

Универзитет „Св. Кирил и Методиј“



Природно-математички факултет - Скопје

Институт за хемија

М-р Менче Најдоска - Богданов

**ПРОУЧУВАЊЕ НА ХЕМИСКИОТ СОСТАВ НА *FOENICULUM  
VULGARE* ОД МАКЕДОНИЈА СО ПРИМЕНА НА  
ХРОМАТОГРАФСКИ МЕТОДИ**

Докторска дисертација

Скопје, 2016

**МЕНТОР:**

Проф. д-р Марина Стефова, редовен професор,  
Природно-математички факултет, Скопје

**ЧЛЕНОВИ НА КОМИСИЈАТА:**

Проф. Д-р Зоран Здравковски, редовен професор на  
Природно-математички факултет - Скопје

Академик Д-р Владо Матовски, редовен професор  
на Природно-математичкиот факултет - Скопје, член  
на Македонската академија на науките и  
уметностите, Скопје

Д-р Наташа Ристовска, доцент на Природно-  
математичкиот факултет – Скопје

Д-р Јасмина Петреска Станоева, доцент на  
Природно-математички факултет - Скопје

Проф. Д-р Марина Стефова, редовен професор на  
Природно-математичкиот факултет - Скопје

*Дата на одбраната:*

\_\_\_\_\_

*Дата на промоцијата:*

\_\_\_\_\_

*Област:*

**ХЕМИЈА**

## БЛАГОДАРНОСТ

Ја изразувам мојата искрена благодарност до мојот ментор Проф. Д-р Марина Стефова за помошта, постојаното насочување и поддршка кои ми ги пружи во текот на годините на изработка на оваа докторска дисертација.

Исто така, искрено се заблагодарувам и на членовите на рецензентската комисија: Проф. Д-р Зоран Здравковски, Академик Владо Матовски, Д-р Наташа Ристовска и Д-р Јасмина Петреска Станоева, кои со своите забелешки придонесоа кон сеопшто подобрување на истата.

Особено се заблагодарувам на Академик Владо Матовски за знаењето и помошта кои ми ги пружи во текот на собирањето и идентификација на примероците од *Foeniculum vulgare* Mill.

Благодарност изразувам и до мојот сопруг, Проф. Д-р Јане Богданов, за сите добронамерни сугестии и помош кои придонесоа изработката на овој труд да биде подобра.

Огромна благодарност изразувам и до членовите на две семејства, Најдоски и Богданови, бидејќи секој од нив на свој начин допринесе до можноста за реализација на овој труд. Овде изразувам благодарност до Љубомир, Снежана и Ивана Најдоски за целата помош, поддршка и разбирање кои ми ги пружија во текот на годините на мојата работа. Особено и се заблагодарувам на мојата мајка Снежана Најдоска, без чија бескрајна помош изработката на овој труд ќе беше особено тешка.

Скопје, март, 2016  
Менче Најдоска - Богданов

## ПРОУЧУВАЊЕ НА ХЕМИСКИОТ СОСТАВ НА *Foeniculum Vulgare* ОД МАКЕДОНИЈА СО ПРИМЕНА НА ХРОМАТОГРАФСКИ МЕТОДИ

### Апстракт:

*Foeniculum vulgare* Mill. (анасон) припаѓа на фамилијата *Apiaceae* и има комерцијална вредност. Потекнува од Медитеранскиот регион, но се распространило во повеќе региони во светот. Во ова истражување се проучувани повеќе од четириесет примероци на анасон (диворастечки и одгледувани) од различни локации во Р. Македонија со цел определување на диверзитетот на видовите од морфолошки и хемиски аспект и определување на квалитетот во поглед на нивната употреба во медицински цели или како додаток на храна. Примероците беа анализирани за испарливите секундарни метаболити, фенолни/полифенолни соединенија и масно-киселински состав. Одгледуваните вариетети имаат најголема застапеност на *trans*-анетол (над 75%) и ниска застапеност на фенхон (под 2%). Инфрацрвената спектроскопија (ATR-FTIR) е користена за првична квалитативна проценка на етеричното масло.

Хемискиот состав на етеричните масла е одреден со гасна хроматографија (GC-FID, колона SP2560, 100 m, 0,25 mm i.d., 0,20  $\mu$ m и GC-MS, колона HP5-MS 30 m, 0,25 mm i.d., 0,25  $\mu$ m) со користење на автентични стандарди. Главните компоненти во етеричното масло од сладок анасон (вариетет *dulce*) беа: *trans*-анетол (>80%), естрагол (<6%), лимонен (<6%), анисалдехид (<1%) и фенхон (<1,5%). Анализирани примероци од диворастечкиот анасон имаат варијабилен состав, и генерално имаат повисока содржина на фенхон (> 8%). Развиена е алтернативна метода за истовремена екстракција и анализа на испарливата и неиспарливата неполарна фракција од плодовите на анасон. Екстракцијата од примероците беше направена со смеса од 3:1 (V/V) *n*-хексан и дихлорометан проследена со трансестерификација на екстрактот без испарување на растворувачот. Овој раствор содржи компоненти од етеричното масло и метил естери на масни киселини кои беа карактеризирани со гасно хроматографски методи (GC-FID и GC-MS). Главните масни киселини беа C<sub>18:1</sub> позиционите изомери петроселинска и олеинска киселина (75,0-82,8%). Разликите во хемискиот состав на испарливата фракција по екстракција и естерификација се минорни во споредба со хемискиот состав на чистите етерични масла што укажува дека испарливите компоненти не претрпеле хемиска трансформација во текот на екстракцијата и дериватизацијата и развиената метода може да се користи за истовремена анализа на испарливите секундарни метаболити и масните киселини.

За анализа и споредба на испарливата фракција од анасон со мало количество на примерок развиена е статична хедспејс гасно хроматографска метода (SHS-GC-FID, HP-5 колона 30 m, 0,25 mm i.d., 0,25  $\mu$ m) и споредена е со „стандардната“ метода хидродестилација/GC анализа (HD/GC). При проучувањето на примероците постари од 3 години се детектирани нови продукти: лимонен оксид, карвон и карвеол, како и *threo*-анетол  $\beta$ -хидрокси метил етер, *erythro*-анетол  $\beta$ -хидрокси метил етер и анетол гликол. Релативната застапеност на главните компоненти добиена со двете методи е споредлива до 3 години на чување на плодовите од анасон и може да се користи било која од двете методи зависно од намената и количеството на растителен материјал. За проучување на стабилноста, изведено е прелиминарно испитување на фотохемиското однесување на *trans*-анетол паралелно со етерично масло од сладок анасон (со 85% *trans*-анетол), кои беа паралелно изложени на сончева светлина, а потоа анализирани со GC-MS. Кај чистиот *trans*-анетол доминантен процес беше димеризацијата, додека кај етеричното масло доминантен процес беше изомеризацијата до *cis*-анетол.

Во последната фаза од испитувањата, примероците од анасон беа екстрахирани со 70% воден метанол и анализирани со развиена HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> метода со цел да се одреди полифенолниот профил. Од фенолните киселини беше идентификувана хидроксибензоевата киселина, а од хидроксициметните киселини беа идентификувани изомери на кафеоилхинска и дикафеоилхинска киселина, како и нивни деривати со остаток од малонска киселина. Главната компонента со флавоноидна структура и најголема застапеност кај примероците беше кверцетин-3-*O*-глукуронид.

**Клучни зборови:** *Foeniculum vulgare* Mill., хемиски состав, етерично масло, масно-киселински профил, гасна хроматографија, GC-FID, GC-MS, HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>

## STUDY OF CHEMICAL COMPOSITION OF *Foeniculum Vulgare* FROM MACEDONIA USING CHROMATOGRAPHIC METHODS

### Abstract:

Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) is commercially valuable plant from the *Apiaceae* family. It originates from the Mediterranean basin, but has spread to several areas in the world. In this work, more than forty samples of fennel (wild and cultivated) have been collected from different locations in Macedonia, and were analyzed in order to determine the diversity between species from both, morphological and chemical point of view, as well as determination of the quality in terms of their use in medicinal purposes and as food additive. The samples were analyzed for volatile secondary metabolites, polyphenolic compounds and fatty acid composition. The cultivated varieties have the highest content of *trans*-anethole (above 75%) and low content of fenchone (< 2%). IR spectroscopy (ATR-FTIR) was found as valuable for initial qualitative assessment of the essential oils.

The chemical composition was determined using gas chromatography with flame-ionization detection (GC-FID, column SP2560, 100 m, 0.25 mm i.d., 0.20  $\mu$ m) and with mass spectrometric detection (GC-MS, column HP-5MS, 30 m, 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu$ m) using authentic standards. The main components of the essential oil of sweet fennel were identified as: *trans*-anethole (>80%), estragole (<6%), limonene (<6%), anisaldehyde (<1%) and fenchone (<1%). The analyzed samples of wild fennel had a variable composition, but in general had a higher content of fenchone (>8%). An alternative method for extraction and analysis of both volatile and non-volatile nonpolar fractions was developed. The extraction was carried out using 3:1 (V/V) *n*-hexane and dichloromethane followed by transesterification of the extract without prior evaporation of the solvents. The extracts obtained with this procedure, containing the components of the essential oil and fatty acids methyl esters were characterized using GC-FID and GC-MS. The dominant fatty acids were found to be C<sub>18:1</sub> positional isomers (petroselinic and oleic acid), and their content in the analyzed samples was in range from 75.0-82.8%. The differences in chemical composition of volatile fraction after extraction and transesterification were very similar to the ones obtained for the pure essential oils implying that the volatile components did not undergo chemical transformation during extraction and derivatization and the developed sample preparation method can be used for simultaneous determination of volatile components and fatty acids in fennel.

For analysis and comparison of fennel volatile fraction, a static headspace gas-chromatographic method (SHS-GC-FID, HP-5 column 30 m, 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu$ m) was developed and compared with the "standard" hydrodistillation/GC method (HD/GC). As the fennel fruit ages, new products such as limonene oxides, carvone and carveole were detectable and other biosynthesized products were also present: *threo*-anethole  $\beta$ -hydroxy methylether, *erythro*-anethole  $\beta$ -hydroxy methylether and anethole glycol. The relative abundance of the major components is quite comparable between these two methods for fennel fruits up to 3 years from the harvest (HD/GC, SHS-GC-FID) and they can be used interchangeably depending on the purpose and amount of material. In order of further testing of the stability of the volatiles, photochemical behavior of pure *trans*-anethole was compared to that of sweet fennel essential oil (85% *trans*-anethole content) by exposing each to sunlight for different time intervals and then analyzing them by GC-MS. In the case of pure *trans*-anethole the dominant process was found to be dimerization, whereas for the essential oil the dominant process was isomerization to *cis*-anethole.

In the last stage of the study, fennel samples were extracted with 70% methanol and analyzed using HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> to determine the polyphenolic profile. Hydroxybenzoic acid together with derivatives of hydroxycinnamic acids such as isomers of caffeoylquinic and dicaffeoylquinic acid were determined, as well as their malonyl derivatives. The main flavonoid component that was detected in all analyzed samples was quercetin-3-*O*-glucuronide.

**Key words:** *Foeniculum vulgare*, chemical composition, essential oil, fatty acid profile, polyphenols, gas chromatography, GC-FID, GC-MS, HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>

## ЛИСТА НА КРАТЕНКИ

<b>amu</b>	atomic mass units (атомски масени единици)
<b>ANOVA</b>	Analysis of Variance (Анализа на варијабилност)
<b>APCI</b>	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (хемиска јонизација под атмосферски притисок)
<b>ATR</b>	Attenuated Total Reflectance (придушена тотална рефлектанца)
<b>FTIR</b>	Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Fourier-ова трансформација инфрацрвена спектроскопија)
<b>CI</b>	Chemical Ionization (хемиска јонизација)
<b>DAB</b>	Deutsches Arzneibuch (Германска фармакопеја)
<b>DAD</b>	Diode Array Detector (детектор со низа на диоди)
<b>EI</b>	Electron Impact Ionization (јонизација со бомбардирање со електрони)
<b>EI/CI-MSD</b>	Electron Ionization/Chemical Ionization - Mass Detection (Јонизација со електрони/Хемиска јонизација - масена детекција.)
<b>EMA</b>	European Medicines Agency (Европска агенција за лекови)
<b>EO</b>	Essential oil (етерично масло)
<b>ESI</b>	Electrospray ionization (електроспреј јонизација)
<b>FAMES</b>	Fatty Acid Methyl Esters (метил естери на масни киселини)
<b>FID</b>	Flame Ionization Detector (пламен-јонизациски детектор)
<b>GC</b>	Gas Chromatography (гасна хроматографија)
<b>GC-FID</b>	Gas Chromatography - Flame Ionization Detection (гасна хроматографија спрегната со пламен јонизациски детектор)
<b>GC-MS</b>	Gas Chromatography-Mass Spectrometry (гасна хроматографија спрегната со масена спектрометрија)
<b>HD/GC</b>	Hydrodistillation/Gas Chromatography (хидродестилација проследена со гасна хроматографија.)
<b>HPLC</b>	High Pressure Liquid Chromatography (високо ефикасна течна хроматографија)
<b>MS<sup>n</sup></b>	Tandem Mass Spectrometry (тандем масена спектрометрија.)
<b>HS-GC</b>	Headspace Gas Chromatography (хедспејс гасна хроматографија)

<b>HSME</b>	Headspace Microextraction (хедспејс микроекстракција)
<b>i.d.</b>	internal diameter (внатрешен дијаметар)
<b>IUPAC</b>	International Union of Pure and Applied Chemistry (Интернационална унија на чиста и применета хемија)
<b>IR</b>	Infrared Spectroscopy (инфрацрвена спектроскопија)
<b>IT</b>	Ion Trap (јонска стапица)
<b>LC-MS</b>	Liquid Chromatography Mass Spectrometry (течна хроматографија спрегната со масена спектрометрија)
<b>MS</b>	Mass Spectrometry (Масена спектрометрија)
<b>NIR</b>	Near-Infrared (блиска инфрацрвена спектроскопија)
<b>NIST</b>	National Institute of Standards and Technology (Национален институт за стандарди и технологија)
<b>NMR</b>	Nuclear Magnetic Resonance (нуклеарно магнетна резонанца)
<b>Ph.Eur.</b>	Pharmacopoeia Europaea (Европска фармакопеја)
<b>PTFE</b>	Poly(tetrafluoroethylene) (политетрафлуоро етилен)
<b>SC-CO<sub>2</sub></b>	Super critical – carbon dioxide (суперкритичен CO <sub>2</sub> )
<b>SD</b>	Standard deviation (стандрдна девијација)
<b>SDE</b>	Simultaneous distillation/extraction (едновремена дестилација/екстракција)
<b>SFE</b>	Supercritical Fluid Extraction (суперкритична екстракција на флуиди)
<b>SHS-GC</b>	Static Headspace Gas Chromatography (статична хедспејс гасна хроматографија)
<b>SPE</b>	Solid Phase Extraction (екстракција од цврста фаза)
<b>SPME</b>	Solid-phase microextraction (цврсто-фазна микроекстракција)
<b>UV</b>	Ultraviolet (ултравиолетов)
<b>UV-VIS</b>	Ultraviolet-Visible (ултравиолетов-видлив)

# СОДРЖИНА

<b>1. ВОВЕД</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ТЕОРЕТСКИ ДЕЛ</b> .....	<b>9</b>
2.1. <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. – таксономија, морфолошки карактеристики и примена..	9
2.2. Хемиски состав на плодот од <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. и диференцијација меѓу таксоните во рамките на видот .....	11
2.2.1. <i>Хемиски состав и својства на етеричното масло</i> .....	16
2.2.2. <i>Промени во составот на етеричното масло со стареење на плодот – формирање на секундарни оксидациони продукти</i> .....	25
2.2.3. <i>Фотохемиски промени кај чист trans-анетол и изолирано етеричното масло од плодот на сладок анасон</i> .....	27
2.2.4. <i>Хемиски состав и својства на неполярни неиспарливи смеси (растително масло/фиксно масло), методи за екстракција и анализа</i> .....	28
2.2.5. <i>Хемиски состав и својства на неиспарливи поларни класи соединенија (полифеноли), методи за екстракција и анализа</i> .....	30
<b>3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДЕЛ</b> .....	<b>39</b>
3.1. Материјали и методи.....	39
3.2. Растворувачи и реагенси.....	44
3.2.1. <i>Автентични стандарди за идентификација на компонентите од етеричното масло</i> .....	44
3.2.2. <i>Автентични стандарди за идентификација на компонентите од фиксното масло и внатрешни стандарди за квантификација на компонентите од етеричното и фиксното масло</i> .....	44
3.2.3. <i>Растворувачи и други реагенси потребни за подготовка на неполярната фракција за хроматографска анализа</i> .....	44
3.2.4. <i>Стандарди за идентификација и квантификација на испарливи секундарни оксидациони продукти</i> .....	44
3.2.5. <i>Растворувачи и реагенси потребни за синтеза на стандардите за идентификација и квантификација на испарливите оксидациони продукти</i> ....	45
3.2.6. <i>Растворувачи и реагенси користени за испитување на фотохемиската стабилност на trans-анетол и етерично масло изолирано од сладок анасон</i> .....	46
3.2.7. <i>Растворувачи користени за екстракција и разделување на полифеноли</i> ...	46
3.3. Подготовка на стандарди.....	47
3.3.1. <i>Подготовка на смеса од стандарди за идентификација на компонентите од етеричното масло</i> .....	47
3.3.2. <i>Подготовка на стандарди за едновремена идентификација на компонентите од етеричното и фиксното масло</i> .....	47
3.3.3. <i>Синтези на стандарди од испарливи секундарни продукти</i> .....	48

3.3.3.1 Синтеза на <i>trans</i> -анетол епоксид (Mohan и Whalen, 1993).....	48
3.3.3.2 Синтеза на 1,2-дихидрокси-1-(4-метоксифенил)пропан .....	48
3.3.3.3 Синтеза на 1-метокси-1-(4-метоксифенил)пропан2-ол .....	49
3.4. Подготовка на примероците за анализа .....	49
3.4.1. <i>Изолација на етерично масло</i> .....	49
3.4.2. <i>Soxhlet екстракција и трансестерификација</i> .....	50
3.4.3. <i>Подготовка на примероците за испитување на фотохемиска стабилност</i> .....	51
3.4.4. <i>Изолација на полифеноли со смеса од метанол и вода</i> .....	51
3.5. Користена инструментација за анализа на примероците .....	51
<b>4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА .....</b>	<b>55</b>
4.1. <i>Изолација и прелиминарна анализа на етеричното масло</i> .....	55
4.1.1. <i>Развивање GC-FID метода за разделување и идентификација на компонентите од етеричното масло на високо поларна колона</i> .....	59
4.1.2. <i>Развивање GC-MS метода за разделување и идентификација на компонентите од етеричното масло</i> .....	63
4.1.3. <i>Развивање SHS-GC-FID метода за разделување и идентификација на компонентите од плодот на <i>Foeniculum Vulgare Mill.</i></i> .....	65
4.1.4. <i>Споредба на резултатите добиени од GC анализа на испарливите компоненти од плодот на <i>Foeniculum vulgare Mill.</i></i> .....	66
4.2. <i>Развивање метода за едновремена екстракција на фиксното и етеричното масло и идентификација на компонентите со GC-FID и GC-MS</i> .....	70
4.3. <i>Споредба на методите преку статистичка обработка на добиените податоци</i> .....	77
4.4. <i>Определување на промената на хемискиот состав на етеричното масло како функција од степенот на старост на плодовите од <i>Foeniculum vulgare Mill</i></i> .....	80
4.4.1. <i>GC-FID и GC-MS анализи на етеричното масло изолирано од плодот на <i>Foeniculum vulgare Mill.</i></i> .....	81
4.4.2. <i>SHS-GC-FID метода за разделување на компонентите и докажување на биосинтетизирани поларни секундарни продукти кај старите примероци</i> .....	86
4.4.3. <i>Докажување на потеклото на поларните компоненти присутни во етеричното масло</i> .....	92
4.5. <i>Фотохемиска стабилност на <i>trans</i>-анетол и етерично масло од <i>Foeniculum vulgare Mill</i></i> .....	95
4.6. <i>Хемиски состав на испарлива фракција од диворастечки <i>Foeniculum vulgare Mill.</i> од Македонија</i> .....	101
4.7. <i>Развивање HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> метода за разделување на поларните компоненти</i> .104	
4.8. <i>Хемиски состав на поларната фракција изолирана од плодот на <i>Foeniculum vulgare Mill.</i></i> .....	106
4.8.1. <i>Идентификација на хидроксибензоеви и хидроксициметни киселини и нивни деривати</i> .....	109
4.8.2. <i>Идентификација на флавоноиди</i> .....	118
<b>5. ЗАКЛУЧОК .....</b>	<b>123</b>

<b>6. ЛИТЕРАТУРА .....</b>	<b>127</b>
<b>7. ПРИЛОГ .....</b>	<b>138</b>
7.1. Преглед на анализирани примероци <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. ....	139
7.2. Инфрацрвени спектри на чисти главни компоненти присутни во етерично масло од анасон и репрезентативни примероци од изолирани етерични масла.....	141
7.3. Анализирани репрезентативни примероци од <i>F. vulgare</i> Mill. ....	146
7.4. Синтетизирани соединенија за потврда на идентитетот на секундарните продукти .....	163
7.4.1. Подготовка на смеса од threo/erythro-1-(4-метоксифенил)-1,2-дихидрокси пропан (Carteau et al., 2007). ....	163
7.4.2. Подготовка на смеса од threo/erythro-1-метокси-1-(4- метоксифенил)пропан-2-ол (Waumans et al., 2003).....	165
7.5. Прилог репрезентативни хроматограми од HPLC-DAD анализи на дадени примероци <i>Foeniculum vulgare</i> Mill.....	169

## 1. ВОВЕД

Поголемиот број растителни видови кои припаѓаат на фамилијата *Apiaceae* (*Umbelliferae*) се познати по нивната примена како хербални лекови и како зачини за храна и пијалоци. Меѓу нив видот *Foeniculum vulgare* Mill. (анасон) е добро познато двегодишно или повеќегодишно растение, кое потекнува од медитеранскиот регион, но во текот на еден долг временски период, заради неговата примена како хербален лек, е натурализиран и распространет во многу делови од светот (Azeez, 2008; Weiss, 2002). Во рамките на видот *Foeniculum vulgare* Mill. се издиференцирани и опишани два подвида (subspecies, subsp.) - subsp. *piperitum* и subsp. *vulgare*. Најзначајните диференцијални разлики помеѓу двата подвида се манифестираат во морфолошките карактеристики на листовите. Листовите на подвидот *piperitum* се долги и имаат триаголна форма, со ригидни, кратки и месести сегменти (Czygan, 1989; Brand, 1993). Во рамките на подвидот *vulgare*, се издвоени три вариетети (varieties, var.), и тоа: var. *dulce*, var. *vulgare* и var. *azoricum*. Вариететот *dulce* (*Foeniculum vulgare* var. *dulce*), најмногу е застапен во медитеранските земји, var. *vulgare* е повеќе застапен во западноевропските земји, додека var. *azoricum* е познат за јужниот дел на Италија (Miraldi, 1999; Piccaglia и Marotti, 2001). Подвидот *vulgare* се одгледува главно во Русија, Унгарија, Германија, Франција, Италија, Индија и САД, додека подвидот *piperitum* може да се сретне во земји со медитеранска клима, најчесто во Турција, Франција, Италија и Шпанија (Badoc et al., 1994; Krüger и Hammer, 1999; Figueredo et al., 2011; Muckensturm et al., 1997; Bernath и Nemeth, 2007).

