-hepta-2,4-dienal (*c6*) and phenylacetaldehyde (*c7*) were the distinctive components for the discrimination of *G. cordifolia* from Mostar (second group). The *G. cordifolia* sample from Baške Oštarije and the two *G. meridionalis* samples, characterized by eight volatile compounds (*c4*, *c5*, *c9*, *c12*, *c13*, *c15*, *c16*, and *c18*), composed the third group.

To provide a better understanding of the interrelationships within different *Globularia* species, a hierarchical cluster analysis (HCA) of the essential-oil components from both the present samples and the two Algerian *G.*

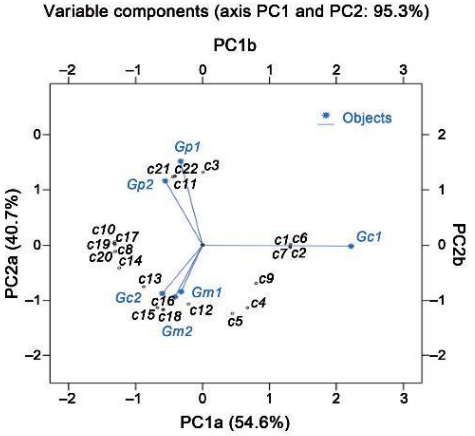


Fig. 1. *Biplot obtained by principal component analysis of the six* Globularia *samples and based on 22 volatile compounds with contents* $\geq$ *1.6% in at least one of the samples.* For the sample codes and the abbreviations of the volatile compounds, *cf. Tables 1* and *2*, respectively.

alypum samples [9] was conducted. As in the previous analysis, only compounds that were present with a content of at least 1.6% in at least one of the eight oils were included in the HCA. The benzene-1,2-dicarboxylic acid (phthalic acid) esters found in the *G. alypum* samples were excluded from the comparative analysis, as they were assumed to be the result of environmental contamination rather than plant secondary metabolites with potential chemotaxonomic significance [14].

The resulting dendrogram shows the clustering of the compared samples into two main clades (*Fig. 2.*), indicating the separation of the European from the African taxa. The volatile compounds responsible for the differentiation of the *G. alypum* samples from the other investigated samples were linalool, α-terpineol, eugenol, and phytol, which were present also in other *Globularia* species, as well as nine compounds that were not detected in the European samples. *G. alypum* is a Mediterranean shrub, highly adapted to extreme, dry conditions, for which volatile compounds might play an important role. According to the current intrageneric classification [15][16], *G. alypum* belongs to a homonymous section of the subgenus *Aborlaria*.

 © 2016 Verlag Helvetica Chimica Acta AG, Zürich

Table 2. *Composition of the Essential Oils Isolated from the Aerial Parts of* Globularia cordifolia (*Gc1* and *Gc2*), G. meridionalis (*Gm1* and *Gm2*), *and* G. punctata (*Gp1* and *Gp2*)

Compound name and class	CA[a])	*RI*[b])	Content [%]					
			Gc1[c])	*Gc2*	*Gm1*	*Gm2*	*Gp1*	*Gp2*
trans-Hex-2-enal		< 900	1.4	0.8	0.8	1.4	1.3	1.0
cis-Hex-3-en-1-ol	*c1*	< 900	10.5	1.3	2.2	–	0.6	–
Octan-1-ol	*c2*	< 900	1.9	–	0.8	0.2	–	–
Nonane		900	–	–	0.2	–	0.4	–
Benzaldehyde	*c3*	965	0.4	–	–	–	2.6	1.4
Oct-1-en-3-ol	*c4*	984	47.0	12.3	22.6	9.0	2.9	3.0
2-Pentylfuran		996	–	–	–	0.4	–	0.5
Octan-3-ol	*c5*	1000	1.1	0.7	1.0	2.2	–	–
(*E*,*E*)-Hepta-2,4-dienal	*c6*	1016	3.5	–	–	–	1.1	–
Phenylacetaldehyde	*c7*	1048	3.3	–	–	–	0.4	0.8
Benzofuran (coumarone)[d])	*c8*	1081	0.2	1.8	0.6	0.5	1.6	1.8
Linalool	*c9*	1107	2.8	1.1	3.0	1.8	1.0	1.0
2-Methylbenzofuran (2-methyl-coumarone)[d])	*c10*	1180	0.3	9.8	2.9	0.9	4.7	5.5
α-Terpineol	*c11*	1198	0.7	0.7	1.7	1.2	1.9	3.8
4-Vinyl-2-methoxyphenol	*c12*	1314	0.6	5.3	0.3	3.3	–	1.3
Eugenol		1362	–	–	–	0.5	–	0.7
trans-β-Damascenone		1390	0.6	1.5	0.8	0.6	0.5	0.7
Geranyl acetone		1461	–	–	–	0.2	0.2	0.5
(*E*)-β-Ionone	*c13*	1492	1.3	2.2	1.9	1.4	1.1	1.9
γ-Cadinene		1521	–	–	–	0.2	–	0.4
δ-Cadinene		1531	–	1.3	0.7	0.6	0.6	1.1
cis-Hex-3-enyl benzoate	*c14*	1575	–	6.8	2.9	1.4	0.5	0.4
Caryophyllene oxide	*c15*	1589	–	2.0	2.4	0.8	–	–
1,2,3,4,4a,7-Hexahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)naphtalene[d])		1635	–	–	0.9	0.8	0.7	0.8
τ-Muurolol	*c16*	1660	–	1.6	2.9	2.9	0.6	1.0
6-(1,5-Dimethylhex-4-enyl)-3-methyl-cyclohex-2-enone[d])	*c17*	1756	8.2	16.5	13.7	19.0	40.9	10.5
Benzyl benzoate		1775	–	–	0.9	0.1	–	0.7
Fukinanolid (bakkenolid A)[d])	*c18*	1822	7.4	12.5	16.5	31.6	9.7	8.3
6,10,14-Trimethylpentadecan-2-one (hexahydroxyfarnesyl acetone)	*c19*	1857	1.2	4.7	3.8	3.1	2.6	3.1
(*E*,*E*)-Farnesyl acetone		1928	0.1	0.7	0.6	0.8	1.0	1.3
Hexadecanoic acid (palmitic acid)	*c20*	1963	0.3	1.4	4.5	6.1	1.7	17.6
Phytol isomer	*c21*	2122	–	5.2	2.7	–	9.1	13.0
(Z)-Octadec-9-enoic acid (oleic acid)	*c22*	2181	–	–	–	0.1	3.9	8.1
Total identified [%]			**92.8**	**90.2**	**91.3**	**91.1**	**91.6**	**90.2**
Terpenes			**22.3**	**50.0**	**51.6**	**65.0**	**69.9**	**47.4**
Oxygenated monoterpenes			3.5	1.8	4.7	3.2	3.1	5.3
Diterpenes			–	5.2	2.7	–	9.1	13.0
Sesquiterpene hydrocarbons			–	1.3	1.6	1.6	1.3	1.9
Oxygenated sesquiterpenes			16.9	38.0	39.9	58.2	54.8	24.6
Norisoprenoids			1.9	3.7	2.7	2.0	1.6	2.6
Oxygenated compounds			**70.5**	**40.2**	**39.5**	**26.1**	**21.3**	**42.8**
Aliphatic alcohols			60.5	14.3	26.6	11.4	3.5	3.0
Aldehydes			8.6	0.8	0.8	1.4	5.4	3.2
Fatty acids			0.3	1.4	4.5	6.2	5.6	25.7
Furans			0.5	11.6	3.5	1.8	6.3	7.8
Phenolic compounds			0.6	12.1	4.1	5.3	0.5	3.1
Others			–	–	**0.2**	–	**0.4**	–
Aliphatic hydrocarbons			–	–	0.2	–	0.4	–

[a]) CA: Compound abbreviation of the compounds included in the statistical analyses (with contents $\geq$ 1.6% in at least one of the samples). [b]) *RI*: Retention index determined relative to a homologous series of *n*-alkanes (C_9 – C_{25}) on a *HP-5ms* column. [c]) For the sample codes, *cf. Table 1*. [d]) Compound tentatively identified based on MS spectra.

© 2016 Verlag Helvetica Chimica Acta AG, Zürich

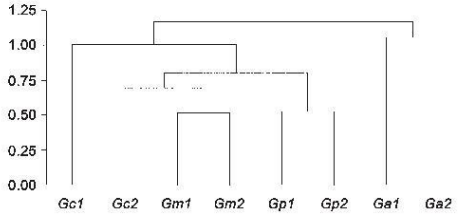


Fig. 2. *Dendrogram obtained by hierarchical cluster analysis of eight samples of four* Globularia *species* (two samples each of the three species investigated here and two Algerian *G. alypum* samples [9]). *Ga1*, *G. alypum* from Boutaleb; *Ga2*, *G. alypum* from Khenchela; for the codes of the other samples, *cf. Table 1*.

The subdivision of European samples into three subclades is interesting from both geographical and taxonomic aspects. The distinctive oil composition of the *G. cordifolia* sample from Mostar (*Gc1*) may be due to the different edapho-climatic conditions of its locality, characterized by the humid environment of the Neretva river banks [17], but also the result of unique genetic characteristics, to which disjunction of the population could have led [18]. It is also possible that the high content of oct-1-en-3-ol, detected especially in sample *Gc1*, could be the result of a fungal infection, since this compound is known as the major volatile metabolite produced by molds, and its emission by infected plants has been previously reported [19]. Although such contamination was not observed during the sampling process, it was observed that the population from Mostar was considerably smaller in growth compared to the other included populations of *G. cordifolia*/*G. meridionalis* group (*Gc2*, *Gm1*, *Gm2*). Recent studies on *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. indicated that oct-1-en-3-ol can lead to retarded seedling formation, inhibition of plant growth, as well as inhibition of chlorophyll production [20].

Another interesting point that arises from the present analysis is the distinction of a second subclade, consisting of the two *G. meridionalis* samples and *G. cordifolia* sample from Baške Oštarije (*Gc2*). The observed clustering could be explained by the close relationship of these taxa, which were earlier considered conspecific. The resemblance of *G. cordifolia* and *G. meridionalis* has long been observed and their taxonomic affiliation debated. Morphological similarities of these taxa were noticed by many authors and their differentiation on the level of subspecies is very common in the botanical literature [2][21 – 28]. In 1939, *Schwarz* [15] gave distinguishing features and precise geographic-distribution data of *G. cordifolia* and *G. meridionalis*, which he placed into the section *Empetron*, along with four related species [15][16]. Nevertheless, a comprehensive comparison of *Globularia* populations along their distribution area gave confusing results. Besides their own unique morphological features described by *Schwarz*, both taxa had also features that were characteristic of the other taxon [21]. This phenomenon is especially noticeable in the overlapping areas of their distribution, such as the northern part of the Dinaric Alps including Baške Oštarije [21][23], one of the sampling areas of the present study.

The third subclade comprised the two samples of *G. punctata*, the widespread European species that is a member of section *Globularia*. Formation of this separate clade might prove the similar oil composition to be a consequence of genetic rather than biological influence owing to different sampling localities.

Evaluation of the Chemotaxonomic Potential of Globularia L. Volatile Compounds. The present study showed that the essential oils of species from the genus *Globularia* exhibited several characteristic compounds, and their chemical composition could be useful in the assessment of phylogenetic relationships among *Globularia* species.

Although the number of samples in this study was not sufficient to permit major conclusions of phylogeny and biogeography of *Globularia*, it should be noted that the results partially corroborated previous classifications of *Globularia* species, suggesting some novel relations and providing a few clues for further studies of this genus. The inclusion in the statistical analysis of the results obtained by *Ramdani et al.* [9] showed the distinct separation of the *G. alypum* samples from the three studied European species. This is not in accordance with the suggested division of the genus in two subgenera, with *G. punctata* belonging to subgenus *Globularia* (syn. subgen. *Jasionopsis* Schwarz) and *G. alypum*, *G. cordifolia*, and *G. meridionalis* belonging to subgenus *Abolaria* Schwarz [2][16]. Even though the observed separation could be due to the influence of different ecological factors, the results of our preliminary molecular comparison based on internal transcribed spacer (ITS) sequence analysis suggest the same relation pattern between the four *Globularia* species (*Hazler Pilepić et al.*, unpublished results). Definitive conclusions about the taxonomic relationships among *Globularia* taxa, especially between *G. cordifolia* and *G. meridionalis*, require a detailed characterization on the population level and could probably be explained with more certainty after conducting an extensive molecular genetic analysis. As for *G. cordifolia* and *G. meridionalis* chemotaxonomy, 5-substituted iridoids (*e.g.*, globularifolin) are considered to have some taxonomic potential for the title species, since they were only found in these two taxa by now [8].

Conclusions. – The analysis of the chemical composition of the volatile compounds of *G. cordifolia*, *G. meridionalis*, and *G. punctata* resulted in the identification of 33 oil constituents. The results of the statistical analyses suggested that the chemical composition of *Globularia* essential oils could be useful for the evaluation of their phylogenetic relationships. The results confirmed to some extent the assumed phylogenetic relationships of the *Globularia* species studied, including the close relationship between the morphologically similar species *G. cordifolia* and *G. meridionalis*. However, they also raise some questions about the current classification of *Globularia* species. To address these questions and possibly to find a chemotaxonomic marker for

 © 2016 Verlag Helvetica Chimica Acta AG, Zürich

the reliable distinction of the two closely-related taxa, it is necessary to conduct a study on samples from a larger number of populations and collected from a wider distribution area, thus eliminating the possible influence of environmental factors on the essential oil biosynthesis.

The authors would like to thank Mr. *S. Maslo* for his help in collecting the plant material from Mostar. This research has been supported by the *Croatian Ministry of Science, Education and Sports* (project Z-1.1.2.7.) and, in part, by the *Croatian Science Foundation* (project IP-11-2013-8547).

Experimental Part

Plant Material. The aerial parts of *Globularia cordifolia* L., *G. meridionalis* (Podp.) O.Schwarz, and *G. punctata* Lapeyr. were collected during the flowering period in May 2012 from natural populations (two for each taxa) in Croatia and Bosnia and Herzegovina. The plant species were identified by *K. H. P.*, and voucher specimens have been deposited with the Herbarium of the Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Croatia. Sample codes, voucher numbers, harvesting locations, and geographic data are presented in *Table 1*.

Isolation of Volatile Compounds. All samples (20 g) were air-dried to constant weight, ground into a powder, and submitted to hydrodistillation for 2.5 h using a *Clevenger*-type apparatus. The obtained essential oils (colorless in the case of *G. cordifolia* from Mostar, pale yellow for the two *G. meridionalis* oils, and yellow for the remaining samples) were separated, dried (Na_2SO_4), and stored under Ar in sealed vials at 4° until required. The oil yields were very low (< 0.1%), similar to those previously reported [9].

GC-FID Analysis. The GC-FID analyses were carried out with an *Agilent Technologies* (Palo Alto, CA, USA) gas chromatograph model *7890A* equipped with a flame ionization detector (FID) and a *HP-5ms* cap. column (5% phenyl-methylpolysiloxane, *Agilent J&W*). The GC conditions were similar to those described previously [29][30]. In brief, the oven temp. was programmed isothermal at 70° for 2 min, increasing from 70 to 200° at 3°/min, and hold isothermal at 200° for 15 min; carrier gas, He (1.0 ml/min).

GC/MS Analysis. The GC/MS analyses were performed using an *Agilent Technologies* (Palo Alto, CA, USA) gas chromatograph model *7890A* equipped with a mass selective detector (MSD) model *5975C* (*Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, USA) and a *HP-5ms* cap. column, under the same analytical conditions as described for the GC-FID analysis. The MSD (EI mode) was operated at 70 eV, and the mass range was 30 – 300 amu, as previously reported [29][30].

Identification of Volatile Compounds. The identification of the volatile constituents was based on the comparison of their retention indices (*RI*s), determined rel. to the retention times (t_R) of a homologous series of *n*-alkanes (C_9 – C_{25}), with those reported in the literature [29][30] and their mass spectra with those of authentic compounds available in our laboratories or those listed in the *NIST 08* and *Wiley 275* mass spectral libraries [29][30].

Multivariate Statistical Analyses of Globularia *Volatile Compounds.* Principal component analysis (PCA) was performed on the main volatile constituents (content ≥ 1.6% in at least one of the samples) of all six samples, to examine the interrelationships between species and stands, using the IBM SPSS Statistics software version 22.0 [31]. Hierarchical cluster analysis (HCA) was also applied, to study the similarity of the samples (the six investigated and two Algerian *G. alypum* oils [9]) based on their constituent distribution (content ≥ 1.6% in at least one of the samples). The squared *Euclidean* distance was used as a measure of dissimilarity between objects, and the hierarchical clustering was performed using *Ward*'s method with SAS/STAT software version 9.0 [32].

REFERENCES

[1] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, *Food. Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 446.
[2] K. Holländer, E. J. Jäger, *Flora* **1994**, *189*, 223.
[3] T. G. Tutin, in 'Flora Europaea', Eds. T. G. Tutin, V. H. Heywood, N. A. Burges, D. M. Moore, D. H. Valentine, S. M. Walters, D. A. Webb, Cambridge University Press, Cambridge, 1972, Vol. 3, p. 282.
[4] J. Fakchich, M. Elachouri, *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *154*, 76.
[5] M. Dal Cero, R. Saller, C. S. Weckerle, *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *151*, 253.
[6] N. Amessis-Ouchemoukh, I. M. Abu-Reidah, R. Quirantes-Piné, C. Rodríguez-Pérez, K. Madani, A. Fernández-Gutiérrez, A. Segura-Carretero, *Phytochem. Anal.* **2014**, *25*, 389.
[7] J. B. Harborne, C. A. Williams, *Phytochemistry* **1971**, *10*, 367.
[8] R. Tundis, L. Peruzzi, C. Colica, F. Menichini, *Biochem. Syst. Ecol.* **2012**, *40*, 71.
[9] M. Ramdani, T. Lograda, A. Ounoughi, P. Chalard, G. Figueredo, H. Laidoudi, M. ELKolli, *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2014**, *3*, 306.
[10] J. Llusià, J. Peñuelas, G. A. Alessio, M. Estiarte, *Physiol. Plantarum* **2006**, *127*, 632.
[11] N. Radulović, M. Dekić, M. Joksović, R. Vukićević, *Chem. Biodiversity* **2012**, *9*, 106.
[12] T. Radjabian, A. Salimi, N. Rahmani, *Chem. Biodiversity* **2014**, *11*, 1945.
[13] B. Barhouchi, S. Aouadi, A. Abdi, *J. Chem. Pharm. Res.* **2014**, *6*, 776.
[14] A. Manayi, M. Kurepaz-mahmoodabadi, A. R. Gohari, Y. Ajani, S. Saeidnia, *DARU J. Pharm. Sci.* **2014**, *22*, 78.
[15] O. Schwarz, *Bot. Jahrb. Syst.* **1938**, *69*, 318.
[16] O. Schwarz, *Drudea* **1963**, *3*, 5.
[17] N. A. Abdelmajeed, E. N. Danial, H. S. Ayad, *Arch. Sci.* **2013**, *66*, 100.
[18] J. D. Thompson, *Heredity* **1999**, *82*, 229.
[19] K. Kishimoto, K. Matsui, R. Ozawa, J. Takabayashi, *J. Gen. Plant Pathol.* **2007**, *73*, 35.
[20] R. Hung, S. Lee, J. W. Bennett, *Mycology* **2014**, *5*, 73.
[21] V. Ravnik, *SAZU, Razr. prir. med. vede, Odd. prir. vede, Razprave* **1965**, *8*, 5.
[22] I. Ljubičić, M. Britvec, M. Plazibat, I. Vitasović Kosić, *Agric. Conspec. Sci.* **2010**, *75*, 67.
[23] T. Nikolić, *Nat. Croat.* **2000**, *9*, 46.
[24] R. Domac, in 'Mala Flora Hrvatske i Susjednih Područja', Školska knjiga, Zagreb, 1973, p. 340.
[25] A. Degen, in 'Flora Velebitica, III. Band', Verlag der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest, 1938, p. 44.
[26] N. Stojanov, B. Stefanov, in 'Flora na Bălgarija', 3rd edn, University Press, Sofia, 1948, p. 1062.
[27] A. Fiori, in 'Nuova Flora Analitica d'Italia', Tipografia di M. Ricci, Firenze, 1925 – 1929, Vol. II, p. 474.
[28] A. Hayek, in 'Prodromus Florae Peninsulae Balcanicae, I. Band', Verlag des Repertoriums, Dahlem, 1927, p. 400.
[29] I. Jerković, M. Šuste, Ž. Malež, K. Hazler Pilepić, *Nat. Prod. Commun.* **2012**, *7*, 931.
[30] I. Jerković, Z. Marijanović, *Chem. Biodiversity* **2010**, *7*, 2309.
[31] SPSS IBM Corp., Released 2013, IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0., IBM Corp., Armonk, NY, 2013.
[32] SAS/STAT Software, Version 9.0 of the SAS System for [Unix], SAS Institute Inc., 2004.

Received February 18, 2015
Accepted April 8, 2015

© 2016 Verlag Helvetica Chimica Acta AG, Zürich

PERIODICUM BIOLOGORUM
VOL. 118, No 4, 417–424, 2016
DOI: 10.18054/pb.v118i4.3856

UDC 57:61
CODEN PDBIAD
ISSN 0031-5362

original research article

Contribution to *Globularia* phylogeny based on nuclear ribosomal spacer and two chloroplast DNA regions

K. HAZLER PILEPIĆ[1]
M. FRIŠČIĆ[1]
A. DURAN[2]
S. MASLO[3]
R. GARIĆ[4]
S. ČULJAK[1]
K. ŠUTALO[1]

[1] Department of Pharmaceutical Botany
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
University of Zagreb
Schrottova 39, 10 000 Zagreb, Croatia

[2] Department of Biology
Faculty of Science
Selçuk University
42 075 Selçuklu, Konya, Turkey

[3] Lundåkerskolan
Södra Storgatan 45, 332 33 Gislaved, Sweden

[4] Institute for Marine and Coastal Research
University of Dubrovnik
Kneza Damjana Jude 12, 20 000 Dubrovnik, Croatia

Correspondence:
Kroata Hazler Pilepić
Department of Pharmaceutical Botany
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
University of Zagreb
Schrottova 39, 10 000 Zagreb, Croatia
E-mail: khazler@pharma.hr

Keywords: *Globularia*, ITS, *trnL-trnF*, *rbcL*, Maximum Parsimony, Quaternary

Received January 07, 2016.
Revised June 23, 2016.
Accepted September 01, 2016.

Abstract

Background and Purpose: *Molecular approach has a major impact on phylogenetic studies of plants, considering that it gives useful information about evolutionary events and relations on all taxonomic levels. The sequence data of the nuclear ITS and of two chloroplast regions,* trn*L*-trn*F spacer and* rbc*L gene, obtained from thirteen* Globularia *L. taxa, including five Anatolian endemics, representing six sections altogether, were analyzed in order to determine the relations between the European and the Anatolian species and get a better insight into the phylogeny of several closely related* Globularia *taxa.*

Materials and Methods: *Total cellular DNA was extracted from fresh or frozen leaf tissue of thirteen* Globularia *samples. The ITS regions of nuclear DNA and two chloroplast DNA regions were amplified and sequenced. Obtained nuclear and combined plastid data matrices were subjected to Maximum Parsimony analyses.*

Results and Conclusions: *Molecular data that were obtained in this study indicate the existence of separate centers of diversification for the European and the Anatolian* Globularia. *The results provide support for relationships among the studied Anatolian endemic species and indications for a redefinition of affinities of some of the European species. The results presented herein are discussed along with available morphological, karyological, phytogeographical and molecular data.*

INTRODUCTION

Globularia L. is a small Angiosperm genus mostly comprised of evergreen perennials and small shrubs, recognizable by blue flowers assembled in globular capitula, which it was named after. The first extensive classifications of *Globularia* were proposed by Schwarz *(1, 2)*. They comprised 22-25 taxa, which were divided into nine sections. Subsequently, Schwarz's studies regarding this genus have undergone some modifications by several authors *(3, 4, 5)*. The finally accepted classification of *Globularia* separates the genus into eight sections based on morphological characters, cytological data, ecology and distribution. These include *Lytanthus*, *Polycephalium*, *Carradoria*, *Hellenion*, *Globularia*, *Alypum*, *Empetron* and *Gymnocladium (5)*.

Since most of the taxa are localized in Central and Southern Europe, Anatolia, Northern Africa and Macaronesia, the Mediterranean basin is viewed as their primary center of diversification, which has started approximately 7.57 million years ago in the Miocene *(6, 7)*. *Globularia vulgaris* L. is the only taxon distributed more northward, reaching the

Baltic region. A total of 15 *Globularia* species are included in the European flora *(8)* and 11 taxa in the flora of Turkey *(9, 10)*. Among and above these taxa there is a considerable number of endemic species, particularly in Macaronesia *(11)*, Morocco *(12)*, Italy *(13)*, Greece *(14)* and Turkey *(9, 15)*. Taxa of *Globularia* are known as outcrossing and mainly exhibit two ploidy levels, diploids (2n=2x=16 chromosomes) and tetraploids (2n=4x=32), whereby autopolyploidy is a proposed mode of genome duplication *(1, 3, 4, 16)*. Cytogeographical relations indicate that endemic taxa and taxa which grow in moderate climate areas are predominantly diploids, while taxa with broader distributions and growing in rigorous habitat conditions are mainly tetraploids *(1, 3)*. All *Globularia* examined by now have the same pollen morphology *(17)*. From an economic point of view, several *Globularia* species are valuable herbal plants, for example *G. alypum* L. and *G. trichosantha* Fisch & C.A. Mey., used in traditional medicine of countries such as Spain, Italy, Tunisia and Turkey *(18, 19, 20)*. Several recent investigations showed that some widespread European taxa also exhibit medicinal potential *(21, 22)*.

In the past few decades, molecular studies have greatly contributed to a better understanding of relations and plant phylogeny at all taxonomic levels. Accordingly, the genus *Globularia* that had traditionally been included in the homonymous family of Globulariaceae, was meanwhile proposed for inclusion into the Plantaginaceae, based on molecular evidence *(23, 24)*. Moreover, the ITS molecular data obtained from 23 *Globularia* taxa proposed interesting conclusions about their Miocene origin and Pleistocene independent development of three European Alpine/montane and two Mediterranean *Globularia* lineages with proposed rate of 0.33 net speciation events per million years *(6, 7, 25, 26)*.

In order to provide better understanding of intrageneric relationships among *Globularia*, Maximum Parsimony analyses were conducted on three DNA regions from seven European, five Anatolian and one Mediterranean *Globularia* taxon. Taking into account the above mentioned studies that comprise most of the *Globularia* species, including Macaronesian endemic species, our study is focused on the comparison of several European and Anatolian species, among which five are endemics. Phylogenetic relationships were reconstructed using the internal transcribed spacer (ITS) of the nuclear rDNA repeats and two chloroplast regions, nontranscribed *trn*L-*trn*F spacer and plastid gene *rbc*L.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and DNA Extraction

Samples of 13 *Globularia* taxa belonging to six sections were studied. The plants were collected from their natural habitats or obtained from botanical gardens. Voucher specimens were deposited in the Herbarium of the Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Croatia. Table 1 lists all the data about plant samples, including the geographical distribution of investigated taxa and GenBank accession numbers of the analyzed sequences. Total cellular DNA was extracted from 100–140g dry, fresh or frozen leaf tissue following the procedure of Doyle and Doyle *(27)*, modified as reported in Petit et al *(28)*.

Amplification and Sequencing

The ITS regions of nuclear DNA and two chloroplast DNA regions were amplified via the polymerase chain reaction (PCR) using the primer pairs designed by White et al. *(29)* for ITS, Taberlet et al. *(30)* for *trn*L-*trn*F and Hasebe et al. *(31)* for *rbc*L. Amplification reactions were performed in volumes of 50μL containing 0.5μM of each primer, 200μM of each nucleotide, 2mM $MgCl_2$ and 1.25 units of *TaKaRa Taq* HS polymerase (Takara Bio Inc, Japan). Amplifications were performed using a Biorad MyCycler 1065 under the following conditions: first denaturation at 93°C for 3 min, followed by 35 cycles of template denaturation at 93°C for 1 min, primer annealing at 50°C for 1 min, elongation at 72°C for 1 min and a final extension at 72°C for 10 min. The PCR products were verified by electrophoresis on 0.7% agarose gels containing ethidium bromide in Tris-acetate EDTA (TAE) buffer and detected under UV light. The size of fragments was estimated by comparison with a molecular size standard (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas). The PCR products were purified by using the GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, USA) in accordance with the protocol of the manufacturer. DNA sequencing was performed by Macrogen (Seoul, South Korea) on an ABI3730XL DNA sequencer, using the same primer set as for PCR. Double-stranded sequencing was performed for at least 75% of their total length. All sequences have been deposited in the GenBank Sequence Database (Table 1).

Sequence Alignment and Phylogenetic Reconstruction

Nucleotide sequence fragments were manually edited and aligned using ClustalX.2.1 *(32)*. The alignment is available from the author upon request. The data set contained a total of 13 *Globularia* taxa sequenced in this work, and the sequences of *Plantago major* L. (*trn*L-*trn*F, *rbc*L), *P. lanceolata* L. (ITS), *Veronica officinalis* L. (ITS, *trn*L-*trn*F, *rbc*L), *Digitalis lanata* Ehrh. (ITS, *trn*L-*trn*F) and *D. lutea* L. (*rbc*L), which were retrieved from GenBank. GenBank accession numbers of outgroup taxa are listed in Table 2. We analyzed the nuclear and combined plastid data sets independently and thus two sequence data matrices were generated: (1) an ITS data matrix and (2) a *trn*L-*trn*F combined with a *rbc*L data matrix, all comprised of 13 *Globularia* taxa and 3 outgroup taxa.

Sequence data matrices were subjected to phylogenetic analyses using the Maximum Parsimony Method in

TABLE 1 *Plant material, voucher information, geographical distribution and GenBank accession numbers.*

Taxon	Source of material[1)]	Voucher number	Geographical distribution[2)]	GenBank accession number	Section[4)]
Globularia alypum L.	42°30′ N 18°19′ E, 1	16025_1	Mediterranean	ITS KP278477 LF[3)] KT853048 *rbc*L KT853061	*Alypum*
G. anatolica Duran, Çetin, Öztürk	37°44′ N 29°20′ E, 2	16030_1	Anatolia endemic	ITS KT757362 LF KT853049 *rbc*L KT853062	*Polycephalium*
G. cordifolia L.	44°43′ N 14°58′ E, 3	16035_1	Central / SE Europe	ITS KP278478 LF KT853050 *rbc*L KT853063	*Empetron*
G. davisiana O. Schwarz	36°44′ N 30°32′ E, 2	16040_1	Anatolia endemic	ITS KT757363 LF KT853051 *rbc*L KT853064	*Polycephalium*
G. dumulosa O. Schwarz	mc, 4	16042_1	Anatolia endemic	ITS KT757364 LF KT853052 *rbc*L KT853065	*Hellenion*
G. hedgei H. Duman	37°27′ N 30°54′ E, 2	16043_1	Anatolia endemic	ITS KT757365 LF KT853053 *rbc*L KT853066	*Polycephalium*
G. meridionalis (Podp.) O. Schwarz	45°22′ N 14°30′ E, 3	16045_1	Central / SE Europe	ITS KP278479 LF KT853054 *rbc*L KT853067	*Empetron*
G. nudicaulis L.	45°45′ N 10°36′ E, 5	16050_1	Central Europe	ITS KT757366 LF KT853055 *rbc*L KT853068	*Gymnocladium*
G. punctata Lapeyr.	45°22′ N 14°30′ E, 3	16059_1	Europe	ITS KP278480 LF KT853056 *rbc*L KT853069	*Globularia*
G. repens Lam.	mc, 5	16060_1	SW Europe	ITS KT757367 LF KT853057 *rbc*L KT853070	*Empetron*
G. sintenisii Hausskn. & Wettst.	37°42′ N 41°24′ E, 2	16065_1	Anatolia endemic	ITS KT757368 LF KT853058 *rbc*L KT853071	*Polycephalium*
G. trichosantha Fisch. & C.A.Mey.	mc, 6	16070_1	E Europe, Anatolia, Crimea	ITS KT757369 LF KT853059 *rbc*L KT853072	*Globularia*
G. vulgaris L.	56°58′ N 16°46′ E, 7	16072_1	N Iberia, NW Baltic	ITS KT757370 LF KT853060 *rbc*L KT853073	*Globularia*

[1)] 1 – Collected by R. Garić from natural stands in Croatia, 2 – Collected by A. Duran from natural stands in Turkey, 3 – Collected by K. Hazler Pilepić from natural stands in Croatia, 4 – Botanische Gärten der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Germany; 5 – Botanische Gärten der Universität Bonn, Germany; 6 – Botanische Gärten der Philipps-Universität, Marburg, Germany; 7 – Collected by S. Maslo from natural stands in Sweden. mc – missing coordinates. [2)] Tutin et al *(3)*; Duran et al *(9)*; Schwarz *(1)*; Duman *(15)*; Wettstein *(40)*.[3)] LF – *trn*L-*trn*F intergenic spacer. [4)] Schwarz *(1)*; Duman *(15)*; Duran et al *(9)*.

MEGA 6 *(33)*. Three outgroups were used to root the trees. Phylogenetic reconstructions were carried out via heuristic searches using the Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) algorithm *(34)* with search level 1 in which the initial trees were obtained by random addition of sequences (10 replicates). Gaps and missing data were excluded from the dataset. The bootstrap method *(35)* was employed to examine the robustness of various clades revealed in the trees.

RESULTS

Analysis of the ITS Data Set

The aligned length of the ITS data set was 863 base pairs, 468 of which were constant, while 255 were variable characters and 111 (13%) were potentially parsimony-informative characters. Six equally parsimonious trees (consistency index 0.763, retention index 0.794) were

TABLE 2 *Outgroup samples' sequences retrieved from GenBank.*

Taxon	Sequence	Accesion number
Plantago lanceolata L.	ITS	AY101898.1
P. major L.	*trn*L-*trn*F	FJ490807.1
P. major L.	*rbc*L	KF602240.1
Veronica officinalis L.	ITS	DQ534900.1
V. officinalis L.	*trn*L-*trn*F	AF486391.1
V. officinalis L.	*rbc*L	HQ590322.1
Digitalis lanata L.	ITS	AY591284.1
D. lanata L.	*trn*L-*trn*F	AY591318.1
D. lutea L.	*rbc*L	FM207428.1

found by Maximum Parsimony analysis of the ITS region of the 13 taxa studied. The 50% consensus tree is presented in Figure 1. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% of the trees were collapsed.

The topology of the ITS consensus tree indicates that *Globularia* is separated into two major clades with high bootstrap support (BS = 83%/83%). Within clade I a sister relationship between all the European taxa is apparent, while within clade II all the Anatolian taxa are clustered together with the Mediterranean taxon *G. alypum*. The taxa within the European clade are separated into two well-supported subclades (BS = 100%). The first subclade comprises representatives of the section *Globularia* along with one from the section *Gymnocladium*, while all taxa in the second subclade belong to the section *Empetron*. In the Anatolian clade, the taxa from sections *Polycephalium* and *Alypum* form a subclade (BS = 66%) divided into two branches (BS = 66% and 50%), while *G. dumulosa* is supported as a sister to this alliance (BS = 83%).