На територијата на Р. Македонија анасонот е застапен како диворастечко, но и како култивирано растение. Според податоците на Мицевски и Матевски (2005) презентирани при обработката на родот *Foeniculum* во едицијата Флора на Република Македонија, за територијата на Република Македонија се наведуваат subsp. *vulgare* и subsp. *piperitum*. При тоа, subsp. *vulgare* е регистриран во Скопје (Гази Баба), Охрид (Канео) и во струмичкиот регион, додека subsp. *piperitum* претставува ретко растение на територијата на Р. Македонија, кое според истите автори е забележано во гевгелискиот регион (Мицевски и Матевски, 2005). Според податоците со кои се располага var. *azoricum* не е познат за територијата на Р. Македонија. Најчесто култивиран вариетет на територијата на Р. Македонија е var. *dulce*.

*Foeniculum vulgare* Mill. сè уште се користи кај медитеранските народи како хербален лек и како додаток на храна и пијалоци. И денес неговите плодови и листови главно се користат како зачини, давајќи им на храната и пијалоците силен вкус и арома. Освен во кулинарската пракса, документирана е и нивната примена во козметичката индустрија (Dervendji, 1986). Споменатите својства биле припишувани главно на компонентите кои ги содржи етеричното масло, кое се наоѓа во фоликули сместени во самиот плод на растението. Хербалните препарати добиени од плодот на слаткиот анасон се познати по својата диуретска, аналгетска, антипиретска и антиоксидациска активност. Поновите истражувања за фармаколошката активност на компонентите застапени во зрелиот и сув плод, кој често може во литературата да биде именуван и како семе, покажал антимикуробни, карминативни, експекторансни и стимулативни својства (Weiss, 2002). Подготвените водни екстракти од плодот, најчесто се користат како антиспазмодици и при третман на диспептични тегоби (Weiss, 1997), но исто така и за третман на катаракта на горниот респираторен тракт (Weiss, 1997; Brand, 1993; Forster et al., 1980).

Исто така, спроведените студии на водните екстракти од хербалниот лек, но и на самото етерично масло, кои освен хепатопротективните својства (Ozbek et al., 2003) ги потврдиле и неговите антиинфламаторни, аналгетски и антиоксидациски својства (Choi и Hwang, 2004). Последните истражувања покажале дека екстрактите добиени од плодот на анасон имаат и антиканцерогени својства (Rather et al., 2012). Истражувањата кои биле спроведени на одделни компоненти присутни во плодот од анасон, покажале дека делуваат инхибиторно на растот на патогени бактерии и мувли. Секретолитичкиот и експекторансниот ефект на две компоненти, имено *trans*-анетол и естрагол, ја потврдуваат неговата традиционална употреба при настинки поврзани со кашлица. Студиите покажале и дека димерите на анетол, т.е. дианетол и фотоанетол се одговорни за естрогената активност на плодот/етеричното масло од *Foeniculum vulgare* Mill. (ЕМЕА, 2010).

Голем број истражувања биле направени заради определување на структурата на компонентите присутни во различни делови од растението, а потоа и карактеризирање на фармаколошката активност на хербалните препарати кои ги содржат овие компоненти. Како водечки за ваквите студии, биле користени гасни и течни хроматографски методи, во зависност од природата на добиените екстракти. Водејќи се според добиените резултати (Jodral, 2004; Azeez, 2008; Pacifico et al., 2015)

листовите содржат главно полифенолни компоненти (поларни соединенија, растворливи во вода и други поларни растворувачи), додека кај плодот од растението, најчесто е испитуван хемискиот состав на етеричното масло кое е составено главно од фенилпропаноиди и монотерпеноиди. Исто така, различни истражувачки групи ги карактеризирале полифенолните компоненти екстрахирани од плодот на *Foeniculum vulgare* Mill., каде како најзастапени се споменуваат различни флавоноиди, нивни глукозиди, како и фенолни киселини (Kitajima et al., 1998a; Kitajima et al., 1998b; Bilia et al., 2000; De Marino et al., 2007). Најмал број истражувања се направени на неиспарливото или т.н. фиксно масло, кое главно содржи триглицериди на заситени и незаситени масни киселини. Фитохемиските студии биле спроведени со помош на различни техники за екстракција на компонентите од интерес, а потоа истите биле карактеризирани со соодветни хроматографски техники.

Исто така, голем број студии на етеричното масло изолирано од плодот на *Foeniculum vulgare* Mill. биле извршени заради определување на хемискиот профил на етеричното масло изолирано од плодот на различните вариетети на *Foeniculum vulgare* Mill. од различно географско потекло (Miraldi, 1999; Barazani et al., 2002; Gross et al., 2009). Различни методи се користени за екстракција и концентрирање на испарливата фракција добиена од плодот на ова растение, меѓу кои дестилација со водна пара, хидродестилација, Soxhlet екстракција, SDE, хедспејс-техники и екстракции со суперкритични флуиди (SFE) (Yamini et al., 2002; Coelho et al., 2003; Damjanović et al., 2005; Križman et al., 2007; Tschiggerl и Bucar, 2010; Diaz-Maroto et al., 2005). По голем број од споменатите техники се користат за добивање екстракти од испарливата фракција на аналитичка скала, додека дестилација со водна пара, хидродестилација, како и екстракција со суперкритичен CO<sub>2</sub> се користат за добивање на етеричното масло во индустриски размери.

Резултатите од овие анализи покажале дека кај етеричното масло од анасон најзастапени се фенилпропаноиди и монотерпеноиди (Ravid et al., 1983; Brand, 1993, Bernath et al., 1994; Trenkle, 1972; Azeez, 2008; Jodral, 2004), чија содржина варира помеѓу видовите. Најзастапена компонента е *trans*-анетол, а потоа лимонен, естрагол и фенхон, додека како помалку застапени компоненти се пинени, мирцен, терпинен, феландрен. Етеричните масла изолирани од различните подвидови/вариетети, обично содржат мал процент  $\alpha$ -пинен,  $\beta$ -пинен,  $\beta$ -мирцен,  $\gamma$ -терпинен, *p*-цимен, 1,8-цинеол. Од сите споменати вариетети, вариететот *dulce* најмногу се користи како додаток на храна

и пијалоци. Слатката арома на етеричното масло од овој сорт е резултат на ниската содржина на фенхон, но висока содржина на *trans*-анетол. Освен во плодот на растението, компоненти од етеричното масло може да се сретнат практично во сите негови делови (Diaz-Maroto et al., 2006; Gross et al., 2009). Составот на етеричното масло, како и застапеноста на компонентите варира во различни делови на растението, испитувано во различни стадиуми на развој на истото (Telci et al., 2009).

Определувањето на хемискиот профил на етеричното масло изолирано од плодот на ова растение, може да послужи и како дополнителна информација за определување на хемотаксономијата на растението, во придружба со одредувањето на видот на растението од ботаничко-морфолошки аспект. Според монографијата за *Foeniculum vulgare* Mill. дадена во Европската фармакопеја 8.5, приносот на етеричното масло изолирано од сортот *vulgare* (горчлив анасон) потребно е да изнесува минимум 4,0 mL/kg, и да содржи од 55,0-75,0 % *trans*-анетол, од 12,0-25,0 % фенхон, естрагол максимум 6,0 % и анисалдехид максимум 2,0 %. Приносот на етеричното масло од сортот *dulce* (сладок анасон) треба да изнесува минимум 2,0 mL/kg и да содржи минимум 80,0 % *trans*-анетол, максимум 10,0 % естрагол и максимум 7,5 % фенхон. Приносот на етеричното масло како и застапеноста на овие компоненти е различна кај останатите сортови и подвидови, при што клучен фактор се генетските предиспозиции на растението, географското потекло, климатските услови, земјоделската практика, како и времето на берба на плодовите (Bernath et al., 1994; Miraldi, 1999; Diaz-Maroto et al., 2006; Raal et al., 2011). Дополнително, ефикасноста, квалитетот, како и токсиколошките својства на екстрактите од анасон наменети за конзумација, се засновани на застапеноста на главните компоненти. Во последната декада, содржината на естрагол е особено важен параметар, бидејќи истражувањата јасно ги покажале канцерогените својства кои ги поседува оваа компонента (Guenther и Luo, 2001; Bristol, 2011; Martins et al., 2012). Според Европската фармакопеја 8.5 (Ph. Eur. 8.5), максималната граница на застапеност на естрагол во етерично масло од плодот на сортот *dulce* изнесува 10,0 %.

Освен како извор на етерично масло, важно е да се напомене дека зрелите плодови од анасон може да се користат и како извор на растително (фиксно) масло. Неговата содржина изнесува приближно 12,0 %, според истражувањата на (Cosge et al., 2008b) и содржи триглицериди на заситени и незаситени масни киселини. Според истражувањата на (Reiter et al., 1998), приносот на фиксното масло од плодот на анасон

изнесува од 8,0-24,0 %, чија вредност зависи од потеклото на примерокот, како и начинот и условите на екстракција. Составот на масните киселини бил определен со помош на хроматографски техники, со претходна дериватизација на триглицеридите до метил, изопропил или бутил естери на соодветните масни киселини. Идентификувани заситени масни киселини (т.е нивни естери) кои биле изолирани од плодот на *Foeniculum vulgare* Mill. се миристинска (14:0), палмитинска (16:0), стеаринска (18:0) и арахидна киселина (20:0). Карактеризирани незаситени масни киселини биле трите положбени изомери на октадекенска киселина [петроселинска (6с-18:1), олеинска (9с-18:1) и ваценска киселина (11с-18:1)], потоа, лиолна (9с, 12с-18:2) и лиоленска (9с, 12с, 15с-18:3) киселина. (Cosge et al., 2008b; Reiter et al., 1998). Според резултатите добиени од истражувањата, плодовите од видовите кои припаѓаат на фамилијата *Ariaceae*, се богати со петроселинска киселина (6с-18:1), (Kleiman, 1982) и се смета дека доколку се намалат изворите на лауринска и адипинска киселина, или пак побарувачката за овие соединенија стане многу поголема, петроселинската киселина може да стане нивен важен синтетички прекурсор. Содржината на петроселинската киселина (6с-18:1) во плодот од анасон изнесува приближно 80,0 %, според (Reiter et al., 1998) во зависност од видот и географските услови под кои е одгледувано самото растение (Kleiman и Spencer, 1982).

Профилот на етеричното масло од плодот од анасон бил проучуван од повеќе автори, каде самите студии вклучуваат карактеризација и сепарација на трите 18:1 положбени изомери на октадекенска киселина (Charvet et al., 1991; Wolff, 1992; Reiter et al., 1998; Cosge et al., 2008b). Во студијата на споменатиот автор Cosge et al., (2008b), одделно бил проучуван составот на етеричното масло, а потоа и составот на фиксното масло изолирани одделно од плодот од вариететот *dulce* и вариететот *vulgare*. Одделно, од страна на различни истражувачки групи, бил проучуван само составот на етеричното масло или пак само составот на фиксното масло, но постапки за едновремено определување на составот на двете масла досега не биле објавени. Исто така, во поголемиот број студии таксономската идентификација/класификација на примерокот не била поврзана со хемискиот состав на фиксното масло изолирано од плодот на ова растение.

Освен компонентите од растителното и етеричното масло кои се одговорни за фитохемиските карактеристики на *Foeniculum vulgare* Mill., друга класа соединенија со докажана фитохемиска активност се полифенолите и фенолните глукозиди. Нивната

метаболичка активност привлекува особено внимание меѓу научниците заради високото влијание во превенцијата од различни дисфункции на организмот. Од досега објавените студии, агликони детектирани кај *Foeniculum vulgare* Mill. се акадетин, кемферол, нарингенин и изорамнетин. Освен овие типови соединенија, детектирани биле и изомери на фенолни киселини, најчесто изомери на кафеоилхинската киселина, кои покажале антиоксидациска активност. (Faudale et al., 2008). Декоктите добиени од плодот на *Foeniculum vulgare* Mill., според Parejo et al., (2004a) содржат кверцетин-3-*O*-галактозид, кемферол-3-*O*-рутинозид, изокверцетин и изорамнетин, како и изомери на хлорогените киселини. Нивната фитохемиска активност се поврзува со превенција на различни кардиоваскуларни болести, канцер и инфламација. Од плодот на *Foeniculum vulgare* Mill., биле изолирани и тримери на *cis/trans*-миабенол С, *trans*-ресвератрол-3-*O*- $\beta$ -D-глюкопиранозид, синапоил глукозид, сингетин-4-*O*- $\beta$ -глукозид (De Marino et al., 2007). Од цветовите на растението бил изолиран и карактеризиран ацетиран кемферол глукозид (Soliman et al., 2002). Етанолните екстракти добиени од плодот на *Foeniculum vulgare* Mill., ја инхибирале пероксидацијата на линоленска киселина многу повеќе отколку истото количество витамин Е. Водните и етанолните екстракти имаат огромна редуирачка моќ и способност за врзување на слободни радикали, слободни радикали на супероксидите и металните јони (Andersen и Markham, 2006).

Заради огромниот број компоненти кои се идентификувани во екстрактите добиени од анасон и кои се наменети за медицински цели, тешко е прецизно да се дефинира активноста на секоја компонента. Студиите спроведени на изолирани компоненти од овие екстракти не можеле целосно да ја објаснат медицинската активност, со што се покажало дека неколку компоненти присутни во екстрактите од анасон делуваат синергистички. На овој начин целосно се постигнува фармаколошкиот ефект на добиениот екстракт. Исто така, голем број студии биле извршени за одредување на нивото на толеранција на екстрактите од анасон наменети за медицински цели. Најчестите несакани ефекти кои се јавуваат при нивната употреба се поврзани со алергиски реакции на кожата и/или респираторниот систем (ЕМЕА, 2010).

До денес, малку се знае за хемискиот состав на *Foeniculum vulgare* застапен во Р. Македонија, иако македонскиот анасон е познат како извонредно квалитетен и заради тоа се користи во прехранбената, фармацевтската и индустријата за алкохолни пијалоци. Во литературата обично се смета дека *Foeniculum vulgare* Mill. кој се одгледува во Р. Македонија е од вариететот *dulce*, и е познат по своето народно име -

сладок анасон. И покрај ова, неговиот хемиски состав не е потврден хемотаксономски и експериментално.

За целосно карактеризирање на компонентите присутни во плодот на различни подвидови/вариетети анасон, примарно беше извршена изолација на етеричното масло со хидродестилација, потоа беше определен приносот на етеричното масло и карактеризирани неговите физички својства. Имајќи ги предвид податоците дадени во литературата за составот и својствата на карактеризираните компоненти кои биле изолирани, цел на ова истражување беше определувањето на хемискиот состав на етеричното масло, како и хемискиот состав на растителното масло изолирани од плодовите на *Foeniculum vulgare* Mill. од Р. Македонија. Воедно беше направен обид за пронаоѓање на хемиските маркери кои ќе ја карактеризираат разликата помеѓу одделните вариетети. Дополнително, како цел на ова истражување беше направена споредба помеѓу подвидовите/вариететите во насока на определување на разлики во масно-киселинскиот состав или пак во процентуалната застапеност на масните киселини. Конечно, беше разгледувана можноста од таксономско определување (од хемиски аспект) на подвидовите и вариететите од *Foeniculum vulgare* Mill., со едновремена анализа на целокупната неполярна фракција застапена во плодот на растението. Со користење на податоците дадени во монографијата на Европската фармакопеја 8.5 за застапеноста на секоја компонента од етеричното масло во плод кој би бил безбеден за конзумација и подготовка на медицински препарати наменети за новороденчиња, анализирани беа плодови од растението од неколку изминати години на берба. Заради сеопфатна анализа на составот, за целите на експериментот, примероците беа чувани во амбиентални услови. Кај овие примероци, од интерес беше определувањето на структурата на секундарни продукти во етеричното масло, кои главно се биосинтетизираат како резултат на автооксидациски реакции на компонентите кои се иницијално присутни во самото етерично масло.

За утврдување на составот на неполярните смеси (етерично масло и нивни екстракти во различни растворувачи) беа користени гасно-хроматографски методи, спрегнати со различни видови детектори, што воедно преку споредба на добиените резултати овозможува и споредба на самите техники. За разделување и квантификација на компонентите од неполярната фракција беше користена гасно-хроматографска метода со пламен-јонизациски детектор (GC-FID), додека за квалитативна анализа беше користена гасно-хроматографска метода со масен детектор (GC-MS). Анализа на

испарливата фракција беше извршена и со статична хедспејс гасна хроматографија со пламен јонизациски детектор (SHS-GC-FID), и воедно беше направена и споредба на добиените податоци со оние добиени од анализа со GC-FID. Се покажа дека употребата на SHS-GC-FID е побрза техника за анализирање и техника за која не е потребно поголемо количество примерок за анализа и сепак дава огромна точност на добиените резултати.

Од аспект на хемискиот состав на поларната фракција од плодите од *Foeniculum vulgare* Mill., беа идентификувани и квантифицирани компоненти од метанолни екстракти, со цел утврдување на структурата на истите и пронаоѓање на разлика во хемискиот состав и во оваа фракција помеѓу видовите. Во понатамошниот тек на ова истражување беше направена споредба на содржината и природата на етеричните масла и полифеноли во испитуваните примероци од нашето поднебје со литературни податоци за соодветни примероци од други региони. Фокус на докторската работа беше даден на плодот на растението, а после изведените екстракции беше пристапено кон разработка на брзи и сигурни методи за анализа и идентификација на застапените природни производи, користејќи современи инструментални техники кои вклучуваат гасна хроматографија спрегната со масена спектрометрија и високоефикасна течна хроматографија (HPLC), комбинирана со UV-Vis спектрофотометрија и тандем масена спектрометрија (HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>). Овие техники несомнено овозможуваат добивање на значајни структурни информации за природата и застапеноста на разновидните компоненти присутни во екстрактите.

Овие истражувања се прва систематска студија на фитохемијата на видот *Foeniculum vulgare* Mill. од нашето поднебје и насочуваат кон добивање на повеќе сознанија за структурните карактеристики, содржината, својствата, како и намената на испарливите и неиспарливите компоненти карактеризирани кај ова растение. Добиените податоци за неговиот фитохемиски профил беа споредени со достапни литературни податоци со цел утврдување на специфичности кај македонскиот анасон во споредба со анасонот од другите делови на Медитеранот, со што се овозможува етаблирање на неговата класификација. Развиените методи може да се користат за одредување на квалитетот и автентичноста на плодите и комерцијалните етерични масла, за следење на нивната стабилност (термичка или фотохемиска), како и за следење на квалитетот на други комерцијални препарати кои содржат екстракти од различни делови од *Foeniculum vulgare* Mill.

## 2. ТЕОРЕТСКИ ДЕЛ

### 2.1. *Foeniculum vulgare* Mill. – таксономија, морфолошки карактеристики и примена

Во литературата може да се сретнат различни таксономски класификации на *Foeniculum vulgare* Mill. Во продолжение дадена е таксономијата на растението според Weiss (2002).

- ❖ Оддел: *Spermatophyta*
- ❖ Пододдел: *Magnoliophyta*
- ❖ Класа: *Magnolitae*
- ❖ Подкласа: *Rosiflorae*
- ❖ Ред: *Apiales*
- ❖ Фамилија: *Apiaceae* (= *Umbelliferae*)
- ❖ Род: *Foeniculum*
- ❖ Вид: *Foeniculum vulgare* Mill.
- ❖ Подвидови: subsp. *vulgare* и subsp. *piperitum*
- ❖ Подвид: subsp. *vulgare*, var. *vulgare*, var. *dulce* и var. *azoricum*

Фамилијата *Apiaceae* е една од трите групи фамилии кои во својот метаболизам вклучуваат и биосинтеза на етерични масла (Goodwin et al., 1983; Czygan, 1989; Brand, 1993). *Foeniculum vulgare* Mill. или во Р. Македонија познат како анасон, е тревесто растение со висина од 150-200 cm (слика 2.1). Стеблото е округло, сивкасто обоено, со фини ребрести пруги, многу разгрането, но компактно, со јак и специфичен мирис. Базалните листови се јајцевидни со должина до 30 cm и ширина до 15 cm, 3-4 пати перести, со кончесто-тенки сегменти, околу 0,5 mm широки и до 40 mm долги. Штитовите содржат од 4-30 штитчиња, кои се поставени на дршки со различна должина, а содржат од 18-25 цветови. Цветовите се многу мали и обично хермафродитни. Венечните ливчиња се жолти, јајцевидни, со врвот свиткани кон внатрешноста на цветот. Плодот е жолто-зелен, долгнавесто-јајцевиден, од 4-10 mm долг, гол, со три грбни дебели и испакнати ребра и две латерални поразвиени ребра. (Матевски и Мицевски, 2005). Според Weiss (2002) плодот од *Foeniculum vulgare* Mill.

е составен од два помали едносемени делови (мерикарпиуми), во чија внатрешност се наоѓаат одделни секреторни канали во кои е сместено етеричното масло. Подвидот *vulgare* е двегодишно растение, кај кое штитот содржи од 12-25 штитчиња, чии листови се меки и се подолги од 10 mm, додека подвидот *piperitum* е повеќегодишно растение, штитот содржи од 4-10 mm штитчиња, чии лисни сегменти се ретко подолги од 10 mm, тие се тврди и прилично месести.



Слика 2.1. *Foeniculum vulgare* Mill. subsp. *vulgare*, var. *dulce* од Р. Македонија.

Во Р. Македонија се култивира таксонот *Foeniculum vulgare* Mill., subsp. *vulgare* var. *dulce* (сладок анасон), наменет за прехранбената и фармацевтската индустрија и се одгледува главно во велешкиот регион, иако можат да се сретнат засадени површини и во гевгелискиот регион. Добиениот плод од овие два региони е со висок квалитет, оценето според барањата на Европската фармакопеја 8.5 за приносот и хемискиот состав на етеричното масло изолирано од плодот на овој вариетет. Диворастечките популации на анасон главно припаѓаат кон вариететот *vulgare*, кој може да се сретне

и на поголеми надморски височини, така што за овие простори не е карактеристично одгледувањето на овој сорт. Диворастечки примероци од подвидот *piperitum* се забележани претежно во јужните делови на Р. Македонија, гевгелискиот регион - Богданци и Дојран (Мицевски и Матевски, 2005). Определувањето на хемискиот состав на овој подвид од различно географско потекло, покажале присуство на хемиски маркери според кои дополнително подвидот *piperitum* се разликува од сортите на подвидот *vulgare* (Muckensturm et al., 1997; Gudi et al., 2014). Досега, направени се мал број истражувања за нивната фармаколошка активност и безбедна употреба, што од друга страна не го фаворизира одгледувањето/употребата на плодот од овој подвид.

## 2.2. Хемиски состав на плодот од *Foeniculum vulgare* Mill. и диференцијација меѓу таксоните во рамките на видот

Во литературата најчесто се сретнува преглед на хемискиот состав на плодот од *Foeniculum vulgare* Mill. кој е заснован на изолирани компоненти со различна поларност, во зависност од поларноста на користениот растворувач за изолација на истите. Врз основа на добиените податоци, денес се познати огромен број соединенија кои биле изолирани и идентификувани како составни компоненти на етеричното масло, растителното (или фиксно) масло, или пак составен дел на поларната фракција (фенолни киселини, флавоноиди, глукозиди).

Освен етерично масло, плодот од *Foeniculum vulgare* Mill. содржи и растително (фиксно масло) во чиј состав влегуваат заситени масни киселини, мононезаситени масни и полинезаситени масни киселини. Како главна компонента била определена петроселинската киселина (6с-18:1), чија застапеност може да изнесува од 70-80 % (Reiter et al., 1998; Charvet et al., 1991). Освен споменатата незаситена масна киселина, од овие автори документирано е и присуство на миристинска (14:0), палмитинска (16:0), стеаринска (18:0), олеинска (9с-18:1), линолна (9с, 12с-18:2) и линоленска (9с, 12с, 15с-18:3) киселина.

Поларната фракција изолирана од плодот на растението, главно се одликува со различни подкласи флавоноиди, за кои била испитувана и докажана нивната изразена антиоксидациска активност (Faudale et al., 2008; Parejo et al., 2004a; De Marino et al., 2007). Од цветовите на растението биле изолирани фенолни киселини и глукозиди, за

кои било утврдено дека поседуваат силна способност за сврзување радикали (Parejo et al., 2004b; Soliman et al., 2002).

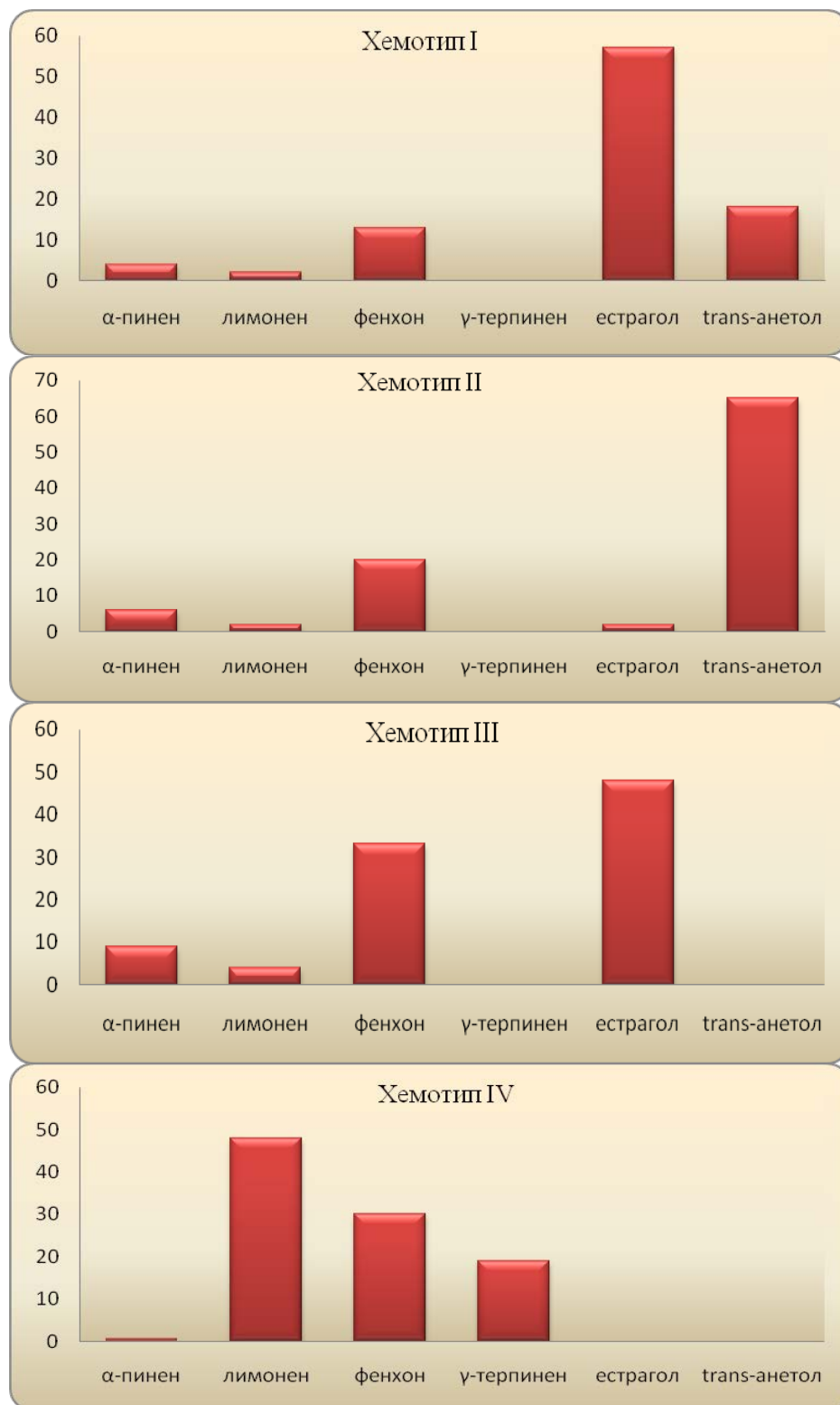
Дополнително, биле извршени студии во кои била определена и нутритивната вредност на плодот од *Foeniculum vulgare* Mill. Според истражувањата од страна на USDA била определена вредноста на вкупни протеини (1,24 g), растително масло (0,2 g), јаглехидрати (7,3 g) и растителни влакна (3,1 g) на 100 g сув плод. Плодот содржи и минерали, меѓу кои калиум, натриум, калциум, магнезиум, железо, цинк и фосфор, потоа витамини од В групата и витамин С, но и во помали количества витамин А и витамин Е, како и есенцијални аминокиселини (Badgujar et al., 2014).

Денешната класификација на растенијата на анасон е базирана претежно според употребата (Muckensturm et al., 1997). Според современото сваќање за таксономијата на родот *Foeniculum*, тој се смета за монотипен род, кој се состои само еден вид - *Foeniculum vulgare* Miller. Во рамките на овој вид се јавува одредена варијабилност, со присуство на два подвидови *Foeniculum vulgare* subsp. *vulgare* и *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum*. *Foeniculum vulgare* subsp. *vulgare* ги опфаќа сите култивирани и натурализирани таксони на анасон, со помалку или повеќе интензивен мирис/вкус на анетол и е издиференциран во три вариетети: var. *azoricum*, var. *dulce* (сладок анасон, англ. sweet fennel), „Bronze” (англ. cultivar Rubrum, bronze fennel) и subsp. *vulgare*. *Foeniculum vulgare*, subsp. *vulgare* var. *dulce* (англ. sweet fennel, Roman fennel) се одгледува заради квалитетното етерично масло. Култиварот „Bronze” е градинарски вариетет на анасон, додека вариететот *vulgare* ги обединува сите некултивирани анасони или оние што „избегале” од култивација и имаат горчлив вкус. Овој вариетет се користи во прехранбената индустрија за екстракција на *trans*-анетол и како додаток кој допринесува за анетол вкус/арома кај различни видови производи.

Спротивно на subsp. *vulgare*, subsp. *piperitum* (англ. wild pepper fennel) нема вкус на анасон (*trans*-анетол, анис) и не содржи анетол. Овој подвид често се меша со хемотип на *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* кој има горчлив, но посебен (карактеристичен, поинаков) вкус и кој е култивиран само заради добивање анетол. Krüger и Hammer (1999) после извршените хемиски анализи (екстракција проследена со GC анализа) на примероци од плодови од анасон направиле хемотаксономска класификација. Во сите примероци доминантна компонента била фенилпропаноидна структура (или естрагол или *trans*-анетол). Тие предложиле класификација (хемотип) на анасонот според присуство или отсуство на еден од главните фенилпропаноиди

(слика 2.2). Сите примероци содржат помалку или повеќе фенхон. Авторите предложиле анетол хемотип (I), естрагол хемотип (II), анетол-естрагол хемотип (III) и хемотип (IV) кој воопшто нема фенилпропаноиди. Според нив во хемотипот (IV) влегува подвидот *piperitum* кој не содржи анетол, естрагол и фенхон. Во нивната студија главни компоненти на испитаниот примерок се пиперитенон оксид и лимонен.

Јасна диференцијација помеѓу вариететот *vulgare* и вариететот *dulce*, кои можат да се класифицираат во (хемотип II), а која се бара од Европската фармакопеја 8.5, е мошне тешка бидејќи нема остра таксономска/хемотаксономска граница помеѓу типовите на анасон со висока (12,0-25,0 %) и ниска (макс. 7,5%) содржина на фенхон. Според Европската фармакопеја 8.5 содржината на *trans*-анетол за вариететот *vulgare* е од 55,0-75,0 % додека за вариететот *dulce* е минимум 80%. Интересни се примероците во граничните подрачја 7,5-12,0 % фенхон и 75,0-80,0 % *trans*-анетол. Во табела 2.1 даден е литературен преглед за составот на етеричното масло на подвидот *piperitum*.



**Слика 2.2.** Класификација на *Foeniculum vulgare* на хемотипови според застапеноста на доминантните компоненти (Krüger и Hammer 1999). Хемотип естрагол-анетол (I), хемотип-анетол (II), хемотип естрагол (III) и хемотип (IV) во кој според авторите влегува *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum*.

Табела 2.1. Литературен преглед на хемскиот состав на испарливата фракција на *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* одреден со GC-MS.

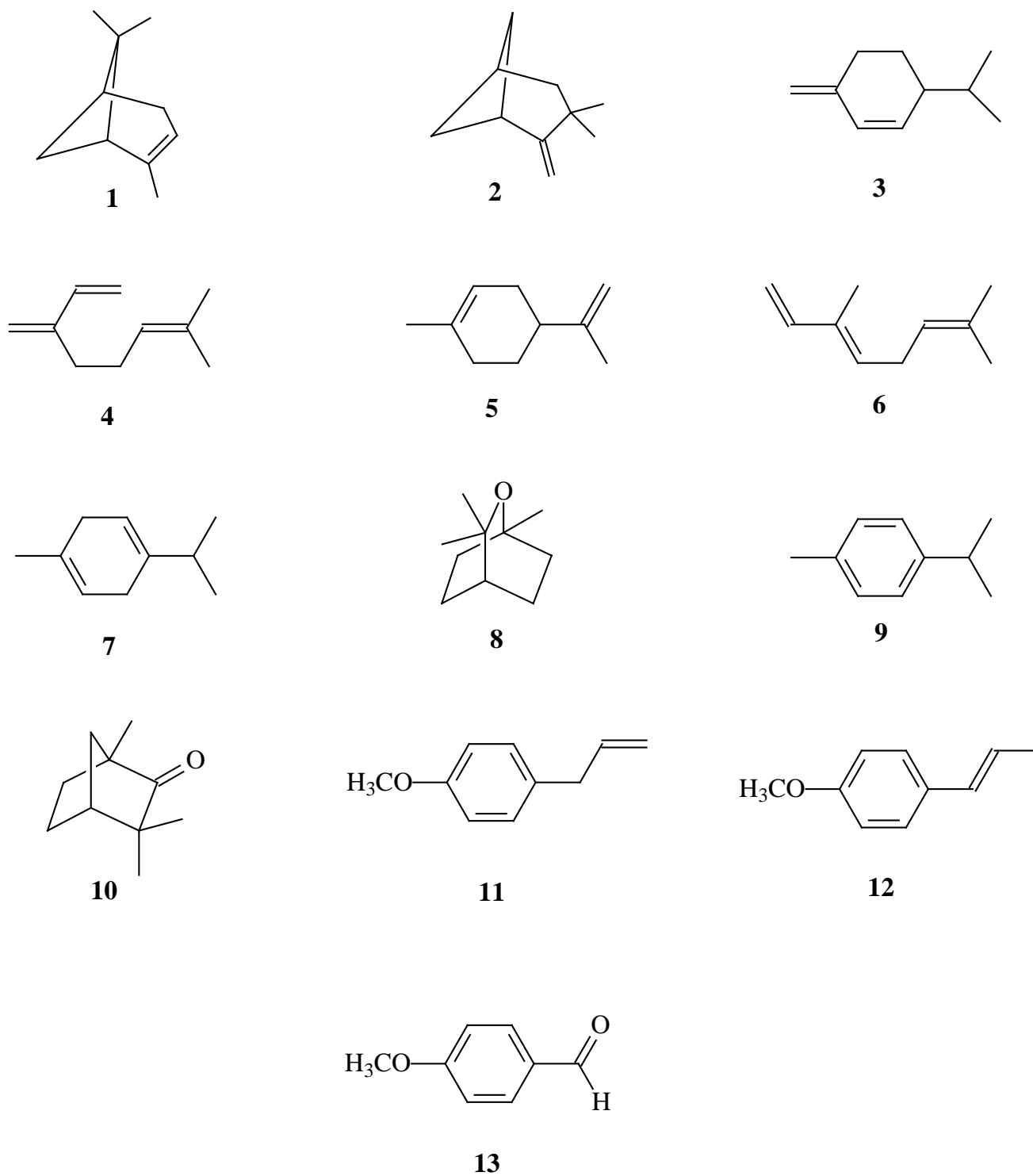
Референца	Gudi et al., 2014	Muckensturm et al., 1997	Napoli et al., 2010 (I)	Ozcan et al., 2006a	Ozcan et al., 2006b	Napoli et al., 2010 (I)	Napoli et al., 2010 (II)	Napoli et al., 2010 (III)
Соединение	Содржина (%)							
$\alpha$ -пинен	0,6	тр.	0,2	1,86	1,15	3-21	3-11	1-6
сабинен	/	1	0,2	0,39	0,20	/	/	/
$\alpha$ -феландрен	/	2	0,8	2,30	0,72	т-5	т-1	т-1
мирцен	0,9	/	0,8	1,20	0,95	1-3	т-6	т-1
<i>p</i> -цимен	1,5	/	0,7	/	8,68	0-4	т-1	т
лимонен	47,2	30	33,7	17,66	/	2-17	1-7	1-4
терпинолен	5,6	12	/	/	/	/	/	/
<i>trans</i> -оцимен	/	/	0,1	0,06	0,10	/	/	/
$\gamma$ -терпинен	10,6	15	6,4	1,77	0,68	1-4	т-2	т-2
фенхон	0,3	/	9,7	16,19	23,46	4-16	10-28	12-21
<b>естрагол</b>	н.д.	/	тр.	<b>40,49</b>	<b>61,08</b>	<b>34-60</b>	<b>60-66</b>	<b>70-84</b>
пиперитенон	/	/	2,0	/	/	/	/	/
<b>пиперитенон оксид</b>	<b>28,7</b>	<b>25</b>	<b>42,4</b>	н.д.	/	/	/	/
камфор	5,6	12	0,1	0,50	0,58	/	/	/
<i>endo</i> -фенхил ацетат	/	/	/	0,06	0,43	/	/	/
<i>exo</i> -фенхил ацетат	/	/	/	0,38	0,43	/	/	/
<i>trans</i> -анетол	н.д.	/	н.д.	0,12	н.д.	т-36	т-5	т-3

тр.-траги; н.д.-не е детектиран. Римските броеви до референците означуваат поделба на примероците во групи.

### 2.2.1. Хемиски состав и својства на етеричното масло

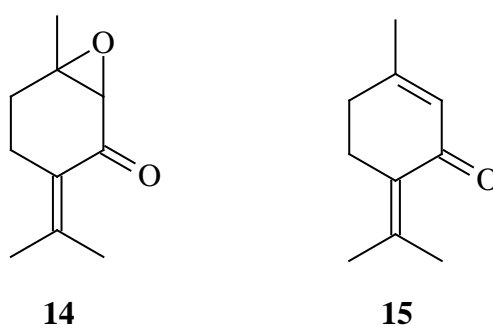
Најчесто анализирано во смисла на хемискиот состав и биоактивноста на неговите компоненти е етеричното масло изолирано од зрели и суви плодови на *Foeniculum vulgare* Mill. Испарливите компоненти, односно компонентите од етеричното масло се сконцентрирани во плодот, но сепак постојат истражувања кои докажуваат дека испарлива фракција со сличен состав може да се сретне практично и во останатите делови на растението (Diaz-Maroto et al., 2006; Gross et al., 2009). Составот на оваа фракција го сочинуваат монотерпени, монотерпеноиди и фенилпропаноиди. Главни компоненти на етеричното масло изолирано од плодот на *Foeniculum vulgare* Mill. се: *trans*-анетол (**12**), фенхон (**10**), естрагол (**11**) и лимонен (**5**), додека како компоненти со помала застапеност се јавуваат:  $\alpha$ -пинен (**1**),  $\beta$ -пинен (**2**),  $\beta$ -феландрен (**3**), мирцен (**4**),  $\gamma$ -терпинен (**7**), 1,8-цинеол (**8**), *p*-цимен (**9**) и анисалдеhid (**13**). Релевантните структури на споменатите соединенија се дадени на слика 2.3.

Низ литературата може да се сретнат различни податоци за вкупниот број соединенија кои го сочинуваат етеричното масло, во зависност од видот, потеклото, климатските услови (Miraldi, 1999; Raal et al., 2011) и степенот на зрелост (Telci et al., 2009), но и од начинот на екстракција на истите. Застапеноста на овие компоненти ги дава уникатните органолептички својства на етеричното масло, но и на растението во целост. Плодовите од вариететот *dulce* содржат повеќе од 80,0 % *trans*-анетол, но многу мали количества фенхон, на што се должи изразениот сладок вкус на маслото и на самиот плод.



**Слика 2.3.** Компоненти на етерично масло изолирано од плодот на *Foeniculum vulgare* Mill.:  $\alpha$ -пинен (1),  $\beta$ -пинен (2),  $\beta$ -феландрен (3), мирцен (4), лимонен (5), *trans*-оцимен (6),  $\gamma$ -терпинен (7), 1,8-цинеол (8), *p*-цимен (9), фенхон (10), естрагол (11), *trans*-анетол (12) и анисалдеhid (13). Овие ознаки на компонентите ќе се користат за означување на истите во приложените хроматограми.

Кај вариететот *vulgare*, процентуалната застапеност на фенхон е поголема, што доведува до поизразен горчлив вкус на етеричното масло и плодот. Повеќе автори тврдат дека етеричното масло на подвидот *piperitum* има различен хемиски состав од подвидот *vulgare*: етерично масло од плодовите на *piperitum* не содржи фенилпропаноиди (*trans*-анетол и естрагол), туку содржи само монотерпени и монотерпеноиди од кои карактеристичен е пиперитенон оксид (ротундифолон) (14) (Muckensturm et al., 1997; Badok 1994; Krüger и Hammer 1999). Покрај пиперитенон оксид доминантна компонента е и лимонен (5), а често присутни се и  $\gamma$ -терпинен (7) и пиперитенон (15) (слика 2.3 и 2.4).



**Слика 2.4.** Карактеристични соединенија за етеричното масло од *Foeniculiūm vulgare* subsp. *piperitum*: пиперитенон оксид (ротундифолон) (14) и пиперитенон (15).

Со цел класификација и идентификација на подвидовите, биле направени огромен број студии (Zoubiri и Baaliouamer, 2010; Gudi et al., 2014; Bernath и Nemeth, 2007; Weiss, 2002; Gross et al., 2009) насочени кон определување на хемискиот состав на етеричното масло. Овие студии покажале значителна варијабилност во хемискиот профил кој е во директна зависност од географското потекло на плодот, што од друга страна доведува до отежнување на самата класификација на растението во целост (Teucher et al., 2002; Gross et al., 2009; Krüger и Hammer, 1999). Кај ваквите гранични случаи, неопходна е хемотаксономска идентификација на целото растение. Податоците најдени низ литературата кои ја потврдуваат варијабилноста во хемискиот состав, како и варијабилноста во процентуалната застапеност на компонентите се дадени во табела 2.2. Хемискиот состав на етеричното масло е изучуван со примена на различни методи за екстракција и различни гасно-хроматографски методи за разделување и идентификација на компонентите кои го сочинуваат. За определување

на хемискиот состав, поретко се користи класична екстракција со соодветен растворувач (Guillén и Manzanos, 1996). Процесот на изолација на етеричното масло со хидродестилација, проследен со анализа на изолатот со гасно-хроматографски техники (GC-FID и GC-MS) е најчесто применуван (Tognolini et al., 2007; Akgul и Bayrak, 1988; Telci et al., 2009; Singh et al., 2006; Najdoska-Bogdanov et al., 2015), иако е можна промена на основната структура на испарливите компоненти во текот на дестилацијата (Tisserand и Young, 2014). Од оваа причина, развиени се техники кои овозможуваат поумерени услови за екстракција и спречуваат хемиски трансформации на основните конституенти. Екстракцијата на испарливите компоненти со суперкритичен CO<sub>2</sub> (SC-CO<sub>2</sub>) и SPE (Damjanovic et al., 2005; Moura et al., 2005; Yamini et al., 2002), како и анализата со спрегнати техники HSME-GC<sup>1</sup>, SPME-GC<sup>2</sup> и SHS-GC-FID<sup>3</sup> овозможуваат карактеризација на поголем број компоненти кои ја сочинуваат испарливата фракција.

---

<sup>1</sup>Headspace Solvent Microextraction Gas Chromatography-HSME-GC.

<sup>2</sup>Solid Phase Microextraction Gas Chromatography-SPME-GC.

<sup>3</sup>Static Headspace Gas Chromatography Flame Ionization Detection-SHS-GC-FID.

Табела 2.2. Литературен преглед на хемскиот состав на етеричното масло од *Foeniculum vulgare* Mill.