Analysis of Combined *trn*L-*trn*F and *rbc*L Data Set

The final alignment of the combined *trn*L-*trn*F and *rbc*L data sets had 2217 positions, 1659 of which were constant, while 501 characters were variable and 81 characters (4%) were potentially parsimony-informative. Maximum Parsimony analysis of the combined *trn*L-*trn*F and *rbc*L regions of the 16 taxa found two most parsimonious trees (consistency index 0.809, retention index 0.827). The 50% majority rule consensus tree is shown in Figure 2.

The main topology of the consensus tree produced from combined *trn*L-*trn*F/*rbc*L sequence data was not much different from that of the ITS consensus tree. However, lower resolution was noticed for some taxa in the plastid sequences-based tree. All *Globularia* taxa were grouped into two major clusters. The extensive one (BS = 100%) comprises all European taxa along with the Anatolian *G. dumulosa,* while the Mediterranean *G. alypum* forms a weakly supported sister clade (BS = 50%). The second clade contains three representatives from the Anatolian section *Polycephalium* (BS = 100%), while *G. sintenisii* is separated without support.

DISCUSSION

The ITS sequence data, which are widely used for phylogenetic reconstruction of closely related species, showed an appropriate level of variation in the genus *Globularia*. Applied cpDNA regions were found to be less informative for this genus. Slower evolutionary rates of chloroplast genome may cause difficulties in finding the appropriate phylogenetic signal in some plant taxa *(36).*

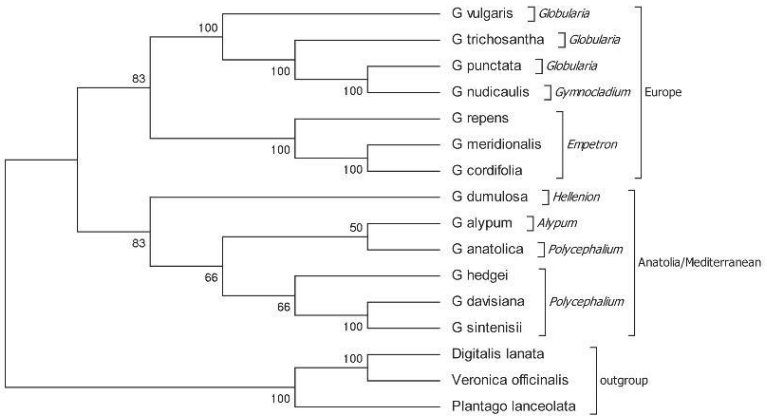


Figure 1. *The 50% consensus tree of 6 most parsimonious trees (CI = 0.763; RI = 0.794) from the Maximum Parsimony analysis of nrDNA ITS sequences obtained from* Globularia *taxa. Numbers above the branches are bootstrap values. Brackets indicate sections discussed in the text.*

Nevertheless, both trees showed similar topology and several resulting conclusions were derived.

The genus *Globularia* in this paper is represented by 13 taxa. Seven of them originate from Europe, five are Anatolian, while one is a Mediterranean species. The taxa investigated in our study belong to six sections and the resulting parsimony analysis mainly corroborates the current classification and interspecific affinities. The results of our analyses provide strong evidence for an early split within the genus and further diversification of two lineages in both the European and the Anatolian area.

According to the ITS 50% consensus tree, *G. vulgaris*, *G. punctata* and *G. trichosantha*, representatives of the section *Globularia* in our data set, form a well-supported clade (BS = 100%) including the *G. nudicaulis*, the single representative of the section *Gymnocladium*. By contrast, the cpDNA tree shows two well supported dichotomous nodes (BS = 100%), the first consisted of *G. vulgaris* and *G. punctata,* while the other one includes *G. nudicaulis* and *G. trichosantha*. The aforementioned taxa are evergreen perennials: *G. vulgaris*, *G. punctata* and *G. nudicaulis* form pleiocormous rosettes, while *G. trichosantha* develops stolons and has an espalier like growth form *(5)*. *G. vulgaris* is a tetraploid *(1, 3, 13, 16)* showing two disjunct distribution areas, one on the Iberian peninsula and in Southern France, and the other on the Baltic islands of Öland and Gotland *(8)*. This could indicate that *G. vulgaris* used to be more widespread than it is today. With respect to the estimated origin of *Globularia* in the Late Miocene *(7)*, it is possible that these populations separated during the Quaternary and that the polyploidization occured due to unfavorable conditions of glaciation periods. It has been proven that effective 2n gametes, which may lead to polyploidization, are induced by abiotic stress such as temperature *(37)*. Interestingly, no morphological difference has been noticed between the separated populations *(16)*. *G. vulgaris* shares a common cpDNA haplotype with *G. punctata,* which is a diploid taxon *(1, 3, 5, 16)* and the most widespread European *Globularia*, suggesting the possibility of a common maternal ancestor and overlapping areas in the past. Nevertheless, the ITS data indicates a close relationship of *G. punctata* with *G. nudicaulis,* a montane European taxon distributed in the Alps, the Pyrenees and mountains of Northern Spain. This diploid taxon, which shows great uniformity throughout the geographical range of its distribution (from Northern Spain to the Alps, *8, 13*), belongs to the section *Gymnocladium*, along with two taxa: *G. gracilis* Rouy et Richt., which is restricted to the Pyrenees and *G. liouvillei* Jah. et Maire, an endemic taxon of High Atlas in Morocco. According to Schwarz *(1)*, affiliation to the section *Gymnocladium* is based on the development of short stolons. However, *G. nudicaulis* was found to grow without stolons *(5)*. Whereas earlier obtained ITS data *(26)* have put *G. nudicaulis* in a separate clade along with *G. gracilis* from the same section, the results of our ITS analysis that indicate a sister-relationship between *G. nudicaulis* and *G. punctata* are somewhat unexpected. Moreover, in the cpDNA tree, *G. nudicaulis* was positioned with *G. trichosantha,* another member of the section *Globularia*. These results may be a consequence of incomplete taxon sampling. *G. trichosantha* is a diploid taxon distributed from the Eastern Balkans to the Crimea. Comes and Kadereit *(26)* have considered this species an early branching taxon of the Asia Minor clade together with *G. punctata*, but our molecular data clearly support separation of these European samples from those of Asia Minor.

The position of three taxa in our study that belong to the European section of *Empetron* (*G. cordifolia*, *G. meridionalis* and *G. repens*) was in good agreement with the current intrageneric classification. Close relationship was confirmed by both of our trees (BS = 100). These taxa are morphologically very similar dwarf shrubs, distributed in mountainous regions. *G. repens* is a diploid taxon *(1, 3)*, slightly smaller than the other two, commonly found in mountainous regions of South-Western Europe. Comes and Kadereit *(25, 26)*, proposed that *G. cordifolia* and *G. repens,* along with other Apennines/Balkan *Globularia* taxa (*G. neapolitana* O. Schwarz and *G. stygia* Orph. ex Boiss.), originated in the Pleistocene. Origin of many montane taxa could be explained by the ecological niche concept.

G. cordifolia and *G. meridionalis* form a supported (BS = 100) subcluster indicating their common ancestor and encouraging existing debates about their taxonomic affiliation. These two taxa are widespread in the mountains of Central and Southern Europe, from the Pyrenees to the Carpathians and show high degree of morphological and karyological polymorphism (2n=16 or 32, *4, 16, 38, 39*). In his early work, Wettstein *(40)* had noticed the existence of an intermediate form between these two taxa (*G. cordifolia* var. *intermedia*). In spite of that, Schwarz *(2)* persisted in the division of these taxa, giving distinguishing features and precise geographical distribution for each taxon. Nonetheless, a further comprehensive comparison of these two *Globularia* throughout their distribution area confirmed a high level of variability *(38)*. Therefore, differentiation based on their morphological features, clearly described by Schwarz, is not always possible, as both of the taxa display mixed characteristics finally leading to their questionable separation *(4, 38)*. Even though our results indicate common genealogy, at this level of research it could not be assessed with certainty whether the taxa should be divided or considered as one. Molecular data could suggest that *G. cordifolia* and *G. meridionalis* are evolutionary young, sympatric taxa, among which total reproductive isolation cannot be confirmed, especially taking into account their mixed characteristics, particularly seen in the populations from overlapping areas, such as the Dinaric Alps *(38, 41)*. Tetraploid forms, which are mostly found in the Apennines and in the Dinaric regions, could be an effective way of

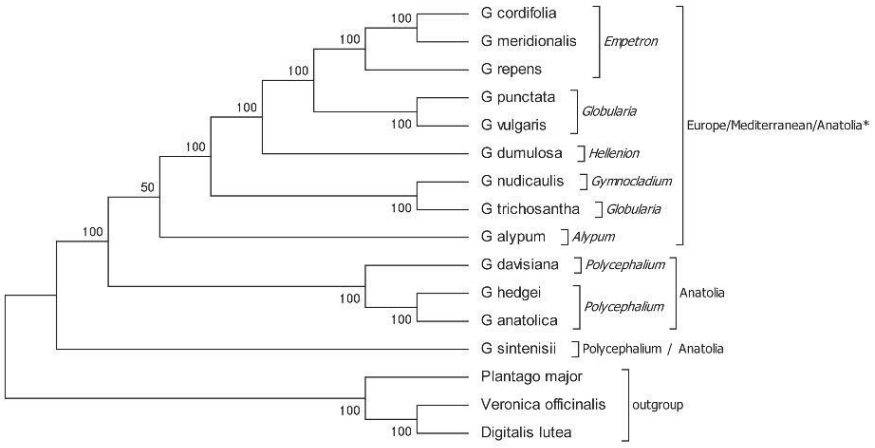


Figure 2. *The 50% consensus tree of 2 most parsimonious trees (CI = 0.809; RI = 0.827) from the analysis of combined* trn*L*-trn*F and* rbc*L sequences obtained from* Globularia *taxa. Numbers above the branches are bootstrap values. Brackets indicate sections discussed in the text.* *G. dumulosa

adaptation during glaciations and a powerful force for postglacial recolonizations. Existence of a tetraploid form could have some evolutionary advantage, especially in the areas with strong environmental changes *(42)*. However, molecular data that give evidence of close links between *G. cordifolia* and *G. meridionalis* could also suggest that these taxa could be considered as one. The results of phytochemical comparative studies of Croatian populations showed a pronounced similarity between their essential oil composition *(43)* and iridoid content *(44)*. From everything mentioned above, the consideration of these taxa as subspecies, which is very common in older botanical literature, cannot be dismissed *(5, 45, 46, 47, 48, 49, 50)*. However, the use of low-copy nuclear genes or some other molecular markers, which could provide sufficient resolution and further evidence on relations among these two taxa, is necessary.

Five Anatolian endemic taxa, *G. anatolica*, *G. davisiana*, *G. dumulosa, G. hedgei* and *G. sintenisii*, form a clearly resolved clade along with the Mediterranean *G. alypum* on the ITS tree. Based on the chloroplast sequence data, phylogenetic positions of *G. alypum* and *G. sintenisii* were poorly resolved, as demonstrated by weak or no bootstrap support, respectively. According to the same data set, *G. dumulosa,* which belongs to the section *Hellenion***,** was positioned among the European taxa. It is a high-mountainous, long-lived shrub that is morphologically well-characterized by hemispherical cushion-forming growth *(5)*. It probably originated in the Pliocene, as did the majority of *Globularia (7)*. Isolated and well-adapted, it remains to be present until today in the area of high mountains.

The remaining investigated Anatolian endemic taxa (*G. anatolica*, *G. davisiana*, *G. hedgei* and *G. sintenisii*) belong to the section *Polycephalium. G. anatolica* is a new endemic species found recently in the Honaz Mountain National Park *(9)*, an important biogeographical region, very rich in endemic plants. Although this taxon is morphologically most similar to *G. sintenisii (9)*, our ITS data indicate a poorly supported relation with *G. alypum*, which could be a consequence of our incomplete dataset or poor resolution of the ITS alone. By contrast, the cpDNA data confirm its close relation with *G. hedgei* and *G. davisiana*. This result is in accordance with the previous morphological/taxonomic studies which support *G. anatolica* as a member of the section *Polycephalium (9). G. hedgei*, a local Turkish endemic restricted to a single location in Yazili Kanyon National Park *(15)*, is yet another new species included in our analysis. It is a cushion-forming perennial divided into several rosettes that is morphologically very similar to *G. orientalis* L. and *G. sintenisii,* while it differs from all *Globularia* species by densely stellate hairs. Molecular data confirm its relation with other Anatolian taxa, *G. davisiana* and *G. sintenisii*, and especially with *G. anatolica* on the basis of chloroplast markers. Finally, *G. davisiana* and *G. sintenisii* are joined together in the ITS tree confirming their similar geographical range and possible origin from a common lineage.

In conclusion, this study indicates existence of separate centers of diversification for European and Asia Minor *Globularia*. Although Kadereit and Comes *(7)* proposed that evolutionary events in *Globularia* dated earlier than the Quaternary, it could be hypothesized that speciation of some of the European and Anatolian taxa began during

the glacial period, having in mind that morphological characteristics are often under severe ecological selection pressure, which may lead to the creation of advantages necessary for adaptation to extreme habitat conditions. Closely related taxa, such as *G. cordifolia* and *G. meridionalis*, as well as the majority of Anatolian endemics, probably developed in such conditions exactly. Nevertheless, conduction of additional research to confirm these assumptions is necessary.

Acknowledgements: *The authors would like to thank H. Fulgosi from the Laboratory of Electron Microscopy, Division of Molecular Biology at Ruđer Bošković Institute for kindly providing laboratory facilities. The authors are grateful to all institutions that helped with plant material from their collections. This work was supported by the Science and Research Funding of University of Zagreb under Grant 1.1.2.7.*

REFERENCES

1. SCHWARZ O 1963 Chromosomenzahlen, Lebensformen und Evolution der Gattung *Globularia* L. Drudea 3: 5-16
2. SCHWARZ O 1938 Die Gattung *Globularia*. Bot Jahrb Syst 69: 318-373
3. CONTANDRIOPOULOS J 1978 Contribution a l'etude cytobiogeographique du genre *Globularia*. Biologie et écologie méditerranéenne 5: 3-13
4. MILLETTI N 1987 Revisione sistemática del genere *Globularia* L. (Globulariaceae) in Italia. [dissertation] University of Florence.
5. HOLLÄNDER K, JÄGER EJ 1994 Morphologie, Biologie und ökogeographische Differenzierung von *Globularia*. Flora 189: 223-254
6. KADEREIT JW, GRIEBELER EM, COMES HP 2004 Quaternary diversification in European alpine plants – pattern and process. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 359: 265 – 274. https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1389
7. KADEREIT JW, COMES HP 2005 The temporal course of alpine plant diversification in the Quaternary. In Bakker FT, Chatrou LW, Gravendeel B, Pelser P (eds). Plant species-level systematics: Patterns, processes and new applications. Regnum Vegetabile 142: 117-130
8. TUTIN TG 1972 *Globularia* L. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (eds) Flora Europaea Vol III. Cambridge University Press, Cambridge, p 282
9. DURAN A, ÇETIN Ö, ÖZTÜRK M 2009 *Globularia anatolica* sp. nov. (Globulariaceae) from the Honaz Mountain National Park, southwest Turkey. Nord J Bot 27: 232-237. https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.2009.00412.x
10. EKIM T 2012 *Globularia*. In: Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babaç MT (eds) Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, İstanbul, p 672
11. BARRENO E, BRAMWELL D, CABEZUDO B, CARDONA MA, COSTA M, FERNÁNDEZ-CASAS FJ et al 1984 Listado de plantas endémicas, raras o amenazadas de España. Información Ambiental 3: 48-71
12. MATEOS MA, VALDÉS B 2006 A new species of *Globularia* (Globulariaceae) from the Talassemtane National Park, N Morocco. Willdenowia 36: 409-412. https://doi.org/10.3372/wi.36.36137
13. PIGNATTI S 1982 Flora d'Italia Vol. II. Edagricole, Bologna, p 620
14. DIMOPOULOS P, RAUS T, BERGMEIER E, CONSTANTINIDIS T, IATROU G, KOKKINI S et al 2013 Vascular plants of Greece: an annotated checklist. Englera 31: 1-370
15. DUMAN H 2001 A new species of *Globularia* L. (Globulariaceae) from South Anatolia. Bot J Linn Soc 137: 425-428. https://doi.org/10.1006/boj1.2001.0489
16. LARSEN K 1957 Cytological observation on some species of *Globularia*. Botaniska notiser 110: 265-270
17. ARGUE CL 1993 Pollen morphology in the *Selagineae*, *Manuleae* (Scrophulariaceae), and selected Globulariaceae, and its taxonomic significance. Am J Bot 80: 723-733. https://doi.org/10.2307/2445442
18. SEZIK E, TABATA M, YEŞILADA E, HONDA G, GOTO K, IKESHIRO Y 1991 Traditional medicine in Turkey. I. Folk medicine in northeast Anatolia. J Ethnopharmacol 35: 191-196. https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90072-L
19. LEPORATTI ML, GHEDIRA K 2009 Comparative analysis of medicinal plants used in traditional medicine in Italy and Tunisia. J Ethnobiol Ethnomed 5: 31-38. https://doi.org/10.1186/1746-4269-5-31
20. CARRIÓ E, VALLÈS J 2012 Ethnobotany of medicinal plants used in Eastern Mallorca (Balearic Islands, Mediterranean Sea). J Ethnopharmacol 141: 1021-1040. https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.049
21. TUNDIS R, BONESI M, MENICHINI F, LOIZZO MR, CONFORTI F, STATTI G, PIRISI FM, MENICHINI F 2012 Antioxidant and anti-cholinesterase activity of *Globularia meridionalis* extracts and isolated constituents. Nat Prod Commun 7: 1015-1020
22. SIPAHI H, BECKER K, GOSTNER JM, CHAREHSAZ M, KIRMIZIBEKMEZ H, SCHENNACH H, AYDIN A, FUCHS D 2014 Effects of globularifolin on cell survival, nuclear factor-κB activity, neopterin production, tryptophan breakdown and free radicals *in vitro*. Fitoterapia 92: 85-92. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.10.012
23. OXELMAN B, BACKLUND M, BREMER B 1999 Relationships of the Buddlejaceae s. 1. investigated using parsimony jackknife and branch support analysis of chloroplast *ndh*F and *rbc*L sequence data. Syst Bot 24: 164-182. https://doi.org/10.2307/2419547
24. ALBACH DC, MEUDT HM, OXELMAN B 2005 Piecing together the „new" Plantaginaceae. Am J Bot 92: 297-315. https://doi.org/10.3732/ajb.92.2.297
25. COMES HP, KADEREIT JW 2001 Tests of Pleistocene speciation among alpine and montane species of *Globularia* (Globulariaceae) from the European high mountains. Bauhinia 15: 76
26. COMES HP, KADEREIT JW 2003 Spatial and temporal patterns in the evolution of the flora of the European Alpine System. Taxon 52: 451-462. https://doi.org/10.2307/3647445
27. DOYLE JJ, DOYLE JL 1990 Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15
28. PETIT RJ, KREMER A, WAGNER DB 1993 Geographic structure of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks. Theor Appl Genet 87: 122-128. https://doi.org/10.1007/BF00223755
29. WHITE TT, BRUNS T, LEE S, TAYLOR J 1990 Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T (eds) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, California, p 315. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1
30. TABERLET P, GIELLY L, PAUTOU G, BOUVET J 1991 Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Mol Biol 17: 1105-1109. https://doi.org/10.1007/BF00037152

31. HASEBE M, OMORI T, NAKAZAWA M, SANO T, KATO M, IWATSUKI K 1994 rbcL gene sequences provide evidence for the evolutionary lineages of leptosporangiate ferns. Proc Natl Acad Sci USA 91: 5730-5734
32. LARKIN MA, BLACKSHIELDS G, BROWN NP, CHENNA R, MCGETTIGAN PA, MCWILLIAM H et al 2007 Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23: 2947-2948. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404
33. TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, KUMAR S 2013 MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30: 2725-2729. https://doi.org/10.1093/molbev/mst197
34. NEI M, KUMAR S 2000 Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York, p 126
35. FELSENSTEIN J 1985 Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791. https://doi.org/10.2307/2408678
36. BORSCH T, QUANDT D 2009 Mutational dynamics and phylogenetic utility of noncoding chloroplast DNA. Plant Sys Evol 282: 169-199. https://doi.org/10.1007/s00606-009-0210-8
37. DE STORME N, GEELEN D 2013 Sexual polyploidization in plants – cytological mechanisms and molecular regulation. New Phytol 198: 670-684. https://doi.org/10.1111/nph.12184
38. RAVNIK V 1965 Zur morphologisch-systematischen und chorologischen Problematik der Art *Globularia cordifolia* L. s. lat. Razpr Slov Akad Znan Umet Razred Prirodosl 8: 5-41
39. KLIPHUIS E, WIEFFERING JH 1972 Chromosome numbers of some angiosperms from the South of France. Acta Bot Neerl 21: 598-604. https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1972.tb00218.x
40. WETTSTEIN R 1895 Globulariaceen-Studien. Bull Herb Boiss 6: 271-290
41. LJUBIČIĆ I, BRITVEC M, PLAZIBAT M, VITASOVIĆ KOSIĆ I 2010 Flora of the South-Western part of the National Park „Northern Velebit". Agric Conspec Sci 75: 67-73
42. PARISOD C, HOLDEREGGER R, BROCHMANN C 2010 Evolutionary consequences of autopolyploidy. New Phytol 186: 5–17. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03142.x
43. CRKVENČIĆ M, DUDAŠ S, JERKOVIĆ I, MARIJANOVIĆ Z, POLJUHA D, HAZLER PILEPIĆ K 2016 Essential oil composition of three *Globularia* species. Chem Biodivers 13: 219-223.
44. SERTIĆ M, CRKVENČIĆ M, MORNAR A, HAZLER PILEPIĆ K, NIGOVIĆ B, MALEŠ Ž 2015 Analysis of aucubin and catalpol content in different plant parts of four *Globularia* species. J Appl Bot Food Qual 88: 209-214. http://dx.doi.org/10.5073/JABFQ.2015.088.030
45. FIORI A 1925-1929 Nuova flora analitica d'Italia Vol II. Tipografia di M. Ricci, Firenze, p 474
46. HAYEK A 1927 Prodromus florae peninsulae Balcanicae Vol I. Verlag des Repertoriums, Dahlem, p 400
47. DEGEN A 1938 Flora Velebitica Vol III. Verlag der Ungar, Akademie der Wissenschaften, Budapest, p 44
48. DOMAC R 1973 Mala flora Hrvatske i susjednih područja. Školska knjiga, Zagreb, p 340
49. STOJANOV N, STEFANOV B 1948 Flora na Bălgarija. University Press, Sofia, p 1062
50. NIKOLIĆ T 2000 Index Florae Croaticae Pars III. Nat Croat 9: 46

Research article

Journal of MASS SPECTROMETRY

Received: 12 May 2016 Revised: 24 August 2016 Accepted: 29 August 2016 Published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jms.3844

LC-PDA-ESI-MS^n analysis of phenolic and iridoid compounds from *Globularia* spp.

Maja Friščić,[a]* Franz Bucar[b]* and Kroata Hazler Pilepić[a]

Plants produce a great number of metabolites with potentially useful biological activities. Species from the genus *Globularia* (Plantaginaceae) are known as sources of different phenolic and iridoid compounds. *Globularia alypum* L. is a medicinal plant used as a healing agent in many Mediterranean countries. Similarities in phytochemical composition are often observed for related species. For *Globularia* spp., such findings were mostly based on identification of several isolated compounds from distinct species. To our knowledge, this is the first study that enables simultaneous comparison of phytochemical profiles from several members of the genus *Globularia*.

Liquid chromatography-photodiode array detection-electrospray ionization-tandem mass spectrometry was used for the analysis of methanolic extracts of aerial parts obtained from four *Globularia* species (*G. alypum*, *G. punctata*, *G. cordifolia* and *G. meridionalis*). In total, 85 compounds were identified or tentatively identified based on comparison of their retention time, UV and MS^n (up to MS^4) spectra to those of standard compounds and/or to literature data. Among these, high relative amounts of bioactive molecules such as globularin, globularifolin, asperuloside and verbascoside (acteoside) were found. Apart from providing new insights into the phytochemistry and chemotaxonomy of selected *Globularia* species, results of this study complement existing MS/MS spectral data and could enable easier mass spectrometric profiling of certain bioactive compounds such as iridoids and phenylethanoids in related plant species, genera and families. Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: tandem mass spectrometry; negative ESI-MS; phytochemical profiling; plant metabolomics; chemotaxonomy

Introduction

Plants produce a great variety of metabolites, including different compounds with biological activities potentially beneficial for human health.[1,2] The genus *Globularia* (family Plantaginaceae) is a small genus within the *Angiosperms* (flowering plants), which consists of evergreen perennials, sub-shrubs and small shrubs. Its members are mainly distributed in the Mediterranean area and Central Europe.[3] Species of the genus are known to produce different phenolic and iridoid compounds.[4–6] While many of these phytochemicals are widely distributed across different plant genera and families,[7–9] some of them, like galypumosides A and B,[4] aphyllanthoside[5] and globuloside C,[10] are restricted only to individual species of the aforementioned genus. This gives them chemotaxonomic significance.[7,11]

Globularia alypum L. is a Mediterranean plant used as a healing agent along the area of its distribution.[12,13] Recently, phytochemical composition of a methanolic extract prepared by maceration from leaves of *G. alypum* was investigated in detail.[14] However, ethnopharmacological studies reveal that aerial parts of this plant, prepared by both infusion and decoction, are often used in folk medicine.[13] Literature data also indicate that chemical compositions of related plant species are similar to that of *G. alypum*,[7] making them potentially useful sources of bioactive molecules. Identification of these molecules is often made difficult by lack of commercially available standards. This is the reason why full identification after isolation is still the most important methodology in plant metabolomics.[15] Thereby, nuclear magnetic resonance is considered to be a powerful tool for structure elucidation that allows detailed analysis of phytochemical composition. However, it is often limited to detection and quantification of major metabolites.[16]

Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry is an analytical technique that allows fast simultaneous detection of various plant metabolites, including minor compounds, as well as their structural characterization based on fragmentation patterns observed after collision of analyte ions with inert gas molecules [collision-induced dissociation (CID)]. In that way, it can provide identification even of those compounds for which reference standards are not commercially available.[16] The possibility of applying tandem mass spectrometry in structural elucidation of plant metabolites was already investigated on several specific iridoids and flavonoids isolated from *G. alypum* macerated aerial parts.[17–20]

In this study, liquid chromatography-photodiode array detection-electrospray ionization-tandem mass spectrometry was used for analysis of methanolic extracts prepared by boiling under reflux conditions of aerial parts obtained from four *Globularia* species: *G. alypum*, *G. punctata*, *G. cordifolia* and *G. meridionalis*. While the original objective was mainly to provide a comparative analysis of the phytochemical composition of these species in order to explore the medicinal potential of less investigated species (*G. punctata*, *G. cordifolia* and *G. meridionalis*), obtained results have also pointed

* *Correspondence to: Maja Friščić, Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Schrottova 39, HR-10000 Zagreb, Croatia. E-mail: mfriscic@pharma.hr*
Franz Bucar, Department of Pharmacognosy, Institute of Pharmaceutical Sciences, University of Graz, Universitätsplatz 4, A-8010 Graz, Austria. E-mail: franz.bucar@uni-graz.at

a *Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, HR-10000, Zagreb, Croatia*

b *Department of Pharmacognosy, Institute of Pharmaceutical Sciences, University of Graz, A-8010, Graz, Austria*

Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Journal of MASS SPECTROMETRY

out some new and interesting chemotaxonomic implications. The results of this study include spectral data not only for specific compounds found in *Globularia* spp. but also for 29 standard compounds from various groups of plant metabolites. Having in mind the existing need for expansion of MS/MS spectral data of plant metabolites, presented results should be interesting from both phytochemical and analytical perspective.

Materials and methods

Plant material

Plant material was collected in 2013 from wild populations in Croatia with respect to their flowering period: *G. alypum* in March and *G. punctata*, *G. cordifolia* and *G. meridionalis* in May 2013. *G. alypum* was collected from Konavle cliffs (coordinates: 42°30′50″N; 18°19′07″E; 15 m a.s.l.), *G. cordifolia* from northern Velebit (coordinates: 44°43′15″N; 14°58′05″E; 1340 m a.s.l.) and *G. meridionalis* and *G. punctata* from Grobnik field (coordinates: 45°22′39″N; 14°30′53″E; 308 m a.s.l.). Plant material was authenticated by Prof. Kroata Hazler Pilepić, Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Croatia. Voucher specimens were deposited in the Herbarium of the Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Croatia (Voucher No. 16 020, 16 032, 16 040 and 16 056). The material was air-dried in a single layer in a well-ventilated room at ambient temperature (22 °C), protected from direct sunlight.

Sample preparation

Dried aerial parts (>150 g) were homogenized and freshly pulverized (>10 g), and 2.0 g of powdered material were subjected to extraction with 20 ml of methanol by heating under reflux conditions for 45 min. After evaporating the extracts to dryness under reduced pressure at 30 °C, residues were diluted in 50% (v/v) methanol p.a. (Merck, Darmstadt, Germany) to obtain a final concentration of 10 mg/ml. Prepared sample solutions (10 ml) were centrifuged at 3.000 rpm for 15 min at 20 °C, and 1.5 ml of supernatants were subjected to high-performance liquid chromatography-photodiode array detection (HPLC-PDA) and liquid chromatography-photodiode array detection-tandem mass spectrometry (LC-PDA-MS^n) analyses.

Standard solutions

Methanolic solutions (0.5 mg/ml) of the following standards were prepared: salicylic acid from Caesar and Lorentz (Bonn, Germany); apigenin 7-*O*-glucoside, asperuloside, aucubin, catalpol, chrysoeriol, cyanidin chloride, 5,7-dihydroxy-8-methyl-flavanon, eriodictyol, eriodictyol 7-*O*-glucoside, ferulic acid, isoquercitrin, kaempferol, luteolin, luteolin 7-*O*-glucoside, protocatechuic acid, quercetin, rutin, sinapic acid, syringic acid from Carl Roth (Karlsruhe, Germany); geniposide and isoverbascoside from ChromaDex (Irvine, CA, USA); apigenin, benzoic acid, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid from Fluka (Buchs, Schwitzerland); verbascoside from HWI Analytik (Rülzheim, Germany); cinnamic acid from Schering-Kahlbaum (Berlin, Germany); and caffeic acid from Sigma (St. Louis, MO, USA).

HPLC-PDA-ESI-MS^n conditions

Optimal conditions for the separation of extract components were first tested on a Merck-Hitachi HPLC system D-7000 composed of the following units: interface D-7000, diode-array detector L-7455, column oven L-7300, programmable autosampler L-7250 and pump L-7100 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany; Hitachi Instruments Inc., San Jose, USA). Acetonitrile used in the mobile phase was of HPLC grade (LiChrosolv® Merck, Darmstadt, Germany). Formic acid, eluent additive for LC-MS, was purchased from Fluka (Buchs, Schwitzerland). Ultrapure water used in the mobile phase was obtained by Easypure™ RF system (Barnstead, Germany). Optimal separation was performed on a Zorbax SB-C18 reversed-phase column (150 × 2.1 mm internal diameter; 3.5 μm particle size) (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) under gradient elution conditions using a binary mobile phase consisted of 0.1% formic acid (solvent A) and acetonitrile with 0.1% formic acid (solvent B). The following time program was used: 0 min, 5% B; 40 min, 30% B; 45 min, 70% B; 46 min, 5% B and 58 min, 5% B. The flow rate of the mobile phase was 0.3 ml/min, and the column temperature was set at 50.0 °C. Injection volume was 5.0 μl. UV spectral data for all peaks were recorded in the range of 190–450 nm. Data acquisition and processing were performed using LaChrom D-7000 HPLC System Manager v.3.1.1. (Hitachi, San Jose, USA).

Mass spectra were obtained by liquid chromatography-photodiode array detection-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-PDA-ESI-MS^n) analysis on an LTQ XL linear ion trap mass spectrometer connected to a Dionex UltiMate 3000 LC System (Thermo Fisher Scientific, Germering, Germany). Samples were recorded in both positive and negative ionization mode. In agreement to previous reports,[19] negative mode provided better analytical selectivity and sensitivity for iridoid glycosides, which were present as major constituents. Therefore, this mode was chosen for detailed analysis of samples. The following parameters were used: dry gas flow (N_2) 8.0 l/min, capillary temperature at 330 °C, source heater temperature at 250 °C, sheath gas flow at 50 arbitrary units, auxiliary gas flow at 10 arbitrary units, source voltage at 3 kV, source current at 100 μA and capillary voltage at −45 V. Mass spectra were recorded over a range *m/z* 50–2000. MS^n spectra (up to MS^4) were obtained by CID with helium used as collision gas and normalized collision energy of 35%. Data acquisition and processing were performed using Thermo Xcalibur 2.2 software (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

Identification of compounds and estimation of their relative amounts

Prior to analysis, a database of substances isolated from or reported for *Globularia* spp. was composed using SciFinder®. The database consisted of the following parts: compound name and structure, molecular formula, molecular weight, list of *Globularia* species for which the compound was reported together with UV and MS spectral data, when available. Literature search for published spectral information was carried out by using both SciFinder® and Reaxys®. Chromatographic and spectral properties, including MS^n fragmentation patterns (up to MS^4) were first obtained for 29 standard compounds of different iridoids, aromatic/phenolic acids, flavonoids and phenylethanoids, which were selected for target analysis, mostly based on previous literature reports. Only minor proportion of phytochemical constituents observed in prepared samples could be identified based on comparison of their retention time, UV, MS and MS/MS spectra to those of standard compounds. Structural elucidation of remained undetermined compounds was based on comparison of their chromatographic and spectral properties to those reported in the literature. Detailed examination of elution order and observed fragmentation patterns of standard substances,

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Journal of MASS SPECTROMETRY

together with information on substances previously reported as present in *Globularia* spp., enabled identification or tentative identification of non-targeted compounds. Estimation of relative amounts of different compounds was based on the comparison of their HPLC-MS base peak chromatogram peak areas in combination with literature data on the quantities of constituents that had been previously isolated from individual *Globularia* spp. Estimation of relative amounts of the same compound between different species was based on the comparison of the HPLC-MS base chromatogram peak areas. Considering the compounds represented by overlapped peaks, their amounts were anticipated based on the high relative abundances of their major precursor ions. The second-order MS obtained from the major ions, together with the presence of accompanying minor adducts in MS^1, ensured that the major ions were not a result of adduct formation (as observed in several cases) but were actually attributable to individual compounds.

Results and discussion

In order to compare the phytochemical composition of three *Globularia* species, *G. punctata*, *G. cordifolia* and *G. meridionalis*, to that of the medicinal species *G. alypum*, LC-PDA-ESI-MS^n analyses were conducted on methanolic extracts of dried aerial parts obtained by extraction under reflux conditions. Prior to characterization of sample compounds, chromatographic and spectral properties were obtained for 29 standards, including different iridoid glycosides, aromatic/phenolic acids, flavonoid glycosides and aglycons, as well as phenylethanoids (Table 1), allowing unambiguous identification of several *Globularia* constituents. Chromatographic and spectral properties of compounds detected in samples are given in Table 2. In total, 85 compounds were identified or tentatively identified (Table 3). Those that are reported for the first time for a particular species are marked with an asterisk (*). In the case of *G. punctata*, compounds are marked as new reports only if they were not previously isolated from both *G. punctata* and *G. aphyllanthes*. The reason for this will be explained later in text under chemotaxonomic implications. Iridoid and bisiridoid glycosides (32), phenylethanoids (21) and flavonoids (mainly in the form of glycosides) (18) were recognized as main secondary metabolites of investigated species.

Iridoids and bisiridoids

Iridoids were present in the form of glucosides and were either free or esterified with aromatic/phenolic acids, such as benzoic, cinnamic, *p*-coumaric, caffeic and isoferulic (Fig. 1). Compounds **4** (*m/z* 407), **6** (*m/z* 391) and **20** (*m/z* 459) were unambiguously identified as catalpol, aucubin and asperuloside by comparison of their retention times, UV and MS/MS spectra to those of reference standards. The major ion observed in first-order mass spectra of these compounds was a formic acid adduct (FAA) of their molecular ion, confirmed by loss of 46 Da in MS^2. The main fragment of catalpol and aucubin in MS^3 of the molecular ion was obtained by a neutral loss of anhydroglucose (aGlc) $[M\text{-}H\text{-}162]^-$, a typical fragmentation pattern observed for most iridoid glucosides.[21,22] This was followed by loss of 30 Da in MS^4 of catalpol $[M\text{-}H\text{-}aGlc\text{-}CH_2O]^-$ and loss of 18 Da in MS^4 of aucubin $[M\text{-}H\text{-}aGlc\text{-}H_2O]^-$. In MS^3 of asperuloside, the major fragment was observed at *m/z* 147 $[M\text{-}H\text{-}aGlc\text{-acetic acid (AA)}\text{-}CO_2]^-$ together with a minor fragment at *m/z* 191 $[M\text{-}H\text{-}aGlc\text{-}AA]^-$, as reported previously.[22] Consecutive loss of 28 Da was observed in MS^4 leading to formation of *m/z* 119 ion $[M\text{-}H\text{-}aGlc\text{-}AA\text{-}CO_2\text{-}CO]^-$. Catalpol was present only in *G. alypum* and *G. punctata*, as reported previously.[23] This compound was isolated from *G. alypum*,[24] as well as from *G. vulgaris*[7] and *G. aphyllanthes*.[5] Asperuloside was observed as a major iridoid glucoside in *G. cordifolia*, *G. meridionalis* and *G. punctata*, while only trace amounts were observed for *G. alypum*. This observation was consistent with literature data, where asperuloside was reported as a compound isolated from *G. cordifolia*,[10] *G. meridionalis*,[11] *G. vulgaris*[7] and *G. aphyllanthes*.[5] Low amounts of aucubin were present in all four species. This iridoid was isolated from a great number of *Globularia* species, including *G. cordifolia*,[10] *G. vulgaris*[7] and *G. aphyllanthes*.[5] Its presence in *G. alypum* and *G. meridionalis* was recently confirmed too.[23]

Presence of a major molecular ion together with a smaller dimer ion in the first-order MS and loss of 206 Da $[M\text{-}H\text{-}aGlc\text{-}CO_2]^-$ in MS^2 were observed for compound **5** (*m/z* 389), detected in *G. punctata*. The following MS^3 and MS^4 fragmentation pattern were similar to that of aucubin. In comparison to fragments observed in literature data,[25] this compound was tentatively identified as scandoside. Scandoside was previously isolated from related *Globularia* species.[5,26] For compound **7** (*m/z* 407, FAA), present at the same retention time as aucubin, the major fragments in MS^3 were observed at *m/z* 179 $[M\text{-}H\text{-aglycone}]^-$ and 199 $[M\text{-}H\text{-}aGlc]^-$, followed by minor fragments at *m/z* 143 $[M\text{-}H\text{-aglycone-}2H_2O]^-$, 155 $[M\text{-}H\text{-}aGlc\text{-}CO_2]^-$ and 181 $[M\text{-}H\text{-}aGlc\text{-}H_2O]^-$. MS^4 of product ion *m/z* 179 gave a fragmentation pattern characteristic for hexoses,[27] while MS^4 of the aglycone (*m/z* 199) indicated further loss of 44 Da and 18 Da, attributed to C_2H_4O and H_2O.[25] Compound **7** was tentatively identified as a 5-hydroxylated aucubin derivative, namely monomelittoside, which was, together with asperuloside, aucubin and catalpol, previously reported for *G. cordifolia*.[28]

Compounds **8** (*m/z* 417, FAA), **17** (*m/z* 431) and **27** (*m/z* 491, FAA) were present in *G. cordifolia*, *G. meridionalis* and *G. punctata*. MS^3 of compound **8** revealed a loss of 206 Da $[M\text{-}H\text{-}aGlc\text{-}CO_2]^-$, which was followed by loss of 30 Da in MS^4 $[M\text{-}H\text{-}aGlc\text{-}CO_2\text{-}CH_2O]^-$. In MS^1 of compound **17**, a molecular ion was present with trace amounts of a dimer ion $[2\ M\text{-}H]^-$, same as for scandoside. Major ion observed in MS^2 (*m/z* 251) of compound **17** was formed by loss of glucose (Glc) $[M\text{-}H\text{-}180]^-$, while the major ion observed in MS^3 (*m/z* 147) could be attributed to simultaneous loss of AA (60 Da) and carbon dioxide (44 Da). It was observed that MS/MS fragmentation patterns and UV spectra of these compounds were similar to those of asperuloside, which was found in high amounts in *G. cordifolia*, *G. meridionalis* and *G. punctata*. Therefore, these compounds were tentatively identified as derivatives of asperuloside, deacetylasperuloside (**8**) and asperulosidic acid (**17**). Small amounts of deacetylasperuloside were also observed in the reference standard. Both compounds were previously found in related species of the genus *Globularia*.[5,26] Additionally to the molecular ion (*m/z* 445), present as a major fragment in MS^2 of compound **27**, the following fragments were observed: *m/z* 241 $[M\text{-}H\text{-}aGlc\text{-anhydroacetic acid (aAA)}]^-$, 283 $[M\text{-}H\text{-}aGlc]^-$ and 385 $[M\text{-}H\text{-}AA]^-$. In comparison to other compounds found in *G. cordifolia*, *G. meridionalis* and *G. punctata*, it was identified as asperulosidic acid methyl ester (daphylloside). This compound was previously isolated from *G. aphyllanthes*.[5] Compounds **9**, **14** and **31** were present in all investigated species. All three compounds were presented with relatively high molecular ions and FAAs followed by smaller peaks of dimer ions in MS^1 and gave similar UV spectra. Compound **31** (*m/z* 415, relative intensity 82; *m/z* 461, relative intensity 100) was present in higher amounts relative to other two compounds. In MS^3, the molecular ion (*m/z* 415) gave a major ion of *m/z* 355 in

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Journal of MASS SPECTROMETRY

Table 1. Chromatographic and spectral properties of iridoid, aromatic/phenolic acid, flavonoid and phenylethanoid standard compounds

Compound name	MW	t_R (min)	UV λ_{max} (nm)	Ions detected in MS^1 and MS/MS fragment ions (% relative abundance)
Catalpol[a]	362.33	1.9	194	397 $[M+{}^{35}Cl]^-$, 399 $[M+{}^{37}Cl]^-$ **407*** $[M-H+HCOOH]^-$, 459 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS^2**: 407 → 199 (42), 361 (100); **MS^3**: 361 → 137 (7), 169 (23), 181 (11), 199 (100), 343 (8); **MS^4**: 199 → 137 (22), 163 (7), 169 (100), 181 (31)
Aucubin[a]	346.33	2.6	191	381 $[M+{}^{35}Cl]^-$, 383 $[M+{}^{37}Cl]^-$ **391** $[M-H+HCOOH]^-$, 443 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS^2**: 391 → 165 (8), 183 (64), 345 (100); **MS^3**: 345 → 165 (15), 183 (100); **MS^4**: 183 → 97 (4), 99 (13), 121 (5), 137 (40), 139 (52), 153 (35), 165 (100)
Protocatechuic acid[b]	154.12	3.7	205, 261, 295	**153** $[M-H]^-$ **MS^2**: 153 → 109 (100), 153 (70); **MS^3**: 109 → 109 (100); **MS^4**: —
Chlorogenic acid[b]	354.31	7.9	191, 219, 237, 327	191 $[M-H-aCA]^-$, **353** $[M-H]^-$, 451 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 707 $[2M-H]^-$ **MS^2**: 353 → 191 (100); **MS^3**: 191 → 85 (71), 87 (16), 93 (48), 109 (22), 111 (36), 127 (100), 155 (10), 171 (26), 173 (87); **MS^4**: 127 → 81 (7), 83 (17), 85 (100), 99 (42), 109 (45), 127 (21)
Caffeic acid[b]	180.16	8.1	192, 219, 236, 324	135 $[M-H-CO_2]^-$, **179** $[M-H]^-$ **MS^2**: 179 → 135 (100), 179 (17); **MS^3**: 135 → 135 (100); **MS^4**: —
Asperuloside[a]	414.36	9.5	191, 239	449 $[M+{}^{35}Cl]^-$, 451 $[M+{}^{37}Cl]^-$, **459** $[M-H+HCOOH]^-$, 511 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS^2**: 459 → 413 (100); **MS^3**: 413 → 147 (100), 191 (31), 251 (10); **MS^4**: 147 → 91 (8), 103 (18), 119 (100), 147 (73)
Syringic acid[b]	198.17	10.0	217, 276	—
Geniposide[a]	388.37	11.2	192, 240	**433** $[M-H+HCOOH]^-$ **MS^2**: 433 → 225 (100), 387 (28); **MS^3**: 225 → 123 (100); **MS^4**: 123 → 105 (100), 123 (23)
p-Coumaric acid[b]	164.16	12.1	210, 227, 311	**163** $[M-H]^-$ **MS^2**: 163 → 119 (100); **MS^3**: 119 → 119 (100); **MS^4**: —
Cyanidin chloride[c]	322.70	15.1	198, 279	**285** $[M-H-HCl]^-$, 303 $[M-H-H_2O]^-$, 331 $[M-H-HCl+HCOOH]^-$, 349 $[M-H-H_2O+HCOOH]^-$ **MS^2**: 285 → 125 (60), 147 (12), 163 (58), 199 (21), 213 (34), 217 (58), 241 (89), 257 (100), 267 (10); **MS^3**: 241 → 185 (9), 197 (27), 199 (29), 213 (100), 223 (39), 241 (14); 257 → 147 (10), 171 (11), 189 (27), 213 (100), 214 (19), 215 (58), 229 (68), 239 (11); **MS^4**: 213 → 157 (6), 169 (19), 171 (44), 185 (100), 195 (43), 198 (19)
Ferulic acid[b]	194.18	15.4	192, 218, 237, 323	177 $[M-OH]^-$, **193** $[M-H]^-$ **MS^2**: 193 → 134 (37), 149 (100), 178 (54); **MS^3**: 149 → 134 (100); **MS^4**: 134 → 134 (100)
Benzoic acid[b]	122.12	16.0	195, 230	—
Salicylic acid[b]	138.12	16.2	203, 238, 303	**137** $[M-H]^-$ **MS^2**: 137 → 93 (40), 137 (100); **MS^3**: 93 → 93 (100); **MS^4**: —
Sinapic acid[b]	224.21	16.7	193, 238, 324	**223** $[M-H]^-$ **MS^2**: 223 → 164 (26), 179 (47), 208 (100); **MS^3**: 208 → 149 (9), 164 (100); **MS^4**: 164 → 135 (27), 149 (100)
Eriodictyol 7-*O*-glucoside[c]	450.39	17.3	197, 286	**449** $[M-H]^-$, 899 $[2M-H]^-$ **MS^2**: 449 → 287 (100); **MS^3**: 287 → 151 (100); **MS^4**: 151 → 107 (72), 151 (100)
Rutin[c]	610.52	18.5	204, 258, 355	463 $[M-H-aRha]^-$, **609** $[M-H]^-$, 707 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 1219 $[2M-H]^-$ **MS^2**: 609 → 300 (23), 301 (100); **MS^3**: 301 → 151 (64), 179 (100), 257 (16), 273 (16); **MS^4**: 179 → 151 (100)
Isoquercitrin[c]	464.38	18.9	205, 258, 355	**463** $[M-H]^-$, 927 $[2M-H]^-$ **MS^2**: 463 → 300 (19), 301 (100); **MS^3**: 301 → 151 (65), 179 (100), 257 (15), 273 (15); **MS^4**: 179 → 151 (100)
Luteolin 7-*O*-glucoside[c]	448.37	19.1	206, 256, 348	**447** $[M-H]^-$, 895 $[2M-H]^-$ **MS^2**: 447 → 285 (100); **MS^3**: 285 → 151 (23), 175 (66), 199 (65), 217 (57), 241 (100), 243 (61), 257 (20), 285 (73); **MS^4**: —
Verbascoside[d]	624.59	20.7	198, 218, 331	**623** $[M-H]^-$, 1247 $[2M-H]^-$ **MS^2**: 623 → 461 (100); **MS^3**: 461 → 135 (38), 161 (12), 297 (13), 315 (100); **MS^4**: 315 → 135 (100)
Isoverbascoside[d]	624.59	22.2	198, 219, 294, 328	**623** $[M-H]^-$, 1247 $[2M-H]^-$ **MS^2**: 623 → 461 (100); **MS^3**: 461 → 135 (38), 161 (11), 297 (13), 315 (100); **MS^4**: 315 → 135 (100)

(Continues)

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Table 1. *(Continued)*

Compound name	MW	t_R (min)	UV λ_{max} (nm)	Ions detected in MS^1 and MS/MS fragment ions (% relative abundance)
Apigenin 7-*O*-glucoside[c]	432.38	22.7	199, 269, 338	**431**$[M-H]^-$, 863 $[2M-H]^-$ **MS^2**: 431 → 269 (100); **MS^3**: 269 → 149 (16), 151 (9), 183 (14), 197 (18), 225 (66), 227 (16), 269 (100); **MS^4**: —
Eriodictyol[c]	288.25	26.6	199, 290	**287** $[M-H]^-$ **MS^2**: 287 → 151 (100); **MS^3**: 151 → 107 (100), 151 (17); **MS^4**: 107 → 65 (100), 107 (24)
Cinnamic acid[b]	148.16	27.3	204, 216, 280	—
Quercetin[c]	302.24	29.0	202, 257, 372	**301** $[M-H]^-$, 603 $[2M-H]^-$ **MS^2**: 301 → 151 (69), 179 (100), 257 (14), 273 (14); **MS^3**: 179 → 151 (100); **MS^4**: 151 → 107 (100)
Luteolin[c]	286.24	29.6	208, 255, 268, 348	**285** $[M-H]^-$, 571 $[2M-H]^-$ **MS^2**: 285 → 151 (19), 175 (59), 199 (55), 217 (51), 241 (100), 243 (58), 285 (28); **MS^3**: 241 → 185 (11), 197 (99), 198 (100), 199 (95), 213 (67), 226 (18); **MS^4**: 197 → 153 (16), 169 (100), 182 (20), 197 (21); 198 → 154 (20), 169 (78), 170 (100), 171 (60), 197 (9), 198 (43), 199 (15); 199 → 143 (18), 155 (17), 171 (100), 199 (23)
Apigenin[c]	270.24	35.0	209, 269, 338	**269** $[M-H]^-$ **MS^2**: 269 → 149 (34), 151 (18), 201 (25), 225 (100), 269 (16); **MS^3**: 225 → 169 (15), 181 (100), 183 (38), 196 (18), 197 (42); **MS^4**: 181 → 141 (16), 152 (15), 153 (30), 180 (15), 181 (100)
Kaempferol[c]	286.24	35.4	197, 267, 366	**285** $[M-H]^-$ **MS^2**: 285 → 151 (100), 169 (39), 185 (39), 213 (55), 229 (53), 241 (51), 257 (68), 285 (97); **MS^3**: 151 → 107 (100); **MS^4**: 107 → 63 (50), 65 (100), 107 (20)
Chrysoeriol[c]	300.26	37.2	208, 253, 269, 347	**299** $[M-H]^-$ **MS^2**: 299 → 284 (100); **MS^3**: 284 → 256 (100); **MS^4**: 256 → 135 (5), 158 (8), 187 (9), 188 (26), 199 (10), 200 (18), 211 (19), 212 (18), 227 (100), 228 (31), 239 (7), 256 (26)
5,7-Dihydroxy-8-*C*-methyl flavanone[c]	270.28	47.0	—	**269** $[M-H]^-$ **MS^2**: 269 → 165 (34), 178 (26), 183 (19), 201 (10), 225 (86), 227 (100), 241 (38), 251 (12) 269 (33), 270 (9); **MS^3**: 227 → 155 (12), 181 (14), 183 (100), 199 (76); **MS^4**: 183 → 115 (28), 127 (9), 141 (32), 155 (100), 165 (10), 181 (22)

*Major ion in MS^1, marked in bold numbers (100% relative abundance).
[a]Iridoid.
[b]Aromatic/phenolic acid.
[c]Flavonoid.
[d]Phenylethanoid.
aCA, anhydrocaffeic acid; aRha, anhydrorhamnose; MW, molecular weight.

MS^3, attributed to loss of AA (−60 Da). Additional ions in MS^3, observed at *m/z* 149 $[M-H\text{-}aGlc\text{-}AA\text{-}CO_2]^-$ and 191 $[M-H\text{-}Glc\text{-}CO_2]^-$, indicated presence of a carboxyl group. This compound was tentatively identified as alpinoside, an unusual iridoid containing a *C*-8-*C*-9-double bond, previously isolated from many *Globularia* species, including *G alypum*,[4] *G. cordifolia*[10] and *G. aphyllanthes*.[5] Compound **9** (*m/z* 373, relative intensity of 100; *m/z* 419, relative intensity of 72) gave a major fragment at *m/z* 211 in MS^2 $[M-H\text{-}aGlc]^-$, followed by two consecutive losses of 44 Da leading to formation of $[M-H\text{-}aGlc\text{-}CO_2]^-$ in MS^3 and $[M-H\text{-}aGlc\text{-}C_3H_4O_3]^-$ in MS^4.[25] Observed MS/MS fragmentation pattern was similar to fragmentation pattern of geniposidic acid standard described in the literature.[25] However, comparing the expected molecular weight of compound **9** to that of compounds previously described for *Globularia* species, three possible identities were found: deacetylalpinoside, gardoside and geniposidic acid.[7,26,29] Loss of 162 Da (aGlc) in MS^2 indicated presence of a hydroxyl group attached in *C*-8/*C*-10 position,[21] thus eliminating gardoside as a possible solution. Deacetylalpinoside is a structural isomer of geniposidic acid containing a *C*-8–*C*-9-double bond, instead of a more usual *C*-7-*C*-8 double bond. In this study, it was observed that compounds bearing a carboxyl group in *C*-4 position did not give FAAs in MS^1 when a double bond was present between *C*-7 and *C*-8 (compounds **5** and **17**). Conversely, compounds lacking this feature, such as alpinoside, showed concomitant presence of abundant molecular ion and its FAA. Based on these observations, compound **9** was tentatively identified as deacetylalpinoside, a degradation product of alpinoside. It was previously isolated from *G. dumulosa*[29] and *G. trichosantha*.[26] Compound **14** (*m/z* 373, relative intensity of 53; *m/z* 419, relative intensity of 100) was characterized by Glc loss in MS^3 (*m/z* 193), followed by decarboxylation in MS^4 (*m/z* 149). The neutral loss of 180 Da observed in third-order MS indicated absence of a hydroxyl group at *C*-8/*C*-10 position, present in the majority of identified iridoids, which would enable formation of a hydrogen bond with the oxygen at *C*-1 position. Comparing to literature data, this compound was tentatively

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Journal of MASS SPECTROMETRY

Table 2. Chromatographic and spectral properties of compounds detected in methanolic extracts of *Globularia* spp.

Peak	Proposed compound	MW	t_R (min)	UV λ_{max} (nm)	Ions detected in MS^1 and MS/MS fragment ions (% relative abundance)
Iridoids and bisiridoids					
4	Catalpol[a,c]	362.33	1.8	194	**407*** [M-H + HCOOH]$^-$ **MS^2:** 407 → 199 (41), 361 (100); **MS^3:** 361 → 137 (7), 169 (23), 181 (10), 199 (100), 343 (8); **MS^4:** 199 → 137 (23), 163 (8), 169 (100), 181 (31)
5	Scandoside[b,c,d]	390.34	2.3	191, 239	**389** [M-H]$^-$, 779 [2 M-H]$^-$ **MS^2:** 389 → 135 (6), 137 (11), 139 (16), 165 (35), 183 (100), 209 (60), 227 (86); **MS^3:** 183 → 97 (5), 99 (12), 137 (41), 139 (51), 153 (34), 165 (100); **MS^4:** 165 → 119 (6), 121 (30), 135 (100), 137 (52), 147 (41)
6	Aucubin[a,c]	346.33	2.4	191	**391** [M-H + HCOOH]$^-$ **MS^2:** 391 → 165 (6), 183 (50), 345 (100); **MS^3:** 345 → 139 (4), 165 (14), 183 (100), 301 (15), 317 (3); **MS^4:** 183 → 85 (2), 97 (4), 99 (11), 121 (6), 137 (34), 139 (45), 153 (30), 165 (100)
7	Monomelittoside[c,d]	362.33	2.4	192	361 [M-H]$^-$, 397 [M + ^{35}Cl]$^-$, **407** [M-H + HCOOH]$^-$, 459 [M + H_2PO_4/HSO_4]$^-$ **MS^2:** 407 → 361 (100); **MS^3:** 361 → 143 (11), 155 (26), 179 (100), 181 (32), 199 (98); **MS^4:** 179 → 89 (65), 113 (20), 119 (49), 131 (22), 143 (93), 161 (100); 199 → 155 (100), 181 (14)
8	Deacetylasperuloside[c,d]	372.32	2.6	191, 242	371 [M-H]$^-$, 407 [M + ^{35}Cl]$^-$, **417** [M-H + HCOOH]$^-$, 469 [M + H_2PO_4/HSO_4]$^-$ **MS^2:** 417 → 371 (100); **MS^3:** 371 → 147 (14), 165 (100), 191 (23), 209 (29); **MS^4:** 165 → 135 (100), 147 (37)
9	Deacetylalpinoside[c,d]	374.34	3.9	192, 239	**373** [M-H]$^-$, 419 [M-H + HCOOH]$^-$, 747 [2 M-H]$^-$ **MS^2:** 373 → 123 (50), 149 (14), 167 (30), 193 (2), 211 (100); **MS^3:** 211 → 123 (60), 149 (7), 167 (100); **MS^4:** 167 → 123 (100), 149 (18)
10	Mussaenosidic acid[b,c,d]	376.36	5.3	239	**375** [M-H]$^-$, 421 [M-H + HCOOH]$^-$, 751 [2 M-H]$^-$ **MS^2:** 375 → 151 (58), 169 (62), 213 (100); **MS^3:** 213 → 151 (100), 169 (96); **MS^4:** —
11	(*epi*)Loganic acid[b,c,d]	376.36	5.5	238	**375** [M-H]$^-$, 421 [M-H + HCOOH]$^-$, 751 [2 M-H]$^-$ **MS^2:** 375 → 151 (12), 169 (55), 213 (100); **MS^3:** 213 → 125 (24), 151 (10), 169 (100); **MS^4:** 169 → 95 (21), 151 (100)
14	Gardoside[b,c,d]	374.34	6.3	192, 239	373 [M-H]$^-$, **419** [M-H + HCOOH]$^-$, 747 [2 M-H]$^-$ **MS^2:** 419 → 373 (100); **MS^3:** 373 → 149 (16), 167 (26), 193 (100), 209 (8), 221 (7), 251 (8), 329 (6); **MS^4:** 193 → 119 (6), 149 (100)
17	Asperulosidic acid[c,d]	432.38	7.4	191, 239	**431** [M-H]$^-$, 863 [2 M-H]$^-$ **MS^2:** 431 → 147 (8), 165 (21), 225 (14), 251 (100), 269 (19); **MS^3:** 251 → 147 (100), 165 (36), 191 (46), 207 (66), 233 (15); **MS^4:** —
20	Asperuloside[a,c]	414.36	9.4	192, 239	413 [M-H]$^-$, 449 [M + ^{35}Cl]$^-$, **459** [M-H + HCOOH]$^-$, 511 [M + H_2PO_4/HSO_4]$^-$ **MS^2:** 459 → 413 (100); **MS^3:** 413 → 147 (100), 191 (32); **MS^4:** 147 → 103 (16), 119 (100), 137 (8), 147 (79)
23	Verminoside[b,c]	524.47	11.3	241, 327	**523** [M-H]$^-$ **MS^2:** 523 → 161 (55), 179 (100), 323 (29); **MS^3:** 179 → 135 (100); **MS^4:** 135 → 135 (100)
26	Specioside[b,c]	508.47	14.4	229, 313	**507** [M-H]$^-$, 553 [M-H + HCOOH]$^-$ **MS^2:** 507 → 145 (15), 163 (100), 181 (10), 307 (15), 323 (7), 345 (9); **MS^3:** 163 → 119 (100); **MS^4:** 119 → 119 (100)
27	Daphylloside[c,d]	446.40	14.7	193, 236	**491** [M-H + HCOOH]$^-$ **MS^2:** 491 → 241 (25), 283 (39), 385 (17), 445 (100); **MS^3:** 445 → 241 (18), 385 (100); **MS^4:** 385 → 241 (100)
31	Alpinoside[b,c]	416.38	16.5	192, 238	415 [M-H]$^-$, **461** [M-H + HCOOH]$^-$, 831 [2 M-H]$^-$ **MS^2:** 461 → 415 (100); **MS^3:** 415 → 149 (20), 191 (17), 355 (100); **MS^4:** —
32	Minecoside[b,c]	538.50	16.7	191, 218, 238, 295, 327	**537** [M-H]$^-$ **MS^2:** 537 → 175 (23), 193 (100), 337 (13), 375 (15); **MS^3:** 193 → 134 (100), 149 (95), 178 (45); **MS^4:** 134 → 134 (100)
33	Globularinin[b,c]	510.49	16.9	218, 284	**555** [M-H + HCOOH]$^-$ **MS^2:** 555 → 509 (100); **MS^3:** 509 → 147 (100), 199 (50), 283 (23), 361 (27); **MS^4:** 147 → 103 (100), 147 (20)
34	Globularimin[b,c]	510.49	18.1	199, 220, 283	**555** [M-H + HCOOH]$^-$ **MS^2:** 555 → 361 (24), 509 (100); **MS^3:** 509 → 361 (100); **MS^4:** 361 → 119 (21), 181 (20), 199 (54), 217 (78), 295 (36), 329 (58), 343 (100)

(Continues)

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Table 2. *(Continued)*

Peak	Proposed compound	MW	t_R (min)	UV λ_{max} (nm)	Ions detected in MS^1 and MS/MS fragment ions (% relative abundance)
36	6′-*O*-Benzoyl monomelittoside[d,e]	466.44	18.6	194, 232	465 $[M-H]^-$, 501 $[M+{}^{35}Cl]^-$, **511** $[M-H+HCOOH]^-$, 563 $[M+H_2PO_4/HSO_4]$ **MS^2:** 511 → 465 (100); **MS^3:** 465 → 343 (100); **MS^4:** 343 → 113 (100), 155 (17), 161 (94), 181 (32), 199 (12)
40	6-*O*-Benzoylaucubin[d]	450.44	19.7	191, 232	**495** $[M-H+HCOOH]^-$ **MS^2:** 495 → 449 (100); **MS^3:** 449 → 327 (13), 431 (100); **MS^4:** —
43	5-Hydroxydavisioside[c,d]	468.45	20.6	197, 224	**513** $[M-H+HCOOH]^-$ **MS^2:** 513 → 179 (14), 467 (100); **MS^3:** 467 → 161 (16), 179 (100), 449 (26); **MS^4:** 179 → 87 (16), 89 (34), 101 (36), 107 (24), 119 (40), 131 (12), 143 (100), 161 (74)
50	Globularidin[b,c]	494.49	22.2	207, 281	**539** $[M-H+HCOOH]^-$ **MS^2:** 539 → 493 (100); **MS^3:** 493 → 147 (100), 345 (6); **MS^4:** —
55	Globularifolin[c,d]	466.44	22.9	200, 233, 275	465 $[M-H]^-$, 501 $[M+{}^{35}Cl]^-$, **511** $[M-H+HCOOH]^-$, 563 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS^2:** 511 → 465 (100); **MS^3:** 465 → 179 (100), 303 (20), 343 (13); **MS^4:** 179 → 89 (61), 113 (13), 119 (41), 131 (24), 143 (86), 161 (100)
61	Globularin[b,c]	492.47	24.1	204, 217, 283	527 $[M+{}^{35}Cl]^-$, **537** $[M-H+HCOOH]^-$ **MS^2:** 537 → 199 (15), 491 (100); **MS^3:** 491 → 147 (100); **MS^4:** 147 → 103 (100), 147 (9)
62	6′-*O*-Benzoyl deacetylalpinoside[d]	478.45	24.8	193, 234	477 $[M-H]^-$, **523** $[M-H+HCOOH]^-$ **MS^2:** 523 → 477 (100); **MS^3:** 477 → 167 (13), 211 (45), 355 (100); **MS^4:** —
68	Besperuloside[c,d]	476.43	27.8	195, 233	475 $[M-H]^-$, 511 $[M+{}^{35}Cl]^-$, **521** $[M-H+HCOOH]^-$, 573 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 1041 [2 (M-H + HCOOH)-H]$^-$ **MS^2:** 521 → 475 (100); **MS^3:** 475 → 147 (100), 191 (44), 313 (7); **MS^4:** 147 → 91 (8), 103 (16), 117 (2), 119 (100), 121 (2), 137 (7), 147 (66)
70	Globularioside[b,c]/ Baldaccioside[c]	528.93	28.6	219, 283	**573** $[M(^{35}Cl)-H+HCOOH]^-$, 575 $[M(^{37}Cl)-H+HCOOH]^-$ **MS^2:** 573 → 527 (100); **MS^3:** 527 → 181 (17), 383 (8), 415 (11), 471 (32), 481 (16), 499 (100); **MS^4:** —
71	Deacetylglobuloside A[d]	848.80	28.7	219, 283	**893** $[M-H+HCOOH]^-$ **MS^2:** 893 → 685 (10), 847 (100); **MS^3:** 847 → 355 (100), 485 (9), 561 (26), 685 (21), 699 (12) 757 (10), 788 (8); **MS^4:** —
75	Lytanthosalin[c,d]	476.47	30.4	205, 216, 283	**521** $[M-H+HCOOH]^-$ **MS^2:** 521 → 313 (30), 475 (100); **MS^3:** 475 → 147 (100); **MS^4:** 147 → 103 (100)
76	10-*O*-Benzoyl deacetylalpinoside[d]	478.45	30.6	194, 235	**477** $[M-H]^-$, 523 $[M-H+HCOOH]^-$ **MS^2:** 477 → 175 (57), 193 (38), 271 (24), 315 (37), 355 (100); **MS^3:** 355 → 123 (8), 131 (40), 149 (10), 175 (100); **MS^4:** 175 → 131 (100)
77	Alpinoside-alpinoside dimer[d]	814.74	32.1	194, 240	**813** $[M-H]^-$ **MS^2:** 813 → 337 (14), 355 (41), 397 (35), 415 (100), 485 (87), 549 (13), 573 (14), 591 (98), 693 (11), 753 (62), 771 (11); **MS^3:** 415 → 149 (26), 191 (12), 251 (9), 295 (16), 355 (100); **MS^4:** —
81	Globuloside A[c,d]	890.83	36.3	201, 219sh, 250sh, 284	**935** $[M-H+HCOOH]^-$ **MS^2:** 935 → 337 (7), 537 (7), 561 (15), 667 (22), 709 (16) 727 (45), 829 (53), 889 (100); **MS^3:** 889 → 259 (15), 319 (24), 337 (21), 397 (100), 415 (16), 431 (19), 515 (21), 519 (42), 537 (47), 562 (31), 650 (18), 667 (19), 675 (20), 694 (10), 728 (23), 742 (22), 829 (40), 845 (12), 871 (8); **MS^4:** —
Phenylethanoids					
12	Decaffeoylverbascoside[b,c,d]	462.45	5.6	202, 235	**461** $[M-H]^-$ **MS^2:** 461 → 135 (38), 161 (12), 297 (9), 315 (100), 415 (11); **MS^3:** 315 → 119 (8), 135 (100); **MS^4:** —
29	*β*-OH-Verbascoside[b,d]	640.59	15.4	195, 230, 327	**639** $[M-H]^-$ **MS^2:** 639 → 621 (100); **MS^3:** 621 → 459 (100), 469 (12); **MS^4:** 459 → 151 (100), 161 (78), 247 (16), 307 (12)
38	Calceolarioside A[b,c,d]	478.45	19.3	200, 218, 289, 327	**477** $[M-H]^-$ **MS^2:** 477 → 161 (100), 179 (21), 315 (22); **MS^3:** 161 → 133 (100), 161 (28); **MS^4:** —

(Continues)

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Journal of MASS SPECTROMETRY