Референца	Zoubiri et al., 2010	Akgul et al., 1988	Telci et al., 2009	Damjanovic et al., 2005	Singh et al., 2006	Ravid et al., 1983	Dukic et al., 2003	Miraldi et al., 1999
Потекло	Источен Алжир	Турција	Турција	Црна Гора	Непознато	Израел	Србија	Италија
	<b>Содржина (%)</b>							
<b>Соединение</b>								
$\alpha$ -тујен	0	0	0	0,05	тр.	0	тр.	0
$\alpha$ -пинен	1,22	3,18	0,12	2,81	0,2	0,3	2,12	0,4
камфен	0,19	0,93	0	0,34	тр.	тр.	0,21	0
сабинен	0	0	0	0,56	тр.	0	0,12	тр.
$\beta$ -пинен	0	1,17	0,05	0	0,2	тр.	0,17	0
$\beta$ -феландрен	0,28	0	0,01	0	0	0	0,62	0
мирцен	0,69	1,32	0,18	1,68	0,1	0,1		тр.
$\alpha$ -феландрен	0,13	1,15	тр.	0,73	0	0	0,23	тр.
<i>p</i> -цимен	0,08	1,78	0	0,28	3,1	тр.	0,3	0,2
лимонен	6,37	2,87	2,96	3,15	3,1	4,1	1,8	4,5
1,8-цинеол	0	0	0	1,2	0,1	0	0	0
3-карен	0,17	0	0	0	0	0	тр.	0
<i>trans</i> -оцимен	0,54	0	0,83	0,22	0	0	тр.	0
$\gamma$ -терпинен	0	0,83	0	1,05	2,1	0,2	0,67	0,2
фенхон	12,93	13,85	1,19	20,3	8,6	6,4	16,35	2,3
линалоол	0	0	0	0	1,2	0	0	0
камфор	0,21	0	тр.	0	0,3	0,2	0,45	0
естрагол	3,41	4,96	5,16	4,9	4,7	3,8	3,78	8,2

Продолжува табела 2.2

Референца	Zoubiri et al., 2010	Akgul et al., 1988	Telci et al., 2009	Damjanović et al., 2005	Singh et al., 2006	Ravid et al., 1983	Dukič et al., 2003	Miraldi et al., 1999 (I)
Потекло	Источен Алжир	Турција	Турција	Црна Гора	Непознато	Израел	Србија	Италија
<b>Содржина (%)</b>								
Соединение								
карвон	0	0	0	0	0	0	тр.	0
фенхил ацетат	0,14	0	0,13	0	0,2	0	0	0
<i>trans</i> -анетол	72,86	64,71	87,85	62	70,1	84,4	72,27	81,6
гермакрен D	0	0	0	0,18	0	0	тр.	0
анискетон	0	1,12	0	0	0	0	0	0
апиол	0,05	0	0	0	0	0	0	тр.
анисалдеhid	0	0	0	0	0	0	тр.	2,6
фенхил алкохол	0	0	0	0	0	0	0	0
$\beta$ -кариофилен	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>cis</i> -анетол	0	0	0	0	0	0	0	0
терпинолен	0	0	0	0	0	0	0	0
принос	1,28	5,6	3	5 g/100g	/	1,6	2,82 $\pm$ 0,23	3,46 $\pm$ 0,15

Референца	Miraldi, 1999 (II)	Miraldi, 1999 (III)	Anwar et al., 2009	Cosge et al., 2008a	Cosge et al., 2008b	Katsiotis, 1988	Yamini et al., 2002	Shahat et al., 2011
Потекло								
	<i>Содржина (%)</i>							
Соединение								
$\alpha$ -тујен	0	0	0	0	0	0	0	/
$\alpha$ -пинен	0,2	0,7	0,55	0	0,57	0,19	0,89	3,26
камфен	0	0	0,13	0	0	0,16	0,09	0,3
сабинен	тр.	тр.	0,19	0	0	0	0,15	0,27
$\beta$ -пинен	тр.	тр.	0,09	0	0	0,03	0	0,14
$\beta$ -феландрен	0	0	0	0	0	0	0	/
мирцен	тр.	0,4	0,87	0	0	0	0,58	0,66
$\alpha$ -феландрен	тр.	тр.	0,19	0	0	0	0	0,18
<i>p</i> -цимен	тр.	тр.	тр.	0	0	0	0,24	/
лимонен	0,6	1,6	5,1	0,91	1,08	3,6	10	27,78
1,8-цинеол	тр.	0,5	0,23	0	0	0	0	/
3-карен	0	0	0	0	0	0	0	/
<i>trans</i> -оцимен	0,21	0	0,6	0	0	0	0,96	/
$\gamma$ -терпинен	0,2	тр.	0,16	0	0,84	0,25	0,72	0,06

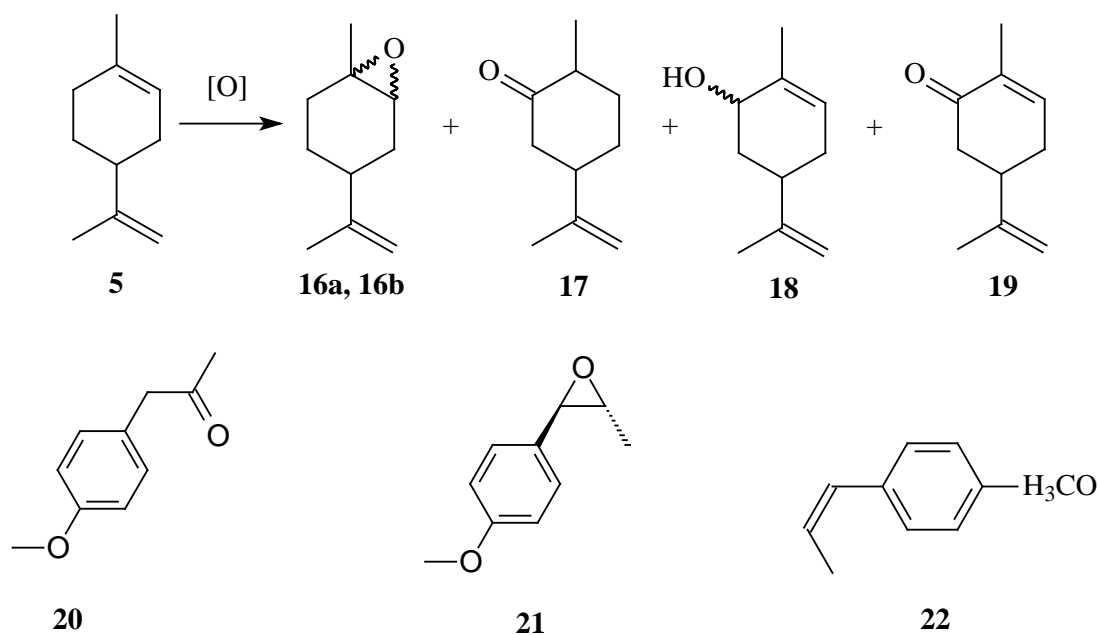
Референца	Miraldi, 1999 (II)	Miraldi, 1999 (III)	Anwar et al., 2009	Cosge et al., 2008	Cosge et al., 2008	Katsiotis, 1988	Yamini et al., 2002	Shahat et al., 2011
Потекло	Италија	Италија	Пакистан	Турција	Турција	Грција	Иран	Египет
<b>Содржина (%)</b>								
фенхон	10,4	5,4	10,23	0,62	5,03	2,1	11	12,77
линалоол	0	0	0	0	0	0,09	0	0,09
камфор	0	тр.	0	0	0	0	0,24	0,18
естрагол	69,3	75	5,45	2,87	15,51	4,22	4,45	6,34
карвон	0	0	0	0	0	0	0	/
фенхил ацетат	0	0	0,66	0	0	0	0	0,06
<i>trans</i> -анетол	19	16,3	69,87	0	75,13	86,83	69,41	46,26
гермакрен D	0	0	0,09	0	0	0	0,25	/
анискетон	0	0	0	0	0	0	0	/
апиол	0	тр.	0	0	0	0	0	/
анисалдехид	0,1	0,1	0,19	0,24	н.д.	0,9	0,57	0,11
фенхил алкохол	0	0	0,4	0	0	0	0	/
$\beta$ -кариофилен	0	0	0	0,26	0	0	0	/
<i>cis</i> -анетол	0	0	0,27	0	0	0,29	0,27	/
терпинолен	0	0	0	0	0	0	0,13	/
принос	3,28±0,23	3,03 ± 0,04	2,81±0,14	3	3,1	/	/	/

На ваков начин може да се направи споредба на ефикасноста на самата екстракција. Кај сите студии, како компоненти со најголема застапеност биле карактеризирани *trans*-анетол, фенхон, естрагол и лимонен. Други компоненти кои се присутни, но со помала застапеност се:  $\alpha$ -пинен,  $\beta$ -пинен, *trans*-оцимен,  $\alpha$ -феландрен,  $\beta$ -феландрен, мирцен, 1,8-цинеол и  $\gamma$ -терпинен. Карактеристични компоненти за вариететите *vulgare* и *azoricum* како и подвидот *piperitum* се  $\alpha$ -тујен, линалоол, камфен, камфор, сабинен и фенхон (Cetin et al., 2010). Составот на испарливата фракција бил одредуван и кај другите делови на растението. Според податоците, дополнително биле определени камфен и камфор, кои не се сретнуваат во етеричното масло изолирано од плодот на вариететот *dulce* (Diaz-Maroto et al., 2006). Овие компоненти, според истражувањата на (Simandi et al., 1999) се карактеристични за вариететите *vulgare* и *azoricum*, додека кај подвидот *piperitum* се сретнуваат во многу мали количества. За овој подвид, според Muckensturm et al., (1997) карактеристично е присуството на сабинен, ротундифолон и 10-нонакосанон, но и присуство на  $\gamma$ -асарон, според истражувањата на Gudi et al., (2014). Заради споменатата варијабилност на составот во зависност од генетските фактори, географското потекло и климатските услови под кои се развивал плодот, присуството на карвон, *trans*-карвеол и сабинен не е неочекувано (Simandi et al., 1999).

Освен споменатите техники, можно е и определување на составот на етеричното масло и со употреба на спектроскопски методи. Strehle et al., (2005), вовеле раманска спектроскопска метода за локализирање на етеричното масло и негова анализа директно во плодот на растението. Gudi et al., 2014 развиле методи засновани на вибрациони спектроскопски техники (IR, NIR и Raman) со кои воедно е овозможена и диференцијација помеѓу одделните видови. Со примена на развиените методи се овозможува следење на приносот и квалитетот на етеричното масло во текот на зреењето, со што се овозможува и попрецизно определување на оптималното време за берба на плодовите.

### **2.2.2. Промени во составот на етеричното масло со стареење на плодот – формирање на секундарни оксидациони продукти**

Различните својства на етеричните масла се должат на поголем број соединенија кои структурно се тесно поврзани. Нивната специфична арома се должи на застапеноста на секоја компонента, што од друга страна го потврдува фактот дека промени во структурата на основните компоненти може да доведе до промена на органолептичките и фармаколошките карактеристики на етеричното масло (Grosch, 2007). Врз основа на структурната релација на компонентите во една иста хемиска група, позната е конверзија на истите преку реакции на оксидација, циклизација, изомеризација или дехидрогенација. Овие реакции може да бидат предизвикани од продолжени ензимски процеси или пак од хемиски фактори (Turek и Stintzing, 2013). Заради високата испарливост и термолабилност, промени во структурата биле забележани кај терпеноидите. Новодобиените соединенија биле резултат на оксидирани или хидролизирани терпенски структури од оние кои иницијално се присутни во етеричното масло (Scott, 2005). Промената на хемискиот состав главно се должи на несоодветни услови на чување на плодовите или на изолираното етерично масло. Најчести фактори кои предизвикуваат промена во структурата се: изложеност на воздух (кислород), топлина и светлина (Tisserand и Young, 2014). Кислородот во контакт со етеричното масло доведува до образување на оксидациони продукти на монотерпените, додека светлината, особено УВ зрачењето доведува до формирање на кислородни слободни радикали, кои се силно реактивни и доведуваат до брзи хемиски трансформации (Misharina и Polshkov, 2005). Својствени за УВ зрачењето се и реакциите на изомеризација на иницијалните компоненти, особено кај конјугираните фенилпропаноиди (Ziegler, 1991; Choe и Min, 2006) (слика 2.5). Исто така, како причина за хемиска промена може да биде и самиот процес на хидродестилација. Високата температура при која се одвива, како и поларноста на водата се фактори кои предизвикуваат промени во првобитната структура на соединенијата кои го сочинуваат етеричното масло (Mockute et al., 2005; Schweiggert et al., 2007). Особено е важно следењето на промените во иницијалната структура на етеричните масла, заради тоа што новосинтетизираните компоненти ги менуваат нивните иницијални својства, а со тоа ја менуваат нивната ефикасност и безбедност за употреба.

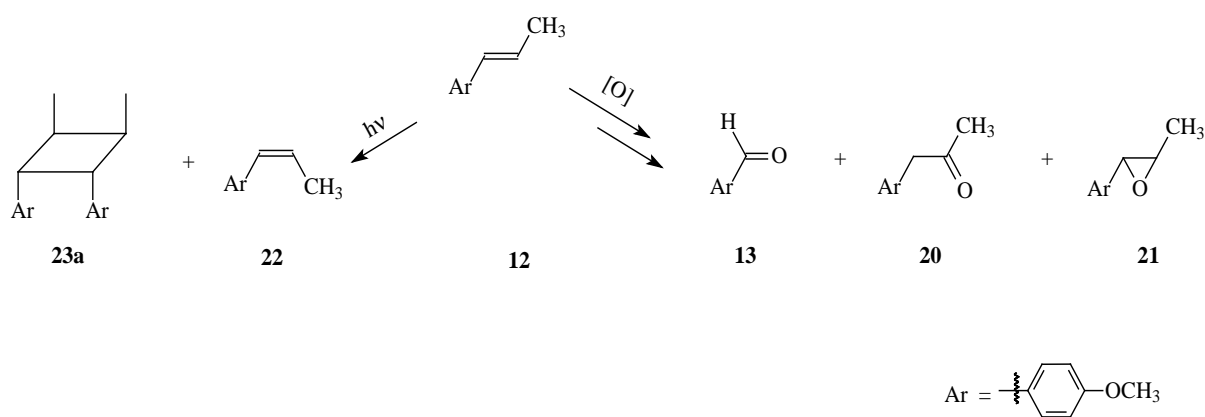


**Слика 2.5.** Потенцијални производи на оксидација на лимонен (**5**): лимонен епоксиди (**16a**, **16b**), дихидрокарвон (**17**), карвеол (**18**) карвон (**19**) и производи на изомеризација и оксидација на фенилпропаноидните структури: анискетон (**20**), анетол епоксид (**21**) и *cis*-анетол (**22**).

Според Karlberg (1994), новонастанатите производи на оксидација на лимонен, (–)-карвон и *Z* и *E* изомерите на лимонен-1,2-оксид делуваат иритирачки на кожата, додека за *Z* и *E* карвеол ваквите својства не биле забележани. Исто така, *Z* и *E* изомерите на лимонен-2-хидропероксид се потенцијални алергени (Karlberg et al., 1994; Brared-Christensson et al., 2009). Според понови истражувања, постојат алтернативни методи за инхибирање на деградационите реакции. Овие методи вклучуваат додавање на  $\alpha$ -токоферол, розмаринска киселина, пропилен галат или аскорбил палмитат во етеричните масла (Turek и Stintzing, 2012). Ваквите методи ретко се користат заради фактот што досега малку е познато за нивната ефикасност во случајот на етеричните масла, но и фактот дека повеќе инхибитори може да доведат до појава на синергистички ефекти. Инхибицијата е можна и со комбинирање на етеричните масла. Според истражувањата на Misharina и Polshkov (2005), смеса од етерични масла од кориандер и лорбер силно ја забавиле оксидацијата на етерично масло од анасон. Исто така, промената во составот може да се забави и со чување на етеричните масла во пропишани услови (темни, добро затворени садови, поставени на темно и ладно место). Во ваков случај деградација на основните производи не би настанала во тек на месеци или години, но и мала промена во условите би довела до деградација која се одвива во неколку денови или недели.

### 2.2.3. Фотохемиски промени кај чист *trans*-анетол и изолирано етеричното масло од плодот на сладок анасон

Хемиските својства на *trans*-анетол биле проучувани во поголем број студии, но особено внимание било обрнато на фотохемиските процеси во кои стапува (Hoering и Grälert, 1909; Naves, 1958; Nozaki et al., 1968; Lewiss, 1988; Arai и Tokumaru, 1982; Lewis et al., 1994; Carteau et al., 2007; Castro et al., 2010; Marquez et al., 2008). Во зависност од реакционите услови, *trans*-анетол може да стапи во реакции на оксидација каде како продукти се образуваат анисалдеhid, анетол епоксид и анискетон. Исто така, *trans*-анетол може да учествува и во фотохемиски процеси, чии главни продукти се *cis*-анетол, анетол димер, деривати на оксетан, фотоанетол и хидропероксид (слика 2.6).

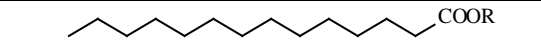
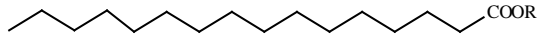
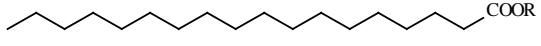
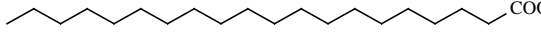
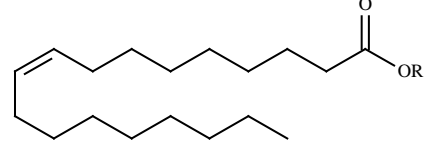
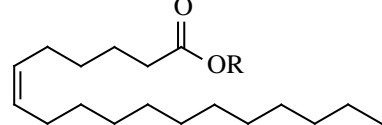
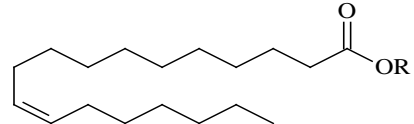
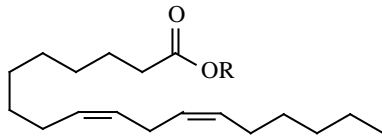
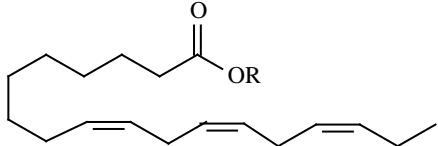


Слика 2.6. Фотохемиски и оксидациски продукти на *trans*-анетол (12).

Според истражувањата, кога *trans*-анетол е изложен на UV зрачење доаѓа до изомеризација до *cis*-анетол. Овие студии помогнале кон определување на хемиски маркери кои се индикатори за промена во квалитетот на етеричното масло, и воедно даваат дополнителна информација за оптималните услови за чување на изолирано етерично масло, кои не би предизвикале промена во хемискиот состав.

#### **2.2.4. Хемиски состав и својства на неполярни неиспарливи смеси (растително масло/фиксно масло), методи за екстракција и анализа**

Освен етерично масло, плодот од анасон содржи и приближно 20,0 % фиксно масло (Reiter et al., 1998; Charvet et al., 1991; Cosge et al., 2008b; Najdoska-Bogdanov et al., 2015). Екстракцијата на фиксното масло може да се изврши со едноставна екстракција со неполарен растворувач (*n*-хексан, петрол етер или диетил етер) со помош на Soxhlet апаратура. За определување на структурата на масните киселини со гасно- хроматографски методи (GC-FID и GC-MS) неопходна е претходна дериватизација/трансестерификација на масните киселини во соодветни естери. Постојат повеќе методи кои ја овозможуваат потребната конверзија. Најчесто користени се кисело-катализираната и базно-катализираната естерификација/трансестерификација (Christie, 1993), иако е познато дека метилирање под кисели услови дедува до изомеризација и до формирање на продукти/артефакти (Kramer et al., 1997). Најчесто синтетизирани се соодветните метил естери на масните киселини (Fatty Acid Methyl Esters, FAMES) (Kleiman и Spencer, 1982; Reiter et al., 1998; Charvet et al., 1991), иако можна е и дериватизација до соодветните бутил или изопропил естери (Reiter et al., 1998; Wolff и Vandamme, 1992). Карактеристични масни киселини за фамилијата *Apiaceae* (*Umbelifferae*) се двата изомери на олеинска киселина (9с-18:1): петроселинска киселина (6с-18:1), чија застапеност варира помеѓу 70,4 и 78,9 % и ваценска киселина (11с-18:1) чија застапеност изнесува 0,4 %. Освен двата споменати изомери, идентификувани биле и линоленска (9с,12с,15с-18:3), палмитинска (16:0) и стеаринска (18:0) киселина (Reiter et al., 1998). Од друга страна, анализата на составот на ацетонски екстракти од плод на анасон покажала најголема вредност за процентуалната застапеност на линоленска киселина (9с,12с,15с-18:3) додека споредни компоненти во споменатиот екстракт биле палмитинска (16:0) и олеинска (9с-18:1) киселина (Singh et al., 2006). Структурите на релевантните масни киселини се дадени на слика 2.7.

	<i>Име според IUPAC/ Тривијално име</i>	<i>Ознака според Christie W.W. 1993</i>	<i>Структури</i>
24	Тетрадеканска киселина/ Миристинска киселина	14:0	
25	Хексадеканска киселина/ Пламитинска киселина	16:0	
26	Октадеканска киселина/ Стеаринска киселина	18:0	
27	Еикосанска киселина/ арахидна киселина	20:0	
28	(9Z)-октадека-9-енска киселина/ Олеинска киселина	9c-18:1	
29	(6Z)-октадека-6-енска киселина/ Петроселинска киселина	6c-18:1	
30	(11Z)-октадека-11-енска киселина/ ваценска киселина	11c-18:1	
31	(9Z,12Z)-октадека-9,12-диенска киселина/линолна киселина	9c,12c-18:2	
32	9Z, 12Z, 15Z-октадека-9,12,15- триенска киселина/линоленска киселина	9c,12c,15c-18:3	

\*R = H = масна киселина; R = CH<sub>3</sub> = метил естер на масна киселина.

Слика 2.7. Структури на заситени и незаситени масни киселини идентификувани во фиксното масло од сладок анасон.

### 2.2.5. Хемиски состав и својства на неиспарливи поларни класи соединенија (полифеноли), методи за екстракција и анализа

Полифенолите претставуваат голема група соединенија кои содржат хидроксилна група врзана за еден или повеќе ароматични прстени. Нивната застапеност кај растенијата е најизразена бидејќи претставуваат важни продукти на секундарниот метаболизам и учествуваат во различни физиолошки процеси. Заради различната структура, биле направени повеќе различни поделби според бројот на јаглеродни атоми во молекулата. Поделбата на овие соединенија според Harborne и Simmonds (1964) е дадена во табела 2.3.