Table 2. *(Continued)*

Peak	Proposed compound	MW	t_R (min)	UV λ_{max} (nm)	Ions detected in MS^1 and MS/MS fragment ions (% relative abundance)
42	Calceolarioside B[b,c,d]	478.45	20.3	198, 235, 327	**477** $[M-H]^-$ **MS^2:** 477 → 161 (100), 179 (3), 315 (23); **MS^3:** 161 → 133 (100), 161 (30); **MS^4:** —
44	Rossicaside A[c,d]	786.73	20.8	219, 250sh, 290sh, 331	**785** $[M-H]^-$, 883 $[M + H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS^2:** 785 → 623 (100); **MS^3:** 623 → 315 (14), 443 (13), 461 (100); **MS^4:** 461 → 135 (41), 161 (9), 297 (14), 315 (100)
45	Verbascoside[a,c]	624.59	20.9	219, 250sh, 290sh, 331	**623** $[M-H]^-$, 721 $[M + H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS^2:** 623 → 461 (100); **MS^3:** 461 → 135 (35), 161 (11), 297 (12), 315 (100); **MS^4:** 315 → 135 (100)
46	Rossicaside A (isomer 1)[d]	786.73	21.8	197, 233, 330	**785** $[M-H]^-$ **MS^2:** 785 → 623 (100); **MS^3:** 623 → 315 (14), 443 (13), 461 (100); **MS^4:** 461 → 135 (41), 161 (9), 297 (14), 315 (100)
49	Trichosanthoside B[c,d]	888.82	22.1	197, 219, 331	443 $[M-2H]^{2-}$, **887** $[M-H]^-$, 985 $[M + H_2PO_4/HSO_4]^-$ **MS^2:** 887 → 593 (2), 725 (100); **MS^3:** 725 → 429 (5), 447 (11), 461 (3), 575 (7), 593 (100); **MS^4:** 593 → 297 (3), 315 (9), 429 (9), 443 (5), 447 (53), 461 (100)
51	Rossicaside A (isomer 2)[d]	786.73	22.4	199, 218, 291, 328	**785** $[M-H]^-$ **MS^2:** 785 → 623 (100); **MS^3:** 623 → 315 (14), 443 (12), 461 (100); **MS^4:** 461 → 135 (41), 161 (9), 297 (16), 315 (100)
52	Isoverbascoside[a,c]	624.59	22.6	199, 218, 291, 328	**623** $[M-H]^-$ **MS^2:** 623 → 461 (100); **MS^3:** 461 → 135 (33), 161 (11), 297 (11), 315 (100); **MS^4:** 315 → 135 (100)
54	Trichosanthoside A[c,d]	756.70	22.8	198, 218, 331	**755** $[M-H]^-$, 853 $[M + H_2PO_4/HSO_4]^-$, 1511 $[2\,M-H]^-$ **MS^2:** 755 → 461 (2), 593 (100); **MS^3:** 593 → 297 (3), 315 (10), 443 (8), 461 (100); **MS^4:** 461 → 135 (37), 161 (11), 297 (11), 315 (100)
58	Verbascoside isomer[d]	624.59	23.4	191, 221, 329	**623** $[M-H]^-$ **MS^2:** 623 → 461 (100); **MS^3:** 461 → 135 (34), 161 (12), 297 (12), 315 (100); **MS^4:** 315 → 135 (100)
59	Neosyringalide[c,e]	462.45	23.5	194, 230, 285, 328	**461** $[M-H]^-$ **MS^2:** —; **MS^3:** —; **MS^4:** —
60	Deoxyrossicaside A[d]	770.73	23.7	202, 217, 283, 329	**769** $[M-H]^-$ **MS^2:** 769 → 623 (100); **MS^3:** 623 → 297 (3), 315 (14), 443 (12), 461 (100); **MS^4:** 461 → 135 (34), 161 (11), 297 (11), 315 (100)
63	Arenarioside[c,d]	756.70	25.2	195, 213, 336	**755** $[M-H]^-$ **MS^2:** 755 → 593 (100), 609 (28); **MS^3:** 593 → 461 (100); **MS^4:** 461 → 135 (41), 315 (100)
64	Leucosceptoside A[c,d]	638.61	25.5	334	**637** $[M-H]^-$ **MS^2:** 637 → 461 (100); **MS^3:** 461 → 135 (34), 161 (12), 297 (11), 315 (100); **MS^4:** 315 → 135 (100)
66	Plantainoside C[c,d]	638.61	27.0	214, 243, 364	**637** $[M-H]^-$ **MS^2:** 637 → 461 (100); **MS^3:** 461 → 135 (26), 161 (8), 297 (8), 315 (100); **MS^4:** —
72	Desmethylglobusintenoside isomer[e]	948.87	29.4	218, 248, 310, 332	**947/948** $[M-H]^-$ **MS^2:** 947 → 785 (100); **MS^3:** 785 → 623 (100); **MS^4:** 623 → 297 (3), 315 (13), 443 (12), 461 (100)
78	Globusintenoside isomer[c,d]	962.90	33.0	219, 327	**961/962** $[M-H]^-$ **MS^2:** 961 → 623 (14), 767 (7), 785 (100), 799 (44); **MS^3:** 785 → 623 (100); **MS^4:** 623 → 315 (15), 443 (11), 461 (100)
79	6′-*O*-Caffeoylverbascoside[d]	786.73	34.1	196, 222, 245sh, 302sh, 329	**785** $[M-H]^-$ **MS^2:** 785 → 623 (100); **MS^3:** 623 → 461 (100); **MS^4:** 461 → 135 (36), 161 (12), 297 (11), 315 (100)
82	Galypumoside B[b,c]	800.76	38.8	197, 213sh, 310sh, 320	**799** $[M-H]^-$ **MS^2:** 799 → 461 (13), 623 (65), 637 (100); **MS^3:** 637 → 443 (5), 461 (100), 475 (10), 491 (14); **MS^4:** 461 → 135 (39), 161 (11), 297 (6), 315 (100)

(Continues)

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Table 2. *(Continued)*

Peak	Proposed compound	MW	t_R (min)	UV λ_{max} (nm)	Ions detected in MS^1 and MS/MS fragment ions (% relative abundance)
Flavonoids					
25	Vicenin-2[b]	594.52	12.9	218, 244, 273, 343	**593** $[M-H]^-$ **MS^2:** 593 → 353 (23), 383 (12), 473 (100), 503 (28), 575 (11); **MS^3:** 473 → 353 (100), 383 (16); **MS^4:** 353 → 297 (38), 325 (100)
28	6-Hydroxyluteolin 7-*O*-diglucoside[b,c]	626.52	15.0	213, 285, 348	**625** $[M-H]^-$ **MS^2:** 625 → 301 (100), 445 (18), 463 (25); **MS^3:** 301 → 165 (26), 191 (9), 192 (11), 201 (30), 211 (14), 215 (10), 227 (10), 229 (29), 255 (55), 257 (25), 283 (100), 301 (12); **MS^4:** 283 → 227 (13), 237 (14), 255 (100)
30	6-Hydroxyluteolin 7-*O*-glucoside[b,c]	464.38	16.1	195, 215, 282, 346	**463** $[M-H]^-$ **MS^2:** 463 → 301 (100); **MS^3:** 301 → 165 (19), 201 (31), 229 (27), 255 (46), 257 (22), 283 (100); **MS^4:** 283 → 227 (16), 237 (15), 255 (100)
37	Isoquercitrin[a,c]	464.38	18.9	271, 350	**463** $[M-H]^-$ **MS^2:** 463 → 300 (31), 301 (100); **MS^3:** 301 → 151 (62), 179 (100), 229 (10), 255 (9), 257 (19), 273 (17); **MS^4:** 179 → 151 (100)
39	Luteolin 7-*O*-glucoside[a,c]	448.37	19.5	215, 288, 334	**447** $[M-H]^-$ **MS^2:** 447 → 285 (100); **MS^3:** 285 → 151 (26), 175 (67), 199 (64), 217 (63), 241 (100), 243 (65), 257 (24), 267 (15), 285 (21); **MS^4:** —
41	6-Hydroxyluteolin 7-*O*-(6‴-*O*-caffeoyl)-sophoroside[c,d]	788.66	20.0	214, 288, 335	**787** $[M-H]^-$, 885 $[M+H_2PO_4/HSO_4]^-$, 1575 $[2M-H]^-$ **MS^2**: 787 → 625 (100); **MS^3**: 625 → 300 (21), 301 (100), 343 (7), 445 (19), 463 (26); **MS^4**: 301 → 137 (7), 165 (25), 192 (11), 201 (33), 211 (16), 229 (27), 239 (15), 255 (53), 257 (26), 273 (14), 283 (100), 301 (10)
47	Scutellarein 7-*O*-glucoside[e]	448.37	21.9	215, 256, 285, 342	**447** $[M-H]^-$ **MS^2**: —; **MS^3**: —; **MS^4**: —
48	6-Hydroxychrysoeriol 7-*O*-glucoside[d]	478.40	22.0	197, 216, 234, 287, 337	**477** $[M-H]^-$ **MS^2**: 477 → 315 (100); **MS^3**: 315 → 300 (100); **MS^4**: 300 → 137 (13), 174 (19), 199 (12), 200 (36), 201 (30), 202 (12), 211 (17), 212 (34), 213 (35), 214 (46), 216 (100), 227 (63), 228 (67), 239 (10), 241 (36), 243 (28), 244 (19), 254 (15), 255 (48), 256 (57), 271 (36), 272 (60), 283 (36), 299 (40)
53	Apigenin 7-*O*-glucuronide[d]	446.36	22.8	199, 269, 337	**445** $[M-H]^-$ **MS^2**: 445 → 175 (14), 269 (100); **MS^3**: 269 → 149 (33), 151 (17), 181 (11), 183 (18), 197 (8), 201 (25), 225 (100), 227 (17), 269 (26); **MS^4**: —
56	Apigenin 7-*O*-glucoside[a,c]	432.38	23.0	199, 268, 338	**431** $[M-H]^-$ **MS^2**: 431 → 269 (100); **MS^3**: 269 → 149 (22), 151 (13), 169 (14), 181 (14), 183 (22), 197 (27), 201 (21), 224 (24), 225 (100), 227 (28), 241 (10), 269 (52); **MS^4**: —
57	6-Hydroxyluteolin 7-*O*-(6‴-*O*-*p*-coumaroyl)-sophoroside[c,d]	772.66	23.3	214, 288, 324	**771** $[M-H]^-$ **MS^2**: 771 → 625 (100); **MS^3**: 625 → 301 (100), 445 (19), 463 (27); **MS^4**: 301 → 165 (23), 201 (31), 229 (27), 255 (50), 257 (26), 283 (100), 301 (9)
65	6-Hydroxychrysoeriol 7-*O*-allosylglucoside[d]	640.54	26.5	215, 289, 338	**639** $[M-H]^-$ **MS^2**: 639 → 301 (92), 315 (100), 323 (90); **MS^3**: 315 → 300 (100); 300 → 137 (12), 165 (46), 201 (17), 229 (36), 255 (84), 273 (27), 283 (100), 301 (20); **MS^4**: —
67	Scutellarein 4′-methyl ether 7-*O*-diglucoside[d]	624.54	27.3	200, 288, 332	**623** $[M-H]^-$ **MS^2**: 623 → 299 (100); **MS^3**: 299 → 284 (100); **MS^4**: —
69	Aphyllanthoside[c,d]	730.62	28.2	195, 243, 282, 345	**729** $[M-H]^-$ **MS^2**: 729 → 607 (100); **MS^3**: 607 → 300 (58), 301 (100), 445 (11), 463 (13); **MS^4**: 301 → 165 (17), 201 (27), 229 (36), 255 (41), 283 (100), 301 (12)
73	Luteolin[a,c]	286.24	29.7	208, 257, 350	**285** $[M-H]^-$ **MS^2**: 285 → 175 (44), 199 (42), 217 (36), 241 (100), 243 (48), 257 (15), 285 (18); **MS^3**: —; **MS^4**: —
74	Demethoxycentaureidin 7-*O*-hexosylglucoside[e]	654.57	30.2	214, 288, 341	**653** $[M-H]^-$ **MS^2**: 653 → 300 (20), 315 (100); **MS^3**: 315 → 300 (100); **MS^4**: 300 → 174 (7), 214 (16), 216 (36), 227 (27), 272 (100), 283 (14), 299 (16)

(Continues)

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Table 2. *(Continued)*

Peak	Proposed compound	MW	t_R (min)	UV λ_{max} (nm)	Ions detected in MS^1 and MS/MS fragment ions (% relative abundance)
80	Apigenin[a,c]	270.24	34.9	197, 207, 268, 340	**269** $[M-H]^-$ **MS^2**: 269 → 149 (33), 151 (18), 201 (25), 225 (100), 226 (15), 227 (15), 269 (16); **MS^3**: 225 → 157 (5), 169 (13), 180 (13), 181 (100), 183 (36), 196 (20), 197 (38); **MS^4**: —
83	Pectolinarigenin 7-*O*-hexosylglucoside[e]	638.57	39.3	191, 217, 242, 292, 334	**637** $[M-H]^-$ **MS^2**: 637 → 284 (13), 299 (100), 337 (11); **MS^3**: 299 → 284 (100); **MS^4**: 284 → 137 (45), 150 (10), 200 (27), 212 (43), 227 (100), 228 (81), 256 (63), 283 (47)
Other polar compounds					
1	Mannitol[b,c]	182.17	1.2	—	181 $[M-H]^-$, **217** $[M+{}^{35}Cl]^-$, 219 $[M+{}^{37}Cl]^-$ **MS^2**: 217 → 163 (14), 181 (100); **MS^3**: 181 → 89 (26), 101 (46), 113 (13), 119 (43), 131 (17), 143 (13), 163 (100); **MS^4**: 163 → 59 (32), 71 (12), 85 (100), 89 (55), 101 (100), 113 (51), 119 (16), 131 (34), 145 (18)
2	Sucrose[b,c]	342.30	1.2	—	341 $[M-H]^-$, **377** $[M+{}^{35}Cl]^-$, 379 $[M+{}^{37}Cl]^-$ **MS^2**: 377 → 215 (10), 341 (100); **MS^3**: 341 → 113 (12), 119 (11), 143 (15), 161 (17), 179 (100); **MS^4**: 179 → 87 (10), 89 (48), 113 (11), 119 (38), 131 (22), 143 (100), 161 (72)
3	Quinic acid[b,c]	192.17	1.3	—	**191** $[M-H]^-$ **MS^2**: 191 → 127 (100); **MS^3**: —; **MS^4**: —
13	Caffeoylglucoside (isomer 1)[b,c]	342.30	6.1	192, 217, 243, 305, 327	**341** $[M-H]^-$ **MS^2**: 341 → 179 (20), 221 (17), 251 (61), 281 (100), 323 (13); **MS^3**: 281 → 179 (100), 221 (32); **MS^4**: 179 → 135 (100)
15	Hebitol II[b,c]	506.45	6.8	244, 327	**505** $[M-H]^-$ **MS^2**: 505 → 161 (100), 179 (72), 221 (16), 251 (35), 281 (62), 341 (21), 343 (24); **MS^3**: 161 → 133 (100), 161 (21); **MS^4**: —
16	Caffeoylglucoside (isomer 2)[b,c]	342.30	7.2	192, 217, 241, 305, 327	**341** $[M-H]^-$ **MS^2**: 341 → 179 (20), 221 (17), 251 (62), 281 (100), 323 (12); **MS^3**: 281 → 179 (100), 221 (30); **MS^4**: 179 → 135 (100)
18	*p*-Coumaroylglucoside (isomer 1)[b,c]	326.30	7.9	226, 314	**325** $[M-H]^-$ **MS^2**: 325 → 119 (7), 145 (46), 163 (100), 187 (27), 265 (11); **MS^3**: 163 → 119 (100); **MS^4**: —
19	*p*-Coumaroylglucoside (isomer 2)[b,c]	326.30	8.7	236, 313	**325** $[M-H]^-$ **MS^2**: 325 → 235 (100), 265 (93); **MS^3**: 235 → 163 (100); **MS^4**: 163 → 119 (100)
21	Feruloylglucoside (isomer 1)[d]	356.32	11.0	218, 296, 325	**355** $[M-H]^-$ **MS^2**: 355 → 193 (15), 235 (76), 265 (100), 295 (82); **MS^3**: 265 → 193 (100), 217 (5), 221 (5); **MS^4**: 193 → 134 (20), 149 (100), 178 (60)
22	Globularitol[c]	520.48	11.1	218, 296, 325	**519** $[M-H]^-$ **MS^2**: 519 → 193 (100), 235 (26), 265 (15), 295 (18), 325 (43), 355 (12); **MS^3**: 193 → 134 (36), 149 (100), 178 (55); **MS^4**: —
24	Feruloylglucoside (isomer 2)[d]	356.32	12.4	217, 241, 327	**355** $[M-H]^-$ **MS^2**: 355 → 161 (20), 193 (14), 235 (79), 265 (100), 295 (80); **MS^3**: 265 → 193 (100); **MS^4**: 193 → 134 (21), 149 (100), 178 (62)
35	Liriodendrin[c]	742.72	18.5	207, 230	**787** $[M-H+HCOOH]^-$ **MS^2**: 787 → 417 (7), 579 (100), 624 (30), 625 (28), 741 (67), 769 (41); **MS^3**: —; **MS^4**: —
Other non-polar compounds					
84	Oxo-dihydroxy-octadecenoic acid[b]	328.44	40.2	—	**327** $[M-H]^-$ **MS^2**: 327 → 171 (31), 209 (18), 211 (46), 221 (18), 229 (100), 239 (16), 291 (62), 309 (23); **MS^3**: 229 → 125 (17), 127 (11), 155 (13), 167 (10), 209 (41), 211 (100); **MS^4**: 211 → 125 (31), 167 (56), 183 (100), 193 (30)

(Continues)

Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Table 2. *(Continued)*

Peak	Proposed compound	MW	t_R (min)	UV λ_{max} (nm)	Ions detected in MS^1 and MS/MS fragment ions (% relative abundance)
85	Trihydroxy-octadecenoic acid[b]	330.46	43.3	—	**329** $[M-H]^-$ **MS^2**: 329 → 171 (26), 211 (58), 229 (100), 293 (32), 311 (52); **MS^3**: 229 → 125 (18), 127 (13), 155 (13), 167 (12), 209 (41), 211 (100); **MS^4**: 211 → 125 (18), 167 (63), 183 (100), 193 (52)

*Major ion in MS^1, marked in bold numbers (100% relative abundance).
[a]Comparison of t_R, MS^1 and PDA spectra and MS/MS fragmentation pattern with those of standard compounds.
[b]Comparison of t_R, MS^1 and PDA spectra and MS/MS fragmentation pattern with literature data.
[c]MS/MS fragmentation pattern expected for a compound previously reported for *Globularia* spp. (+PDA for additional confirmation).
[d]MS/MS fragmentation pattern (and t_R) similar to those of other identified compounds (+PDA for additional confirmation).
[e]MS^1 spectrum or MS/MS fragmentation pattern expected for compounds similar to those previously reported for *Globularia* spp. and t_R similar to those of other identified compounds (+PDA for additional confirmation).
MW, molecular weight.

identified as gardoside,[21] a compound previously isolated from *G. vulgaris*.[7] Compounds **10** and **11**, found in all four species, were also characterized by the presence of an abundant molecular ion and its FAA at *m/z* 375 and 421, respectively. They were tentatively identified as mussaenosidic acid and (*epi*)loganic acid, as in a recent study performed on *G. alypum*.[14] The similarity of retention times between (*epi*)loganic acid and gardoside is in agreement with their similar structures (Fig. 1).

Compounds **23** (*m/z* 523), **26** (*m/z* 507) and **32** (*m/z* 537) were characteristic for *G. alypum*. All three compounds gave a loss of 344 Da in MS^2 $[M-H\text{-}aGlc\text{-}182]^-$. Obtained fragments for compounds **23** and **26** were attributed to caffeic (CA) (*m/z* 179) and *p*-coumaric acid (PCA) (*m/z* 163) based on comparison of their MS/MS fragmentation pattern and UV spectra to reference standards. Compound **32** gave a major ion at *m/z* 193 in MS^2, which subsequently lead to fragment ions at *m/z* 134 $[M-H\text{-}aGlc\text{-}182\text{-}CO_2\text{-}CH_3]^-$ (major ion), 149 $[M-H\text{-}aGlc\text{-}182\text{-}CO_2]^-$ and 178 $[M-H\text{-}aGlc\text{-}182\text{-}CH_3]^-$ in MS^3. Same fragments were obtained in MS^2 of the ferulic acid (FA) standard, but with fragment at *m/z* 149 as a major ion. Compounds with the same molecular weight and elution pattern were observed in a recent study of *G. alypum* methanolic extracts obtained from leaves, where they were tentatively identified as 6-*O*-esters of catalpol, namely verminoside, specioside and minecoside.[14] The same identities were attributed to compounds bearing similar MS/MS fragmentation patterns, which were found together with catalpol, aucubin and scandoside in a related species of the Plantaginaceae family, *Veronica linariifolia*.[25]

Compounds **33** (*m/z* 555, FAA), **34** (*m/z* 555, FAA), **50** (*m/z* 539, FAA), **61** (*m/z* 537, FAA) and **70** (*m/z* 573, FAA) were present only in *G. alypum* and *G. punctata*. According to MS/MS fragmentation pattern of iridoids previously isolated from *G. alypum*[19,30] and their order of elution under analytical conditions similar to those used in the present study,[31] these compounds were identified as globularinin, globularimin, globularidin, globularin and globularioside, respectively. All are 10-*O*-cinnamoyl esters of catalpol or catalpol derivatives, which is supported by their UV spectra, consistent with the UV spectrum obtained from a cinnamic acid standard. Globularin (10-*O*-*trans*-cinnamoylcatalpol) was observed as a major compound in *G. alypum* extract, as reported previously.[24,31] Globularinin and globularimin are isomers, probably formed by hydrolysis of the globularin epoxide ring, while globularidin is a *C*3–*C*4-saturated derivative of globularin. Globularioside is structurally similar to globularinin, but it contains a chlorine atom instead of a hydroxyl group in the *C*-7 position (Fig. 1). Presence of a chlorine atom in globularioside was supported by its first-order MS, which contained two peaks with a difference of 2 *m/z* values and with relative abundances of approximately 3 : 1.[19] Globularin was reported from several *Globularia* species by now[4,5,7] and globularidin from *G. alypum*[4] and *G. trichosantha*.[26] However, this is the first report of globularinin, globularimin and globularioside in a *Globularia* species other than *G. alypum*. On the other hand, it should be noted that a structural isomer of globularioside, named baldaccioside, was isolated previously from *G. aphyllanthes*.[5]

Compounds **36** (*m/z* 511, FAA), **40** (*m/z* 495, FAA), **43** (*m/z* 513, FAA), **55** (*m/z* 511, FAA) and **62** (*m/z* 523, FAA) were only found in *G. cordifolia* and *G. meridionalis*. UV spectra of all compounds were comparable to that of the benzoic acid (BA) reference standard. Compounds **43** and **55** were characterized by a major ion at *m/z* 179 $[Glc-H]^-$ in MS^3 and MS^4 comparable to that of compound **7** (monomelittoside). Compound **55** (*m/z* 511) was identified as globularifolin (10-*O*-benzoylmonomelittoside), according to previous studies in which it was isolated as a major compound from both *G. cordifolia*[10] and *G. meridionalis*.[11] The difference in retention time between compound **43** (*m/z* 513) and globularifolin (*m/z* 511) was comparable to that between globularidin (3,4-dihydroglobularin) (compound **50**, *m/z* 539) and globularin (compound **61**, *m/z* 537). Compound **43** (*m/z* 513) was tentatively identified as 5-hydroxydavisioside (3,4-dihydroglobularifolin), previously isolated from *G. cordifolia*.[10] For compounds **36**, **40** and **62**, a loss of 122 Da was observed in MS^3, attributed to BA. Compound **36** was tentatively identified as 5-hydroxydumuloside (6′-*O*-benzoylmonomelittoside) based on its MS/MS fragmentation pattern. Loss of 230 Da in MS^4 was assumed to be the result of the cross-ring cleavage of the two ring iridoid skeleton leading to the $^{1,7}X^-$ product ion.[19] The same cleavage was noticed in MS^3 of scandoside and MS^4 of aucubin (−86 Da) and globularimin (−248 Da). A related compound, named dumuloside (6′-*O*-benzoylaucubin), was previously isolated from *G. dumulosa*, together with davisioside (3,4-dihydromelampyroside) and melampyroside.[29] Besides a minor fragment observed in MS^3 at *m/z* 327, which indicated presence of BA, the major fragment obtained for compound **40** was present at *m/z* 431 (−18 Da). The UV spectrum matched that of BA and aucubin standards.

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Journal of MASS SPECTROMETRY

Table 3. Comparison of tentatively identified compounds present in different *Globularia* spp.

Peak	Proposed compound	*Ga*	*Gp*	*Gc*	*Gm*
Iridoids and bisiridoids					
4	Catalpol	+	+	-	-
5	Scandoside	-	+	-	-
6	Aucubin	+	t	t	t
7	Monomelittoside	-	-	+	+*
8	Deacetylasperuloside	-	+*	+*	+*
9	Deacetylalpinoside	+*	+*	+*	+*
10	Mussaenosidic acid	t	+*	+*	+*
11	(*epi*)Loganic acid	t	+*	+*	+*
14	Gardoside	+	+*	+*	+*
17	Asperulosidic acid	-	+	+*	+*
20	Asperuloside	t	+	+	+
23	Verminoside	+	-	-	-
26	Specioside	+	-	-	-
27	Daphylloside	-	+	+*	+*
31	Alpinoside	+	+	+	+*
32	Minecoside	+	-	-	-
33	Globularinin	+	+*	-	-
34	Globularimin	+	+*	-	-
36	6'-*O*-Benzoylmonomelittoside	-	-	+*	+*
40	6-*O*-Benzoylaucubin	-	-	+*	+*
43	5-Hydroxydavisioside	-	-	+	+*
50	Globularidin	+	+*	-	-
55	Globularifolin	-	-	+	+
61	Globularin	+	+	-	-
62	6'-*O*-Benzoyldeacetylalpinoside	-	-	+*	+*
68	Besperuloside	-	+	t*	t*
70	Globularioside/Baldaccioside	+	+	-	-
71	Deacetylglobuloside A	+*	-	-	-
75	Lytanthosalin	+	-	-	-
76	10-*O*-Benzoyldeacetylalpinoside	+*	-	t*	t*
77	Alpinoside-alpinoside dimer	+*	-	-	-
81	Globuloside A	+*	-	-	-
Phenylethanoids					
12	Decaffeoylverbascoside	+	t*	+*	+*
29	*β*-OH-Verbascoside	+*	t*	+*	+*
38	Calceolarioside A	+	-	-	-
42	Calceolarioside B	+	-	-	-
44	Rossicaside A	+	+	+	+*
45	Verbascoside	+	+	+	+
46	Rossicaside A (isomer 1)	+*	-	-	-
49	Trichosanthoside B	-	+*	-	-
51	Rossicaside A (isomer 2)	+*	+*	t*	t*
52	Isoverbascoside	+	+*	+	+
54	Trichosanthoside A	-	+	-	-
58	Verbascoside isomer	+*	+*	+*	+*
59	Neosyringalide	t	t*	t*	t*
60	Deoxyrossicaside A	+*	t*	t*	t*

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Table 3. *(Continued)*

63	Arenarioside	-	+*	-	-
64	Leucosceptoside A	+*	t*	+	+*
66	Plantainoside C	-	-	t*	+*
72	Desmethylglobusintenoside isomer	+*	+*	+*	+*
78	Globusintenoside isomer	+*	+*	+*	+*
79	6'-*O*-Caffeoylverbascoside	+*	t*	t*	t*
82	Galypumoside B	+	-	-	-
Flavonoids					
25	Vicenin-2	+*	t*	t*	t*
28	6-Hydroxyluteolin 7-*O*-diglucoside	+	+	-	-
30	6-Hydroxyluteolin 7-*O*-glucoside	+	+*	+	+*
37	Isoquercitrin	t	+	t*	t*
39	Luteolin 7-*O*-glucoside	+	+*	+*	+*
41	6-Hydroxyluteolin 7-*O*-(6'''-*O*-caffeoyl)-sophoroside	-	+	-	-
47	Scutellarein 7-*O*-glucoside	t*	-	t*	t*
48	6-Hydroxychrysoeriol 7-*O*-glucoside	-	-	t*	+*
53	Apigenin 7-*O*-glucuronide	+*	t*	t*	t*
56	Apigenin 7-*O*-glucoside	+*	t*	t*	t
57	6-Hydroxyluteolin 7-*O*-(6'''-*O*-*p*-coumaroyl)-sophoroside	-	+	-	-
65	6-Hydroxychrysoeriol 7-*O*-allosylglucoside	t*	t*	+*	+*
67	Scutellarein 4'-methyl ether 7-*O*-diglucoside	t*	-	t*	t*
69	Aphyllanthoside	-	+	-	-
73	Luteolin	-	+*	-	-
74	Demethoxycentaureidin 7-*O*-hexosylglucoside	-	-	+*	+*
80	Apigenin	+	+*	+*	+*
83	Pectolinarigenin 7-*O*-hexosylglucoside	-	-	t*	+*
Other polar compounds					
1	Mannitol	+	+*	+*	+*
2	Sucrose	+	+*	+*	+*
3	Quinic acid	-	+*	+*	+*
13	Caffeoylglucoside (isomer 1)	+	+*	+*	+*
15	Hebitol II	t	+*	t*	t*
16	Caffeoylglucoside (isomer 2)	+	+*	+*	+*
18	*p*-Coumaroylglucoside (isomer 1)	+	+*	+*	+*
19	*p*-Coumaroylglucoside (isomer 2)	t	+*	t*	t*
21	Feruloylglucoside (isomer 1)	+*	t*	t*	t*
22	Globularitol	+	t*	+*	+*
24	Feruloylglucoside (isomer 2)	+*	+*	t*	+*
35	Liriodendrin	+	-	-	-
Other non-polar compounds					
84	Oxo-dihydroxy-octadecenoic acid	+*	+*	+*	+*
85	Trihydroxy-octadecenoic acid	+*	+*	+*	+*

Different colors highlight specific compound classes (gray) and the compounds characteristic for certain *Globularia* species or a group of *Globularia* species: red, *Ga*; blue, *Gp*; yellow, *Gc*/*Gm*; purple, *Ga* and *Gp*; orange, *Ga* and *Gc*/*Gm*; green, *Gp* and *Gc*/*Gm*.
+, compound was detected (MS/MS fragmentation obtained); -, compound was not detected; t, trace amounts/low relative abundance of the precursor ion (MS/MS fragmentation not obtained).
*First report for this species (including reports for *G. aphyllanthes* in the case of *G. punctata*).
Ga, *G. alypum*; *Gp*, *G. punctata*; *Gc*, *G. cordifolia*; *Gm*, *G. meridionalis*.

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Journal of MASS SPECTROMETRY

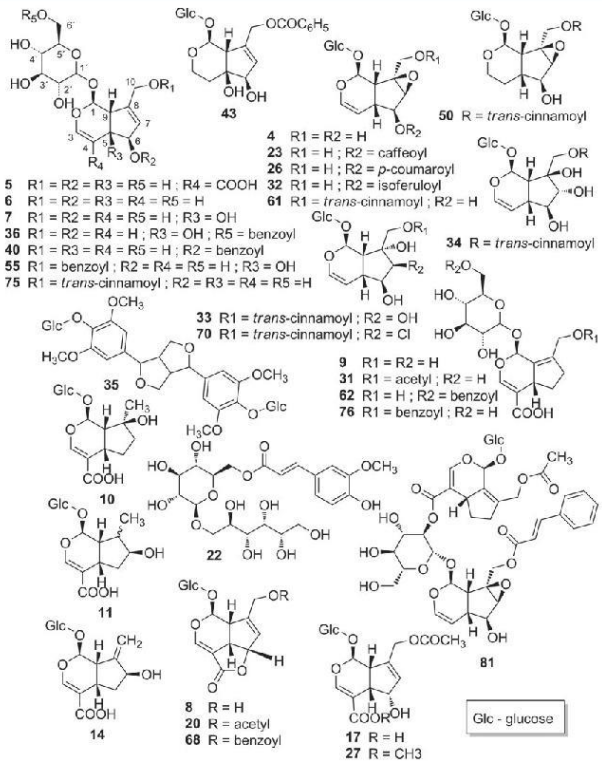


Figure 1. Structures of iridoids and some polar compounds identified in this study. Numbers refer to compounds listed in Tables 2 and 3.

Previously, 10-*O*-benzoylaucubin (melampyroside) was identified in *Globularia* species.[10,11,29,32] However, the retention time of the present compound (20.1 min) was a bit lower than that expected for melampyroside, comparing to that of the 5-hydroxylated melampyroside derivative, globularifolin (23.5 min). On the other hand, comparison of its retention time to 6-acylated catalpol derivatives enabled its tentative identification as 6-*O*-benzoylaucubin.

First-order mass spectra of compound **62** yielded high relative abundances of both the molecular ion at *m/z* 477 (83) and its FAA at *m/z* 523 (100). Besides a loss of 122 Da, resulting in a major ion at *m/z* 355 in MS^3 of compound **62** (*m/z* 477), it gave ions at *m/z* 167 and 211, which were also observed in MS/MS of compound **9**. Loss of 266 Da, which led to formation of the second ion at *m/z* 211, indicated that the benzoyl moiety was attached to the Glc part of the molecule $[M\text{-}H\text{-}benzoylaGlc]^-$. Ion at *m/z* 167 was assumed to be a result of further decarboxylation $[M\text{-}H\text{-}benzoylaGlc\text{-}CO_2]^-$. This compound was tentatively identified as 6′-*O*-benzoyldeacetylalpinoside.

Compound **68** (*m/z* 521, FAA) was present in great amount in *G. punctata*. It showed a UV spectrum comparable to other BA esters and similar MS/MS fragmentation pattern to that of asperuloside. Main fragments that occured in MS^3 and MS^4 were present at *m/z* 147 $[M\text{-}H\text{-}aGlc\text{-}BA\text{-}CO_2]^-$ and 119 $[M\text{-}H\text{-}aGlc\text{-}BA\text{-}CO_2\text{-}CO]^-$ (Fig. 2), the same as those observed for asperuloside. Therefore, compound **68** was identified as besperuloside, a compound previously reported for *G vulgaris*[7] and *G. aphyllanthes*.[5] Compound **75**, observed only in *G. alypum*, yielded a major ion at *m/z* 521 in first-order MS (FAA), same as the previous compound. Its UV and MS/MS spectra indicated that it was a cinnamic acid derivative. Based on comparison of its fragmentation pattern and retention time to those of other acylated (10-*O*-*trans*-cinnamoylcatalpol (**61**)) and non-acylated compounds (catalpol (**4**), aucubin (**6**)) found in *G. alypum*, this compound was tentatively identified as lytanthosaline (10-*O*-*trans*-cinnamoylaucubin). Lytanthosaline was previously isolated from *G. alypum*.[4]

Compound **76** was characterized by presence of both a molecular ion (*m/z* 477, relative intensity of 100) and an FAA (*m/z* 523, relative intensity of 73) in MS^1, same as compound **9**. MS^2 revealed loss of BA (*m/z* 355), followed by loss of Glc (*m/z* 175) and further decarboxylation (*m/z* 131). Due to comparison of elution order of other free (aucubin (**6**), monomelittoside (**7**), deacetylasperuloside (**8**), deacetylalpinoside (**9**)) and benzoylated iridoids observed (6′-*O*-benzoylmonomelittoside (**36**), 6-*O*-benzoylaucubin (**40**), globularifolin = 10-*O*-benzoylmonomelittoside (**55**), 6′-*O*-benzoyldeacetylalpinoside (**62**), besperuloside = 10-*O*-benzoyldeacetylasperuloside (**68**)), compound **76** was tentatively identified as 10-*O*-benzoyldeacetylalpinoside.

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Journal of MASS SPECTROMETRY

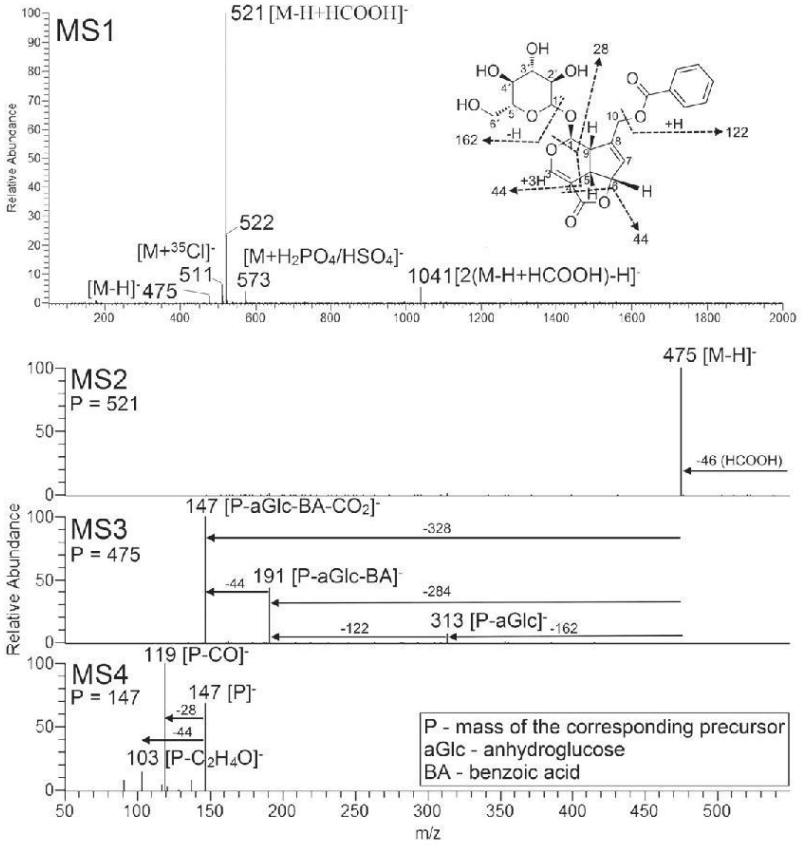


Figure 2. MS^1–MS^4 fragmentation scheme of compound **68**, besperuloside, in negative mode.

In addition to iridoid glycosides, three compounds (**71**, **77** and **81**) found only in *G. alypum* were tentatively identified as bisiridoid glycosides, based on their MS/MS fragmentation patterns and on comparison to similar compounds previously reported for the genus *Globularia*. Compound **81** (*m/z* 935, FAA) was first tentatively identified as globuloside A, an ester of iridoids alpinoside and globularin, both observed as major iridoids of *G. alypum*. UV indicated presence of a cinnamoyl moiety, while MS^2 revealed formation of a FAA, due to a major ion at *m/z* 889 $[M\text{-}H]^-$. This identification was supported by additional ions in MS^2 observed at *m/z* 337 $[M\text{-}H\text{-globularin-AA}]^-$, 537 $[M\text{-}H\text{-aGlc-aAA-cinnamic acid}]^-$, 561 $[M\text{-}H\text{-Glc-cinnamic acid}]^-$, 667 $[M\text{-}H\text{-aGlc-AA}]^-$, 709 $[M\text{-}H\text{-Glc}]^-$, 727 $[M\text{-}H\text{-aGlc}]^-$ and 829 $[M\text{-}H\text{-AA}]^-$. Major ion observed in MS^3 was present at *m/z* 397 $[M\text{-}H\text{-globularin}]^-$. Besides the previously observed peaks at *m/z* 337, 537, 667 and 829, additional supporting peaks were present at *m/z* 319 $[M\text{-}H\text{-globularin-AA-}H_2O]^-$, 415 $[M\text{-}H\text{-anhydroglobularin}]^-$, 519 $[M\text{-}H\text{-aGlc-AA-cinnamic acid}]^-$ and 742 $[M\text{-}H\text{-cinnamic acid}]^-$ in MS^3. By now, three different bisiridoids have been isolated from *Globularia* species, namely globuloside A (alpinoside-globularin dimer), globuloside B (deacetylalpinoside-melampyroside dimer)[11,26] and globuloside C (deacetylalpinoside-aucubin dimer).[10] It can be noted that they all contain the unusual *C8–C9* double bond in one of the two iridoid moieties.

Compound **71** (*m/z* 893, FAA) yielded a UV spectrum similar to that of cinnamic acid. MS^3 led to loss of 492 Da $[M\text{-}H\text{-globularin}]^-$ from the molecular ion obtained as a major fragment in MS^2 (*m/z* 847). Presence of a cinnamic acid moiety was confirmed by a fragment at *m/z* 699 (−148 Da) in MS^3. Based on the comparison of chromatographic and spectral data of compounds observed in this study together with literature data in which only bisiridoids with *C8–C9* unsaturated iridoid moiety were reported for *Globularia* species,[10,11,26] compound **71** was tentatively identified as a deacetylalpinoside-globularin dimer, possibly deacetylated globuloside A (compound **81**). Compound **77** (*m/z* 813) was tentatively identified as an alpinoside-alpinoside dimer based on its UV spectrum similar to that of alpinoside and MS/MS fragmentation pattern with the following ions observed in MS^2: *m/z* 337 $[M\text{-}H\text{-alpinoside-AA}]^-$, 355 $[M\text{-}H\text{-anhydroalpinoside-AA}]^-$, 397 $[M\text{-}H\text{-alpinoside}]^-$, 415 $[M\text{-}H\text{-anhydroalpinoside}]^-$, 485 $[M\text{-}H\text{-Glc-CO-2AA}]^-$, 549 $[M\text{-}H\text{-aGlc-AA-aAA}]^-$, 573 $[M\text{-}H\text{-Glc-AA}]^-$, 591 $[M\text{-}H\text{-aGlc-AA}]^-$, 693 $[M\text{-}H\text{-2AA}]^-$, 753 $[M\text{-}H\text{-AA}]^-$ and 771

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Journal of MASS SPECTROMETRY

[M-H-aAA]$^-$. Major ion observed at *m/z* 415 gave an MS^3 comparable to that of alpinoside (compound **31**). This type of bisiridoid in the genus *Globularia* is reported for the first time.

Phenylethanoids

In total, 21 compounds were tentatively identified as phenylethanoids, most of which were CA derivatives, which was observed through their UV spectra with maximum absorbances around 220 and 330 nm. Unlike the majority of iridoids and bisiridoids, these compounds did not give FAAs, and the major ion observed in MS^1 was always the molecular ion [M-H]$^-$. Compound **45**, which was observed as a major phenylethanoid in all investigated species, and compound **52**, present in minor amounts in all species, were unambiguously identified as verbascoside (acteoside) and isoverbascoside (isoacteoside) based on comparison of their retention times, UV spectra and MS/MS fragmentation patterns to those of verbascoside and isoverbascoside reference standards. Isoverbascoside is a structural isomer of verbascoside in which CA is attached to *C*-6 instead of *C*-4 position of Glc. These two compounds differed only in their retention time, while their spectral properties were the same. For both compounds, MS^2 of the molecular ion (*m/z* 623), obtained in MS^1, resulted in a loss of 162 Da [M-H-anhydrocaffeic acid (aCA)]$^-$. This was followed by a major loss of 146 Da in MS^3, attributed to loss of an anhydrorhamnosyl moiety. MS^4 of the obtained hydroxytyrosol glucoside (HT Glc) (*m/z* 315) led to further loss of Glc (−180 Da). Verbascoside was previously isolated as a major compound from many species of the investigated genus, including *G. alypum*,[4] *G. cordifolia*,[33] *G. meridionalis*[34] and *G. aphyllanthes*.[5] Observed relationship between retention times of these two compounds was in agreement with the previously reported elution sequence for compounds isolated from *G. alypum*.[31] Besides from *G. alypum*, isoverbascoside was isolated also from other related species, including *G. cordifolia*[33] and *G. meridionalis*.[34] Compound **58**, present in lower amounts in all four species, was characterized by the same molecular weight, UV spectrum and MS/MS fragmentation pattern as those of verbascoside/isoverbascoside, indicating that it was also a verbascoside isomer. An additional verbascoside isomer with a rhamnose (Rha) attached to *C*-6-hydroxyl unit, named forsythiaside, was previously isolated from *G. alypum*,[35] but its retention time relative to that of verbascoside and isoverbascoside did not match the one previously reported.[31] Therefore, this compound was tentatively identified only as a verbascoside isomer. Low amounts of compound **12** (*m/z* 461) were present in all four species. MS^2 yielded major loss of 146 Da (*m/z* 315), followed by loss of 180 Da in MS^3 (*m/z* 135). This compound was tentatively identified as a possible degradation product of verbascoside, namely decaffeoylverbascoside. It was previously reported for *G. alypum*[14] and *G. dumulosa*.[29] Compound **29** (*m/z* 639) was tentatively identified as *β*-OH-verbascoside due to comparison of its MS/MS fragmentation pattern to literature data.[36]

Compounds **38** and **42** were both characterized by a major ion at *m/z* 477 in MS^1, which in MS^2 gave fragment ions at *m/z* 161, 179 and 315, attributed to aCA, CA and HT Glc moieties. Fragment at *m/z* 161 showed a further loss of 28 Da in MS^3 [M-H-HT Glc-CO]$^-$. Based on a similar MS/MS fragmentation pattern and on comparison of their retention times to those of verbascoside and isoverbascoside, these compounds were identified as structural isomers calceolarioside A (desrhamnosyl verbascoside) and calceolarioside B (desrhamnosyl isoverbascoside). Reduced dissociation of CA (*m/z* 179) in calceolarioside B, in which CA is linked to *C*-6 atom instead of *C*-4 of Glc, could be explained by formation of a hydrogen bond between hydroxyl groups of the HT and CA moieties attached to *C*-1 and *C*-6 of Glc. Both compounds were detected previously in *G. alypum*,[14] but only the more abundant calceolarioside A was isolated by now.[4]

Compound **44** (*m/z* 785), present in all samples, gave a loss of 162 Da in MS^2, attributed to a CA moiety. This was followed by a loss of 162 Da (aGlc) leading to formation of a major fragment at *m/z* 461, accompanied by fragments at *m/z* 315 (dissociation of anhydrorhamnosylGlc) and 443 (dissociation of Glc) in MS^3. MS^4 was comparable to that of verbascoside and other phenylethanoids. This compound was tentatively identified as rossicaside A, a verbascoside derivative, containing an additional Glc residue attached to the *C*-4 position of the rhamnosyl moiety. Rossicaside A was previously isolated from several *Globularia* species (*G. cordifolia*,[33] *G. trichosantha*[37] and *G. aphyllanthes*).[5] Its presence was also recently reported in *G. alypum*.[14] Compounds **46** and **51** showed similar UV spectra and MS/MS fragmentation patterns to that of rossicaside A. They were tentatively identified as structural isomers of rossicaside A. Compound **79** (*m/z* 785) was observed at relatively high retention time comparing to other compounds of the same molecular mass. It was found only in *G. alypum* and was characterized by two consecutive losses of 162 Da in MS^2 and MS^3, followed by a typical phenylethanoid fragmentation pattern in MS^4 (as observed for verbascoside and isoverbascoside). The UV spectrum indicated it was a CA derivative. Comparison to related compounds identified only in *G. alypum*,[4,14] such as calceolarioside A (desrhamnosyl verbascoside = 4′-*O*-caffeoyl-1′-*O*-HT Glc) and calceolarioside B (desrhamnosyl isoverbascoside = 6′-*O*-caffeoyl-1′-*O*-HT Glc), as well as galypumoside A (6′-*O*-*p*-coumaroylverbascoside) and galypumoside B (6′-*O*-feruloylverbascoside), enabled tentative characterization of this compound as 6′-*O*-caffeoylverbascoside.

Compounds **49** (*m/z* 887) and **54** (*m/z* 755) were only observed in *G. punctata*. Their UV spectra were in accordance with that of the CA standard. MS^2 of compound **49** resulted in loss of 162 Da (*m/z* 725), attributed to aCA. Further fragmentation of this ion led to formation of ions at *m/z* 429 [M-H-aCA-132-164]$^-$, 447 [M-H-aCA-132-146]$^-$, 461 [M-H-aCA-132-132]$^-$, 575 [M-H-aCA-150]$^-$ and 593 [M-H-aCA-132]$^-$, as a major ion in MS^3. In MS^4, the major ion obtained in the previous step was fragmented further, leading to ions at *m/z* 297 [M-H-aCA-132-132-164]$^-$, 315 [M-H-aCA-132-132-146]$^-$, 429, 447 and 461, as a major ion (Fig. 3). In comparison to MS/MS fragmentation patterns of other phenylethanoids and structures of phenylethanoids reported in the literature for different *Globularia* species, it was concluded that the obtained fragmentation pattern for compound **49** could match the predicted fragmentation of trichosanthoside B, where losses of 132/150 Da and 146/164 Da were attributed to losses of anhydroxylose (aXyl)/xylose (Xyl) and anhydrorhamnose (aRha)/Rha. Trichosanthoside B is a verbascoside derivative bearing two Xyl units, one in the *C*-4 position of Rha and one in the *C*-6 position of the central Glc. Trichosanthoside B was previously isolated from *G. trichosantha*.[26,37] Compound **54** (*m/z* 755) showed a similar fragmentation pattern with a loss of 162 Da in MS^2 (*m/z* 593) attributed to aCA, followed by a major loss of 132 Da in MS^3 (*m/z* 461) attributed to aXyl and further fragmentation typical for decaffeoylverbascoside (Fig. 4). Additional minor compounds observed in MS^3 present at *m/z* 297 [M-H-aCA-132-164]$^-$, 315 [M-H-aCA-132-146]$^-$ and 443 [M-H-aCA-150]$^-$ indicated that the

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Journal of MASS SPECTROMETRY

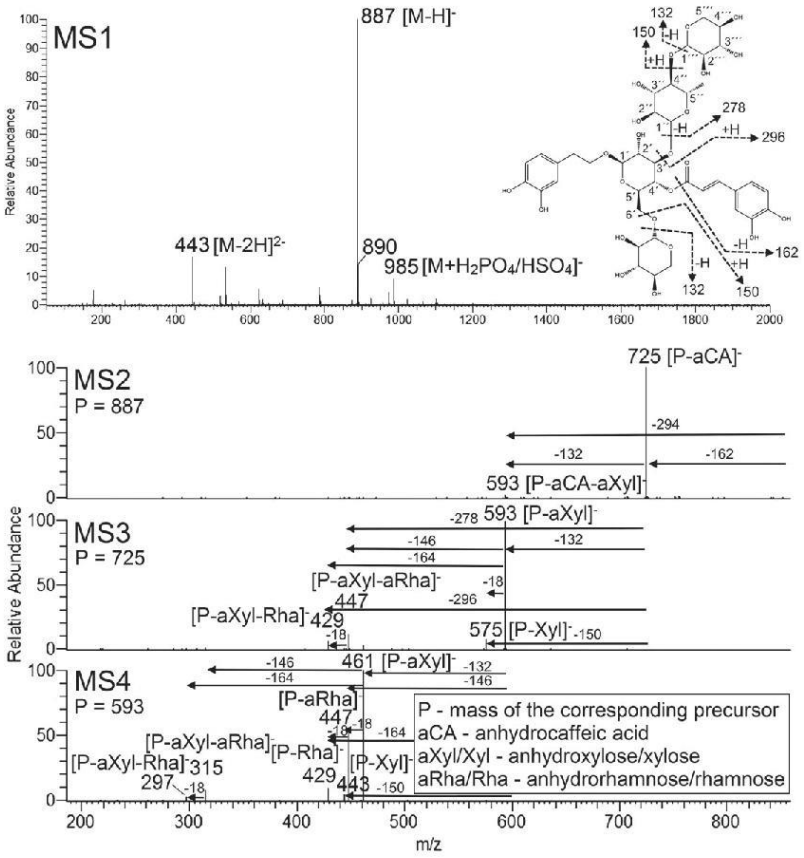


Figure 3. MS^1–MS^4 fragmentation scheme of compound **49**, trichosanthoside B, in negative mode.

Xyl moiety was attached to the Rha sugar. This compound was tentatively identified as trichosanthoside A, a trichosanthoside B derivative lacking the Xyl group in *C*-6 position of the central Glc. In addition to *G. trichosantha*,[26,37] trichosanthoside A was also observed as a major compound in *G. aphyllanthes*.[5] Having in mind that trichosanthoside A (**54**) and rossicaside A (**44**) are both verbascoside derivatives bearing an additional sugar (Glc/Xyl) in the *C*-4 position of Rha, the observed relative difference between their retention times could be expected.[38] An additional compound with the same *m/z* value of 755 (**63**) was present in *G. punctata*. The major product ion obtained in MS^2 (*m/z* 593), attributed to loss of aCA, was accompanied by a minor ion at *m/z* 609 $[M\text{-}H\text{-}aRha]^-$. In MS^3 of the major ion, loss of 132 Da was observed (*m/z* 461). This was attributed to presence of a Xyl group. Further fragmentation (MS^4) matched that of other phenylethanoids leading to formation of a major product ion at *m/z* 315 $[M\text{-}H\text{-}aCA\text{-}aXyl\text{-}aRha]^-$. This compound was tentatively identified as arenarioside, a derivative of trichosanthoside B, lacking the Xyl group attached to the Rha moiety. Arenarioside was previously isolated from *G. trichosantha*.[26]

Low amounts of compounds **59** (*m/z* 461) and **60** (*m/z* 769) were observed in all four species. Although the intensity of the molecular ion was too low to provide further MS^n spectra, compound **59** was tentatively identified as neosyringalide, a compound previously isolated from *G. alypum*,[35] due to its UV spectrum and comparison of its observed retention time to those of related compounds and order of elution found in literature data.[14,31] Neosyringalide is structurally similar to calceolarioside B (**42**), a compound observed only in *G. alypum*. The difference is that it contains PCA in place of CA at *C*-6 position of Glc. The difference between the relative retention times of calceolarioside B (20.3 min) and neosyringalide (23.5 min) matched the retention time difference observed between the CA (8.1 min) and PCA (12.1 min) standard. The main fragments observed for compound **60** (*m/z* 769) were present at *m/z* 623 (−146 Da), 461 (−162 Da) and 315 (−146 Da) in the MS^2, MS^3 and MS^4 spectra. After observing the mass fragmentation pattern of other identified phenylethanoids, such as verbascoside, rossicaside A, trichosanthoside A and trichosanthoside B, it could be noted that the initial loss of the acyl moiety was followed by the loss of attached sugars. Therefore, the first loss of 146 Da in MS^2 was

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Journal of MASS SPECTROMETRY

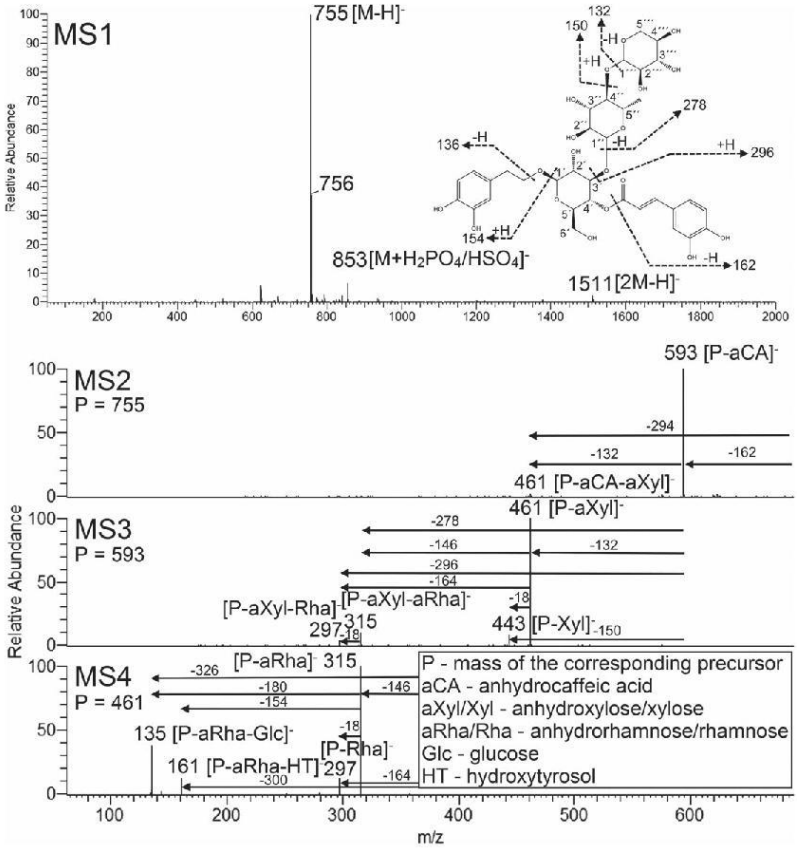


Figure 4. MS^1–MS^4 fragmentation scheme of compound **54**, trichosanthoside A, in negative mode.

attributed to the *p*-coumaroyl part of the molecule, while the second loss of 146 Da observed in MS^4 was attributed to aRha. Fragments obtained from the MS^2 major ion observed in the MS^3 spectrum were present at *m/z* 297 [M-H-anhydro-*p*-coumaric acid (aPCA)-162-164]$^-$, 315 [M-H-aPCA-162-146]$^-$ and 443 [M-H-aPCA-180]$^-$, the same as for rossicaside A and its isomers, which indicated a glucosyl moiety attachment to the Rha part of the molecule. Because rossicaside A was the most abundant compound, compound **60** was tentatively identified as its derivative, deoxyrossicaside A, bearing a *p*-coumaroyl unit in place of the caffeoyl unit. The difference in their retention times (20.8 min for rossicaside A and 23.7 min for deoxyrossicaside A) supported this identification, as in the previous case.

Compound **82** (*m/z* 799) was observed only in *G. alypum*. For this compound, a major loss of 162 Da was observed in MS^2 (*m/z* 637), followed by loss of 176 Da in MS^3 (*m/z* 461), which were attributed to aCA and anhydroferulic acid (aFA). Further fragmentation pattern matched those of other phenylethanoids, with a major fragment attributed to HT Glc (*m/z* 315). This compound was tentatively identified as galypumoside B (6′-*O*-feruloylverbascoside), which was isolated previously from *G. alypum*.[4]

Compound **64** (*m/z* 637) was another phenylethanoid observed in all four species. Because of its major loss of 176 Da in MS^2, followed by a typical fragmentation pattern observed for other phenylethanoids and comparison to literature data, it was tentatively identified as leucosceptoside A. This verbascoside derivative containing FA instead of CA was isolated from several species of the genus *Globularia*, including *G. cordifolia*,[33] *G. davisiana*[32] and *G. dumulosa*.[29] Comparison of its retention time (27.3 min) to that of verbascoside (20.9 min) supported this identification, due to comparison of retention times observed for the CA (8.1 min) and FA (15.4 min) standard. An additional compound (**66**) showing the same molecular weight and fragmentation pattern was present in *G. cordifolia* and *G. meridionalis*. The relationship between its retention time (27.0 min) and retention time of leucosceptoside A (25.5 min) was comparable to that of isoverbascoside (22.6 min) and verbascoside (20.9 min). Therefore, it was identified as the isoverbascoside derivative plantainoside C.[6]

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Journal of MASS SPECTROMETRY

Compounds **72** (*m/z* 947/948) and **78** (*m/z* 961/962) were observed in all species. Both showed UV spectra of CA derivatives and gave MS/MS fragmentation patterns similar to that of rossicaside A (compound **44**). Because rossicaside A was putatively identified to be present in greater amount in all investigated species, these compounds were assumed to be its derivatives. Based on the major loss of 176 Da in MS^2, compound **78** was tentatively identified as a globusintenoside isomer. Globusintenoside is a phenylethanoid compound isolated previously from *G. sintenisii*,[6] which has an additional FA attached to rossicaside A. Compound **72** was tentatively identified as desmethylglobusintenoside isomer, based on its MS/MS fragmentation pattern with a loss of 162 Da in MS^2 and comparison of its retention time to that of compound **78**.

Flavonoids

Flavonoids of flavone (and flavonol) type, present mainly as glycosides, were observed in all four species. Molecular ions $[M-H]^-$ were observed as major ions in MS^1, same as for phenylethanoids. Presence of isoquercitrin (quercetin 3-*O*-glucoside, compound **37**) was determined by the use of its reference standard. This compound was previously isolated from *G. aphyllanthes*[5] and *G. alypum*.[39] Compounds **39** (*m/z* 447) and **56** (*m/z* 431), present in all four species, were unambiguously identified as luteolin 7-*O*-glucoside and apigenin 7-*O*-glucoside by comparison of their retention time, UV and MS^n spectra with those of reference standards. Apigenin 7-*O*-glucoside was previously isolated from *G. alypum*[39] and *G. meridionalis*.[34] Proposed identity of compound **53** (*m/z* 445) is apigenin 7-*O*-glucuronide, based on its retention time relative to that of apigenin 7-*O*-glucoside, comparable UV spectra, loss of 176 Da noted in MS^2 (*m/z* 269) and matching MS^3 of both substances.

Presence of luteolin (compound **73**, *m/z* 285) in *G. punctata* and apigenin (compound **80**, *m/z* 269) in all species was also confirmed by comparison with standard substances. Apigenin was previously isolated from *G. alypum*[40] and luteolin from both *G. alypum*[40] and *G. meridionalis*.[34]

Compound **25** (*m/z* 593) was characterized by two sequential losses of 120 Da in MS^2 and MS^3 leading to formation of major product ions at *m/z* 473 and 353. This type of fragmentation is usually observed for *C*-glycosylated flavonoids.[41] After comparison of its MS/MS fragmentation pattern to literature data, the compound was tentatively identified as apigenin-6,8-di-*C*-glucoside (vicenin-2).[42] To our knowledge, this is the second report of a *C*-glycosylated flavonoid in a *Globularia* species. Previously, 8-*C*-glucosyl-4′,7-dihydroxyflavone (bayin) was isolated from *G. alypum*.[39]

Compounds **28** (*m/z* 625) and **30** (*m/z* 463) showed similar retention times and UV spectra. Both gave a major ion at *m/z* 301 in MS^2, followed by matching fragmentation patterns in MS^3. Compound **30** was present in all four species. It was identified as 6-hydroxyluteolin 7-*O*-glucoside based on comparison of its MS/MS fragmentation pattern to that of the same compound isolated from *G. alypum*.[17] Comparison of the UV spectrum obtained for this compound to literature data supported the proposed identification.[43] Besides *G. alypum*, this compound was previously isolated also from *G. cordifolia*.[44] Major loss of 324 Da in MS^2 of compound **28**, attributed to a diglucosidic residue,[17] was accompanied by losses of 162 Da (aGlc) and 180 Da (Glc). Two 6-hydroxyluteolin diglucosides were previously isolated from *Globularia* species: 7-*O*-sophoroside (7-*O*-glucosyl-(1 → 2)-glucoside) from both *G. alypum*[4] and *G. punctata*[45] and 7-*O*-laminaribioside (7-*O*-glucosyl-(1 → 3)-glucoside), only from *G. alypum*.[35] A 6-hydroxyluteolin diglucoside was previously observed in *G. cordifolia* as well.[44] Compound **28** was observed in both *G. alypum* and *G. punctata*. Because of comparison to other identified compounds (**41**, **57**, **69**) observed in *G. punctata*, it is most likely that this compound is 6-hydroxyluteolin 7-*O*-sophoroside.

Compounds **41** (*m/z* 787), **57** (*m/z* 771) and **69** (*m/z* 729) were tentatively identified as 6‴-*O*-esters (caffeoyl, *p*-coumaroyl and benzoyl) of 6-hydroxyluteolin 7-*O*-sophoroside, according to substances previously reported to be present in *G. punctata*[45] and/or *G. aphyllanthes*.[5] The *C*-6 position of hexoses seems to be the predominant place of acylation.[41] The major fragment of the first two compounds obtained in MS^2, observed at *m/z* 625, was attributed to a loss of aCA (−162 Da) (Fig. 5) and aPCA (−146 Da) moiety. Compound **69** was characterized by a loss of 122 Da in MS^2 (*m/z* 607), attributed to BA. Further fragmentation led to formation of a major ion at *m/z* 301 in MS^3 of all three compounds, which afterwards gave a fragmentation pattern matching that of compound **28**. The minor fragment present at *m/z* 343, attributed to loss of aGlc and partial cleavage of the second Glc ($-C_4H_8O_4$), supported the assumption that the two sugars were connected via a *C*-1–*C*-2 glycosidic bond.

Although no MS/MS spectra were available for compound **47** (*m/z* 447), this compound was tentatively identified as scutellarein (6-hydroxyapigenin) 7-*O*-glucoside due to comparison of its structure and retention time (21.9 min) to those of other identified compounds, 6-hydroxyluteolin 7-*O*-glucoside (**30**) (16.1 min), luteolin 7-*O*-glucoside (**39**) (19.5 min) and apigenin 7-*O*-glucoside (**56**) (23.0 min), as well as comparison of its UV spectrum to literature data.[43] Scutellarein 7-*O*-diglucoside was reported previously for *G. cordifolia*.[44] Compounds **48** (*m/z* 477), **65** (*m/z* 639), **67** (*m/z* 623), **74** (*m/z* 653) and **83** (*m/z* 637), characteristic for *G. cordifolia* and/or *G. meridionalis*, were tentatively identified as methoxylated flavonoid glycosides based on their similar UV and MS^n spectra. Compound **48** (*m/z* 477) yielded a loss of 162 Da in MS^2, which was attributed to aGlc. This was followed by a loss of 15 Da in MS^3, attributed to a methyl group. For compounds **65** (*m/z* 639) and **67** (*m/z* 623), a loss of 324 Da was observed in MS^2, indicating presence of a dihexoside moiety. MS^3 of obtained aglycone ions also led to a loss of 15 Da, resulting in major fragments present at *m/z* 300 and 284, respectively. Further fragmentation of these demethylated ions was not observed. Loss of a methyl group was also observed for the chrysoeriol (3′-*O*-methylluteolin) reference standard and was previously reported as characteristic for methoxylated flavonoids.[46] Investigation of literature data revealed that several methoxylated flavonoids were previously reported for *Globularia* species. For instance, nepetin 7-*O*-glucoside was found in *G. alypum*[14] and *G. dumulosa*,[29] nepetin 7-*O*-rhamnosylglucoside in *G. cordifolia*,[44] pectolinarigenin 7-*O*-glucoside in *G. dumulosa*[29] and *G. meridionalis*,[34] demethoxycentaureidin 7-*O*-glucoside in *G. cordifolia*[44] and *G. dumulosa*[29] and chrysoeriol 7-*O*-allosylglucoside in *G. cordifolia*.[33] The UV spectrum of compound **48** supported the assumption that it was a methoxylated flavone glucoside and indicated that the compound had a 6-OH group and contained two groups in ring B, one of which was methoxylated.[43] Comparison to flavonoids previously isolated from related species enabled tentative characterization of this compound as 6-hydroxychrysoeriol 7-*O*-

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Journal of MASS SPECTROMETRY

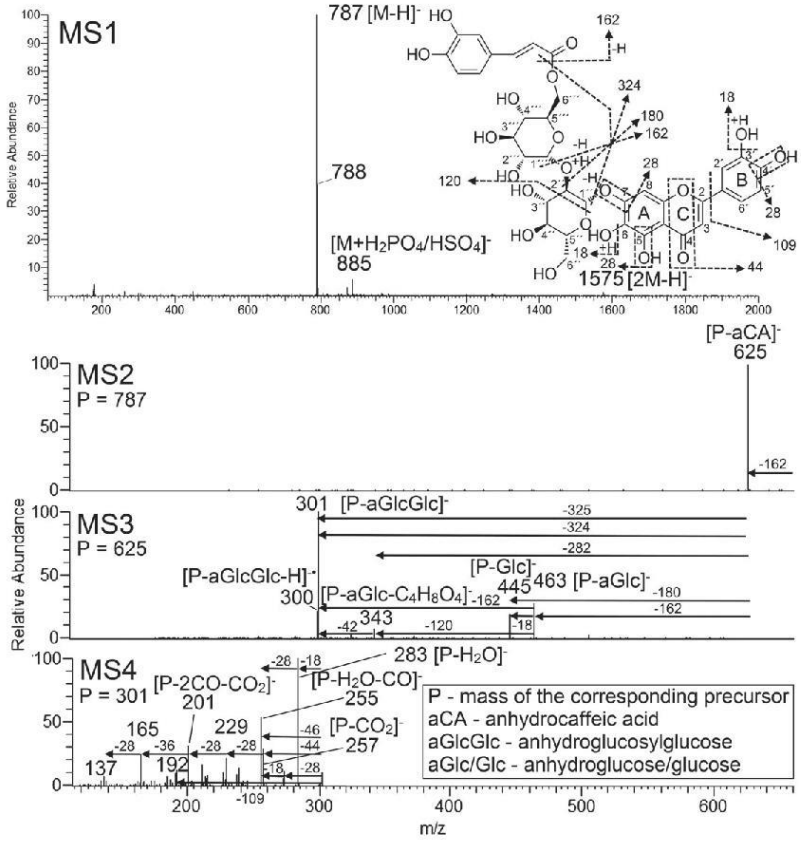


Figure 5. MS^1–MS^4 fragmentation scheme of compound **41**, 6-hydroxyluteolin 7-*O*-(6‴-*O*-caffeoyl)-sophoroside, in negative mode.

glucoside. Observed retention times supported the proposed identification, because they showed that methylation of 6-hydroxyluteolin 7-*O*-glucoside (**30**) (16.1 min) in ring B had a strong influence on increasing lipophilicity for 6-hydroxychrysoeriol 7-*O*-glucoside (**48**) (26.5 min). A similar shift in retention time was also observed for standard compounds luteolin (29.6 min) and chrysoeriol (37.2 min). The UV spectrum of compound **67** indicated presence of a 6-OH group, indicating that the aforementioned methoxylation took place in ring B.[43] Comparing to related compounds, this compound was tentatively identified as scutellarein 4′-methyl ether 7-*O*-diglucoside. Previously, scutellarein 7-*O*-diglucoside was isolated from *G. cordifolia*, while presence of scutellarein 6,4′-dimethyl ether aglycone in the same species was observed after acid hydrolysis.[44] Due to comparison to related compounds (**48**) and compounds found in literature data,[33] compound **65** was tentatively identified as 6-hydroxychrysoeriol 7-*O*-allosylglucoside. Compounds **74** (*m/z* 653) and **83** (*m/z* 637) were both characterized by a major loss of 338 Da in MS^2, together with a minor loss of 353 Da. MS^3 of the major ion led to a loss of 15 Da ($-CH_3$) for both compounds resulting in fragments present at *m/z* 300 and 284, which further led to formation of a major fragment at *m/z* 272 (compound **74**) and a major fragment at *m/z* 227 (compound **83**) in MS^4. Based on comparison of fragmentation patterns of acylated 6-hydroxyluteolin 7-*O*-sophoroside derivatives that were described in the previous section, the loss of 338 Da was not attributed to acylated aGlc (176 Da + 162 Da) but rather to a simultaneous loss of a dihexoside moiety (324 Da) and 14 Da, attributed to presence of an additional methoxyl group. These compounds were tentatively identified as demethoxycentaureidin (6,4′-dimethyl ether of 6-hydroxyluteolin) 7-*O*-hexosylglucoside and pectolinarigenin (6,4′-dimethyl ether of 6-hydroxyapigenin) 7-*O*-hexosylglucoside, based on previously mentioned reports of 7-*O*-monoglucosides of the same flavone aglycones and comparison to other glycosylated flavones observed.[34,44]

Other polar compounds

Other polar compounds, observed in all four species, were different carbohydrates and carbohydrate esters. Very polar compounds,