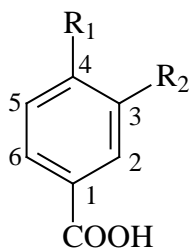
Табела 2.3. Основен јаглероден скелет на фенолни соединенија

<b>Класификација на фенолни соединенија</b>	
<b>Структура</b>	<b>Класа</b>
C <sub>6</sub>	Едноставни феноли
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Фенолни киселини и сродни соединенија
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Ацетофенони и фенилоцетни киселини
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Циметни киселини, цинамил алдехиди и цинамил алкохоли
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Кумарини, изокумарини и хромони
C <sub>15</sub>	Халкони, аурони и дихидрохалкони
C <sub>15</sub>	Флавани
C <sub>15</sub>	Флавони
C <sub>15</sub>	Флавоноли
C <sub>15</sub>	Антоцијанидини
C <sub>15</sub>	Антоцијанини
C <sub>30</sub>	Бифлавоноли
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>1</sub> , C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Бензофенони, ксантони, стилбени
C <sub>6</sub> , C <sub>10</sub> , C <sub>14</sub>	Хинони

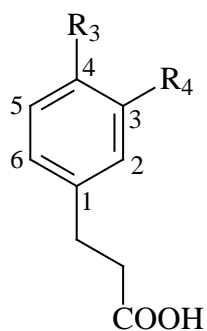
C <sub>18</sub>	Бетацијанини
Лигнани	Димери или олигомери (C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> )
Лигнини	Полимер (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <i>n</i>
Танини	Олигомери или полимери (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <i>n</i>

Основната структура C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> е карактеристична за фенолните (хидроксибензоеви) киселини и нивни деривати, додека C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> основна структура е карактеристична за циметните киселини, цинамил алдехидите и цинамил алкохолите (Clifford, 2000; Thomás Barberán и Clifford, 2000a). Иако најчесто кај растителните видови се сретнуваат хидроксибензоевите и хидроксициметните киселини, можно е да се сретнат и фенилоцетни C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub> и фенилпропански киселини C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>. Кај поголем дел од овие соединенија фенилниот прстен е супституиран во положба 3- и положба 4- (слика 2.8a). Кај некои деривати освен положбите 3- и 4-, дополнително е супституирана и положба 5- на фенилниот прстен (слика 2.8б).

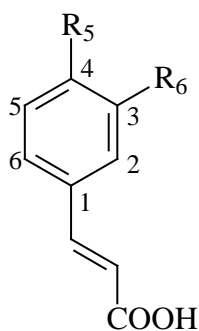
а)



Соединение	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	M <sub>r</sub>
бензоева киселина (33)	H	H	122,12
4- или <i>p</i> -хидроксибензоева киселина (34)	OH	H	138,12
3- или <i>m</i> -хидроксибензоева киселина (35)	H	OH	138,12
ванилинска киселина (36)	OH	OCH <sub>3</sub>	168,14
изованилинска киселина (37)	OCH <sub>3</sub>	OH	168,14

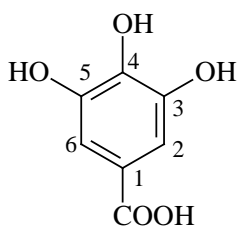


Соединение	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	M <sub>r</sub>
фенилпропионска киселина (38)	H	H	150,17
4-хидроксифенилпропионска киселина (39)	OH	H	166,17
3-хидроксифенилпропионска киселина (40)	H	OH	166,17
3,4-дихидроксифенил пропионска киселина (41)	OH	OH	182,17
дихидроферулна киселина (42)	OH	OCH <sub>3</sub>	196,12
дихидроизоферулна киселина (43)	OCH <sub>3</sub>	OH	196,12

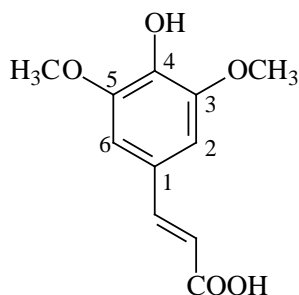


Соединение	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	M <sub>r</sub>
циметна киселина (44)	H	H	148,15
4- хидроксициметна киселина (45)	OH	H	164,15
3- хидроксициметна киселина (46)	H	OH	164,15
кафена киселина (47)	OH	OH	180,16
ферулна киселина (48)	OH	OCH <sub>3</sub>	194,18
изоферулна киселина (49)	OCH <sub>3</sub>	OH	194,18

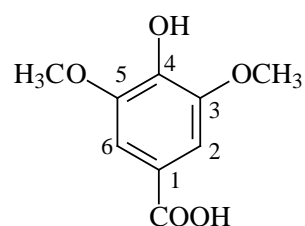
б)



гална киселина (50)  
(M<sub>r</sub> = 170,12)



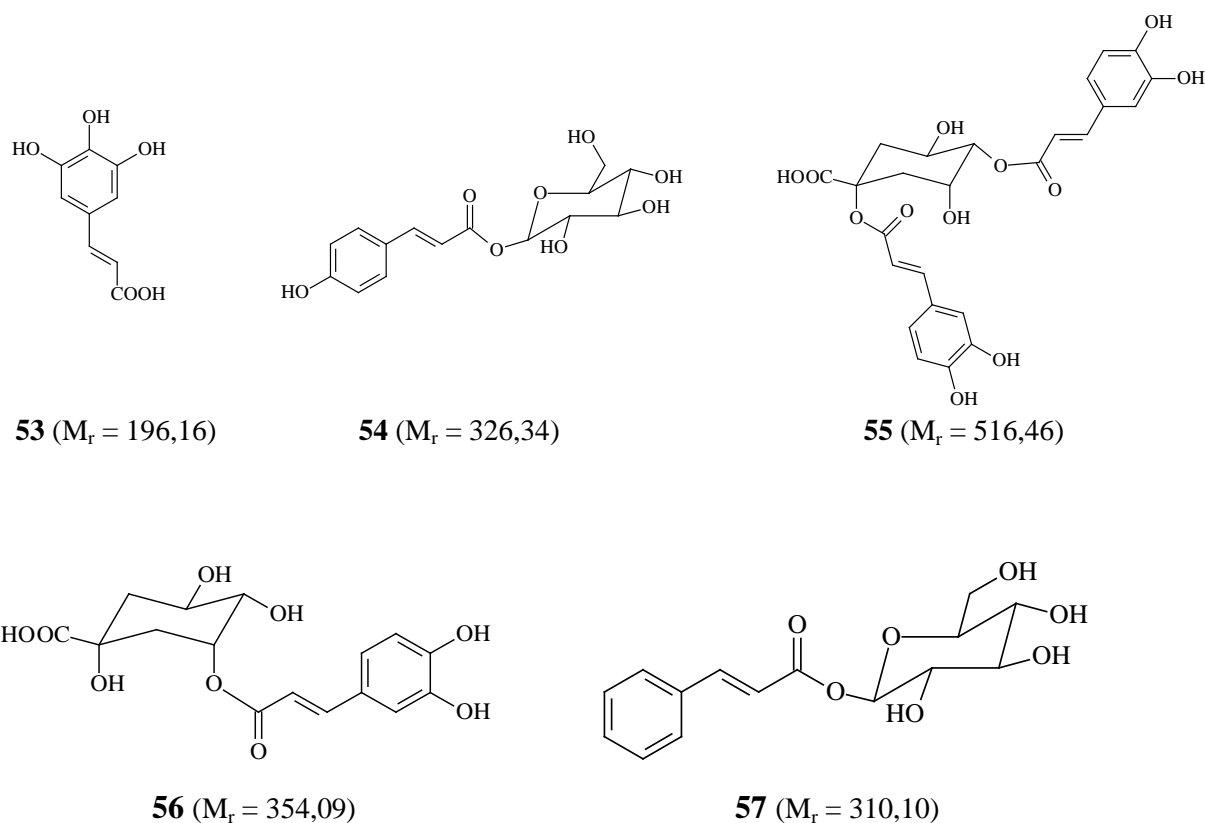
синапна киселина (51)  
(M<sub>r</sub> = 224,12)



сирингинска киселина (52)  
(M<sub>r</sub> = 198,17)

Слика 2.8. Хемиска структура на фенолни киселини: фенолни киселини со дисупституиран фенилен прстен (а) и фенолни киселини со трисупституиран фенилен прстен (б).

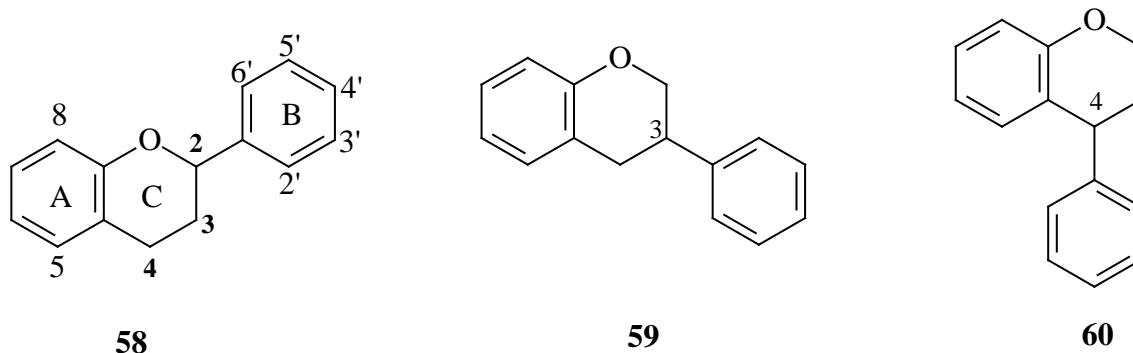
Кај растителните видови кои може да се користат како храна, хидроксibenзоевите киселини може да се сретнат во ниски концентрации, додека застапеноста на хидроксициметните киселини е значително повисока. Кај овошките, зеленчукот и различни видови цералии, најчесто се сретнуваат: кафеена, *p*-кумарна, ферулна и синапна киселина (слика 2.8 и слика 2.9) (Shahidi и Wanasundara, 1992, Mattila et al., 2006, Kern et al., 2003a). Фенолните киселини ретко се наоѓаат во слободна форма. Повеќе се сретнуваат како естери образувани со полисахариди и едноставни шеќери, потоа естери со хинска, шикимска и винска киселина (слика 2.9). Исто така, познати се естери образувани и со други фенолни киселини, со липиди, стероли или глицерол (Clifford, 1999), или пак со аминокиселини (Clifford и Knight, 2004). Естерите со хинската киселина, може да бидат конјугирани како моно, ди, три и тетра естери (Clifford, 2000). Овие естери може да содржат една или повеќе различни хидроксициметни киселини. Помеѓу нив, кафеоилхинските и дикафеоилхинските киселини се најчесто детерминирани.



**Слика 2.9.** Деривати на хидроксициметни киселини: 5-хидроксиферулна киселина (**53**), 1-*O*-кумароил глюкозид (**54**), 1,4-дикафеоилхинска киселина (**55**), 3-кафеоилхинска киселина (**56**) и 1-*O*-цинамоил глюкозид (**57**).

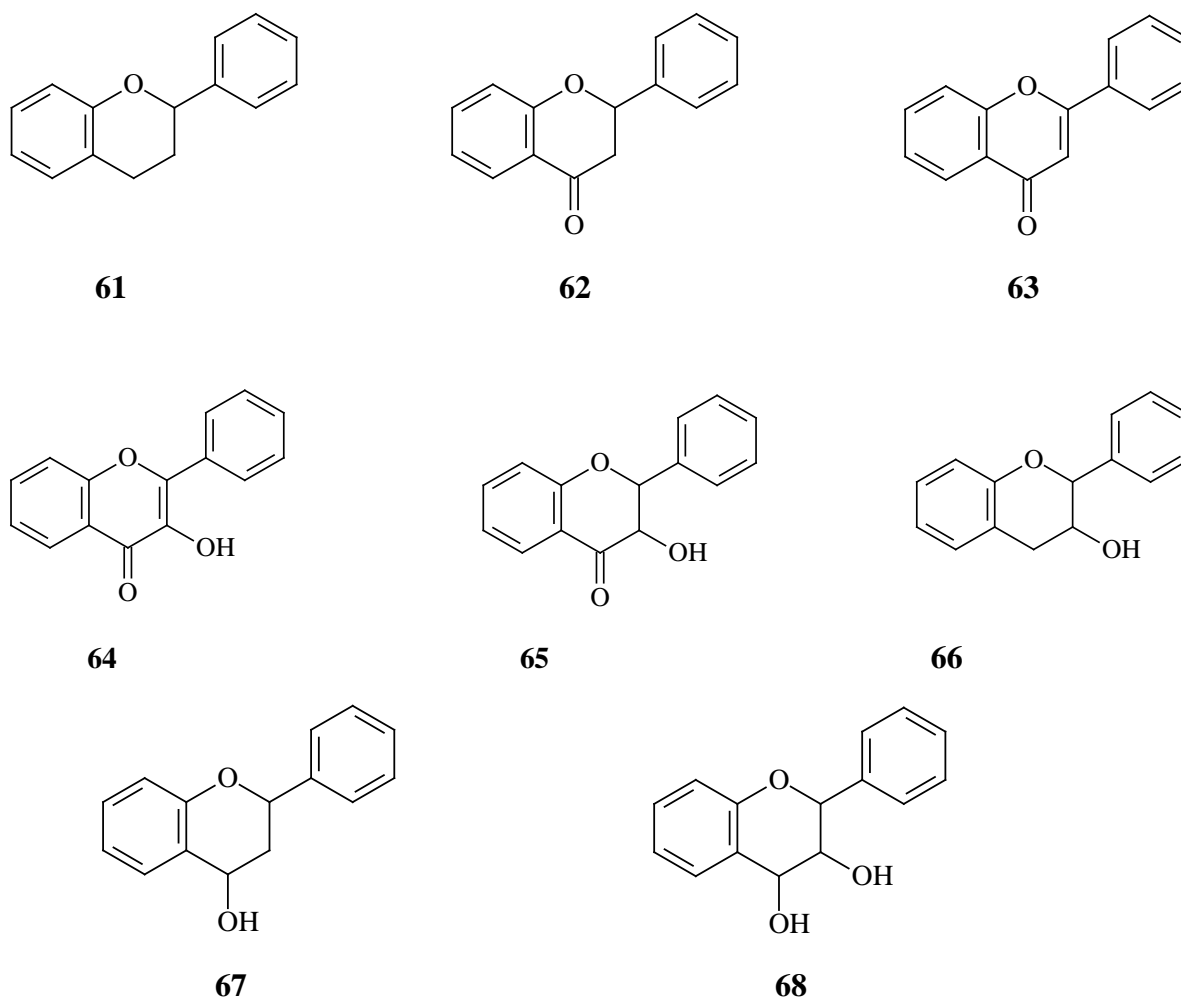
Естери од две фенолни компоненти ( $C_6-C_1$ ) вообичаено не се сретнуваат во природата. Редок и можеби најпознат пример е диестерот на гална киселина (елагова киселина), додека за циметните киселини голема е веројатноста дека не стапуваат во интрамолекуларни кондензации. За овие соединенија образувањето на естери, најчесто со хинската киселина е префериран процес (Vermeris и Nicholson, 2006). Најчесто дискутирана е секако антиоксидациска активност на полифенолните соединенија, која се должи на нивната способност да ги сврзуваат слободните радикали или да образуваат комплекси со метални јони. Овие соединенија се покажале и како ефективни инхибитори на слободно радикални верижни реакции (Fraga, 2009).

Терминот флавоноиди опфаќа голема група на фенолни соединенија кои вклучуваат  $C_6-C_3-C_6$  јаглороден скелет, односно фенилбензопиранска (или хроманонска) функционална група. Во зависност од позицијата на која е врзана фенилната група за хроманонскиот скелет, оваа група е поделена во три класи: флавоноиди (2-фенилбензопирани) **58**, изофлавоноиди (3-бензопирани) **59** и неофлавоноиди (4- фенилбензопирани) **60** (слика 2.10).



Слика 2.10. Основни класи флавоноиди.

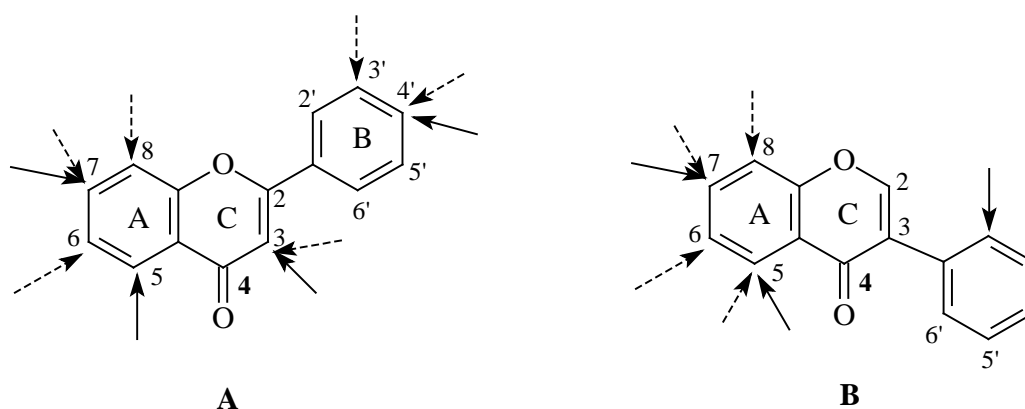
Во зависност од степеност на оксидација и заситеност, флавоноидите се поделени во повеќе различни подгрупи соединенија: флавани (**61**), флаванони (**62**), флаволи (**63**), флавоноли (**64**), дихидрофлавоноли (**65**), флаван-3-оли (**66**), флаван-4-оли (**67**) и флаван-3,4-диоли (**68**) (Mabry et al., 1970; Andersen и Markham, 2006) (слика 2.11).



Слика 2.11. Основни подкласи 2-фенилбензопирани.

Општо, флавоноидите биле изолирани од растителни материјали со користење на соодветен растворувач за нивна екстракција. Нивната идентификација, односно одредувањето на нивната структура, како и определувањето на нивните метаболички својства е особено важно заради докажаните антиоксидациски, анти-инфламаторни, антиканцерогени и хепатопротективни својства (Thomás Barberán и Clifford, 2000b). Изофлавоноидите се различна подкласа флавоноиди, кај кои фенилниот прстен В е врзан на позиција 3 од хроманонскиот скелет. Соединенијата кои припаѓаат на оваа подкласа, структурно значително се разликуваат од флавоноидите. Разликата не произлегува само од позицијата на фенилната група, туку и од степенот на оксидација и присуството на дополнителни хетероциклични прстени. Основните структури на ваквите типови соединенија се: куместан, ротеноид, кумаронохромен,

кумаронохромонен и птерокарпан. Основната структура на флавоноидите може да биде променета преку хидроксилирање, метоксилирање или *O*-гликозилирање на хидроксилните групи, како и преку *C*-гликозилирање директно на јаглероден атом од хроманонската структура. На слика 2.12 дадени се флавоноидни структури во кои е вклучено обележувањето на прстените од основниот скелет, потоа нумерирањето на јаглеродните атоми каде најчесто се сврзани хидрокси или метокси функционални групи, како и најчестите *C* и/или *O*-гликозилирани позиции во молекулата (Grotewold, 2007).



**Слика 2.12.** Флавоени и флавоноли (А) и изофлавоени (В). Полните стрелки ги означуваат позициите на најчесто сврзани -ОН групи, додека испрекинатите стрелки означуваат *C* и/или *O* гликозилирани позиции.

За разделување и идентификација на различните подкласи флавоноиди, неопходна е изолација со соодветен растворувач, кој мора да биде избран според поларноста на соединенијата од интерес. Помалку поларните флавоноиди (изофлавоени, флаванони, метилирани флавоени и флаваноли) најчесто се екстрахираат со хлороформ, метилен хлорид, диетил етер и етил ацетат, додека гликозидите и поларните агликони се екстрахираат со алкохоли или нивни смеси со вода. Флаван-3-олите, проантоцијанидините и кондензираните танини се екстрахираат директно со вода (Andersen и Markham, 2006). За изучување на својствата на флавоноидите од есенцијално значење е можноста за нивна изолација и сепарација (аналитичка и препаративна), а потоа и идентификација. Техника која се покажала како најпогодна за квалитативна и квантитативна анализа е несомнено (високо ефикасната) течна хроматографија (HPLC), чија предност се состои во можноста од едновремена

сепарација, идентификација и квантификација, преку спрегање на истата со детектор со низа од диоди (DAD), масен детектор (MSD) или NMR спектрометар. Анализата на природни производи е овозможена со примена на DAD детектор, но најчесто се врши и спрегање со уште еден детектор чија цел е попрецизно определување на точната структура на дадениот аналит. Масениот детектор е најчесто користен за анализа на овие типови соединенија, заради можноста од примена на различни типови на јонизација, кои овозможуваат различни механизми на фрагментација на формираните јони и конечно нивна идентификација. Исто така за добивање на повеќе информации за структурата на испитуваните соединенија може да се добие преку користење на тандем анализатори. Пример за вакви техники кои овозможуваат повеќестепена тандем масена спектрометрија ( $MS^n$ ) се инструментите со анализатор со јонска стапица (IT). Кај ваквите системи, за протонирање (позитивен јонски мод) и депротонирање (негативен јонски мод) на молекулите се применуваат „помеки“ методи за јонизација (ESI и APCI) кои овозможуваат трансфер на пониска енергија во споредба со EI методот за јонизација кој е применлив при анализа со гасно-хроматографски техники (Grotewold, 2007). За аналитичко разделување на флавоноидите изборот на растворувач за екстракција, мобилна фаза и градиентот мора да бидат оптимизирани. Најголемиот број сепарации се вршат на октадецилсилил стационарни фази, но може да се искористат и октасилилни стационарни фази, иако во последните години нивната употреба е сè поретка (Andersen и Markham, 2006). Предуслов за успешноста во сепарацијата е правилно одбраната метода за екстракција, со која ќе бидат елиминирани можните интерференти, што доведува до поголема селективност и концентрација на аналитот/ите од интерес. Во дадени случаи, доколку е потребно може и да се дериватизира аналитот со цел определување на неговата структура со соодветна хроматографска техника.

*Foeniculum vulgare* Mill. содржи различни видови флавоноиди и фенолни киселини. Истражувањата покажале дека на овој вид соединенија им се припишува силната антиоксидациска, антиинфламаторна, цитопротективна, антиканцерогена и хепатопротективна активност (He и Huang, 2011; Vadgajar et al., 2014). Екстрактите добиени од различни делови на растението, со растворувачи со различна поларност покажале присуство на различни подкласи флавоноиди. Паралелно со определувањето на хемискиот состав на екстрактите, била определувана и нивната антиоксидациска активност (Parejo et al., 2004a; De Marino et al., 2007; Faudale et al., 2008). Екстрактите

со 96 % етанол добиени од цветовите, листовите и плодовите на *Foeniculum vulgare* Mill. покажале присуство на кемферол-3-*O*- $\alpha$ -L-рамнозид, кверцетин, изокверцетин, изорамнетин-3-*O*- $\beta$ -D-глукозид, рутин и кверцетин-3-*O*- $\beta$ -D-глукуронид (Soliman et al., 2002), додека кај диворастечките примероци од медитеранскиот регион, идентификувани биле ериодиктиол-7-*O*-рутинозид, кверцетин-3-*O*-рутинозид, кверцетин-3-*O*-глукуронид и розмаринска киселина (Faudale et al., 2008). Во водните екстракти идентификувани биле кверцетин-3-*O*-глукуронид, изокверцетин, кверцетин-3-арабинозид, кемферол-3-*O*-глукуронид, изорамнетин глукозид (Kunzemann и Hermann, 1977). Исто така, кверцетин-3-*O*-галактозид, кемферол-3-*O*-рутинозид и кемферол-3-*O*-глукозид (Parejo et al., 2004a). Освен флавоноиди, од плодовите на *Foeniculum vulgare* Mill., биле изолирани и идентификувани шесте изомери на дикафеоилхинска киселина и изомерите на кафеоилхинска киселина (Križman et al., 2007; Parejo et al., 2004a; Bilia et al., 2000; Cliford, 2003; Cliford, 2005). Исто така, од плодот на анасон во метанолни екстракти биле изолирани и карактеризирани два диглукозид тримери и дериват на бензоизофуранон (De Marino et al., 2007). Освен наброените флавоноиди, како конституенти на плодот од анасон биле идентификувани и фенхан-монотерпеноидни глукозиди, ментан-монотерпеноидни глукозиди, ациклични монотерпеноидни глукозиди, 1,8-цинеол-тип глукозиди, алкил глукозиди, *erythro*-анетол диол и *p*-хидроксифенилпропилен гликол глукозиди, како и глукозиди на ароматични соединенија (Kitajima et al., 1998a, Kitajima et al., 1998b; Ishikawa et al., 1998).

### 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДЕЛ

#### 3.1. Материјали и методи

Заради определување на хемискиот состав на неполарната фракција изолирана од плодовите, примероци беа добиени од одгледувачи на *Foeniculum vulgare* Mill. subsp. *vulgare* var. *dulce* (сладок анасон) од различни региони во Р. Македонија. Примероците од диворастечки *Foeniculum vulgare* Mill. беа обезбедени од билкособирачи, додека примероци од можен subsp. *piperitum* беа обезбедени во присуство и под стручен надзор на Академик Владо Матевски (Институт за биологија, ПМФ). Примероците кои послужија за следење на промената на хемискиот состав на етеричното масло со стареење на плодот, потекнуваат од с. Иванковци, Велешко, одгледувани на ист регион/локација и надморска височина. До времето на секоја наредна анализа целокупниот примерок беше чуван во хартиени ќеси на темно место и на амбиентална температура ( $25 \pm 4$  °C).

Во текот на истражувањето покрај испитувањата на индустриски релевантниот сладок анасон (var. *dulce*), беа собрани диворастечки примероци од неколку делови на Р. Македонија. Како водич беа земени претходните истражувања на Академик К. Мицевски и Академик В. Матевски опишани во книгата „Флора на Република Македонија” (Том I., св. 6, стр. 1584-1585). Подетални информации за регионот и географската положба на секој примерок се дадени во табела 3.1., додека за примероците кои беа комерцијално обезбедени е дадена само земјата на потекло на хербалниот примерок.

Табела 3.1. Податоци за географското потекло и вариететот на примероците од *Foeniculum vulgare* Mill., од Р. Македонија.

Реден број на примерокот	Ознака на примерокот	Латинско име/подвид/вариетет	Потекло	Координати		Надморска височина /m
1	12AF	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	с. Иванковци, Велешко (пред берба на плодот);	41°50'57.92"N	21°49'31.92"E	536
2	12A2F	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	с. Иванковци, Велешко (после берба);	41°50'57.92"N	21°49'31.92"E	536
3	11BF	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceu</i> , var. <i>dulce</i>	Титова Шума, Велешко;	41°43'25.49"N	21°47'19.45"E	221
4	11CF	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	Ез. Младост, Велешко;	41°46'34.00"N	21°45'58.31"E	287
5	11DF	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>vulgare</i>	Кумановско	42° 6'45.49"N	21°40'57.97"E	424
6	12EF	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	с. Конопиште, Кавадаречко;	41°14'55.44"N	22° 4'41.39"E	718
7	11GF	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	Tea plants, Велес;	41°42'48.82"N	21°44'44.94"E	250
8	12JF	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	с. Каратманово, Велешко;	41°45'59.52"N	21°52'14.37"E	303
9	12LF	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	Кукуш, Егејска Македонија;	/	/	/
10	11HFB	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	Кавадаречко;	41°25'35.83"N	21°59'10.61"E	359
11	11HFB1	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	Кавадаречко;	41°25'35.83"N	21°59'10.61"E	359
12	11MFB	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	с. Иванковци, Велешко;	41°50'57.92"N	21°49'31.92"E	536

Реден број на примерокот	Ознака на примерокот	Латинско име/подвид/вариетет	Потекло	Координати		Надморска височина /m
13	11MFB1	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	Иванковци, Велешко;	41°50'57.92"N	21°49'31.92"E	536
14	11KFB	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	Кавадаречко;	41°25'35.83"N	21°59'10.61"E	359
15	11LFB	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	Радовишко;	41°36'59.04"N	22°27'58.14"E	348
16	11IFB	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	Tea plants, Велес;	41°42'48.82"N	21°44'44.94"E	250
17	07PFB	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	с. Иванковци, Велешко	41°50'57.92"N	21°49'31.92"E	536
18	08OFB	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	с. Иванковци, Велешко	41°50'57.92"N	21°49'31.92"E	536
19	10NFB	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	с. Иванковци, Велешко	41°50'57.92"N	21°49'31.92"E	536
20	12KF	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	Кавадаречко;	41°25'35.83"N	21°59'10.61"E	359
21	12K2F	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	Кавадаречко;	41°25'35.83"N	21°59'10.61"E	359
22	13QF	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	с. Иванковци, велешко;	41°50'57.92"N	21°49'31.92"E	536
23	13RF	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	с. Иванковци, велешко;	41°50'57.92"N	21°49'31.92"E	536
24	13SF	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	с. Тремник, Неготино;	41°26'1.61"N	22°9'25.82"E	225
25	13TF	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	с. Иванковци, Велешко;	41°50'57.92"N	21°49'31.92"E	536

Реден број на примерокот	Ознака на примерокот	Латинско име/подвид/вариетет	Потекло	Координати		Надморска височина /m
26	13IPF	<i>Pimpinella anisum</i>	Херба Стојанови	/	/	/
27	11WFF	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceu</i> , var. <i>vulgare</i>	Кумановско, Див анасон;	/	/	/
28	12WFF	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceu</i> , var. <i>vulgare</i>	Баба Планина, Битолско;	41° 2'50.56"N	21°16'41.59"E	740
29	12FFA	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>azoricum</i>	Италија	/	/	/
30	12YPF	<i>Pimpinella anisum</i>	Грција;	/	/	/
31	13IVF	<i>Illicium verum</i> (star anis)	Мадагаскар;	/	/	/
32	13WFF	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceu</i> , var. <i>vulgare</i>	Драчево, Скопје;	41°55'35.70"N	21°30'38.07"E	352
33	13UF	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	Чашка, Велешко;	41°38'39.14"N	21°41'11.43"E	253
34	13XF	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	Кумановско;	42°10'23.66"N	21°49'30.90"E	423
35	14ENF	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	с. Иванковци, Велешко;	41°50'57.92"N	21°49'31.92"E	536
36	14MBF	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>capillaceum</i> var. <i>dulce</i>	с. Иванковци, Велешко;	41°50'57.92"N	21°49'31.92"E	537
37	1MBP	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>piperitum</i>	с. Богданци, Паљурци;	41°12'39" N	22° 35'56" E	103
38	2MBP	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>piperitum</i>	с. Богданци, Паљурци;	41° 12'36" N	22° 36'05" E	123

<i>Реден број на примерокот</i>	<i>Ознака на примерокот</i>	<i>Латинско име/подвид/вариетет</i>	<i>Потекло</i>	<i>Координати</i>		<i>Надморска височина /m</i>
39	3MBP	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>piperitum</i>	с. Црничани(поеѓу Богданци и Дојран	41° 14'27" N	22° 37'07" E	215
40	4MBP	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>piperitum</i>	с. Ѓопчели, Дојран	41° 14'25" N	22° 40'55" E	228
41	5MBP	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>piperitum</i>	Дојран, пред раскрсн.за Богданци и Валандово	41° 15'03" N	22° 40'55" E	228
42	6MBP	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>piperitum</i>	Дојран, пред раскрсн.за Богданци и Валандово	41° 15'03" N	22° 38'16" E	211
43	7MBP	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. <i>piperitum</i>	Валандово	41°17'28" N	22° 35'38" E	142

## 3.2. Растворувачи и реагенси

**3.2.1. Автентични стандарди за идентификација на компонентите од етеричното масло.** Стандардите (-)- $\alpha$ -пинен 98,0 %; (1*R*)-(-)-фенхон  $\geq$  98,0 %; (-)- $\beta$ -пинен 99,0 %, естрагол 98,0 %, *p*-цимен 98,0 %, *trans*-анетол 99,0 % и анисалдеhid 99,0 %, беа од Aldrich (Steinheim, Германија), додека (*R*)-(+)-лимонен беше од Sigma (Дизенхофен, Германија).

**3.2.2. Автентични стандарди за идентификација на компонентите од фиксното масло и внатрешни стандарди за квантификација на компонентите од етеричното и фиксното масло.** Стандардите метил миристант 99,5 %, метил палмитат, метилстеарат 98,0 %, метил олеат и метил линолеат 99,0 %, за гасно-хроматографски анализи беа доставени од Merck (Дармштад, Германија). Метил естер на хептадеканска киселина (метил хептадеканоат) 99,0 % и *n*-тетрадекан кои беа користени како интерни стандарди, исто така беа од Merck (Дармштад, Германија). Смесата од 37 метил естери на масни киселини (FAMES) со концентрација 10 mg/mL во метилен хлорид беше од Supelco, САД. Ментол (DAB квалитет) кој беше користен како внатрешен стандард при статични хедспејс гасно-хроматографски анализи со пламено јонизациски детектор (SHS-GC-FID), беше од Merck (Дармштад, Германија).

Како внатрешен стандард за квантификација на испарливите компоненти анализирани со SHS-GC-FID, беше користен (-)-ментол (квалитет според барањата на Европска фармакопеја 8.5) од Merck (Дармштад, Германија).

**3.2.3. Растворувачи и други реагенси потребни за подготовка на неполарната фракција за хроматографска анализа.** Растворувачите метилен хлорид  $>$  99,9 % р.а., *n*-хексан (GC чистота 97,0 %) и метанол (99,0 % за градиентни HPLC анализи) беа од Sigma-Aldrich (Штајнхајм, Германија). Безводен натриум сулфат и безводен натриум хидроген сулфат ( $>$  99,9 %) беа од Riedel-deHaën, Германија.

**3.2.4. Стандарди за идентификација и квантификација на испарливи секундарни оксидациски продукти.** Стандардите за идентификација и квантификација на секундарните компоненти кои се формираат во етеричното масло со стареење на плодот беа синтетизирани според постапки опишани во литературата. *trans*-Анетол

оксид беше синтетизиран според методата на Mohan и Whalen (1993). 1,2-дихидрокси-1-(4-метоксифенил) пропан како смеса од *threo/erythro* дијастереомери беше синтетизиран според процедурата на Carteau et al., (2007). GC-MS анализата потврдува дека добиениот продукт е смеса од 68,0 % *threo* диол ( $t_R = 31,87$  min) со масен спектар добиен со примена на електронска јонизација (EI-MS):  $m/z$  182 ( $M^+ - 2,5$ ), 164 ( $M^+ - H_2O$ , 24,0), 137 (42), 121 (100), 109 (7,0) и 32,0 % *erythro* диол ( $t_R = 32,08$  min)(EI-MS): ( $m/z$ 182 ( $M^+ - 2,5$ ), 164 ( $M^+ - H_2O$ , 24,0), 137 (42), 121 (100), 109 (7,0).

Според истата постапка, како смеса од дијастереомери беа синтетизирани и 1-етокси-1-(4-метоксифенил)-2-пропанол и 1-метокси-1-(4-метоксифенил)-2-пропанол, преку третирање на анетол епоксид со етанол и метанол, соодветно. Масените спектри се добиени со EI метода за јонизација на молекулите од 1-етокси-1-(4-метоксифенил)-2-пропанол:  $m/z$  210 ( $M^+ - 0,8$ ), 165 (34,0), 137 (33), 121 (100), 109 (15,0) и 1-метокси-1-(4-метоксифенил)-2-пропанол:  $m/z$  196 ( $M^+ - 0,6$ ), 164 (1.3), 135 (19,0), 151 (100), 121 (18,8), 77 (8,0).

Како алтернативна метода за добивање на смесата од дијастереомери, метанолен раствор на *trans*-анетол со концентрација 10 mg/mL, беше изложен на сончева светлина во кварцна кивета во времетраење од 36 h (според методата на Carteau et al., 2007). Реакционата смеса анализирана со GC-MS содржи 83,0 % *trans*-анетол, 6,3 % *cis*-анетол, 3,37 % 1-метокси-1-(4-метоксифенил)-2-пропанол [1,19 % *threo*-1-метокси-1-(4-метоксифенил)-2-пропанол, 1,19 % *erythro*-1-метокси-1-(4-метоксифенил)-2-пропанол] и 4,49 % анетол димер.

**3.2.5. Растворувачи и реагенси потребни за синтеза на стандардите за идентификација и квантификација на испарливите оксидациони продукти:** За синтеза на *trans*-анетол оксид, според методата на Mohan и Whalen (1993) беа користени следните реагенси: *trans*-анетол 99,0 % од Aldrich (Штајнхајм, Германија), натриум карбонат (99,5 % p.a, Merck-Alkaloid), *m*-хлоропероксибензоева киселина (77,0 %, Aldrich), натриум хлорид (99,5 % p.a, Merck-Alkaloid), безводен магнезиум сулфат (99,5 % p.a, Merck). Како растворувач беше користен метилен хлорид (> 99,9 % p.a) од Merck (Дармштад, Германија).

1,2-дихидрокси-1-(4-метоксифенил) пропан (како смеса од *threo/erythro* дијастереомери) беше синтетизиран според процедурата на Carteau et al. (2007). За

синтеза на овие соединенија беше користен *trans*-анетол оксид, 1,4-диоксан (99,5 % р.а, Merck), натриум перхлорат 99,5 % р.а, Merck), натриум хлорид (99,5 % р.а, Merck-Alkaloid), етил ацетат (99,5 % ACS реагенс, Aldrich), безводен магнезиум сулфат (99,5 % р.а, Merck). Како растворувач беше користена вода (HPLC чистота, Aldrich). Како алтернативна постапка за фотохемиско добивање на смесата од дијастереомери според Carreau et al., (2007), користени беа следните реагенси: *trans*-анетол 99,0 % и метанол (99,0 % за градиентни HPLC анализи) од Aldrich (Штајнхајм, Германија).

За синтеза на 1-метокси-1-(4-метоксифенил)-2-пропанол, беа користени истите реагенси употребени за синтеза на 1,2-дихидрокси-1-(4-метоксифенил) пропан, со единствена разлика: употреба на 99,0 % метанол за градиентни HPLC анализи како растворувач.

### **3.2.6. Растворувачи и реагенси користени за испитување на фотохемиската стабилност на *trans*-анетол и етерично масло изолирано од сладок анасон**

Метилен хлорид (> 99,9 %) р.а. квалитет, метанол (99 % за градиентни HPLC анализи), *trans*-анетол (99 %) и анисалдеhid (98 %) беа од Sigma-Aldrich (Штајнхајм, Германија). *n*-Тетрадекан (без олефини 99 %) користен како внатрешен стандард беше обезбеден од Merck (Дармштад, Германија).

### **3.2.7. Растворувачи користени за екстракција и разделување на полифеноли**

За екстракција беше користена смеса од метанол (99 % за градиентни HPLC анализи) и вода (спроводливост < 2 $\mu$ S/cm) од Sigma-Aldrich (Штајнхајм, Германија). Мравска киселина (puriss, 98-100 %) користена за подготовка на растворувач А (0,1 % мравска киселина) од градиентна мобилна фаза беше од Sigma-Aldrich (Штајнхајм, Германија), додека ацетонитрил (за изократна HPLC) користен како растворувач В, беше од Carlo Erba (Милано, Италија).

### 3.3. Подготовка на стандарди

**3.3.1. Подготовка на смеса од стандарди за идентификација на компонентите од етеричното масло.** За идентификација на главните компоненти од етеричното масло беше користена смеса од стандарди. Содржината на секоја компонента во смесата е следна: *trans*-анетол 3,2512 g (64,56 *m/m* %), естрагол 0,5020 g (9,97 *m/m* %), фенхон 0,2505 g (4,97 *m/m* %), *p*-цимен 0,1401 g (2,78 *m/m* %), лимонен 0,5040 mg (10,01 *m/m* %),  $\alpha$ -пинен 0,126.3 g (2,51 *m/m* %),  $\beta$ -пинен 0,1310 g (2,60 *m/m* %) и анисалдеhid 0,1306 g (2,59 *m/m* %). 100  $\mu$ L од стандардната смеса, беа растворени во метилен хлорид и потоа анализирани со гасно-хроматографска метода.

За идентификација и квантификација на компонентите од етеричното масло, анализирани со SHS-GC-FID, 100  $\mu$ L од смесата од автентични стандарди на компонентите од етеричното масло беа растворени во 10 mg/mL раствор на ментол во метанол. За определување на факторите на одговор на главните компоненти од етеричното масло, GC-FID анализите на етеричните масла беа изведени во трипликат. Понатамошните пресметки беа вршени со користење на *n*-тетрадекан како внатрешен стандард со фактор на одговор 1.0.

### **3.3.2. Подготовка на стандарди за едновремена идентификација на компонентите од етеричното и фиксното масло**

За квантификација на компонентите од етеричното масло беше користена смеса од 4 mg/mL *n*-тетрадекан и 4 mg/mL метил хептадеканоат во метилен хлорид, додека за квантификација на компонентите од целокупната неполарна фракција беше користена смеса од 4 mg/mL *n*-тетрадекан и 4 mg/mL метил хептадеканоат во *n*-хексан. За идентификација на масните киселини од фиксното масло, беше користена стандардна смеса од FAMES. Масите на компонентите за подготовка на стандардната смеса се следни: метил мирилат 3,8 mg, метил палмитат 24,8 mg, метил стеарат 8,3 mg, метил олеат 411,1 mg и метил линолеат 46,0 mg. 1,0 mL од стандардната смеса беше додаден пред процесот на трансестерификацијата на фиксното масло и пред подготовка на примерокот за хроматографска анализа. За определување на факторите на одговор на метил естерите на масните киселини, стандардната смеса од FAMES беше анализирана во трипликат, додека понатамошните пресметки беа направени со користење на метил хептадеканоат како внатрешен стандард со фактор на одговор 1,0.

### 3.3.3. Синтези на стандарди од испарливи секундарни продукти

#### 3.3.3.1 Синтеза на *trans*-анетол епоксид (Mohan и Whalen, 1993)

Во ладна водена бања, беше поставена двофазна смеса составена од 2,0 g *trans*-анетол во 60 mL метилен хлорид и 60 mL 10 % воден раствор од натриум карбонат и кон неа беше додаден раствор од 9,66 g *m*-хлоропероксибензоева киселина (50 %, 0,028 mol) во метилен хлорид. Добиената смеса се меша во времетраење од 3 часа. После префрлувањето на реакционата смеса во одделителна инка, слојот од метилен хлорид беше разделен, а потоа беше измиен со 10 % воден раствор од натриум карбонат (3 x 25 mL) и конечно измиен со заситен воден раствор од натриум хлорид (1 x 25 mL). После испарувањето на растворувачот се добива продукт, кој после дестилација (низ кратка апаратура за дестилација) се издвојува како маслена прозирна течност, со принос од 64,5 %.

#### 3.3.3.2 Синтеза на 1,2-дихидрокси-1-(4-метоксифенил)пропан

Раствор од анетол епоксид (60,0 mg, mmol во 0,2 mL диоксан) беше додаден кон 20 mL раствор од 1,4-диоксан и вода 5:95 (V/V) со pH 4, кој содржи 0,1 M NaClO<sub>4</sub>. Добиената смеса се меша на собна температура во времетраење од 60 min, а потоа беше заситена со натриум хлорид и конечно екстрахирана со етил ацетат (2 x 50 mL). Издвоените слоеви од етил ацетат беа соединети, измиени со заситен раствор од натриум хлорид (4 x 40 mL), а потоа исушени со безводен магнезиум сулфат. После отпарувањето на растворувачот, се добива маслена течност (смеса од *threo/erythro* дијастереомери) со принос од 74,0 %.

Исто така, како алтернативна метода за добивање на смесата од дијастереомери, беше користена методата на Carteau et al., 2007, според која метанолен раствор на *trans*-анетол со концентрација 10 mg/mL е изложен на светлина во кварцна кивета во времетраење од 48 h. Резултат на фотосинтезата е изомеризација на *trans*-анетол во *cis*-анетол, формирање на анисалдехид и анетол фотодимер и формирање на смеса од *threo*-1,2-дихидрокси-1-(4-метоксифенил)пропан и *erythro*-1,2-дихидрокси-1-(4-метокси-фенил)пропан.

### 3.3.3.3 Синтеза на 1-метокси-1-(4-метоксифенил)пропан2-ол

Раствор од 60 mg анетол оксид во 0,2 mL диоксан беше додаден кон 20 mL раствор од диоксан и метанол 5:95 (V/V), pH 4, кој содржи 0,1M NaClO<sub>4</sub>. Добиениот раствор беше чуван на собна температура во времетраење од 60 min, а потоа беше заситен со натриум хлорид и конечно екстрахиран со етил ацетат (2 x 50 mL). Издвоените слоеви од етил ацетат беа соединети, измени со заситен раствор од натриум хлорид (4 x 40 mL), а потоа исушени со безводен магнезиум сулфат. После отпарувањето на растворувачот, се добива масловиден продукт (смеса од threo/erythro дијастереомери) со принос од 65,0 %. Синтезата е извршена според адаптирана постапка на Carteau et al., (2007).