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Journal of MASS SPECTROMETRY

such as **1** and **2**, were characterized by presence of chloride adducts, shifted by 2 *m/z* units, together with the molecular ion in MS^1. Formation of chloride adducts in negative ion ESI-MS was reported previously for different carbohydrates.[47] Compound **1** was characterized by a major ion at *m/z* 217 $[M+^{35}Cl]^-$ followed by ions at *m/z* 181 $[M\text{-}H]^-$ and 219 $[M+^{37}Cl]^-$. Besides from a loss of 36 Da noted in MS^2, occurence of chloride adducts was observed through a 3 : 1 ratio between relative intensities of ions observed at *m/z* 217 and 219. Further fragmentation of the molecular ion gave a major peak at *m/z* 163 $[M\text{-}H\text{-}H_2O]^-$. This compound was tentatively identified as mannitol, a carbohydrate reported previously as characteristic for species of the genus *Globularia*.[7] In MS^1, compound **2** gave a major fragment at *m/z* 377 $[M+^{35}Cl]^-$, with a relative intensity approximately three times greater than that of *m/z* 379 $[M+^{37}Cl]^-$, indicating existence of chloride adducts. MS^2 gave ion at *m/z* 341 $[M\text{-}H]^-$ as a major ion, which further disintegrated to *m/z* 179 in MS^3 and 143 in MS^4. It was tentatively identified as sucrose, because of comparison to literature data.[47] Its presence together with mannitol was recently reported in *G. alypum*.[14] Compound **3** (*m/z* 191) was present at approximately the same retention time as mannitol and sucrose. It was tentatively identified as quinic acid, same as in the previous phytochemical research done on *G. alypum*.[14]

Compounds **13** and **16** (*m/z* 341) were tentatively identified as caffeoylglucoside isomers, which were observed previously in *G. alypum*[14] and are an integral part of majority of phenylethanoids found in investigated samples. Their UV spectra were comparable to that of the CA standard. Loss of 60 Da in MS^2 (*m/z* 281) was followed by loss of 102 Da in MS^3 (*m/z* 179). MS^4 of the obtained fragment matched the observed fragmentation of the CA standard characterized by loss of 44 Da (decarboxylation). Comparing retention times of verbascoside and isoverbascoside, these compounds probably have CA attached at the *C*-4 and *C*-6 position of Glc. Compounds **18** and **19** (*m/z* 325) were tentatively identified as *p*-coumaroylglucoside isomers, based on the comparison of their UV spectra and characteristic MS fragments, observed at *m/z* 163 $[M\text{-}H\text{-}aGlc]^-$ and 119 $[M\text{-}H\text{-}aGlc\text{-}CO_2]^-$, to that of the PCA standard. Their presence was previously reported in *G. alypum*.[14] In the same manner, compounds **21** and **24** (*m/z* 355), present in low amounts in all four species, were tentatively identified as feruloylglucoside isomers. MS^2 of these compounds gave a major product ion at *m/z* 265 $[M\text{-}H\text{-}90]^-$. Further fragmentation led to major product ions at *m/z* 193 $[M\text{-}H\text{-}90\text{-}72]^-$ in MS^3 and 149 $[M\text{-}H\text{-}90\text{-}72\text{-}CO_2]^-$ in MS^4. These fragmentation patterns match that of a FA standard. Even though feruloylglucoside isomers were not reported for species of the genus *Globularia* by now, it can be observed that these compounds are integrated into phenylethanoids present in all four species, such as leucosceptoside A (compound **64**) and globusintenoside (compound **78**), as well as some additional phenylethanoids (**66**, **82**). Additionally, compound **15** (*m/z* 505) was tentatively identified as the mannitol ester hebitol II. This was in agreement with its MS/MS fragmentation pattern, UV spectra and retention time, which was between those of observed caffeolyglucoside isomers, same as previously reported.[14] Compound **22** (*m/z* 519) yielded a major ion at *m/z* 193 in MS^2, which further gave the fragmentation pattern comparable to that of the FA standard (MS^3). Additional fragments obtained in MS^2 indicated that this compound was a sugar ester, possibly the one previously isolated from *G. orientalis*, namely globularitol.[48] The same compound was observed recently in *G. alypum*.[14] Low amounts were present in all four species. Compound **35** (*m/z* 787, FAA) was observed only in *G. alypum*. Major fragments obtained in MS^2 present at *m/z* 579 (−208 Da) and 741 (−46 Da), together with a minor fragment at *m/z* 417 (−370 Da) indicated that it gave adducts with formic acid in MS^1. Examination of compounds previously isolated from *G. alypum* allowed its identification as liriodendrin, a lignan diglucoside.[24]

Other non-polar compounds

Compounds **84** (*m/z* 327) and **85** (*m/z* 329) were present in all samples. These compounds showed a similar MS/MS fragmentation pattern with major fragments at *m/z* 229, 211 and 183 in MS^2, MS^3 and MS^4, respectively. They were tentatively identified in comparison to literature data as oxylipins, fatty acid oxidation products: oxo-dihydroxy-octadecenoic acid and trihydroxy-octadecenoic acid.[49]

Characteristic MS^1 and MS/MS fragmentation pattern data for different compound classes

The results of this study include extensive MS^1 and MS/MS fragmentation pattern data obtained using ESI in negative ionization mode for 29 standard substances and 85 *Globularia* metabolites, mostly belonging to the groups of iridoid and/or phenolic compounds (for example, flavonoids, phenolic acids and phenylethanoids). Negative ionization mode was used due to the observed greater selectivity and sensitivity for the analyzed compounds. Similar observations were described previously.[19,41,46]

For many iridoids and bisiridoids, the major ion present in MS^1 was a FAA $[M\text{-}H+46]^-$, as observed previously.[22,23,50] Although in accordance with the results from previous studies, this was not the case for compounds with the *C*-4-carboxyl group and the common *C*7–*C*8 double bond[22,50]; it should be noted that high abundance of both the molecular ion and its FAA seemed to be characteristic for iridoids having a *C*-4-carboxyl group and an unusual *C*8–*C*9 double bond (alpinoside derivatives). The formation of adducts may be influenced by various factors, including both the compound and the additive concentration, compound structure, instrument parameters and so forth.[22,47,50,51] Although the formation of highly abundant FAAs is certainly not limited solely to iridoids (of characteristic structure), as seen both in the present study (liriodendrin) and in previous studies,[52] it should be noted that the observation of these adducts facilitated the recognition of iridoid compounds in the present study. This phenomenon may or may not be observed in other studies, depending on the previously mentioned factors. However, it might be helpful to keep this possibility in mind when analyzing complex plant mixtures in which iridoid compounds are expected to be present. Iridoids formed also $[M+97]^-$ adducts of lower relative abundance followed by $[M+35/37]^-$ adducts. The former were tentatively identified as sulfuric acid (sulfate)/phosphoric acid (phosphate) adducts, as reported previously,[51,53] while the latter were identified as chloride adducts.[47] The source of these chemical entities could be the plant material itself,[54] the solvents used in the sample/standard solutions' preparation and/or in the separation of individual constituents (according to the anion traces/impurities listed in the solvent specifications), but could also be the result of residual contamination of the used system.[23] The latter is supported by the fact that several adducts of minor intensity, attributable to the polar components of the samples, were present in both the samples and reference standards, having in mind that the samples were analyzed prior to the standards. These

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Journal of MASS SPECTROMETRY

were tentatively identified as follows: +130 Da [M-H+ (quinic acid-CO_2-H_2O)]$^-$, +182 Da [M-H + mannitol]$^-$, +216 Da [M-H + mannitol-H + ^{35}Cl]$^-$ and +262 Da [M-H + mannitol-H + ^{35}Cl + HCOOH]$^-$ (data not shown).

Predominant MS/MS fragmentation pathways of iridoids included the following steps: loss of formic acid (when its attachment was observed in MS[1]), loss of the sugar moiety (abundant aglycon ion peak) and loss of water and/or CH_2O, for simple iridoid glucosides. Water loss was observed in MS[4] of both the iridoids containing a *C*-6-hydroxyl group (catalpol, scandoside, aucubin, monomelittoside, deacetylasperuloside and asperulosidic acid) and those without this group (geniposide and deacetylalpinoside) (Tables 1 and 2). Therefore, it was attributed to the *C*-1-hydroxyl group, as described previously.[25] Conversely, loss of CH_2O, observed in MS[4] of catalpol, scandoside and aucubin, could either be attributed to the *C*-6-hydroxyl group,[25] or to the *C*-1-hydroxyl group, because it was observed also in deacetylasperuloside. In (*epi*)loganic acid/gardoside that contains a hydroxyl group at *C*-7 position, the same cleavage was observed in combination with C_2H_4O/CO_2 loss (−74 Da). Exceptionally, iridoids hydroxylated at *C*-5 position (monomelittoside derivatives) were characterized by an abundant Glc ion peak. The loss of the sugar moiety was concurrent with or followed by the loss of CO_2 (+H_2O) for *C*-4-carboxylated iridoids. The loss of acetic or benzoic acid [combined with aGlc and CO_2 for lactones (Fig. 2)] was favored for iridoids esterified with either of these acids. In the case of lactones (asperuloside and besperuloside), further loss of CO attributable to the *C*-1 position seemed to be favored, followed by a minor loss of 44 Da. The peak formed by the latter loss could be attributed to the $^{1,4}X^-$ product ion (−C_2H_4O).[25,50] The same cleavage was also observed in MS[3] of geniposide (−102 Da) (Table 1)/MS[4] of other iridoids (scandoside, aucubin, monomelittoside, deacetylalpinoside and (*epi*)loganic acid) (Table 2). 10-*O*-cinnamoylated iridoid glucosides and those acylated at the *C*-6 position were characterized by loss of cinnamic acid or loss of their iridoid part, followed by dehydration of the iridoid glucoside/decarboxylation of the remaining phenolic acid. Cleavage of the ester bond between two iridoids was favored for bisiridoids.

Characteristic MS/MS fragmentation of acylated phenylethanoids included the following steps: loss of the acyl group (aCA, aPCA and aFA), loss of aRha and loss of Glc for phenylethanoids containing two sugars (Glc and Rha) or loss of the acyl group followed by a sequential loss of anhydrated sugars for compounds containing three or four sugars, leading to the formation of hydroxytyrosol glucoside, which further lost either the glucose (preferably) or the hydroxytyrosol moiety (Fig. 4). In the case of four-sugared phenylethanoids having one sugar attached to the rhamnose (outer sugar) and one sugar attached to the central glucose (trichosanthoside B), the loss of the outer sugar seemed to be favorable. This was observed through characteristic minor fragments attributable to the loss of the (anhydro)rhamnosylxylose moiety (*m/z* 429 and 447) (Fig. 3). The three-sugar phenylethanoids having an additional acyl goup attached to the outer sugars, such as globusintenoside, were characterized by the sequential loss of two acyl groups (first the outer acyl group and then the one attached to the central Glc), followed by loss of the outer Glc. A minor fragment present at *m/z* 443 (relative abundance of about 10), which was obtained by cleavage of the whole sugar, indicated that the additional sugar(s) was/were not attached to the central Glc, but rather to the rhamnosyl moiety. The phenylethanoid possessing an additional caffeoyl group attached to the central Glc could be differentiated from those with additional glucosidic moieties based on the major backward shift in retention time (more than 10 min). Similarly, a major forward shift in retention time (about 15 min) could be observed for a deacylated compound (comparison of decaffeoylverbascoside and verbascoside).

Typical MS/MS fragmentation pattern of flavonoids included the loss of the acyl moiety (aCA, aPCA and BA), if present, followed by loss of the *O*-bound glycosidic moiety (loss of 324/308 Da for dihexosides) and water (Fig. 5). Loss of 162 Da (or 176 Da) for *O*-monoglycosylated flavonoids that lead to formation of aglycone product ions was followed by the loss of CO_2 for flavones. In the case of flavonol and 6-hydroxylated flavone glycosides (Fig. 5), formation of a regular aglycone product ion was accompanied by the formation of a radical aglycone product ion of minor relative abundance. Formation of such radical aglycones from *O*-glycosilated flavonoids has been previously described and is explained by homolytic cleavage.[41] Loss of water (and CO) was observed to be characteristic for 6-hydroxylated flavones (Fig. 5) and loss of CH_3 for methylated flavones. Dimethylated flavone dihexosides were first characterized by loss of 338 Da (324 + 14 Da), followed by loss of an additional methyl group (−15 Da). Characteristic MS/MS fragmentation indicating cross-ring cleavages of the saccharidic residues enabled also tentative identification of a *C*-6-*C*-8-gylcosylated flavone.[41] Flavonol and flavanone aglycones were characterized by abundant $^{1,2}A^-$ and/or $^{1,3}A^-$ ions, which is consistent with earlier studies.[46] Conversely, $^{1,3}A^-$ ions (*m/z* 151) were observed only with small relative abundance for flavone aglycones apigenin and luteolin (Table 1) and not for 6-hydroxyluteolin (Table 2). The fragmentation of these flavones was characterized by a combination of specific order of neutral losses of H_2O (−18 Da), CO (−28 Da), CO_2 (−44 Da) and H_2CCO (−42 Da), as described previously.[41] After comparing the fragmentation pathways of various flavonoid standards, these losses could be attributed to specific parts of the flavone structure. Places of cleavages are demonstrated in Fig. 5 on the example of 6-hydroxyluteolin 7-*O*-(6‴-*O*-caffeoyl)-sophoroside. The predominant loss of water from the deprotonated aglycone (*m/z* 301) observed in MS[4] (*m/z* 283) was attributed to the hydroxyl group attached at *C*-6 position (ring A), as this was the characteristic feature that distinguished the structure of 6-hydroxyluteolin from both apigenin and luteolin. The proposed loss of additional water from the deprotonated aglycone in combination with two CO and CO_2 (*m/z* 165) or three CO and CO_2 (*m/z* 137) was supported by the fourth-order mass spectrum of 6-hydroxyluteolin 7-*O*-glucoside (Table 2). The main fragment in the indicated spectrum obtained from the dehydrated ion fragment at *m/z* 283 was a result of CO loss (*m/z* 255), while the minor fragments could be attributed to the simultaneous loss of CO and H_2O (−46 Da) and two CO (−56 Da). In the third-order mass spectrum of luteolin 7-*O*-glucoside, a minor dehydrated ion fragment was obtained (*m/z* 267) from the aglycone ion (*m/z* 285) (Table 2). Having in mind such fragmentation was not observed for apigenin, the additional water loss was attributed to the *C*-3′-hydroxyl group (ring B). Subsequently, the losses of three CO were attributed to the remaining hydroxylated *C*-atoms (*C*-7, *C*-5 and *C*-4′). Loss of 44 Da was attributed to the cleavage of ring C (–CO_2), because it was observed also in MS[3] of flavonols quercetin and kaempferol and of the flavanone eriodictyol (Table 1). This CO_2 loss was observed individually (*m/z* 257) and in combinations with H_2O (*m/z* 239), CO (*m/z* 229), H_2O and CO (*m/z* 211), two CO (*m/z* 201), two H_2O and two CO (*m/z* 165), two H_2O and three CO (*m/z* 137). Considering these combinations, the CO loss was not considered to be released from ring C, as described previously.[46] Finally, the minor fragment present at *m/z* 192 could be attributed to the cleavage of the B-ring

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

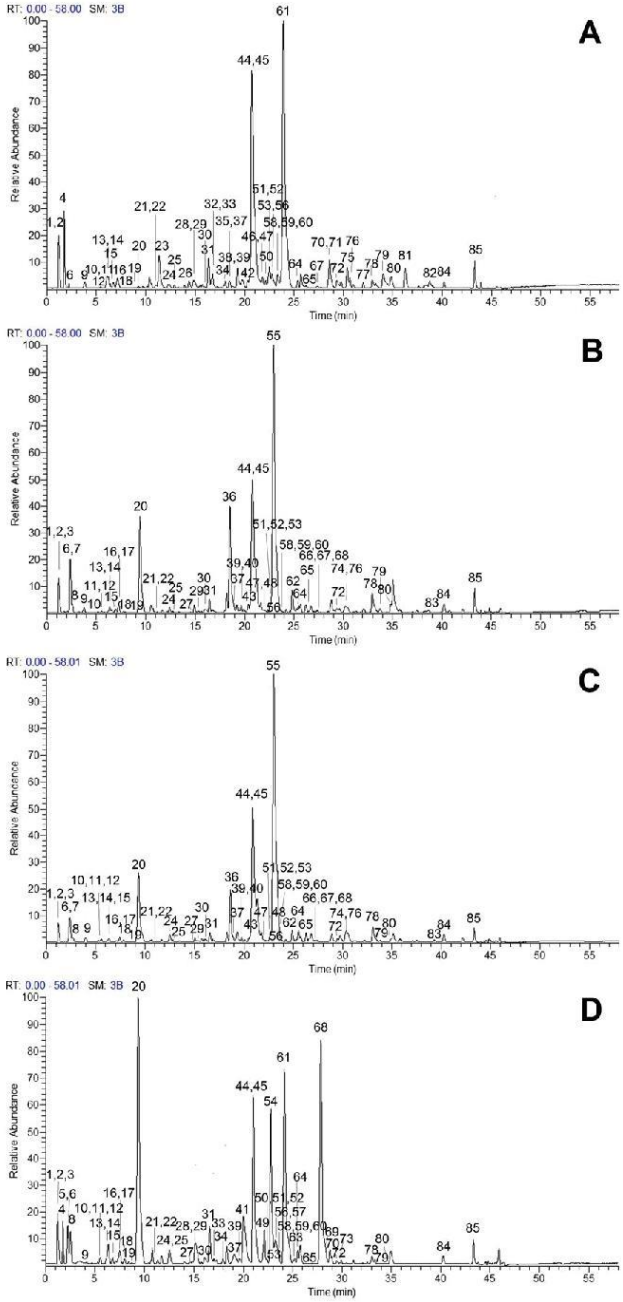


Figure 6. High-performance liquid chromatography-MS base peak chromatograms of methanolic extracts for (A) *G. alypum*, (B) *G. cordifolia*, (C) *G. meridionalis* and (D) *G. punctata*. Numbers on chromatograms refer to compounds listed in Tables 2 and 3.

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Journal of MASS SPECTROMETRY

(−109 Da), which was also observed in the second-order mass spectrum of luteolin (−110 Da) (Table 1).

Phytopharmaceutical and chemotaxonomic implications

Results of this study show that investigated *Globularia* species contain a great number of secondary metabolites, which mostly consist of iridoid glycosides, phenylethanoids and flavone glycosides. Bioactive properties were reported previously for several major compounds, making these plants potentially interesting for exploitation from a phytopharmaceutical perspective. For example, globularin, observed in high amounts in *G. alypum* and *G. punctata* (Fig. 6), showed hypoglycemic and hypolipidemic activity *in vivo*,[55] while for globularifolin, abundantly present in *G. cordifolia* and *G. meridionalis*, *in vitro* immunomodulatory activity was observed.[56] High amounts of an additional iridoid named asperuloside were present in *G. punctata*, *G. cordifolia* and *G. meridionalis*. Asperuloside was recently shown to possess anti-cancer activity against YMB-1 (human breast carcinoma) and HL60 (human promyelocytic leukemia) cell lines.[57] This compound was also suggested as a new endoplasmic reticulum (ER) stress regulator, potentially beneficial for various diseases related to ER stress, including diabetes and hepatic diseases.[58] Finally, high amounts of verbascoside, a phenylethanoid with various reported biological activities,[8,9] were observed in all four species. *G. punctata* was additionally characterized by high amounts of trichosanthoside A, a verbascoside derivative with an additional Xyl unit at *C*-4 position of Rha (Fig. 4), and besperuloside, a compound structurally similar to asperuloside (Fig. 1). *G. punctata* (Syn. *G. elongata*) is one of the most widespread members of the genus *Globularia*.[3] However, its chemical composition[45] has not been as well investigated as that of *G. alypum*,[4,14,24,30] which is used in the treatment of a number of ailments throughout the Mediterranean region.[12,13] The fact that *G. punctata* seems to contain comparable amounts of globularin and verbascoside, the major constituents of *G. alypum* extracts[4] makes it potentially interesting for further research and possible exploitation, especially when having in mind the promising bioactivities of these compounds.[8,9,55] However, one should bear in mind that this species possesses its own characteristic compounds, such as those observed as major peaks in the obtained HPLC-MS base peak chromatogram (Fig. 6), whose therapeutic and toxic effects remain to be tested. The authors believe that this paper will encourage future studies on investigated *Globularia* species, especially on the widespread *G. punctata*. Therefore, in order to facilitate its phytochemical characterization in future studies, MS/MS spectra of *G. punctata* characteristic compounds that, to our knowledge, are yet undescribed, have been given in Figs 2–5.

In addition to previously mentioned major compounds, characteristic minor compounds were observed for *G. alypum*, *G. punctata* and *G. cordifolia*/*G. meridionalis*. Many of these compounds can also be found in species of related genera of the Plantaginaceae, such as *Plantago*[59] and *Veronica*.[25] Although catalpol and its 10-*O*-cinnamoyl ester globularin, as well as different globularin derivatives, were present in both *G. alypum* and *G. punctata*, 6-*O*-esters of catalpol (verminoside, specioside and minecoside) seemed to be characteristic for *G. alypum*. Lytanthosaline, a 10-*O*-benzoylated aucubin derivative, and characteristic desrhamnosyl and acylated derivatives of verbascoside/isoverbascoside (calceolariosides A and B, 6′-*O*-caffeoylverbascoside and galypumoside B) were only found in *G. alypum*. This study also revealed presence of bisiridoid compounds in this species for the first time. *G. punctata* showed a distinct phenylethanoid and flavonoid pattern. It was characterized by xylosylated derivatives of verbascoside (trichosanthosides A and B and arenarioside) and acylated derivatives of 6-hydroxyluteolin 7-*O*-diglucoside. While 6-hydroxyluteolin 7-*O*-diglucoside was only found in *G. alypum* and *G. punctata*, all investigated species contained 7-*O*-glucosides of 6-hydroxyluteolin and of luteolin. Characteristic iridoids observed for *G. punctata* were besperuloside and scandoside. This species also possessed some mutual iridoids with *G. cordifolia* and *G. meridionalis*, namely, deacetylasperuloside, mussaenosidic and (*epi*)loganic acid, asperuloside, asperulosidic acid and asperulosidic acid methyl ester (daphylloside). *G. cordifolia* and *G. meridionalis* showed comparable phytochemical profiles with mainly quantitative differences, providing no major compounds that could serve as chemotaxonomic markers for their differentiation from one another. Both were characterized by high amounts of monomelittoside and its benzoylated esters (6′-*O*-benzoylmonomelittoside and globularifolin). In addition to these, several other benzoylated iridoids were observed. Also, methoxylated flavonoids seemed to be more frequently present in these species than in *G. alypum* and *G. punctata*. Finally, the phenylethanoid plantainoside C was observed only in *G. cordifolia* and *G. meridionalis*.

All compounds characteristic for certain *Globularia* species or a group of *Globularia* species are indicated in different color in Table 3. In some cases, the colors used provide a faster detection of structurally similar compounds, such as in the case of compounds common to *G. punctata*, *G. cordifolia* and *G. meridionalis* (mostly asperuloside derivatives). Although the precise amount of the identified substances was not considered to be essential for the present study, surely not all of them are (equally) important for the chemotaxonomic evaluation of *Globularia* species. For example, asperuloside was found as a major compound characteristic for *G. cordifolia*, *G. meridionalis* and *G. punctata*, while only trace amounts of this compound were detected in *G. alypum*. Because of the indisputable difference in its quantity, the presence of asperuloside in *G. alypum* was not considered to be chemotaxonomically important (Table 3). On the other hand, the differences in the amounts of individual compounds observed for *G. cordifolia* and *G. meridionalis* were not as extreme, although variations that could be attributed to inter-species and/or intra-species/extraction differences were observed. It was not possible to identify specific chemotaxonomic markers (if there are any) for each of these two species based on the obtained results because preparation of multiple samples, which would enable proper quantification, was beyond the primary objectives of this study. However, multiple sample preparations followed by quantification would not have been sufficient to adequately distinct these two species from one another, having in mind that they were sampled from different locations. It is, therefore, likely that the amounts of synthesized compounds would be, at least partially, influenced by distinct environmental factors, and not necessarily a reflection of individual hereditary traits.

Similarities in chemical constituents of *G. cordifolia* and *G. meridionalis*, considering primarily iridoids and bisiridoids, were discussed previously.[11] The two species are closely related and belong to the section *Empetron*.[60,61] Moreover, these species shared a great number of compounds with *G. dumulosa*,[29] which was also included in the section *Empetron* in an older revision of the genus.[61] Similarly, *G. punctata* from the section *Globularia* was observed to possess the same compounds as those reported for other species from the same section: *G. vulgaris*,[7] *G. aphyllanthes*[5] and *G. trichosantha*.[26,37] Although, *G. punctata* is probably one of the most widespread species from the genus *Globularia*,[3] because of

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

the historical use of various synonyms for the name of this species (*G. elongata*, *G. willkommii* and *G. aphyllanthes*) and often misidentification with *G. vulgaris*,[61] its chemical composition is uncertain. When comparing the expected distribution of *G. vulgaris*[3,61] to the mentioned distribution of the Turkish species described under the name *G. aphyllanthes* (syn. *G. vulgaris*),[5] it is possible that the species investigated in the earlier study was actually *G. punctata*. Therefore, compounds observed in *G. punctata* were only indicated as new reports if they were not previously reported from either of these species. Even though *G. cordifolia* and *G. meridionalis* seem to be currently recognized as separate species,[11,34,62] it was suggested previously by different authors that they are in fact varieties of the same species.[3] In accordance to this assumption, differences in their chemical composition do not necessarily have to be found. For instance, a study performed on species from the genus *Plantago* considering iridoid glycosides showed they had no systematic value at infraspecific level.[59] As for comparison of observed mutual compounds between *G. alypum*, *G. punctata* and *G. cordifolia*/*G. meridionalis*, the results show greater similarity of species from the section *Empetron* to *G. punctata* (section *Globularia* (*Aphyllanthes*), subgenus *Globularia* (*Jasionopsis*)) than to *G. alypum* (section *Alypum*, subgenus *Abolaria*).[3,60,61] Although according to earlier classification, *Empetron* and *Alypum* belong to the same subgenus,[60,61] our observations support the remarks from Holländer and Jäger who noted that the proposed division in two subgenera was not a natural division for the genus *Globularia*.[3]

This study shows that tandem mass spectrometry can provide more than just an overview of compounds of possible biological interest. Mass spectrometry enables simultaneous detection of hundreds of compounds within single extracts and allows fast recognition of those that are chemotaxonomically important.

Conclusions

Liquid chromatography coupled with ESI-MS^n proved to be a useful technique for fast phytochemical profiling of *Globularia* spp. Besides targeted detection of plant metabolites using standard compounds for unequivocal identification, this study provides yet undescribed MS/MS fragmentation patterns obtained in negative mode, which were connected to structures of previously isolated compounds. The study demonstrates a possible approach for compound identification through the use of literature data on known isolated plant metabolites when neither standard compounds nor exact MS (and MS/MS) data are available. Having in mind that many compounds that were observed in this study are frequently present in related plant genera and families, the authors believe that the proposed method together with obtained data will be helpful for other researchers interested in plant metabolomics. Although conducted on a small number of species from the same genus, some phylogenetic relations of *Globularia* can be hypothesized, based on the observed similarities between different species. However, to provide more certain conclusions on *Globularia* chemosystematics and phylogeny, more species and/or more populations of each studied species should be included in the future.

Acknowledgements

Maja Friščić (maiden name: Crkvenčić) was awarded an Ernst-Mach-Stipendien granted by the OeAD – Austrian Agency for International Cooperation in Education & Research, financed by the Austrian Federal Ministry of Science and Research (BMWF) for the research project 'Investigations of chemical composition and biological activities of *Globularia* species'.

The authors would like to thank Dr Rade Garić for his help in collecting plant material from Konavle cliffs.

References

[1] G. Fu, H. Pang, Y. H. Wong. Naturally occuring phenylethanoid glycosides: potential leads for new therapeutics. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 2592.
[2] R. Tundis, M. R. Loizzo, F. Menichini, G. A. Statti, F. Menichini. Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments. *Mini Rev. Med. Chem.* **2008**, *8*, 399.
[3] K. Holländer, E. J. Jäger. Morphologie, Biologie und ökogeographische Differenzierung von *Globularia*: 1. Progressionen in der Wuchsform, Infloreszenz, Blattnervatur und Verbreitung. *Flora* **1994**, *189*, 223.
[4] H. Kirmizibekmez, C. Bassarello, S. Piacente, İ. Çaliş. Phenylethyl glycosides from *Globularia alypum* growing in Turkey. *Helv. Chim. Acta* **2008**, *91*, 1525.
[5] H. Kirmizibekmez, C. Bassarello, S. Piacente, G. Akaydin, İ. Çaliş. Flavonoid, phenylethanoid and iridoid glycosides from *Globularia aphyllanthes*. *Z. Naturforsch.* **2009**, *64b*, 252.
[6] H. Kirmizibekmez, İ. Çaliş, S. Piacente, C. Pizza. Iridoid and phenylethyl glycosides from *Globularia sintenisii*. *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 1172.
[7] R. M. Taskova, C. H. Gotfredsen, S. R. Jensen. Chemotaxonomy of Veroniceae and its allies in the Plantaginaceae. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 286.
[8] K. Alipieva, L. Korkina, I. E. Orhan, M. I. Georgiev. Verbascoside – a review of its occurence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnol. Adv.* **2014**, *32*, 1065.
[9] H. Sipahi, J. M. Gostner, K. Becker, M. Charehsaz, H. Kirmizibekmez, H. Schennach, A. Aydin, D. Fuchs. Bioactivites of two common polyphenolic compounds: Verbascoside and catechin. *Pharm. Biol.* **2016**, *54*, 712.
[10] H. Kirmizibekmez, İ. Çaliş, P. Akbay, O. Sticher. Iridoid and bisiridoid glycosides from *Globularia cordifolia*. *Z. Naturforsch* **2003**, *58c*, 337.
[11] R. Tundis, L. Peruzzi, C. Colica, F. Menichini. Iridoid and bisiridoid glycosides from *Globularia meridionalis* (Podp.) O. Schwarz aerial and underground parts. *Biochem. Syst. Ecol.* **2012**, *40*, 71.
[12] M. L. Leporatti, K. Ghedira. Comparative analysis of medicinal plants used in traditional medicine in Italy and Tunisia. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **2009**, *5*, 31.
[13] A. Boudjelal, C. Henchiri, M. Sari, D. Sarri, N. Hendel, A. Benkhaled, G. Ruberto. Herbalists and wild medicinal plants in M' Sila (North Algeria): an ethnopharmacology survey. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *148*, 395.
[14] N. Amessis-Ouchemoukh, I. M. Abu-Reidah, R. Quirantes-Piné, C. Rodríguez-Pérez, K. Madani, A. Fernández-Gutiérrez, A. Segura-Carretero. Tentative characterisation of iridoids, phenylethanoid glycosides and flavonoid derivatives from *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) leaves by LC-ESI-QTOF-MS. *Phytochem. Anal.* **2014**, *25*, 389.
[15] Y. Sawada, R. Nakabayashi, Y. Yamada, M. Suzuki, M. Sato, A. Sakata, K. Akiyama, T. Sakurai, F. Matsuda, T. Aoki, M. Y. Hirai, K. Saito. RIKEN tandem mass spectral database (ReSpect) for phytochemicals: a plant specific MS/MS-based data resource and database. *Phytochemistry* **2012**, *82*, 38.
[16] T. F. Jorge, J. A. Rodrigues, C. Caldana, R. Schmidt, J. T. van Dongen, J. Thomas-Oates, C. António. Mass spectrometry-based plant metabolomics: metabolite responses to abiotic stress. *Mass Spectrom. Rev.* **2016**, *35*, 620.
[17] N.-E. Es-Safi, L. Kerhoas, P.-H. Ducrot. Application of positive and negative electrospray ionization, collision-induced dissociation and tandem mass spectrometry to a study of the fragmentation of 6-hydroxyluteolin 7-*O*-glucoside and 7-*O*-glucosyl-(1 → 3)-glucoside. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 2734.
[18] N.-E. Es-Safi, L. Kerhoas, J. Einhorn, P.-H. Ducrot. Application of ESI/MS, CID/MS and tandem MS/MS to the fragmentation study of eriodictyol 7-*O*-glucosyl-(1 → 2)-glucoside and luteolin 7-*O*-glucosyl-(1 → 2)-glucoside. *Int. J. Mass Spectrom.* **2005**, *247*, 93.
[19] N.-E. Es-Safi, L. Kerhoas, P.-H. Ducrot. Fragmentation study of iridoid glucosides through positive and negative electrospray ionization,