## 3.4. Подготовка на примероците за анализа

**3.4.1. Изолација на етерично масло:** Изолацијата на етеричното масло беше извршена со помош на хидродестилација, при што беше користена апаратура според Clevenger. Пред процесот на изолација, примерокот не беше подложен на претходен термален третман, односно сушење на температура од 105-110 °C во времетраење од 2 h (метода за одредување на вредноста на параметарот губиток при сушење според Европска фармакопеја 8.5). Во колба со волумен 1000 mL беа извагани 50,0 g зрели плодови, свежо измелени до -18+60 mesh (0,25-1,0 mm). Кон нив беа додадени 500 mL дејонизирана вода и примерокот беше дестилиран во времетраење од 3 часа, со стапка од 2,0-3,0 mL/min. После изминување на времето предвидено за хидродестилација, беше определен приносот на етеричното масло изразено во mL/100 g хербален примерок. После одвојувањето од водната фаза, кон етеричното масло беше додаден безводен натриум сулфат со цел отстранување на заостанатата вода. За гасно-хроматографски анализи, 100 µL од етеричното масло беа префрлени во тиквичка со волумен 10 mL и кон нив беа додадени 5 mL смеса од интерни стандарди, а потоа тиквичката беше дополнета со метилен хлорид до конечниот волумен. Најчесто, примероците од етерични масла беа анализирани веднаш после процесот на изолација. Оние примероци кај кои последователна анализа со хроматографска метода не беше

можна, беа чувани во добро затворени садчиња на температура од  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  и анализирани во текот на наредните 72 h.

За анализи со SHS-GC-FID, 5,0 g репрезентативен примерок беа свежо измелени до големина на честички -18+60 mesh. Во 22,0 mL садче за SHS-GC-FID анализа, веднаш беа извагани 10 mg, а потоа беа додадени 10  $\mu\text{L}$  раствор на ментол во метанол со концентрација 10 mg/mL како интерен стандард. Пред анализата, садчето беше добро затворено со тефлонски/силиконски септум (PTFE/Silicone septum). После подготовката, примероците беа веднаш анализирани со претходно развиена SHS-GC-FID метода.

**3.4.2. Soxhlet екстракција и трансестерификација:** 5,0 g од свежо измелениот примерок беа подложени на континуирана екстракција во Soxhlet апаратура, со користење на 3:1 V/V смеса од *n*-хексан и метилен хлорид. Екстракцијата беше вршена во времетраење од 3 h, а после ладење на добиениот екстракт до амбиентална температура, истиот беше сушен со безводен натриум сулфат во времетраење од најмалку 10 min. Трансформацијата на масните киселини во нивните метил естери беше постигната со базно катализирана трансестерификација на добиениот екстракт со 2,0 mol/L калиум метоксид. После третирање на екстрактот со безводен натриум сулфат, 3,0 mL беа префрлени во претходно исушена кивета опремена со сува магнетна тефлонски обложена мешалка. Потоа беше додаден 1,0 mL раствор од интерни стандарди (4 mg/mL *n*-тетрадекан и 4 mg/mL метил хептадеканоат во *n*-хексан). За одвивање на процесот на трансестерификација беа додадени 0,2 mL од 2 mol/L метанолен раствор на калиум хидроксид и добиената смеса беше постојано мешана во времетраење од 20 min. После изминување на предвиденото време за трансестерификација, на врв на шпатула беше додаден безводен натриум хидроген сулфат и смесата беше дополнително мешана уште 1 min. Потоа на врв на шпатула беше додаден безводен натриум сулфат и реакционата смеса беше дополнително мешана во времетраење од 1 min. После центрифугирање на смесата во времетраење од 5 min на 3000 rpm, 1,0 mL од издвоениот супернатант внимателно беше префрлен во садче за гасно-хроматографска анализа и веднаш анализиран со GC-FID и/или GC-MS.

**3.4.3. Подготовка на примероците за испитување на фотохемиска стабилност:** Примерокот од *trans*-анетол беше поставен во садче за GC анализа (без простор за воздух) и затворено. Кон него беше додаден внатрешен стандард (*n*-тетрадекан) и садчето беше изложено на светлина во период од 90 дена. Со цел да се одредат продуктите на оксидација, дополнителен експеримент беше изведен според методата на Carteau et al., (2007). Разреден метанолен раствор на чист *trans*-анетол беше ставен во кварцна кивета и изложен на сончева светлина во времетраење од 10 дена и 90 дена. Истовремено, во садче за GC анализа беше поставен примерок од етерично масло изолирано од сладок анасон и кон него беше додаден внатрешен стандард *n*-тетрадекан. Садчето беше наполнето целосно, без простор за воздух и изложено на сончева светлина во времетраење од 10 дена и 90 дена. Анализата на добиените смеси е извршена со истата хроматографска метода со која беа анализирани сите примероци од етерични масла. Идентификацијата на компонентите беше заснована на споредба на ретенционите времиња со оние на автентични стандарди, и дополнително со споредба на комерцијалните масени спектри сумирани во базата NIST 05.

**3.4.4. Изолација на полифеноли со смеса од метанол и вода:** Во кивета од 15 mL беа извагани 0,5 g од свежо измелен примерок од плод од *Foeniculum vulgare* Mill. и кон него беа додадени 10 mL 70 % метанол. Епруветата беше поставена на ултразвучна бања во времетраење од 30 min. После центрифугирање на смесата на 3000 rpm во времетраење од 25 min, добиениот супернатант беше декантиран во тиквица со волумен од 25 mL и потоа тиквичката беше дополнета до конечниот волумен со 70,0 % (V/V) метанол. 2,0 mL од припремениот раствор беа префрлени во садче за хроматографска анализа и веднаш анализиран со оптимизираната HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> метода.

### 3.5. Користена инструментација за анализа на примероците

Индексите на прекршување на стандардите и примероците од етерични масла беа одредени со помош на дигитален рефрактометар од серијата Krüss, A. Krüss Organic, додека инфрацрвени спектри беа снимени на Varian 3100 Excalibur series ATR-

FTIR спектрометар, со директно нанесување на примероците на ZnSe кристал во опсег од  $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$  и резолуција  $4\text{ cm}^{-1}$ .

Гасно-хроматографските анализи за разделување и карактеризација на компонентите беа изведени на Agilent 6890 GC систем, опремен со пламен-јонизациски детектор (FID) и Agilent 5973 GC автоматски земач на проби. За разделување на компонентите од етеричното масло и метил естерите на масните киселини беше користена SP2560 колона ( $100\text{ m} \times 0,25\text{ mm i.d.}$ ,  $0,20\text{ }\mu\text{m}$  дебелина на стационарната фаза), додека како мобилна фаза беше користен азот при константен проток од  $1,7\text{ mL/min}$ .  $1\text{ }\mu\text{L}$  од примерокот за анализа беше инјектиран во разделителен однос од 1:50 на  $250\text{ }^\circ\text{C}$ . Почетната температура на печката беше  $105\text{ }^\circ\text{C}$  и задржана на оваа вредност во времетраење од  $5\text{ min}$ , а потоа програмирана да се зголемува за  $10\text{ }^\circ\text{C/min}$  до  $240\text{ }^\circ\text{C}$  и да ја задржи оваа вредност во времетраење од  $20\text{ min}$ .

Паралелно, гасно-хроматографските анализи со масен детектор (GC-MS) беа изведени на Agilent Technologies 6890N GC Network систем, опремен со 7683B инјектор и автоматски земач на проби и 5975B Inert XL EI/CI MSD (масен детектор). За разделување на компонентите беше користена HP-5MS колона ( $30\text{ m} \times 0,25\text{ mm i.d.}$ ,  $0,25\text{ }\mu\text{m}$  дебелина на стационарната фаза), додека како гас носач (мобилна фаза) беше користен хелиум при константен проток од  $1,0\text{ mL/min}$ .  $1\text{ }\mu\text{L}$  од примерокот беше инјектиран во разделителен однос од 1:50 на температура од  $250\text{ }^\circ\text{C}$ . Почетната температура на печката беше задржана на вредност од  $140\text{ }^\circ\text{C}$  во времетраење од  $5\text{ min}$  и потоа програмирана да ја зголемува вредноста за  $10\text{ }^\circ\text{C/min}$  до конечна вредност од  $260\text{ }^\circ\text{C}$ . За јонизација на молекулите беше користен модот за електронска јонизација (EI), додека скенирањето беше во опсег од  $m/z\ 40\text{-}350$ .

Хедспејс анализите беа изведени на Perkin-Elmer TurboMatrix HS-110 trap, со автоматски хедспејс земач на проби со замка за концентрирање и пламен-јонизациски детектор HP-6980. HP-5 капиларна колона ( $30\text{ m} \times 0,32\text{ mm i.d.}$ ,  $0,25\text{ }\mu\text{m}$  дебелина на стационарна фаза) беше користена за разделување на компонентите, додека азот беше користен како гас носач. Анализата на примероците со овој систем беше изведена во класичен статичен хедспејс мод со инјектиран волумен од  $150\text{ }\mu\text{L}$ , без концентрирање со замка (анг. without trap enrichment). Условите за анализа беа следни: температура на термостатирање  $145\text{ }^\circ\text{C}$ , температура на иглата  $150\text{ }^\circ\text{C}$  и температура на трансфер линијата  $160\text{ }^\circ\text{C}$ , соодветно. Времето на термостатирање изнесува  $35,0\text{ min}$ ,

времето за кое пробата е под притисок изнесува 0,2 min и времето на инјектирање изнесува 0,15 min. Притисокот на колоната беше подесен на 100 kPa (15 psi). Инјекторот на гасниот хроматограф беше подесен на 220 °C, додека инјектирањето на пробите се вршеше без примена на разделно инјектирање. Температурата на детекторот беше подесена на 250 °C, додека температурната програма на печката применета за оваа анализа беше следна: почетната температура беше подесена на 40 °C и не беше променета во следните 3 min, а потоа беше зголемена за 20 °C/min до вредност од 105 °C, а потоа зголемена за 40 °C/min до конечна вредност од 240 °C.

За сепарација, структурна карактеризација и квалитативна анализа на полифенолните компоненти беше користен течен хроматограф Agilent Technologies 1100 LC, спрегнат со UV/Vis детектор со низа од диоди (G1315D DAD) и Agilent Technologies 6330 IonTrap LC/MS масен детектор со јонска стапица. Течниот хроматограф е составен од бинарната пумпа 1312A, автоматски земач на проби G1329A, дегазер 1379 B и термостат за колоната G1316A. Контрола на системот се врши со помош на Chemstation v.08.03. Акумулатор на јони и масен анализатор во системот е јонската замка. Заради поефикасно прифаќање и ладење на јоните во јонската замка се користи хелиум, кој истовремено служи и за судири со јоните при MS<sup>n</sup> опративен мод.

За хроматографско разделување на полифенолните компоненти беше користена колона Luna C18 (250 mm × 4,6 mm i.d., 5 µm дебелина на стационарната фаза, Phenomenex). Мобилната фаза е смеса од два растворувачи: 0,1 % (V/V) раствор на мравска киселина во вода (A) и ацетонитрил (B). Разделувањето е извршено со следните промени на градиентот во текот на времето:

t (min)	0	10	20	30	40	45	50
B (%)	20	35	45	60	90	100	100

Вкупното време за анализа инесува 50 min, со продолжено време за анализа од 5 min. Протокот на мобилната фаза изнесува 0,5 mL/min, инјектираниот волумен од анализот изнесува 50 µL, додека температурата на колоната изнесува 25 °C. UV-Vis спектрите на компонентите се снимени во спектрално подрачје од 190-600 nm бранова должина, додека хроматограмите беа снимени на 300 nm за флавоноиди и 330 nm за хидроксициметни киселини.

За јонизирање на молекулите од анализот со електроспреј јонизација (ESI), се користи азот под притисок. Температурата и потенцијалот на изворот се 325 °C и 3,5 kV, соодветно. Притисокот на азот како небулизер гас изнесува 50 psi, додека протокот на гасот за сушење изнесува 12 L/min. Масените спектри се снимени во негативен јонски мод, со скенирање во подрачје  $m/z$  од 100 до 1200, со користење на опцијата за зачувување на линиските и профилните спектри, додека масените спектри се добиени како просек од 5 масени спектри, снимени во “smart” модот. Масениот детектор е контролиран со помош на Agilent v.6.1. Понатамошната фрагментација на јоните се одвива заради судири со хелиум и се одвива при променлив напон со вредност од 0,3 до 2 V. Максималното дозволено време за акумулација на јони во масениот анализатор изнесува 300 ms.

## 4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

### 4.1. Изолација и прелиминарна анализа на етеричното масло

Заради прегледност во прикажување на резултатите добиени со прелиминарна анализа, како и со споменатите гасно-хроматографски техники, за споредба одбрани беа седум примероци од плод од *Foeniculum vulgare* Mill. собрани од различни региони во Р. Македонија. Врз основа на нивните морфолошки карактеристики, пет од овие примероци беа класифицирани како *Foeniculum vulgare* Mill., ssp. *vulgare*, var. *dulce*, додека преостанатите два диворастечки примероци беа класифицирани како *Foeniculum vulgare* Mill, subsp. *vulgare*, var. *vulgare* (табела 3.1). Трендовите за физичко-хемиските карактеристики, како и за резултатите добиени од хроматографските анализи, важат за сите анализирани примероци од *Foeniculum vulgare* Mill. subsp. *vulgare*, var. *dulce*. Двата примерока од диворастечкиот анасон се во целост споредувани во продолжение на овој пасус. Табела 4.1 содржи податоци за потеклото на примероците, каде воедно се дадени и податоци за приносот и индексите на рефракција на етеричните масла.

Табела 4.1. Потекло на *Foeniculum vulgare* Mill., приноси и физички својства.

Примерок	Потекло	Географска Ширина/Должина	Надморска височина (m)	Година на берба	$n_D^{20}$	Етерично масло (принос mL/100g)*	Soxhlet екстракција (принос / %)*
13UF	Чашка, Велешко	41°38'39.14"N 21°41'11.43"E	253 m	08.2012	1,5502	3,31 ± 0,06	20,21 ± 0,15
13RF	Иванковци, Велешко	41°50'57.92"N 21°49'31.92"E	536 m	08.2013	1,5509	3,08 ± 0,06	20,26 ± 0,52
13SF	Тремник, Неготино	41°26'1.61"N 22° 9'25.82"E	225 m	08.2013	1,5484	3,38 ± 0,07	19,87 ± 0,24
12KF	Конопиште, Кавадаречко	41°25'35.83"N 21°59'10.61"E	359 m	08.2012	1,5496	2,80 ± 0,07	19,32 ± 0,18
12A2F	Иванковци, Велешко	41°50'57.92"N 21°49'31.92"E	536 m	08.2012	1,5513	3,0 ± 0,06	21,31 ± 0,21
12WFF	Планина Баба, Битолско	41° 2'50.56"N 21°16'41.59"E	740 m	08.2012	1,5173	5,52 ± 0,04	22,12 ± 0,35
13WFF	Драчево, Скопје	41°55'35.70"N 21°30'38.07"E	352 m	08.2013	1,5437	5,16 ± 0,10	18,40 ± 0,38

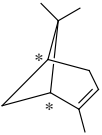
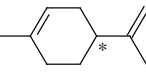
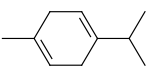
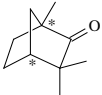
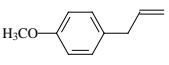
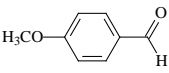
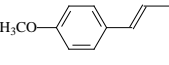
\*Вредностите во табелата се добиени како средни вредности ± SD од три последователни експерименти.

Според Европската фармакопеја 8.5, минималната специфицирана вредност за принос на етерично масло од сладок анасон (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *dulce*) изнесува 2,0 mL/100 g, пресметано на сув хербален примерок. Добиеното етерично

масло би требало да содржи минимум 80,0 % *trans*-анетол, максимум 10,0 % естрагол и максимум 7,5 % фенхон. Вредноста за индексот на рефракција не е специфицирана во монографијата за етерично масло од вариететот *dulce*. Од друга страна, Европската фармакопеја 8.5 специфицира 4,0 mL/100 g минимална вредност за приносот на етерично масло изолирано од вариететот *vulgare*, кое би требало да содржи од 55,0-75,0 % *trans*-анетол 12,0-25,0 % фенхон и максимум 6,0 % естрагол. Индексот на рефракција е специфициран помеѓу две гранични вредности од 1,528-1,539, додека релативната густина изнесува од 0,961-0,975. Споредбата на резултатите добиени од определувањето на овие физички параметри, укажува на разлики во хемискиот состав на маслото помеѓу вариететите.

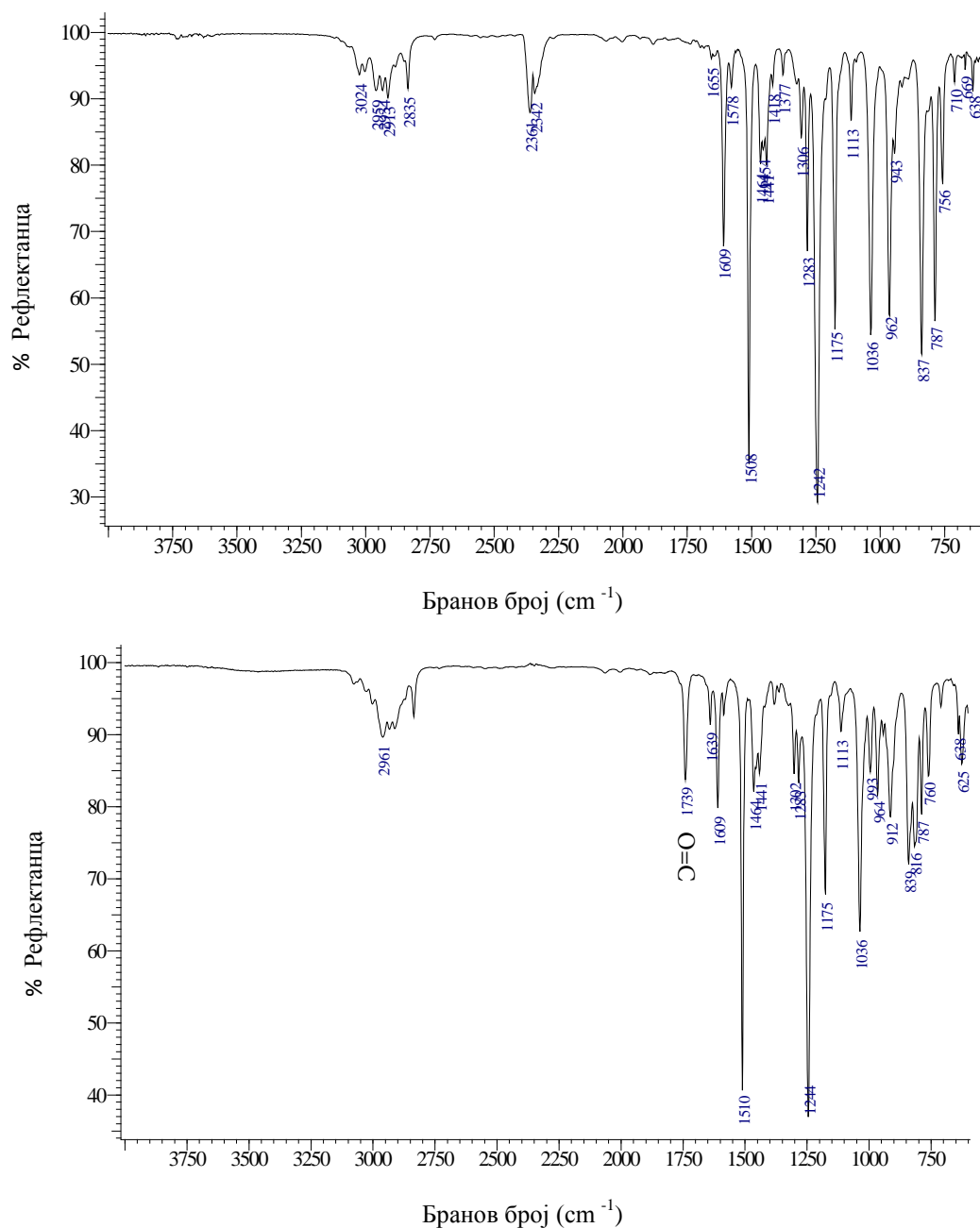
Прв индикатор е различната вредност на приносот на етерично масло помеѓу класифицираните вариетети. Вредностите за приносот кај вариететите *dulce* се во согласност со барањата дефинирани во монографијата од Европската фармакопеја 8.5, додека приносите на етеричните масла изолирани од примероците на див анасон имаат вредности 5,52/100 g и 5,16 mL/100 g почетен хербален материјал. Добиените вредности ги задоволуваат барањата дадени во монографијата на Европската фармакопеја 8.5 за вариететот *vulgare*. Етеричните масла изолирани од плодовите на вариететот *dulce* имаат карактеристичен интензивен мирис и арома. Бојата на истите може да варира, но најчесто е бледо жолта до жолта. Од добиените вредности за индексот на рефракција, може да се претпостави дека се работи за примероци кои имаат висока содржина на *trans*-анетол, чија вредност за индексот на рефракција на 20 °C изнесува 1,5614. Според измерените вредности за индексот на рефракција на диворастечките примероци, примерокот 12WFF има најниска вредност, која е помала и од минималната вредност на индексот на рефракција специфицирана во монографијата за вариететот *vulgare* дадена во Европската фармакопеја 8.5. Во табела 4.2 сумирани се вредностите на релевантните физички својства на чистите компоненти од етеричното масло изолирано од плодот на сладок анасон. Со споредба на вредностите на индексите на рефракција на чистите компоненти и на етеричното масло, се забележува дека колку е поголема содржината на *trans*-анетол во примерокот од етерично масло, толку вредноста на индексот на рефракција на етеричното масло ќе се приближува до вредност 1,5614.

Табела 4.2. Физички својства на чисти компоненти изолирани од етерично масло од анасон.