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

collision-induced dissociation and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 1165.
[20] N.-E. Es-Safi, L. Kerhoas, P.-H. Ducrot. Fragmentation study of globularin through positive and negative ESI/MS, CID/MS and tandem MS/MS. *Spectrosc. Lett.* **2007**, *40*, 695.
[21] T. Zhou, H. Liu, J. Wen, G. Fan, Y. Chai, Y. Wu. Fragmentation study of iridoid glycosides including epimers by liquid chromatography-diode array detection/electrospray ionization mass spectrometry and its application in metabolic fingerprint analysis of *Gardenia jasminoides* Ellis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 2520.
[22] C.-M. Li, X.-L. Zhang, X.-Y. Xue, F.-F. Zhang, Q. Xu, X.-M. Liang. Structural characterization of iridoid glucosides by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 1941.
[23] M. Sertić, M. Crkvenčić, A. Mornar, K. Hazler Pilepić, B. Nigović, Ž. Maleš. Analysis of aucubin and catalpol content in different plant parts of four *Globularia* species. *J. Appl. Bot. Food Qual.* **2015**, *88*, 209.
[24] R. K. Chaudhuri, O. Sticher. New iridoid glucosides and a lignan diglucoside from *Globularia alypum* L. *Helv. Chim. Acta* **1981**, *64*, 3.
[25] J.-L. Hong, X.-Y. Qin, P. Shu, G. Wu, Q. Wang, M.-J. Qin. Analysis of catalpol derivatives by characteristic neutral losses using liquid chromatography combined with electrospray ionization multistage and time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 2680.
[26] İ. Çaliş, H. Kirmizibekmez, O. Sticher. Iridoid glycosides from *Globularia trichosantha*. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 60.
[27] G. Verardo, I. Duse, A. Callea. Analysis of underivatized oligosaccharides by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spetrometry with post-column addition of formic acid. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 1607.
[28] R. K. Chaudhuri, O. Sticher. Globularifolin, a new acyl iridoid glucoside from *Globularia cordifolia*. *Helv. Chim. Acta* **1980**, *63*, 117.
[29] H. Kirmizibekmez, P. Akbay, O. Sticher, İ. Çaliş. Iridoids from *Globularia dumulosa*. *Z. Naturforsch.* **2003**, *58c*, 181.
[30] N.-E. Es-Safi, S. Khlifi, A. Kollmann, L. Kerhoas, A. El Abbouyi, P.-H. Ducrot. Iridoid glucosides from the aerial parts of *Globularia alypum* L. (Globulariaceae). *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54*, 85.
[31] N.-E. Es-Safi, A. Kollmann, S. Khlifi, P.-H. Ducrot. Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L. structure-activity relationship. *LWT-Food Sci. Technol* **2007**, *40*, 1246.
[32] İ. Çaliş, H. Kirmizibekmez, D. Taşdemir, C. M. Ireland. Iridoid glycosides from *Globularia davisiana*. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 678.
[33] H. Kirmizibekmez, İ. Çaliş, S. Piacente, C. Pizza. Phenolic compounds from *Globularia cordifolia*. *Turk. J. Chem.* **2004**, *28*, 455.
[34] R. Tundis, M. Bonesi, F. Menichini, M. R. Loizzo, F. Conforti, G. Statti, F. M. Pirisi, F. Menichini. Antioxidant and anti-cholinesterase activity of *Globularia meridionalis* extracts and isolated constituents. *Nat. Prod. Commun.* **2012**, *7*, 1015.
[35] N.-E. Es-Safi, S. Khlifi, L. Kerhoas, A. Kollmann, A. El Abbouyi, P.-H. Ducrot. Antioxidant constituents of the aerial parts of *Globularia alypum* growing in Morocco. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1293.
[36] M. Innocenti, G. la Marca, S. Malvagia, C. Giaccherini, F. F. Vincieri, N. Mulinacci. Electrospray ionisation tandem mass spectrometric investigation of phenylpropanoids and secoiridoids from solid olive residue. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 2013.
[37] İ. Çaliş, H. Kirmizibekmez, H. Rüegger, O. Sticher. Phenylethanoid glycosides from *Globularia trichosantha*. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1165.
[38] P. Brúder, F. Macášek, E. Búriová. Electrospray ionization mass spectra of pentoses, hexoses, and 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *Chem. Pap.* **2008**, *62*, 547.
[39] B. Ben Hassine, A. M. Bui, Z. Mighri, A. Cave. Flavonoïdes et anthocyanes de *Globularia alypum* L. *Plant Med. Phytother.* **1982**, *16*, 197.
[40] A. Boutiti, A. Benguerba, R. Kitouni, M. Bouhroum, S. Benayache, F. Benayache. Secondary metabolites from *Globularia alypum*. *Chem. Nat. Compd.* **2008**, *44*, 543.
[41] F. Cuyckens, M. Claeys. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 1.
[42] V. Spínola, J. Pinto, P. C. Castilho. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD-ESI-MS^n and screening for their antioxidant activity. *Food Chem.* **2015**, *173*, 14.
[43] L.-Z. Lin, S. Mukhopadhyay, R. J. Robbins, J. M. Harnly. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *J. Food Compost. Anal.* **2007**, *20*, 361.
[44] J. B. Harborne, C. A. Williams. 6-Hydroxyluteolin and scutellarein as phyletic markers in higher plants. *Phytochemistry* **1971**, *10*, 367.
[45] B. Klimek. Acylated 6-hydroxyluteolin diglucosides from *Globularia elongata*. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 255.
[46] N. Fabre, I. Rustan, E. de Hoffmann, J. Quetin-Leclercq. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, *12*, 707.
[47] J. Zhu, R. B. Cole. Ranking of gas-phase acidities and chloride affinities of monosaccharides and linkage specificity in collision-induced decompositions of negative ion electrospray-generated chloride adducts of oligosaccharides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, *12*, 1193.
[48] İ. Çaliş, H. Kirmizibekmez, D. Tasdemir, O. Sticher, C. M. Ireland. Sugar esters from *Globularia orientalis*. *Z. Naturforsch* **2002**, *57c*, 591.
[49] E. J. Llorent-Martínez, V. Spinola, S. Gouveia, P. C. Castilho. HPLC-ESI-MS^n characterization of phenolic compounds, terpenoid saponins, and other minor compounds in *Bituminaria bituminosa*. *Ind. Crop Prod.* **2015**, *69*, 80.
[50] L. Ren, X. Xue, F. Zhang, Y. Wang, Y. Liu, C. Li, X. Liang. Studies of iridoid glycosides using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 3039.
[51] S. K. Chowdhury, V. Katta, R. C. Beavis, B. T. Chait. Origin and removal of adducts (molecular mass = 98 u) attached to peptide and protein ions in electrospray ionization mass spectra. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1990**, *1*, 382.
[52] S. Moco, R. J. Bino, O. Vorst, H. A. Verhoeven, J. de Groot, T. A. van Beek, J. Vervoort, C. H. Ric de Vos. A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. *Plant Physiol.* **2006**, *141*, 1205.
[53] D. J. Harvey. Fragmentation of negative ions from carbohydrates: Part 1. Use of nitrate and other anionic adducts for the production of negative ion electrospray spectra from *N*-linked carbohydrates. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 622.
[54] H. Rouached. Multilevel coordination of phosphate and sulfate homeostasis in plants. *Plant Signal. Behav.* **2011**, *6*, 952.
[55] S. Merghache, M. Zerriouh, D. Merghache, B. Tabti, R. Djaziri, S. Ghalem. Evaluation of hypoglycaemic and hypolipidemic activities of globularin isolated from *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2013**, *3*, 1.
[56] H. Sipahi, K. Becker, J. M. Gostner, M. Charehsaz, H. Kirmizibekmez, H. Schennach, A. Aydin, D. Fuchs. Effects of globularifolin on cell survival, nuclear factor-κB activity, neopterin production, tryptophan breakdown and free radicals *in vitro*. *Fitoterapia* **2014**, *92*, 85.
[57] N. Artanti, M. Hanafi, R. Andriyani, V. Saraswati, Z. Udin, P. D. Lotulung, K. I. Fujita, Y. Usuki. Isolation of an anti-cancer asperuloside from *Hedyotis corymbosa* L. *J. Trop. Life Sci.* **2015**, *5*, 88.
[58] V. H. Giang, N. K. Ban, T. M. Linh, L. Q. Lien, N. X. Nhiem, D. T. Dung, B. H. Tai, H. L. T. Anh, P. H. Yen, C. V. Minh, P. V. Kiem. Iridoid glycosides from *Morinda tomentosa* and their endoplasmic reticulum stress modulation activity. *Vietnam J. Chem.* **2015**, *53*, 112.
[59] R. Taskova, L. Evstatieva, N. Handjieva, S. Popov. Iridoid patterns of genus *Plantago* L. and their systematic significance. *Z. Naturforsch.* **2002**, *57c*, 42.
[60] O. Schwarz. Chromosomenzahlen, Lebensformen und Evolution der Gattung *Globularia* L. *Drudea* **1963**, *3*, 5.
[61] O. Schwarz. Die Gattung *Globularia*. *Bot. Jahrb. Syst. Pflanzengesch. Pflanzengeogr.* **1938**, *69*, 318.
[62] The Plant List (**2013**). Version 1.1. Published on the Internet; http://www.theplantlist.org/ (accessed 4th May 2016).

 Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

ACTA BOTANICA CROATICA

CODEN: ABCRA 25
ISSN 0365-0588
eISSN 1847-8476

ACCEPTED AUTHOR VERSION OF THE MANUSCRIPT

Comparative analysis of specialized metabolites and antioxidant capacity *in vitro* of different natural populations of *Globularia* spp.

DOI: 10.1515/botcro-2017-0017

MAJA FRIŠČIĆ[1], SEMIR MASLO[2], RADE GARIĆ[3], ŽELJAN MALEŠ[1], KROATA HAZLER PILEPIĆ[1]

[1] Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia
[2] Lundåkerskolan, Gislaved, Sweden
[3] Institute for Marine and Coastal Research, University of Dubrovnik, Dubrovnik, Croatia

Please cite this article as: FRIŠČIĆ M., MASLO S., GARIĆ R., MALEŠ Ž., HAZLER PILEPIĆ K.: Comparative analysis of specialized metabolites and antioxidant capacity in vitro of different natural populations of *Globularia* spp. Acta Bot Croat, DOI: 10.1515/botcro-2017-0017.

This is a PDF file of a manuscript that has been accepted for publication and language edited. The manuscript will undergo technical editing, formatting and author proofing before it is published in its final form.

Unauthenticated
Download Date | 9/25/17 11:10 AM

Comparative analysis of specialized metabolites and antioxidant capacity *in vitro* of different natural populations of *Globularia* spp.

Maja Friščić[1], Semir Maslo[2], Rade Garić[3], Željan Maleš[1], Kroata Hazler Pilepić[1]

[1] Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia
[2] Lundåkerskolan, Gislaved, Sweden
[3] Institute for Marine and Coastal Research, University of Dubrovnik, Dubrovnik, Croatia

Running title: Specialized metabolites of *Globularia* spp.

Abstract - Total phenolic, flavonoid, condensed tannin and iridoid content, as well as antioxidant capacity *in vitro,* were determined spectrophotometrically in methanolic extracts of different plant parts of the Mediterranean medicinal plant *Globularia alypum* L. and three widespread European species of the same genus: *G. cordifolia* L., *G. meridionalis* (Podp.) O. Schwarz and *G. punctata* Lapeyr. In order to consider possible environmental influences on the production of specialized metabolites, each species, except *G. alypum*, was collected from three different natural populations. Great variations in the amounts of specialized metabolites were observed among different plant parts and species. For example, total phenolic content ranged from 10.13 (*G. punctata*, flowers) to 44.90 (*G. cordifolia*, flower stems) mg gallic acid equivalent g^{-1} dry weight. Moreover, great differences, attributed to location-specific environmental factors, were observed among different populations of the same species. For example, a strong positive correlation was observed among mean monthly temperatures and total phenolic contents in the leaves of studied *Globularia* spp. ($r = 0.75$, $p = 0.019$). However, despite these differences, all species were rich in bioactive substances when compared to *G. alypum*, especially in their aerial parts. A very good positive correlation was observed between total phenolic content and DPPH radical scavenging capacity ($r = 0.86$, $p < 0.001$)/ABTS radical scavenging capacity ($r = 0.83$, $p < 0.001$). The results obtained show that *G. cordifolia*, *G. meridionalis* and *G. punctata* are rich in bioactive substances, providing support for their pharmaceutical utilization. Further investigations are needed to verify the possibility of their medicinal use.

Keywords: antioxidant activity, environmental factors, flavonoids, *Globularia,* iridoids, polyphenols, proanthocyanidins, secondary metabolites

Introduction

Plants have been used as healing agents since ancient times; many bioactive compounds isolated from herbal sources have been used as drugs or served as lead compounds in drug development. In Europe, herbal medicines in the crude forms of teas and decoctions are often used as supportive therapy, while standardized herbal preparations are a popular alternative to synthetic drugs. Finally, about 80% of the world population (primarily in developing countries) still uses herbal medicine in the treatment of different diseases and in maintaining health (Gurib-Fakim 2006).

The Old World genus *Globularia* L., recently included in the Plantaginaceae family (Albach et al. 2005), consists of perennials, subshrubs and small shrubs. Some members of the genus, mainly *Globularia alypum* L., *G. arabica* Jaub. & Spach and *G. trichosantha* Fisch. & C.A. Mey., are used in the traditional medicine of countries such as Spain, Italy, Morocco, Algeria, Tunisia, Libya, Egypt and Turkey (Leporatti and Ghedira 2009, Altundag

Unauthenticated
Download Date | 9/25/17 11:10 AM

and Ozturk 2011, Carrió and Vallès 2012, De Natale and Pollio 2012, Bouzabata 2013, Eissa et al. 2014, El Abbouyi et al. 2014). They are traditionally used as hypoglycaemic agents, purgatives, depuratives (De Natale and Pollio 2012, Bouzabata 2013), antiparasitic and antifungic agents (Altundag and Ozturk 2011, De Natale and Pollio 2012), tonics and diuretics, for wound healing and in the treatment of insomnia, fits of epilepsy, gastrointestinal disorders, intermittent fever (Leporatti and Ghedira 2009, De Natale and Pollio 2012, Eissa et al. 2014), arthritis and rheumatism (De Natale and Pollio 2012).

Phenolic compounds and iridoids are the main specialized (secondary) metabolites of *Globularia* species (Kirmizibekmez et al. 2008, Kirmizibekmez et al. 2009, Tundis et al. 2012b). *G. alypum*, the most widely used member of the genus *Globularia*, was shown to be especially rich in phenolic compounds in comparison with some other medicinal plants (Djeridane et al. 2006, Djeridane et al. 2010, Amessis-Ouchemoukh et al. 2014, El Guiche et al. 2015). Phenolic compounds possess a wide range of biological activities and thus may contribute to the healing properties of *Globularia* preparations. Radical scavenging activity, also attributed to plant phenolics, is one of the possible protective mechanisms against cancer, cardiovascular diseases, diabetes, osteoporosis and neurodegenerative diseases (Rice-Evans et al. 1997). It was noted that *G. alypum* extracts possess high antioxidant capacity both *in vitro* (Djeridane et al. 2010, Amessis-Ouchemoukh et al. 2014) and *in vivo* (Taleb-Dida et al. 2011). Antioxidant activity was also recently reported in *G. meridionalis* (Tundis et al. 2012a).

The aim of the present study was to analyse and compare the total phenolic content, including flavonoid and condensed tannin content, iridoid content and antioxidant capacity in four members of the genus *Globularia* L. Three of these, namely *G. cordifolia* L., *G. meridionalis* (Podp.) O. Schwarz and *G. punctata* Lapeyr., are less-investigated, although they have a relatively wide distribution in Europe (Tutin 1972). In order to examine their therapeutic potential with regard to the content of bioactive substances, their results were compared to those of the well-investigated medicinal plant *G. alypum* L., which is distributed mainly in the Mediterranean area. Since synthesis and distribution of specialized metabolites is complex and differs between tissues and organs (Boudet 2007), the study was focused on different plant parts. The analysis was done on material collected from three different locations in order to consider possible ecological influences on the production of the specialized metabolites investigated. Exceptionally, *G. alypum* was collected from the only location at which it grows wild in Croatia and was sampled without underground parts because of its near threatened status. Obtained phytochemical data were correlated with environmental factors of different habitats, enabling the interpretation of obtained results from both medicinal and ecological perspectives.

Materials and methods

Plant material and extraction

A total of ten samples of four *Globularia* taxa were collected during the phenophase of blooming from seven locations in Croatia and one in Bosnia and Herzegovina (Tab. 1). Voucher specimens are deposited in the Herbarium of the Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Croatia. The identity of plant material was verified by Prof. Kroata Hazler Pilepić. Meteorological data were obtained from the nearest meteorological stations (Meteorological and Hydrological Service of Croatia and the Federal Hydrometeorological Institute of Bosnia and Herzegovina) (Tab. 2).

Dried and powdered plant parts (2.5 g) were subjected to ultrasound-assisted extraction (Bandelin Sonorex Super, Germany) at room temperature for 30 min with 25 mL of methanol. The residue after filtration was extracted again for 30 min with 25 mL of methanol, filtered

Unauthenticated
Download Date | 9/25/17 11:10 AM

and the final volume was adjusted to 50 mL. Four classes of metabolites were measured spectrophotometrically using a Varian Cary 50 Bio UV-Vis spectrophotometer (USA).

Determination of plant-specialized metabolites

The total phenolic content was determined using Folin-Ciocalteu's reagent according to the method of Singleton and Rossi (1965). The reaction mixture was prepared by mixing 0.5 mL of methanolic extract with 2.5 mL of 10% (v/v) Folin-Ciocalteu's reagent (diluted in distilled water). After 5 min, 2 mL of 7.5 g/100 mL sodium carbonate decahydrate solution were added and the mixture was incubated for 1 h at room temperature. After incubation, the absorbance was read at 765 nm against a distilled water blank. Gallic acid was used for the construction of the calibration curve. The total phenolic content was expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) g^{-1} dry weight (DW).

The flavonoid content was measured using the Dowd method (Arvouet-Grand et al. 1994). Briefly, 1 mL of appropriately diluted extract was mixed with 1 mL of 2 g/100 mL $AlCl_3$ solution in pure methanol. The absorbance was measured after 15 min at 415 nm against a sample blank which consisted of 1 mL of extract and 1 mL of methanol. A standard calibration curve was plotted using quercetin as a reference standard. The results were expressed as mg quercetin equivalent (QE) g^{-1} dry weight (DW).

The condensed tannin (proanthocyanidin) content was determined using the vanillin assay (Broadhurst and Jones 1978, Sun et al. 1998) as described previously by Toda (2005), but with a slightly modified reaction temperature. For the preparation of the sample 2 mL of 1 g/100 mL vanillin in 7 M sulfuric acid were added to a test tube containing 1 mL of diluted extract and the mixture was incubated for 15 min in a water bath with the temperature set at 30 ± 1 °C. The reaction was performed in normal laboratory daylight. After the incubation, the absorbance was recorded at 500 nm against a sample blank which consisted of 1 mL of extract and 2 mL of 7M sulfuric acid, which was incubated under the same conditions as the sample. (+)-catechin was chosen as a standard for the calibration curve. The levels of total condensed tannin content were expressed as mg catechin equivalent (CE) g^{-1} dry weight (DW).

The iridoid content was measured using the Trim-Hill reagent (Trim and Hill 1952) as adapted by Tundis et al. (2012a). To 200 µL of diluted extract 2 mL of Trim-Hill reagent (glacial acetic acid:0.2% copper (II) sulfate pentahydrate:concentrated hydrochloric acid at a ratio of 10:1:0.5, v:v:v) were added and the mixture was heated in a boiling water bath for 5 min. After that, absorbance of the prepared solution was read at 609 nm with methanol used as blank. The concentration of iridoids in the samples was calculated based on an aucubin calibration curve and the results were presented as mg aucubin equivalent (AE) g^{-1} dry weight (DW).

Evaluation of antioxidant capacity

Antioxidant capacity of the extracts was evaluated by the Blois method (1958) using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical solution according to the procedure of Thetsrimuang et al. (2011) with some modifications. A 0.1 mM stock solution of DPPH in methanol was prepared. The working solution was obtained by diluting the stock solution with methanol to obtain an absorbance of 0.7 ± 0.02. To 2 mL of this solution, 10 µL of properly diluted extract were added and the decrease in absorption of the radical was measured at 517 nm after 30 min incubation in the dark against a methanol blank. A calibration curve was obtained by using different concentrations of gallic acid and the results were expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) g^{-1} dry weight (DW).

The 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) radical scavenging capacity was determined following the method of Re et al. (1999) with some modifications. An activated solution of $ABTS^{\bullet+}$ radical cation was prepared by mixing

Unauthenticated
Download Date | 9/25/17 11:10 AM

ABTS and potassium peroxodisulfate solutions so that the final concentrations in the mixture were 7 mM and 2.45 mM, respectively. The solution was held at room temperature (22 ± 2 °C) for at least 16 h before use. The working solution was obtained by diluting the stock solution with distilled water to obtain an absorbance of 0.7 ± 0.02. The fall of absorbance was measured at 734 nm against a distilled water blank 1 min after mixing 10 µL of properly diluted extract with 2 mL of activated radical. ABTS radical scavenging activity was calculated from a gallic acid calibration curve and presented as mg gallic acid equivalent (GAE) g^{-1} dry weight (DW).

Statistical analysis

All measurements were performed in triplicate and the results are presented as means ± standard deviations. A two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni *post-hoc* test was carried out on averaged results for plant parts of each species, to determine significant differences among the same plant parts of different species and different plant parts of the same species. Pearson's correlation coefficient (r) was used to determine the association among parameters, more precisely, among the contents of particular groups of specialized metabolites (total phenolics, flavonoids, condensed tannins and iridoids) in all samples (altogether 48 samples) and their antioxidant capacities evaluated by two different assays (DPPH and ABTS) or among the contents of particular groups of specialized metabolites in specific plant parts and averages of mean monthly temperatures and monthly precipitation amounts of individual locations (maximum of ten samples per analysis), with a significance level $\alpha = 0.05$. The statistical analysis was carried out using GraphPad Prism 5.03 for Windows (GraphPad Software, San Diego, USA).

Results

Content of plant-specialized metabolites

All four investigated species were found to be rich in phenolic compounds, with observed differences among plant parts (Tab. 3). The content of total phenolics ranged from 10.13 (*G. punctata* (3), flowers) to 44.90 (*G. cordifolia* (1), flower stems) mg GAE g^{-1} DW High amounts of polyphenols were observed in leaves of all species, with no significant differences noticed between *G. alypum* and related species. Leaves and flowers of *G. alypum* were the richest plant parts for this species. On the other hand, it was observed that flower stems of *G. cordifolia* and *G. meridionalis*, as well as woody stems and underground parts of *G. punctata*, also contained high amounts of phenolic compounds. Flowers of *G. punctata* were the poorest of all the tested samples ($p < 0.05$).

The flavonoid content ranged from 0.84 (*G. cordifolia* (3), woody stems) to 17.77 (*G. punctata* (2), leaves) mg QE g^{-1} DW (Tab. 3). When different plant parts between species were compared, it was observed that the leaves contained the highest amounts of flavonoids. *G. punctata* leaves and flower stems contained more flavonoids than those of other species ($p < 0.05$), while there were no significant differences among the species for flowers and underground parts. The lowest amounts of flavonoids were observed for woody stems and underground parts.

Condensed tannin (proanthocyanidin) content varied from 0.19 (*G. meridionalis* (2), underground parts) to 9.77 (*G. cordifolia* (3), flower stems) mg CE g^{-1} DW (Tab. 3). Taking into account all plant parts, condensed tannin content was especially high in the population collected from Mostar. Green aerial parts contained more tannins than woody stems and underground parts. In *G. cordifolia*, leaves and flower stems contained the highest amounts of tannins ($p < 0.05$), while for other species no significant differences were observed among plant parts.

The content of iridoids varied from 3.94 (*G. punctata* (3), underground parts) to 143.29 (*G. punctata* (1), leaves) mg aucubin equivalent (AE) g^{-1} DW (Tab. 3). High amounts of

Unauthenticated
Download Date | 9/25/17 11:10 AM

iridoids were found in *G. cordifolia, G. meridionalis* and *G. punctata*, especially in their leaves and flower stems ($p < 0.05$). No significant differences in iridoid content were noticed between different organs of *G. alypum*.

Correlations between phenolic/iridoid content and environmental factors

In order to verify the influence of specific environmental factors on the variability of the compounds determined, results obtained for each plant part were correlated with mean monthly temperatures and monthly precipitation amounts of different stands and seasons (Tab. 2). Averages for the month in which the plant material was collected and the three previous months were correlated with the amounts of investigated compounds. During evaluation of the influence of temperature, the population of Mala Učka had to be excluded due to the great elevation difference between the location of sampling (926 m) and the nearest meteorological station (120 m), from which meteorological data were available, which made it impossible to accurately predict the mean monthly temperatures for this location. Taking this into account, however, a strong positive correlation was observed between mean monthly temperatures and total phenolic contents in the leaves of investigated species ($r = 0.75$, $p = 0.019$), together with a strong negative correlation in the flower stems ($r = -0.88$, $p = 0.002$). In spite of the significant variability discovered in the iridoid contents among populations, no correlation with mean monthly temperatures ($p > 0.05$) was found. Also, no significant correlation between precipitation and amounts of bioactive substances was observed ($p > 0.05$).

Correlations between phenolic/iridoid content and antioxidant capacity

In this study, all tested samples showed antioxidant activity, which was in very good correlation with observed amounts of total phenolic compounds ($r = 0.86$, $p < 0.001$ for DPPH; $r = 0.83$, $p < 0.001$ for ABTS). Poor correlation was observed between flavonoid content and DPPH radical scavenging capacity ($r = 0.32$, $p < 0.05$) (Tab. 4). *G. alypum* leaves and flowers showed higher antioxidant activity than those of related species in the DPPH assay, while in the ABTS assay only flowers were significantly different ($p < 0.05$) (Tab. 3).

Discussion

Comparison to previous studies of *G. alypum* and evaluation of obtained results

In the present study, the medicinal plant *G. alypum* served as a control species, with which all other investigated species were compared. The reason for this was its broad and well-documented medicinal use together with a number of studies highlighting the high contents of its specialized metabolites and pronounced antioxidant activity. Determination of specialized metabolites was conducted according to the same procedures as those used in previous studies of *G. alypum* and related species (Djeridane et al. 2006, Khlifi et al. 2011, Tundis et al. 2012a, Amessis-Ouchemoukh et al. 2014, Taghzouti et al. 2016, Touaibia and Chaouch 2016) to enable a more reliable comparison with literature data. Amounts of total phenolics and flavonoids observed for *G. alypum* in this study were comparable to those in previously reported studies (Djeridane et al. 2006, Djeridane et al. 2010, Chograni et al. 2012), in which they were expressed in the same manner as in our study, per g dry weight of plant (Djeridane et al. 2006), not per g dry extract, as in some other studies. The latter, unsurprisingly, resulted in several times higher values (Khlifi et al. 2011, Amessis-Ouchemoukh et al. 2014, Taghzouti et al. 2016, Touaibia and Chaouch 2016). The present study also shows that green aerial parts of *Globularia* species contain higher amounts of specialized metabolites, with the exception of total phenolics, which were also observed to be high in woody stems and underground parts of *G. punctata*. Leaves of *Globularia* species were rich in all investigated bioactive substances. This could explain why they are frequently used plant parts in folk medicine (De Natale and Pollio 2012, Bouzabata 2013, El Abbouyi et

Unauthenticated
Download Date | 9/25/17 11:10 AM

al. 2014). However, it is important to notice that the use of flowers (Bouzabata 2013) and aerial parts (De Natale and Pollio 2012) is also known, which could be explained by the high amounts of polyphenols found in *G. alypum* flowers and their high antioxidant activity as observed in this study, as well as their recently reported high catalpol content (Sertić et al. 2015) and various biological activities such as antioxidative, anti-inflammatory and acetylcholinesterase inhibitory activity (Amessis-Ouchemoukh et al. 2014).

Two of the most commonly used assays for estimating radical scavenging activity are the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay and the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) assay (Sánchez-Moreno 2002). Both assays were previously used by different authors for estimating the antioxidant capacity of *G. alypum* and showed the species to be a good source of antioxidants (Djeridane et al. 2006, Es-Safi et al. 2007, Djeridane et al. 2010, Khlifi et al. 2011, Chograni et al. 2012). Strong positive correlations between the total phenolic content and antioxidant capacity, similar to those observed in the present study, were also found in earlier studies (Djeridane et al. 2006, Khlifi et al. 2011, Chograni et al. 2012). However, the antioxidant activity observed for *G. alypum* leaves and flowers was not statistically different ($p > 0.05$) from that of previous reports (Chograni et al. 2012, Amessis-Ouchemoukh et al. 2014). Djeridane et al. (2006) noticed higher antioxidant activity in *G. alypum* and other plant extracts in which phenolic acids predominated in comparison to those extracts containing only flavonoids. This could explain why only a poor correlation between flavonoid content and DPPH radical scavenging capacity was found in our study.

Evaluation of medicinal potential of *G. cordifolia*, *G. meridionalis* and *G. punctata*

The high amounts of polyphenols and iridoids found in *G. cordifolia*, *G. meridionalis* and *G. punctata* suggest these species have potentially beneficial health effects similar to those of *G. alypum*. However, it should be noted that the method used for iridoid determination, could only detect the aucubin and asperuloside type iridoids (Trim and Hill 1952), while catalpol derivatives, which are the predominant iridoid glycosides of *G. alypum* (Chaudhuri and Sticher 1981), could not be estimated (Harborne 1998). However, the three species were recently also shown to possess higher amounts of aucubin than *G. alypum*, with *G. punctata* having higher catalpol contents as well (Sertić et al. 2015). High iridoid content in the green aerial parts of *G. cordifolia*, *G. meridionalis* and *G. punctata* observed in this study could be explained by the presence of various aucubin and asperuloside derivatives, which have been previously isolated from these species (Chaudhuri and Sticher 1980, Kirmizibekmez et al. 2003, Tundis et al. 2012b). Indeed, much higher asperuloside amounts have been observed in *G. cordifolia*, *G. meridionalis* and *G. punctata* than in *G. alypum* (Friščić et al. 2016). Similarly to our results, lower amounts of iridoids were previously reported for *G. meridionalis* underground parts in comparison to its aerial parts (Tundis et al. 2012a). Although in most cases, there were no significant differences observed in the amounts of specialized metabolites of the three species, *G. punctata* seems to contain more polyphenols in the woody parts and more flavonoids in the leaves and flower stems. A high catalpol content in the flowers of this species was also recently observed (Sertić et al. 2015). On the other hand, *G. cordifolia* and *G. meridionalis* gave similar results in all performed assays (i.e., no statistically significant differences between the two species were observed). This is not surprising considering their close relationship (Tutin 1972). Although these species could not be distinguished based on the used spectrophotometric assays, it should be noted that the comparison of the proanthocyanidin content indicated a somewhat characteristic chemical composition of the *G. cordifolia* population collected from Mostar. The same phenomenon was observed after an analysis of the essential oil composition of different *Globularia* populations (Crkvenčić et al. 2016).

Unauthenticated
Download Date | 9/25/17 11:10 AM

According to our study, the antioxidant activity of all four species is in good correlation with their total phenolic content. Because *G. cordifolia*, *G. meridionalis* and *G. punctata* are more widely distributed in Europe, it would be interesting to investigate if they have other biological activities that are similar to those of *G. alypum*. Some researches in this field have already yielded promising results. For example, *G. meridionalis* was recently shown to possess inhibitory activity on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, enzymes representing the targets for the symptomatic treatment of Alzheimer's disease (Tundis et al. 2012a). Iridoid glucoside globularifolin, found both in *G. cordifolia* (Chaudhuri and Sticher 1980) and *G. meridionalis* (Tundis et al. 2012b), was also recently reported to possess immunomodulatory activity (Sipahi et al. 2014).

Production of plant-specialized metabolites with respect to environmental factors

Our results confirmed the assumption that phenolic and iridoid concentrations can vary significantly between populations of the same species collected from different locations (Tab. 3) and thus provided a justification for including more populations of each species when comparing different species harvested from natural habitats. As mentioned before, *G. alypum* was presented with only one population. However, the amounts of its specialized metabolites could be compared to numerous literature data.

It is known that environmental factors have a major influence on the synthesis of plant-specialized metabolites causing notable differences in the yields of biologically active compounds among different populations. The correlations observed in this study indicate a possible shift in the polyphenolic production and/or translocation of phenolic compounds from the flower stems to the leaves under the influence of increased temperature. On the other hand, the higher tannin content found in all plant parts of *G. cordifolia* from Mostar area could be connected with its location on the humid Neretva river banks, having in mind that all other samples were collected from well-drained areas with full sun exposure. It was previously reported that tannin-rich plants grew mostly on infertile soils with poor drainage (Kraus et al. 2003). Knowing that iridoids play a major role in defending plants against pathogens or herbivores (Dobler 2011), stimuli other than those considered in the present study seem to be more important for their production.

Bearing in mind that, along with the genetically determined variations of metabolite production, plant-specialized metabolites represent a way of adaptation to environmental factors (Ghasemzadeh and Ghasemzadeh 2011), the yield of bioactive compounds can be significantly different among populations. This fact is very important for users of native medicinal plants. Investigations of plant-specialized metabolites with the aim of checking or predict the medicinal potential of a given plant species should therefore be conducted on several plant populations, when possible. Unfortunately, this is not always the case. The proposed approach could also ensure the selection of the most suitable populations for cultivation and/or the adaptation of growth conditions to those necessary to increase the production of target metabolites. Finally, monitoring the production of plant-specialized metabolites could be very important in terms of occurring global climate changes.

Acknowledgements

This research was supported by the Ministry of Science, Education and Sports of the Republic of Croatia (project No. 006-0061117-1239).

References

Albach, D. C., Meudt, H. M., Oxelman, B., 2005: Piecing together the "new" Plantaginaceae. American Journal of Botany 92, 297–315.

Altundag, E., Ozturk, M., 2011: Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. Procedia - Social and Behavioral Sciences 19, 756–777.

Unauthenticated
Download Date | 9/25/17 11:10 AM

Amessis-Ouchemoukh, N., Madani, K., Falé, P. L. V., Serralheiro, M. L., Araújo, M. E. M., 2014: Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. Industrial Crops and Products 53, 6–15.

Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., Legret, P., 1994: Standardization of propolis extract and identification of principal constituents [Article in French]. Journal de pharmacie de Belgique 49, 462-468.

Blois, M. S., 1958: Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181, 1199-1200.

Boudet, A. M., 2007: Evolution and current status of research in phenolic compounds. Phytochemistry 68, 2722–2735.

Bouzabata, A., 2013: Traditional treatment of high blood pressure and diabetes in Souk Ahras District. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy 5, 12–20.

Broadhurst, R. B., Jones, W. T., 1978: Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. Journal of the Science of Food and Agriculture 29, 788-794.

Carrió, E., Vallès, J., 2012: Ethnobotany of medicinal plants used in Eastern Mallorca (Balearic Islands, Mediterranean Sea). Journal of Ethnopharmacology 141, 1021-1040.

Chaudhuri, R. K., Sticher, O., 1980: Globularifolin, a new acyl iridoid glucoside from *Globularia cordifolia*. Helvetica Chimica Acta 63, 117–120.

Chaudhuri, R. K., Sticher, O., 1981: New iridoid glucosides and a lignan diglucoside from *Globularia alypum* L. Helvetica Chimica Acta 64, 3–15.

Chograni, H., Riahi, L., Zaouali, Y., Boussaid, M., 2012: Polyphenols, flavonoids, antioxidant activity in leaves and flowers of Tunisian *Globularia alypum* L. (Globulariaceae). African Journal of Ecology 51, 343–347.

Crkvenčić, M., Dudaš, S., Jerković, I., Marijanović, Z., Poljuha, D., Hazler Pilepić, K., 2016: Essential oil composition of three *Globularia* species. Chemistry and Biodiversity 13, 219-223.

De Natale, A., Pollio, A., 2012: A forgotten collection: the Libyan ethnobotanical exhibits (1912-14) by A. Trotter at the Museum O. Comes at the University Federico II in Naples, Italy. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine 8, 4.

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006: Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry 97, 654–660.

Djeridane, A., Yousfi, M., Brunel, J. M., Stocker, P., 2010: Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the *in vitro* antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. Food and Chemical Toxicology 48, 2599–2606.

Dobler, S., Petschenka, G., Pankoke, H., 2011: Coping with toxic plant compounds – The insect's perspective on iridoid glycosides and cardenolides. Phytochemistry 72, 1593–1604.

Eissa, T. A. F., Palomino, O. M., Carretero, M. E., Gómez-Serranillos, M. P., 2014: Ethnopharmacological study of medicinal plants used in the treatment of CNS disorders in Sinai Peninsula, Egypt. Journal of Ethnopharmacology 151, 317–332.

El Abbouyi, A., Filali-Ansari, N., EL Khyari, P. S., Loukili, H., 2014: Inventory of medicinal plants prescribed by traditional healers in El Jadida city and suburbs (Morocco). International Journal of Green Pharmacy 8, 242-251.

El Guiche, R., Tahrouch, S., Amri, O., El Mehrach, K., Hatimie, A., 2015: Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of 30 medicinal and aromatic plants located in the South of Morocco. International Journal of New Technology and Research 1, 7-11.

Unauthenticated
Download Date | 9/25/17 11:10 AM

Es-Safi, N. E., Kollmann, A., Khlifi, S., Ducrot, P. H., 2007: Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L. structure-activity relationship. LWT - Food Science and Technology 40, 1246–1252.

Friščić, M., Bucar, F., Hazler Pilepić, K., 2016: LC-PDA-ESI-MS^n analysis of phenolic and iridoid compounds from *Globularia* spp. Journal of Mass Spectrometry 51, 1211-1236.

Ghasemzadeh, A., Ghasemzadeh, N. 2011: Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. Journal of Medicinal Plants Research 5, 6697–6703.

Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine 27, 1–93.

Harborne, J. B., 1998: The terpenoids. In: Harborne, J. B. (ed.), Phytochemical methods, third ed., 107–150. Chapman & Hall, London.

Khlifi, D., Hamdi, M., El Hayouni, A., Cazaux, S., Souchard, J. P., Couderc, F., Bouajila, J., 2011: Global chemical composition and antioxidant and anti-tuberculosis activities of various extracts of *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) leaves. Molecules 16, 10592–10603.

Kirmizibekmez, H., Bassarello, C., Piacente, S., Akaydin, G., Çaliş, İ., 2009: Flavonoid, phenylethanoid and iridoid glycosides from *Globularia aphyllanthes*. Zeitschrift für Naturforschung B 64, 252–256.

Kirmizibekmez, H., Bassarello, C., Piacente, S., Çaliş, İ., 2008: Phenylethyl glycosides from *Globularia alypum* growing in Turkey. Helvetica Chimica Acta 91, 1525–1532.

Kirmizibekmez, H., Çaliş, İ., Akbay, P., Sticher, O., 2003: Iridoid and bisiridoid glycosides from *Globularia cordifolia*. Zeitschrift für Naturforschung C 58, 337–341.

Kraus, T. E. C., Dahlgren, R. A., Zasoski, R. J. 2003: Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems – a review. Plant and Soil 256, 41–66.

Leporatti, M. L., Ghedira, K., 2009: Comparative analysis of medicinal plants used in traditional medicine in Italy and Tunisia. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine 5, 31.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine 26, 1231–1237.

Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G., 1997: Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Sciences 2, 152–159.

Sánchez-Moreno, C., 2002: Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. Food Science and Technology International 8, 121–137.

Sertić, M., Crkvenčić, M., Mornar, A., Hazler Pilepić, K., Nigović, B., Maleš, Ž., 2015: Analysis of aucubin and catalpol content in different plant parts of four *Globularia* species. Journal of Applied Botany and Food Quality 88, 209–214.

Singleton, V. L., Rossi, J. A., 1965: Colorimetry of total phenolics with phospomolybdic-phospotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16, 144-158.

Sipahi, H., Becker, K., Gostner, J. M., Charehsaz, M., Kirmizibekmez, H., Schennach, H., Aydin, A., Fuchs, D., 2014: Effects of globularifolin on cell survival, nuclear factor-κB activity, neopterin production, tryptophan breakdown and free radicals *in vitro*. Fitoterapia 92, 85–92.

Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M., Spranger, I., 1998: Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46, 4267-4274.

Unauthenticated
Download Date | 9/25/17 11:10 AM

Taghzouti, O. K., Balouiri, M., Ouedrhiri, W., Ech chahad, A., Romane, A., 2016: *In vitro* evaluation of the antioxidant and antimicrobial effects of *Globularia alypum* L. extracts. Journal of Materials and Environmental Science 7, 1988-1995.

Taleb-Dida, N., Krouf, D., Bouchenak, M., 2011: *Globularia alypum* aqueous extract decreases hypertriglyceridemia and ameliorates oxidative status of the muscle, kidney, and heart in rats fed a high-fructose diet. Nutrition Research 31, 488–495.

Thetsrimuang, C., Khammuang, S., Sarnthima, R., 2011: Antioxidant activity of crude polysaccharides from edible fresh and dry mushroom fruiting bodies of *Lentinus* sp. Strain RJ-2. International Journal of Pharmacology 7, 58–65.

Toda S., 2005: Antioxidative effects of polyphenols from leaves of *Artemisia princeps* Pamp. on lipid peroxidation *in vitro*. Journal of Food Biochemistry 29, 305-312.

Touaibia, M., Chaouch, F. Z., 2016: Global chemical composition and antioxidative effect of the ethanol extracts prepared from *Globularia alypum* leaves. Nature and Technology 14, 2-6.

Trim, A. R., Hill, R., 1952: The preparation and properties of aucubin, asperuloside and some related glycosides. Biochemical Journal 50, 310–319.

Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., Loizzo, M. R., Conforti, F., Statti, G., Pirisi, F. M., Menichini, F., 2012a: Antioxidant and anti-cholinesterase activity of *Globularia meridionalis* extracts and isolated constituents. Natural Product Communications 7, 1015–1020.

Tundis, R., Peruzzi, L., Colica, C., Menichini, F., 2012b: Iridoid and bisiridoid glycosides from *Globularia meridionalis* (Podp.) O. Schwarz aerial and underground parts. Biochemical Systematics and Ecology 40, 71–74.

Tutin, T. G., 1972: *Globularia* L. In: Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters, S. M., Webb, D. A. (eds.), Flora Europaea (Vol. 3), 282–283. Cambridge University Press, Cambridge.

Unauthenticated
Download Date | 9/25/17 11:10 AM

Tab. 1. Collection and geographical data for plant material of the investigated *Globularia* species; *Ga – Globularia alypum*, *Gc – G. cordifolia*, *Gm – G. meridionalis*, *Gp – G. punctata*.

Species (Voucher No.)	Location	Geographical latitude	Geographical longitude	Elevation (m)	Habitat type	Harvest time
Ga (16 020)	Dubrovnik area (Konavle cliffs)	42°30′50″N	18°19′07″E	15	Limestone cliffs by the sea	March 2013
Gc (1) (16 032)	Northern Velebit area (Alan)	44°43′15″N	14°58′05″E	1340	Calcareous grasslands	May 2013
Gc (2) (16 031)	Middle Velebit area (Baške Oštarije)	44°31′41″N	15°08′38″E	917	Calcareous grasslands	May 2012
Gc (3) (16 030)	Mostar area (the Neretva banks)	43°21′41″N	17°48′20″E	57	Rocky grasslands along a river	May 2012
Gm (1) (16 041)	Istrian peninsula (Mala Učka)	45°17′59″N	14°11′27″E	926	Limestone cliffs	May 2012
Gm (2) (16 040)	Rijeka area (Grobničko polje)	45°22′39″N	14°30′53″E	308	Karst field	May 2013
Gm (3) (16 043)	Middle Velebit area (Baške Oštarije)	44°31′41″N	15°08′38″E	917	Calcareous grasslands	May 2012
Gp (1) (16 051)	Istrian peninsula (Vižintini)	45°23′36″N	13°51′20″E	386	Calcareous grasslands	May 2012
Gp (2) (16 056)	Rijeka area (Grobnik field)	45°22′39″N	14°30′53″E	308	Karst field	May 2013
Gp (3) (16 057)	Žumberak area (Slapnica canyon)	45°44′29″N	15°29′26″E	325	Limestone cliffs	May 2013

Tab. 2. Records of mean monthly temperatures and monthly precipitation amounts from meteorological stations nearby locations where *Globularia* species were collected (for details see Tab. 1). Records are shown for month in which the plant material was harvested (M), the three previous months (M-3, M-2, and M-1) as well as their average; *Ga – Globularia alypum*, *Gc – G. cordifolia*, *Gm – G. meridionali* , *Gp – G. punctata*.

Plant species	Mean monthly temperature (°C)					Monthly precipitation amounts (mm)					Meteorological station (Elevation (m))
	M-3	M-2	M-1	M	Average	M-3	M-2	M-1	M	Average	
Ga	9.6	10.1	9.5	11.2	10.1	283.2	205.2	238.1	214.0	235.1	Dubrovnik (52)
Gc (1)	-6.4	-3.1	3.8	5.6	0.0	284.6	293.9	152.7	253.4	246.2	Zavižan (1594)
Gc (2)	-5.0	7.3	9.8	13.4	6.4	58.2	1.0	116.2	102.0	69.4	Gospić (564)
Gc (3)	1.7	13.5	13.2	18.6	11.8	202.7	0.3	266.6	92.3	140.5	Mostar (99)
Gm (1)	0.7	8.9	11.7	15.5	9.2	30.1	1.3	54.2	104.4	47.5	Letaj (120)
Gm (2)	5.1	8.0	14.3	16.4	11.0	210.1	386.9	80.0	228.3	226.3	Rijeka (120)
Gm (3)	-5.0	7.3	9.8	13.4	6.4	58.2	1.0	116.2	102.0	69.4	Gospić (564)
Gp (1)	0.2	8.8	11.4	15.3	8.9	11.9	0.0	61.4	105.6	44.7	Pazin (291)
Gp (2)	5.1	8.0	14.3	16.4	11.0	210.1	386.9	80.0	228.3	226.3	Rijeka (120)
Gp (3)	1.5	4.4	12.9	15.8	8.7	93.7	121.1	50.2	107.0	93.0	Maksimir (128)

Unauthenticated
Download Date | 9/25/17 11:10 AM

Tab. 3. Total phenolic, flavonoid, condensed tannin and iridoid contents as well as radical scavenging capacities obtained by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assays, in different plant parts of four *Globularia* species collected from different locations (for details see Tab. 1). Values are means ± SD, n = 3; statistically significant differences ($p < 0.05$) between the same plant parts of different species are indicated by different superscript lower case letters (a > b > c > d) and between different plant parts of the same species in different superscript capital letters (A > B > C > D); * – flowers of the plant are carried by woody stems; *Ga* – *Globularia alypum*, *Gc* – *G. cordifolia*, *Gm* – *G. meridionalis*, *Gp* – *G. punctate*; L – leaves, F – flowers, FS – flower stems, WS – woody stems, UP – underground parts; n.m. – not measured; GAE – gallic acid equivalent, DW – dry weight, QE – quercetin equivalent, CE – catechin equivalent, AE – aucubin equivalent.

Plant species	Plant part	Polyphenols (mg GAE g^{-1} DW)	Flavonoids (mg QE g^{-1} DW)	Tannins (mg CE g^{-1} DW)	Iridoids (mg AE g^{-1} DW)	DPPH (mg GAE g^{-1} DW)	ABTS (mg GAE g^{-1} DW)
Ga	L	37.58 ± 0.85^{aA}	9.23 ± 0.39^{bA}	0.76 ± 0.03^{bA}	9.38 ± 0.55^{cA}	18.29 ± 2.64^{aA}	12.35 ± 0.81^{aA}
	F	35.39 ± 0.78^{aA}	5.46 ± 0.04^{aB}	0.77 ± 0.01^{aA}	6.18 ± 0.08^{aA}	20.48 ± 2.03^{aA}	14.41 ± 0.56^{aA}
	FS = WS*	21.16 ± 0.72^{cB}	4.74 ± 0.04^{cB}	0.34 ± 0.03^{bA}	5.06 ± 0.04^{bA}	11.67 ± 0.37^{aB}	8.09 ± 0.37^{bB}
	UP	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
Gc (1)	L	27.67 ± 0.82	9.08 ± 0.36	2.55 ± 0.07	77.34 ± 1.54	9.98 ± 0.97	8.18 ± 0.02
	F	25.68 ± 0.70	7.12 ± 0.08	2.30 ± 0.10	24.67 ± 0.81	7.96 ± 0.68	7.52 ± 1.02
	FS	44.90 ± 1.18	9.56 ± 0.15	4.17 ± 0.07	57.56 ± 2.25	14.70 ± 1.43	12.52 ± 1.98
	WS	22.22 ± 0.51	2.00 ± 0.01	0.28 ± 0.01	8.37 ± 0.48	9.12 ± 0.96	7.91 ± 0.43
	UP	22.15 ± 1.03	1.96 ± 0.07	0.21 ± 0.00	6.03 ± 0.14	9.91 ± 0.22	7.56 ± 0.10
Gc (2)	L	34.42 ± 0.94	9.24 ± 0.15	1.92 ± 0.02	132.43 ± 1.18	11.28 ± 1.90	11.53 ± 0.14
	F	20.06 ± 0.45	4.55 ± 0.02	1.40 ± 0.05	28.74 ± 3.16	7.22 ± 2.27	7.86 ± 0.28
	FS	33.31 ± 0.32	6.73 ± 0.09	3.24 ± 0.08	51.04 ± 0.63	11.45 ± 0.52	8.95 ± 0.19
	WS	14.55 ± 0.10	0.93 ± 0.01	0.33 ± 0.00	6.64 ± 0.01	5.19 ± 0.04	7.27 ± 0.16
	UP	16.54 ± 0.90	1.36 ± 0.13	0.26 ± 0.01	4.92 ± 0.47	5.96 ± 0.26	6.47 ± 0.13
Gc (3)	L	33.33 ± 0.96	9.50 ± 0.27	8.01 ± 0.17	98.25 ± 2.47	10.36 ± 0.49	10.37 ± 0.32
	F	18.88 ± 0.28	3.73 ± 0.09	4.53 ± 0.04	40.56 ± 0.98	5.44 ± 0.44	5.83 ± 0.15
	FS	23.66 ± 0.52	7.59 ± 0.07	9.77 ± 0.20	100.51 ± 1.31	9.80 ± 0.08	8.73 ± 0.33
	WS	13.61 ± 0.56	0.84 ± 0.01	0.75 ± 0.01	10.51 ± 0.04	4.53 ± 1.17	6.24 ± 0.13
	UP	20.37 ± 0.72	1.45 ± 0.02	0.66 ± 0.01	9.95 ± 0.25	8.71 ± 0.91	8.30 ± 0.16
Gc average	L	31.81 ± 3.62^{aAB}	9.27 ± 0.21^{bA}	4.16 ± 3.35^{aA}	102.70 ± 27.81^{abA}	10.54 ± 0.67^{bA}	10.03 ± 1.70^{aA}
	F	21.54 ± 3.63^{bcBC}	5.13 ± 1.77^{aB}	2.74 ± 1.61^{aAB}	31.32 ± 8.25^{aC}	6.87 ± 1.30^{bA}	7.07 ± 1.09^{bA}
	FS	33.96 ± 10.63^{aA}	7.96 ± 1.45^{bA}	5.73 ± 3.53^{aA}	69.70 ± 26.88^{aB}	11.98 ± 2.49^{aA}	10.07 ± 2.13^{bA}
	WS	16.79 ± 4.72^{cC}	1.26 ± 0.65^{dC}	0.45 ± 0.26^{bB}	8.51 ± 1.94^{bC}	6.28 ± 2.48^{bA}	7.14 ± 0.84^{bA}
	UP	19.69 ± 2.87^{bBC}	1.59 ± 0.32^{dC}	0.38 ± 0.25^{aB}	6.97 ± 2.64^{aC}	8.19 ± 2.03^{aA}	7.44 ± 0.92^{bA}
Gm (1)	L	23.03 ± 0.29	6.96 ± 0.08	1.38 ± 0.00	85.89 ± 5.76	10.16 ± 0.22	9.47 ± 0.34
	F	21.69 ± 0.78	5.16 ± 0.03	1.74 ± 0.02	37.65 ± 2.01	9.89 ± 0.08	8.33 ± 0.16

Unauthenticated
Download Date | 9/25/17 11:10 AM

	FS	29.50 ± 0.55	6.07 ± 0.03	2.12 ± 0.02	62.61 ± 1.42	14.07 ± 0.85	11.36 ± 0.11
	WS	17.56 ± 0.04	1.02 ± 0.02	0.34 ± 0.00	8.54 ± 0.12	5.76 ± 0.82	7.68 ± 0.07
	UP	26.05 ± 0.68	2.25 ± 0.04	0.39 ± 0.00	15.98 ± 0.53	9.91 ± 0.18	10.01 ± 0.28
Gm (2)	L	35.18 ± 0.22	11.32 ± 0.17	1.77 ± 0.03	70.50 ± 0.77	12.08 ± 1.01	9.95 ± 0.67
	F	18.28 ± 0.29	5.35 ± 0.07	1.86 ± 0.12	20.50 ± 1.55	7.04 ± 0.61	4.62 ± 0.10
	FS	29.38 ± 0.45	6.37 ± 0.24	2.78 ± 0.09	40.94 ± 3.89	8.19 ± 1.06	8.50 ± 0.31
	WS	20.00 ± 0.17	1.71 ± 0.09	0.24 ± 0.00	9.29 ± 0.49	6.34 ± 0.10	5.67 ± 0.16
	UP	17.13 ± 0.53	1.08 ± 0,01	0.19 ± 0.01	6.20 ± 0.22	5.73 ± 1.20	5.38 ± 0.15
Gm (3)	L	30.81 ± 0.45	8.40 ± 0.10	1.71 ± 0.05	114.08 ± 7.72	9.49 ± 1.08	10.02 ± 0.18
	F	27.25 ± 0.85	4.09 ± 0.03	1.60 ± 0.02	25.19 ± 1.60	6.82 ± 2.20	6.66 ± 0.24
	FS	37.76 ± 1.22	7.86 ± 0.09	3.55 ± 0.11	49.46 ± 4.80	13.19 ± 0.17	9.96 ± 0.92
	WS	16.80 ± 0.54	0.90 ± 0.02	0.41 ± 0.01	8.27 ± 0.13	6.59 ± 0.29	7.99 ± 0.30
	UP	15.86 ± 0.19	1.40 ± 0.09	0.26 ± 0.01	5.04 ± 0.15	5.25 ± 0.25	5.25 ± 0.22
Gm	L	29.67 ± 6.15^{aAB}	8.89 ± 2.22^{bA}	1.62 ± 0.21^{abA}	90.16 ± 22.10^{bA}	10.58 ± 1.34^{bA}	9.81 ± 0.30^{aA}
average	F	22.41 ± 4.53^{bAB}	4.87 ± 0.68^{aB}	1.73 ± 0.13^{aA}	27.78 ± 8.86^{aBC}	7.92 ± 1.71^{bA}	6.54 ± 1.86^{bA}
	FS	32.21 ± 4.80^{abA}	6.77 ± 0.96^{bcAB}	2.82 ± 0.72^{abA}	51.00 ± 10.92^{aB}	11.82 ± 3.17^{aA}	9.94 ± 1.43^{bA}
	WS	18.12 ± 1.67^{cB}	1.21 ± 0.44^{dC}	0.33 ± 0.09^{bA}	8.70 ± 0.53^{bC}	6.23 ± 0.43^{bA}	7.11 ± 1.26^{bA}
	UP	19.68 ± 5.55^{bB}	1.58 ± 0.60^{aC}	0.28 ± 0.10^{aA}	9.07 ± 0.60^{aC}	6.96 ± 2.56^{aA}	6.88 ± 2.71^{bA}
Gp (1)	L	35.31 ± 1.31	14.46 ± 0.20	1.68 ± 0.04	143.29 ± 7.15	15.32 ± 1.04	12.22 ± 0.24
	F	14.02 ± 0.25	6.76 ± 0.05	0.84 ± 0.02	15.26 ± 0.41	4.18 ± 0.42	4.34 ± 0.01
	FS	24.60 ± 0.59	13.93 ± 0.25	0.97 ± 0.04	86.75 ± 1.62	12.91 ± 0.57	7.53 ± 0.29
	WS	34.96 ± 0.57	3.71 ± 0.04	0.58 ± 0.02	8.53 ± 0.18	16.94 ± 1.09	18.95 ± 0.50
	UP	32.68 ± 0.59	2.47 ± 0.02	0.43 ± 0.01	4.37 ± 0.33	11.38 ± 0.77	12.53 ± 0.47
Gp (2)	L	36.10 ± 0.45	17.77 ± 0.87	1.49 ± 0.04	125.83 ± 1.79	11.71 ± 0.23	10.59 ± 0.15
	F	11.19 ± 0.13	5.52 ± 0.24	1.16 ± 0.07	8.02 ± 0.43	3.44 ± 0.06	2.36 ± 0.12
	FS	19.50 ± 0.27	12.55 ± 0.21	1.55 ± 0.07	72.79 ± 1.47	5.12 ± 0.22	5.50 ± 0.26
	WS	30.79 ± 0.27	2.78 ± 0.00	0.30 ± 0.01	6.84 ± 0.28	9.65 ± 0.57	12.05 ± 0.06
	UP	30.87 ± 0.47	2.71 ± 0.01	0.30 ± 0.00	4.76 ± 0.02	9.90 ± 0.22	12.07 ± 0.18
Gp (3)	L	30.46 ± 1.57	14.46 ± 0.58	2.38 ± 0.02	110.32 ± 1.14	10.33 ± 0.71	13.24 ± 1.40
	F	10.13 ± 0.23	5.57 ± 0.07	0.56 ± 0.03	9.44 ± 0.29	3.38 ± 0.54	2.20 ± 0.14
	FS	22.38 ± 0.69	11.65 ± 0.13	2.11 ± 0.07	75.59 ± 1.03	8.92 ± 0.08	5.45 ± 0.96
	WS	44.77 ± 0.49	2.84 ± 0.11	0.60 ± 0.00	9.95 ± 0.52	18.33 ± 1.05	16.24 ± 1.37
	UP	35.20 ± 0.83	2.75 ± 0.07	0.41 ± 0.01	3.94 ± 0.08	12.88 ± 0.89	9.39 ± 0.50
Gp	L	33.96 ± 3.05^{aAB}	15.56 ± 1.91^{aA}	1.85 ± 0.47^{abA}	126.50 ± 16.49^{aA}	12.45 ± 2.58^{bAB}	12.02 ± 1.34^{aAB}
average	F	11.78 ± 2.01^{cC}	5.95 ± 0.70^{aC}	0.85 ± 0.30^{aA}	10.91 ± 3.84^{aC}	3.67 ± 0.45^{bC}	2.97 ± 1.19^{cC}
	FS	22.16 ± 2.56^{bBC}	12.71 ± 1.15^{aB}	1.54 ± 0.57^{bA}	78.38 ± 7.39^{aB}	8.98 ± 3.90^{aBC}	6.16 ± 1.19^{aC}
	WS	36.84 ± 7.18^{aA}	3.11 ± 0.52^{cdD}	0.49 ± 0.17^{bA}	8.44 ± 1.56^{bC}	14.97 ± 4.66^{aA}	15.75 ± 3.48^{aA}
	UP	32.92 ± 2.18^{aAB}	2.64 ± 0.15^{aD}	0.38 ± 0.07^{aA}	4.36 ± 0.41^{aC}	11.39 ± 1.49^{aAB}	11.33 ± 1.70^{aB}

Unauthenticated
Download Date | 9/25/17 11:10 AM

Tab. 4. Pearson's correlation coefficients between total phenolic, flavonoid, condensed tannin and iridoid content and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging capacity in different plant parts of four *Globularia* species collected from different locations. n = 48; statistically significant correlations are indicated by an asterisk (*) for $p < 0.05$ and three asterisks (***) for $p < 0.001$.

	DPPH	ABTS
Polyphenols	0.86***	0.83***
Flavonoids	0.32*	0.17
Tannins	0.08	0.05
Iridoids	0.22	0.20

Unauthenticated
Download Date | 9/25/17 11:10 AM

8. ŽIVOTOPIS

Maja Friščić rođena je 6. kolovoza 1987. u Zagrebu. Osnovnu školu završila je u Zaboku, a nakon toga IV. gimnaziju u Zagrebu prema dvojezičnom programu na engleskom jeziku. Studij farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2006. g. Zbog izvrsnog uspjeha od 2007. g. primala je Državnu stipendiju Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta RH, a 2010. g. dodijeljena joj je Rektorova nagrada za studentski znanstveni rad. Diplomirala je 2011. g. među deset najboljih studenata te je dobila stipendiju Instituta za njemački jezik i kulturu Sveučilišta Halle-Wittenberg. Odradila je pripravnički staž u ljekarni i 2012. g. položila stručni ispit pri Ministarstvu zdravlja.

Od 2012. g. zaposlena je na Zavodu za farmaceutsku botaniku Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta kao asistentica, gdje sudjeluje u izvođenju nastave iz kolegija Stanična biologija s genetikom i Farmaceutska botanika. Suradnica je na projektima prof. dr. sc. Kroate Hazler Pilepić. Poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti upisuje 2013. g. Kao dobitnica Ernst-Mach stipendije znanstveno se usavršavala na Institutu za farmaceutske znanosti Sveučilišta u Grazu.

Do sada je u koautorstvu objavila devet znanstvenih radova, od čega šest u časopisima koje citira baza Current Contents, te jedan stručni rad. Aktivno je sudjelovala na stranim i domaćim znanstvenim skupovima s tri usmena i deset posterskih priopćenja. Na jednom od međunarodnih skupova primila je drugu nagradu za najbolje usmeno izlaganje.

Održala je više radionica i prezentacija na Danima otvorenih vrata FBF-a i Festivalu znanosti, sudjelovala u organizaciji interaktivnih izložbi „Skriveni svijet ljekovitih biljaka“, kao i u organizaciji predstavljanja Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta na Smotri Sveučilišta u Zagrebu i Dana otvorenih vrata 2016. g. Bila je neposredni voditelj šest diplomskih radova.

Član je Hrvatske ljekarničke komore, Hrvatskog farmaceutskog društva, Hrvatskog mikroskopijskog društva i Hrvatskog botaničkog društva.

Znanstveni radovi objavljeni u časopisima koje citira baza Current Contents

1. **Friščić M**, Bucar F, Hazler Pilepić K. LC-PDA-ESI-MS^n analysis of phenolic and iridoid compounds from *Globularia* spp. J Mass Spectrom 2016; 51(12): 1211-1236.
2. Madunić J, Matulić M, **Friščić M**, Hazler Pilepić K. Evaluation of the cytotoxic activity of *Hypericum* spp. on human glioblastoma A1235 and breast cancer MDA MB-231 cells. J Environ Sci Health 2016; 51(13): 1157-1163.
3. **Crkvenčić M**, Dudaš S, Jerković I, Marijanović Z, Poljuha D, Hazler Pilepić K. Essential oil composition of three *Globularia* species. Chem Biodivers 2016; 13(2): 219-223.
4. Sertić M, **Crkvenčić M**, Mornar A, Hazler Pilepić K, Nigović B, Maleš Ž. Analysis of aucubin and catalpol content in different plant parts of four *Globularia* species. J Appl Bot Food Qual 2015; 88: 209-214.
5. Hazler Pilepić K, Maleš Ž, **Crkvenčić M**. Quantitative analysis of total flavonoids and total phenolic acids in thirty *Hypericum* taxa. Nat Prod Commun 2013; 8(3): 347-349.
6. Babić Ž, **Crkvenčić M**, Rajić Z, Mikecin AM, Kralj M, Balzarini J, Petrova M, Vanderleyden J, Zorc B. New sorafenib derivatives: Synthesis, antiproliferatve activity against tumour cell lines and antimetabolic evaluation. Molecules 2012; 17(1): 1124-1137.

Ostali znanstveni i stručni radovi

1. Hazler Pilepić K, **Friščić M**, Duran A, Maslo S, Garić R, Čuljak S, Šutalo K. Contribution to *Globularia* phylogeny based on nuclear ribosomal spacer and two chloroplast DNA regions. Period biol 2016; 118(4): 417-424.
2. Hazler Pilepić K, Antolković A, Maleš Ž, **Crkvenčić M**. Etnobotaničko istraživanje o uporabi biljaka u ljekovite svrhe na području Svetog Ivana Zeline. Farm glasnik 2015; 71(9): 459-466.
3. Maleš Ž, **Crkvenčić M**, Hazler Pilepić K, Herenda F. Istraživanje flavonoida, fenolnih kiselina i aminokiselina gole kilavice – *Herniaria glabra* L. Farm glasnik 2013; 69(11): 673-684.

Radovi u postupku objavljivanja

1. **Friščić M**, Maslo S, Garić R, Maleš Ž, Hazler Pilepić K. Comparative analysis of specialized metabolites and antioxidant capacity *in vitro* of different natural populations of *Globularia* spp. Acta Bot Croat, DOI: 10.1515/botcro-2017-0017.

9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za farmaceutsku botaniku
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorski rad

BOTANIČKA OBILJEŽJA, FITOKEMIJSKI PROFIL I BIOLOŠKI UČINCI VRSTA RODA *GLOBULARIA* L.

Maja Friščić

SAŽETAK

Vrsta *Globularia alypum* L. široko je primjenjivana biljna vrsta u narodnoj medicini mediteranskih zemalja i najbolje istražena predstavnica roda *Globularia* L. U okviru ovog doktorskog rada prvi je put provedeno opsežno usporedno istraživanje botaničkih obilježja, fitokemijskog profila i bioloških učinaka četiriju vrsta roda *Globularia*, koje je, uz vrstu *G. alypum*, uključivalo tri slabije istražene srodne vrste: *G. cordifolia* L. (*G. cordifolia* subsp. *cordifolia* (L.) Hayek), *G. meridionalis* (Podp.) O. Schwarz (*G. cordifolia* subsp. *bellidifolia* (Ten.) Wettst.) i *G. punctata* Lapeyr. Istraživanjem su obuhvaćeni uzorci 19 samoniklih populacija, sabrani u vrijeme cvatnje na području Hrvatske i okolice kroz više različitih sezona (do pet). U cilju procjene biomedicinskog potencijala slabije istraženih vrsta provedena je kvalitativna i kvantitativna kemijska analiza biološki aktivnih sastavnica primjenom različitih kromatografskih i spektroskopskih tehnika (TLC, HPLC-DAD-ESI-MS, LC-PDA-ESI-MS^n, UV/Vis spektrofotometrija, GC-FID, GC-MS), a prikladnim metodama u uvjetima *in vitro* ispitani su odabrani biološki učinci prethodno utvrđeni kod vrste *G. alypum* (antidijabetski, antioksidativni, protuupalni, antimikrobni i citotoksični). Navedenim istraživanjima prethodila su temeljna botanička istraživanja na ekološkoj, morfološkoj, histološko-anatomskoj, citološkoj i molekularnoj razini, kojima se u kombinaciji s fitokemijskim istraživanjima pokušalo pridonijeti rješavanju taksonomskog spora oko razdvojenosti vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis*. Sve četiri istraživane vrste pokazale su antidijabetski, antioksidativni, protuupalni, antimikrobni i citotoksični učinak u uvjetima *in vitro*, što je bilo moguće povezati s njihovim utvrđenim fitokemijskim profilima. Rezultati usporedbe fitokemijskog profila ukazali su na veću sličnost vrste *G. punctata* (podrod *Globularia*) s vrstom *G. alypum* (podrod *Abolaria*) od ostalih dviju vrsta (podrod *Abolaria*). Podjelu na podrodove nije podupirala ni usporedba histološko-anatomskih, molekularnih i fitokemijskih značajki, koja je ukazala na veću sličnost vrsta *G. cordifolia* i *G. meridionalis* s vrstom *G. punctata*. Također, kod uzoraka uključenih u ovo istraživanje nisu uočena karakteristična ekološka, morfološka, histološko-anatomska, citološka, molekularna ili fitokemijska obilježja koja bi podupirala razdvajanje na vrste *G. cordifolia* i *G. meridionalis*.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 399 stranica, 94 grafička prikaza, 45 tablica i 625 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Globularia*, biljni dijelovi, metode ekstrakcije, metanolni ekstrakti, ukupni fenoli, iridoidi, feniletanoidi, verbaskozid, flavonoidi, kondenzirane trjeslovine, eterično ulje, tandemska masena spektrometrija, svjetlosna mikroskopija, ESEM, 2C-vrijednost, broj kromosoma, ITS, *rbc*L, *trn*L-*trn*F, inhibicija α-glukozidaze, Hep G2, hiperglikemijski uvjeti *in vitro*, antioksidativni enzimi, glutation, DPPH, ABTS, inhibicija ciklooksigenaze-I, metoda difuzije iz bunarića, metoda mikrodilucije, MRSA, MDA-MB-231, A1235

Mentor: **Dr. sc. Kroata Hazler Pilepić**, *redovita profesorica, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Željan Maleš**, *redoviti profesor, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*
Dr. sc. Biljana Nigović, *redovita profesorica, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*
Dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek, *znanstvena savjetnica, PLIVA Hrvatska d.o.o.*

Rad prihvaćen: 18. listopada 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Pharmaceutical Botany
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Doctoral thesis

BOTANICAL CHARACTERISTICS, PHYTOCHEMICAL PROFILE AND BIOLOGICAL EFFECTS OF *GLOBULARIA* L. SPECIES

Maja Friščić

SUMMARY

Globularia alypum L. is a plant species widely used in folk medicine of Mediterranean countries and the best explored representative of the genus *Globularia* L. In this doctoral thesis, a comprehensive comparative study of botanical characteristics, phytochemical profile and biological effects of four *Globularia* species, which, apart from *G. alypum*, included three less explored related species: *G. cordifolia* L. (*G. cordifolia* subsp. *cordifolia* (L.) Hayek), *G. meridionalis* (Podp.) O. Schwarz (*G. cordifolia* subsp. *bellidifolia* (Ten.) Wettst.) and *G. punctata* Lapeyr., was conducted for the first time. Samples from 19 natural populations, collected during flowering time in Croatia and surrounding area in several different seasons (up to five), were used in this study. In order to evaluate the biomedical potential of less investigated species, qualitative and quantitative chemical analyses of biologically active constituents were conducted using different chromatographic and spectroscopic techniques (TLC, HPLC-DAD-ESI-MS, LC-PDA-ESI-MS^n, UV/Vis spectrophotometry, GC-FID, GC-MS), while suitable *in vitro* methods were used to evaluate selected biological effects, previously established for *G. alypum* (antidiabetic, antioxidative, anti-inflammatory, antimicrobial and cytotoxic). The aforementioned research was preceded by basic botanical research on ecological, morphological, histo-anatomical, cytological and molecular level, by which, in combination with the phytochemical research, an attempt was made to contribute to the resolution of the taxonomic dispute over the separation of the species *G. cordifolia* and *G. meridionalis*. All four examined species showed antidiabetic, antioxidative, anti-inflammatory, antimicrobial and cytotoxic activity *in vitro*, which could be linked to their established phytochemical profiles. The results of the comparison of phytochemical profiles showed greater similarity of *G. punctata* (subgenus *Globularia*) to *G. alypum* (subgenus *Abolaria*) than those of the other two species (subgenus *Abolaria*). The division into subgenera was also not supported by the comparison of histo-anatomical, molecular and phytochemical characteristics, which indicated greater similarity of *G. cordifolia* and *G. meridionalis* to *G. punctata*. Moreover, no ecological, morphological, histo-anatomical, cytological, molecular or phytochemical characteristics, that would support the separation of *G. cordifolia* and *G. meridionalis* into different species, were observed for the samples included in this study.

The thesis is deposited in the Central Library of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb.

Thesis includes: 399 pages, 94 figures, 45 tables and 625 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Globularia*, plant parts, extraction methods, methanolic extracts, total phenolics, iridoids, phenylethanoids, verbascoside, flavonoids, condensed tannins, essential oil, tandem mass spectrometry, light microscopy, ESEM, 2C-value, chromosome number, ITS, *rbc*L, *trn*L-*trn*F, α-glucosidase inhibition, Hep G2, hyperglycemic conditions *in vitro*, antioxidant enzymes, glutathione, DPPH, ABTS, cyclooxygenase-I inhibition, well-diffusion method, microdilution method, MRSA, MDA-MB-231, A1235

Mentor: **Kroata Hazler Pilepić**, **Ph.D.,** *Full Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb*.

Reviewers: **Željan Maleš**, **Ph.D.,** *Full Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb*.
Biljana Nigović, **Ph.D.,** *Full Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb*.
Biserka Cetina-Čižmek, **Ph.D.,** *Scientific Advisor, PLIVA Croatia Ltd.*

The thesis was accepted: 18th October 2017