	Структура	$\rho$ / (g/cm <sup>3</sup> )	$n_D^{20}$	$\alpha$ / (°)	$T_b$ / (°C)	IR ленти/ (cm <sup>-1</sup> )	Состав Ph. Eur. горчлив анасон	Состав Ph.Eur. сладоk анасон
$\alpha$ -пинен (1)		0,8591	1,4663	+ 51,14 (d-изомер)	155-166	1447 787	1-10%	н.д.
лимонен (5)		0,8402 (21 °C)	1,4744 (21 °C)	+ 123.8 (d-изомер)	175 -176	1645 1437 885	0,9-5%	н.д.
$\gamma$ -терпинен (7)		0,853 (15 °C)	1,4754 (15 °C)	/	183	1466 1447 948	/	н.д.
фенхон (10)		0,948 (18 °C)	1,4636 (18 °C)	+ 66,9 (d-изомер)	193,5	1740 (C=O)	12-25	макс. 7,5%
естрагол (11)		0,9645 (21 °C)	1,5230 (17,5 °C)	/	216	1510 1244 (C-O-C Ar етер)	макс. 6%	макс. 10%
анисалдеhid (13)		1,119 (15°C)	1,5764 (13 °C)	/	248	2741 1689 (C=O)	макс. 2%	н.д.
<i>trans</i> -анетол (12)		0,9883	1,56145	/	231-237	1607 1250 835	55-75%	мин. 80%
етерично масло (var. vulgare)	/	0,961- 0,975	1,528-1,539	+ 10,0 ° до +24,0°	/	/	/	/

Кај етеричните масла изолирани од примероците од див анасон, вредноста на индексот на рефракција е пониска, што укажува и на пониска содржина на *trans*-анетол, во однос на етеричните масла изолирани од вариететот *dulce*. Индексите на рефракција на сите анализирани примероци од етерично масло се сумирани во табела 7.1, дадена во прилог на дисертацијата. Како дел од прелиминарната анализа беа снимени и ATR-FTIR спектри на чистите компоненти, на стандардната смеса од компонентите од етеричното масло, како и на примероците од етерични масла изолирани од *Foeniculum vulgare* Mill. Разликата во спектрите од етеричните масла од различните подвидови и вариетети, е лентата на  $1739\text{ cm}^{-1}$ , карактеристична за C=O валентна вибрација. Оваа лента е специфична за чист фенхон и може да биде почетен индикатор при одредување на квалитетот на етеричното масло, како и за прелиминарна слика за неговиот хемиски состав (слика 4.1.).

Во литературата, дадени се многу податоци за вредности на приносот на етерично масло кои се во границите од 2,0-4,0 mL/100 g, кај кои била определена висока содржина на *trans*-анетол и ниска содржина на естрагол и фенхон (Miraldi, 1999; Damjanovic et al., 2005; Cosge et al., 2008a; Anwar et al., 2009; Raal et al., 2011). Наведените студии даваат потврда за сличноста во хемискиот состав на етеричните масла од плодот од вариететот *dulce* кои потекнуваат од различни географски региони, но сепак ги задоволуваат барањата за квалитет кои се дадени во монографијата за истиот вариетет во Европската фармакопеја 8.5.



Слика 4.1. FTIR-ATR спектри од етерично масло од плод на *Foeniculum vulgare* Mill. var. *dulce* (горе) и етерично масло од плод на *Foeniculum vulgare* Mill. var. *vulgare* (долу).

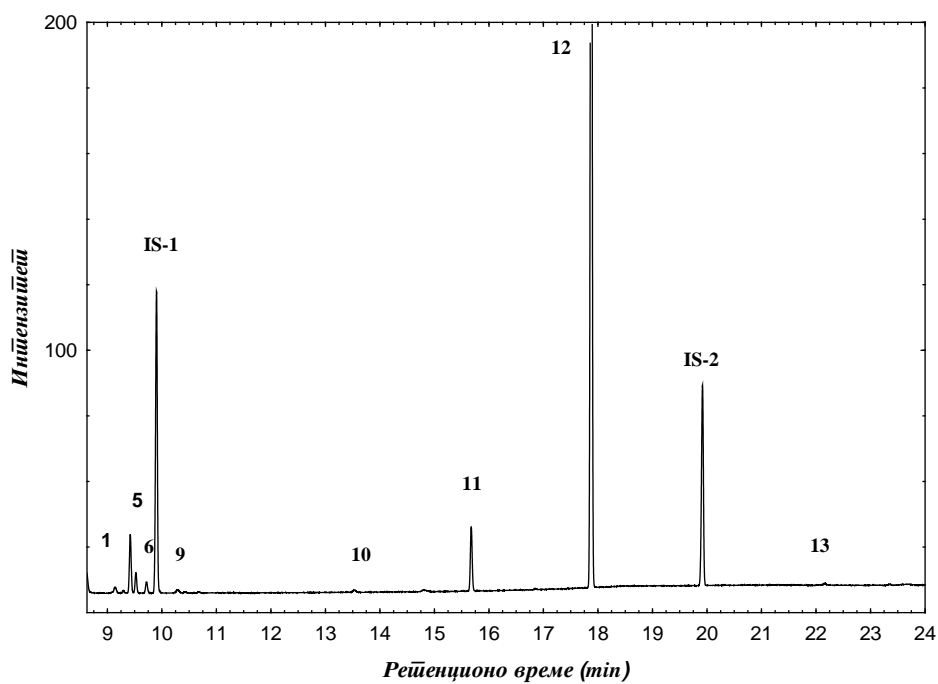
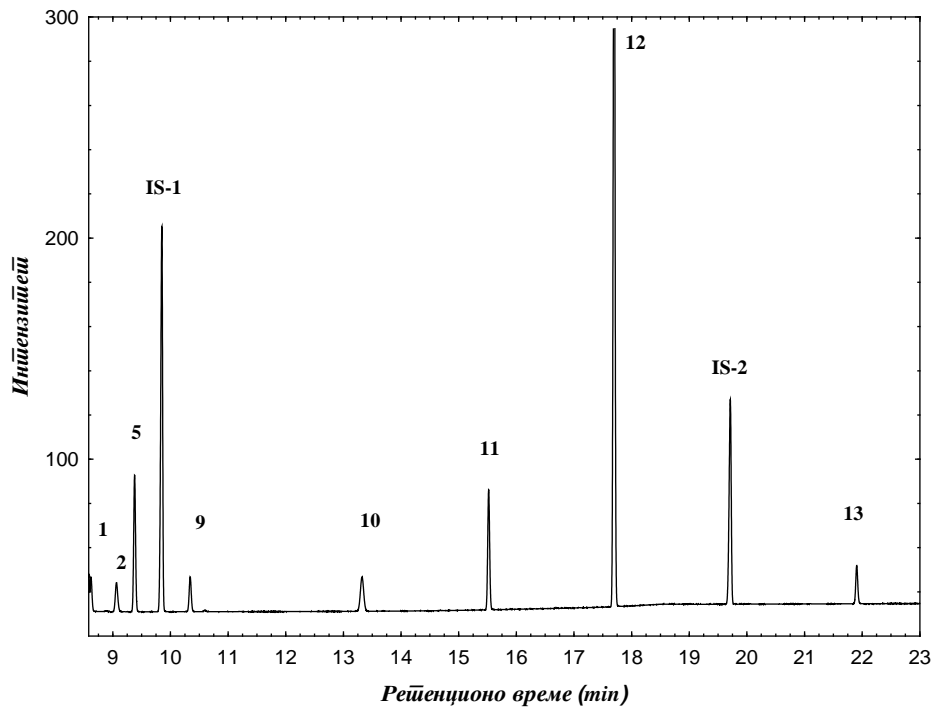
#### 4.1.1. Развивање GC-FID метода за разделување и идентификација на компонентите од етеричното масло на високо поларна колона

Заради определување на хемискиот состав на етеричното масло изолирано од плодовите на *Foeniculum vulgare* Mill., беше развиена GC-FID метода со користење на поларна силика капиларна колона со поли(бисцијанопропилсилоксан) стационарна

фаза. Ваквата стационарна фаза не е типична за разделување и определување на компоненти од етерични масла, заради високата поларност и специфична намена за разделување на позициони и *cis/trans* изомери на метил естери на масни киселини. Исто така, ваквите стационарни фази може да дадат неочекуван редослед на елуирање на компонентите, споредено со помалку поларните стационарни фази кај кои доминантен фактор за разделување е испарливоста на компонентите, односно нивните температури на вриење.

Важен дел од истражувањето беше да се провери соодветноста на поларната стационарна фаза, а потоа истата да се искористи за разделување на монотерпените и фенилпропаноидите присутни во етеричното масло изолирано од плодите на *Foeniculum vulgare* Mill. Овие колони имаат релативно ниска температурна граница (240 °C), додека самото разделување на сложени органски смеси е овозможено со зголемување на протокот на мобилната фаза. За оптимизирање на условите за разделување беше користена автентична смеса од стандарди на главните компоненти на етеричното масло од *Foeniculum vulgare* Mill. Клучните параметри за разделување на компонентите беа: почетната температура на печката, температурната програма и протокот на мобилната фаза. Почетно, потребно беше да се оптимизираат услови за хроматографска анализа, како и соодветен растворувач во кој ќе бидат припремени стандардните раствори и примероците за анализа. Како почетна температура на печката беше зададена вредност од 140 °C, задржана во времетраење од 5 min, а потоа програмирана да се зголемува за 5 °C/min до конечна вредност од 240 °C, при константен проток на мобилната фаза од 1,7 mL/min. Стандардните раствори од испарливите компоненти беа припремени во *n*-хексан, метилен хлорид, бензен и *n*-пентан, со цел да се определи ефикасноста на разделувањето и редоследот на елуирање на компонентите. При приложената почетна температура немаше задоволително разделување на  $\alpha$ -пинен од растворувачите, освен кога како растворувач беше користен *n*-пентан. Причините за добиените резултати се релативно повисоките температури на вриење на *n*-хексан и бензен во однос на метилен хлорид и *n*-пентан, но и поларноста на самите растворувачи. Дополнително, целокупното разделување се врши на поларна колона, на која  $\alpha$ -пинен има слабо задржување. За да се постигне подобро разделување, како и за да се намали времето за анализа, беше модифицирана примарната метода со задавање на пониски вредности на температурата на печката, но и пониска вредност на протокот на мобилната фаза. Задоволително разделување на  $\alpha$ -пинен од растворувачот

беше постигнато во *n*-пентан при почетна температура од 120 °C и проток од 1,7 mL/min, но заради високата вредност на парниот притисок (висока испарливост, а со тоа и можна промена на концентрациите на компонентите од етеричното масло), како посоодветен финален растворувач за хроматографска анализа беше одбран метилен хлорид. Овој растворувач има помала вредност на парниот притисок и следствено помала испарливост. Оптималната почетна вредност на температурата на печката изнесува 105 °C, вредност која е задржана во првите 5 min, а потоа програмирана да се зголемува за 10 °C/min до конечна вредност од 240 °C, при константен проток на мобилната фаза од 1,7 mL/min. Вкупното време на анализа изнесува 38,50 min. Развиената метода применета на автентична смеса од стандарди и примерок од етерично масло од плод од *Foeniculum vulgare* Mill, даде задоволително разделување на компонентите на приложената стационарна фаза, при што забележително е елуирањето на монотерпеноидите на пониски ретенциони времиња во однос на фенилпропаноидите (слика 4.2). Земајќи предвид дека монотерпеноидите се неполарни компоненти, не е изненадувачки фактот дека тие се најкратко задржани и следствено елуираат на пониски ретенциони времиња. На повисоки ретенциони времиња елуираат фенилпропаноидите како резултат на подолгото задржување на приложената стационарна фаза и при дадените хроматографски услови. Од прикажаните хроматограми може да се потврди дека естрагол, *trans*-анетол и анисалдехид се најдолго задржани компоненти, кои од целокупната смеса елуираат на највисоки ретенциони времиња. Анисалдехидот елуира последен, дури и во случајот на разделување на целокупната неполарна фракција изолирана од плодот на *Foeniculum vulgare* Mill.

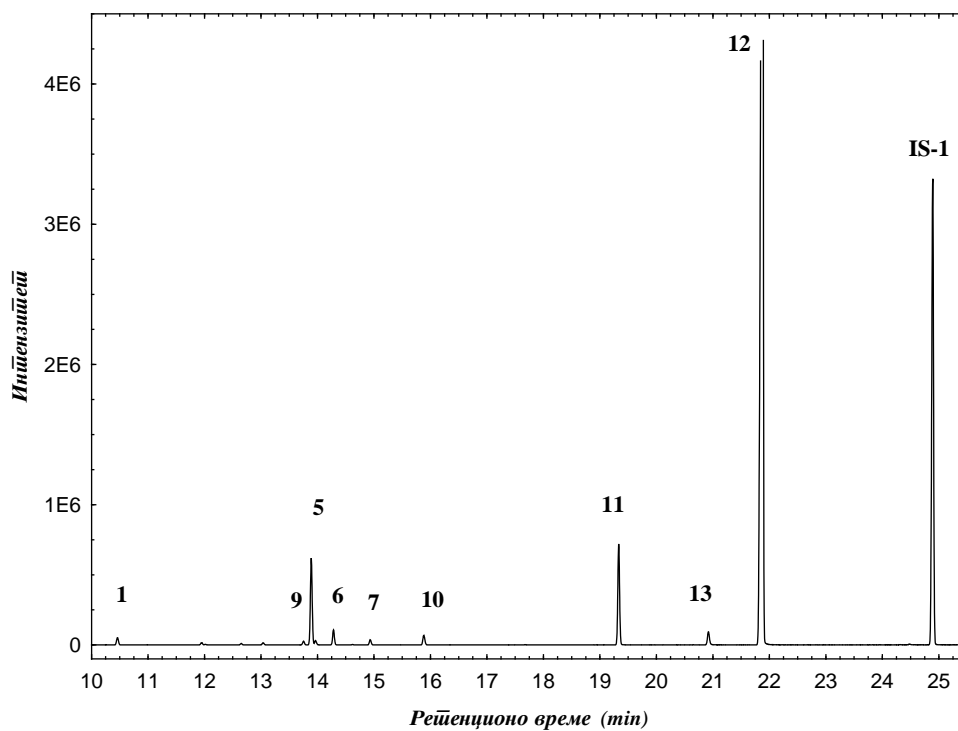
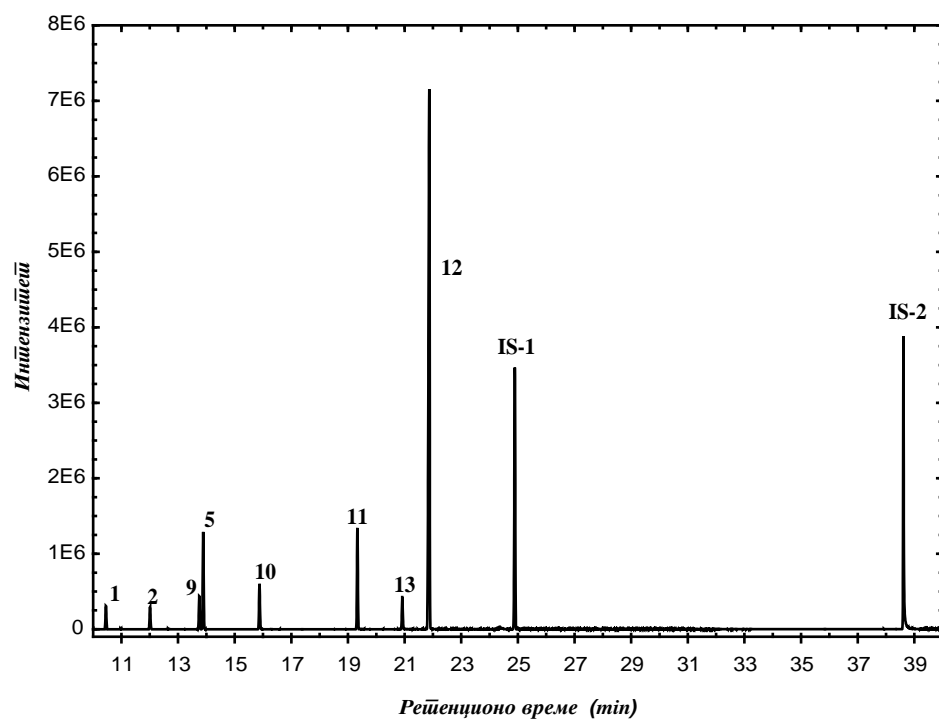


Слика 4.2. Гасни хроматограми на автентична смеса од компоненти на етерично масло и интерни стандарди со приложена поларна силика капиларна колона SP2560 (горе) и етерично масло од примерок од сладок анасон (долу).

#### **4.1.2. Развивање GC-MS метода за разделување и идентификација на компонентите од етеричното масло**

Заради тестирање на ефикасноста на поларната колона, за споредба беше развиена метода за разделување и квалитативно определување на содржината на компонентите од автентичната смеса од етерични масла со GC-MS, а потоа истата беше применета за анализа на примероци од етерични масла изолирана од плодот на *Foeniculum vulgare* Mill. Разделувањето и релативната застапеност на компонентите со споменатата хроматографска техника, беа тестирани на неполарна колона HP-5 MS (30 m × 0,25 mm i.d., 0,25 µm дебелина на стационарната фаза), која е вообичаена за разделување на компоненти од етерични масла со GC-MS. При развивање на методата, беше земено предвид дека монотерпените имаат температури на вриење поголеми од 150 °C, додека кај фенилпропаноидите оваа вредност надминува 200 °C. Врз основа на овие податоци како почетна температура за разделување беше зададена вредност од 40 °C. Оваа вредност е задржана во времетраење од 5 min, а потоа програмирана да ја зголемува вредноста за 5 °C/min до 140 °C. За постигнување на конечната температура од 260 °C зададена е стапка за промена од 10 °C/min. Вкупното време за анализа изнесува 52,0 min. Овие вредности за температурата на печката беа оптимални за разделување на монотерпените кои елуираат на пониски ретенциони времиња во однос на фенилпропаноидите. Како оптимална вредност на протокот на мобилната фаза беше вредноста од 1,0 mL/min.

Идентификацијата на компонентите од етеричните масла беше извршена со споредба на добиените хроматограми со смесата од стандарди на главните компоненти од етеричното масло (слика 4.3), додека помалку застапените компоненти беа определени со помош на анализа на добиените фрагменти и споредба на експериментално добиените масени спектри со спектри од библиотека NIST 05. При одредување на составот на сложени органски смеси/етерични масла, пожелно е да се направи анализа на истите на колони со различна поларност, заради исклучување на можното коелуирање на компоненти со слична структура.



Слика 4.3. Гасни хроматограми добиени од анализа на автентична смеса од компоненти на етерично масло и интерни стандарди со приложена 30 m капиларна колона HP5-MS (горе) и примерок од сладок анасон масло (долу).

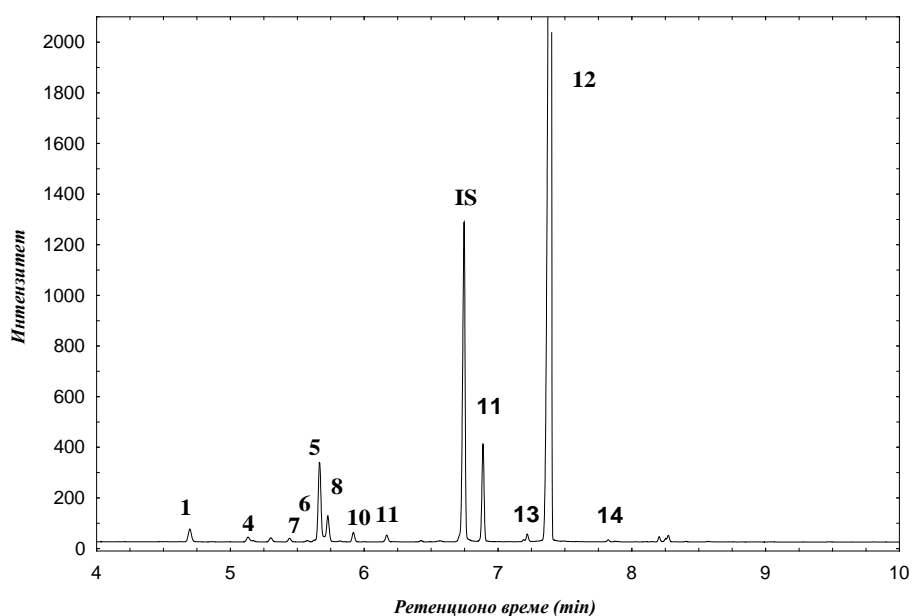
Споредбата на добиените резултати покажува дека нема препокривање на компоненти при разделување на поларната колона SP2560. Исто така, споредбата на релативната застапеност на компонентите добиени со HP-5MS колона, со релативната застапеност на компонентите разделени со SP2560, потврдуваат дека развиената метода на применетата поларна стационарна фаза е применлива за разделување, идентификација и квантификација на компонентите од етерично масло изолирано од *Foeniculum vulgare* Mill.

#### **4.1.3. Развивање SHS-GC-FID метода за разделување и идентификација на компонентите од плодот на *Foeniculum Vulgare* Mill.**

Како појдовна точка за развивање на SHS-GC-FID метода со која ќе се постигне разделување и идентификација на целокупната испарлива неполарна фракција, како почетен водич беше земена методата на Križman et al., (2006). Во неговата студија опишано е разделувањето на испарливата фракција од плод на *Foeniculum vulgare* Mill. со користење на микро шприц систем за земање на гасовити примероци (анг. gas syringe sampling system). Во опишаната метода оптимизирани биле условите за сепарација на испарливите компоненти, каде е вклучено и определување на прецизноста, точноста, сензитивноста и линеарноста на развиената метода. Според оваа студија, максимална ефективност на поминување на компонентите од течна во гасна фаза е постигната на температура од 145 °C, додека термостатирање на примерокот во времетраење од 35 min е доволно за десорпција на испарливите компоненти. При оптимизирање на нашите услови за сепарација со користење на друг вид систем за внесување на пробата т.е. внесување на пробата со балансирање на притисокот (анг. balanced pressure sampling system), важно е да се одредат вредностите на притисокот кој е приложен во пробата пред инјектирањето, времето под притисок (анг. pressurization time), како и вредноста на температурата на трансфер линијата која директно ги поврзува иглата од хедспејс единицата (анг. static head space unit) и колоната во гасниот хроматограф. Како оптимални вредности за температурите на термостатирање, иглата и трансфер линијата беа избрани соодветно 145 °C, 150 °C и 160 °C. Вредностите на времето на термостатирање, времето под притисок и времето на инјектирање беа соодветно 35,0 min, 0,2 min и 0,15 min. Инјектирањето може да се

врши само во неразделителен мод, додека разделувањето на компонентите беше вршено на HP-5 (30 m × 0,32 mm i.d., 0,25 µm дебелина на стационарната фаза) капиларна колона, која вообичаено се користи за анализа на етерични масла и со која во текот на истражувањето беше овозможена споредба на добиените податоци со податоците добиени од анализа на етеричните масла со GC-MS (HP-5MS колона).

Во делот на подготовка на пробите за анализа, додавањето на 20 µL вода според оригиналната постапка беше изоставено, заради можноста од формирање на секундарни продукти, кои иницијално не се биосинтетизираат во плодот од *Foeniculum vulgare* Mill. На слика 4.4 даден е хроматограмот добиен од SHS-GC-FID анализа на примерок од плод на *Foeniculum vulgare* Mill. var. *dulce*.

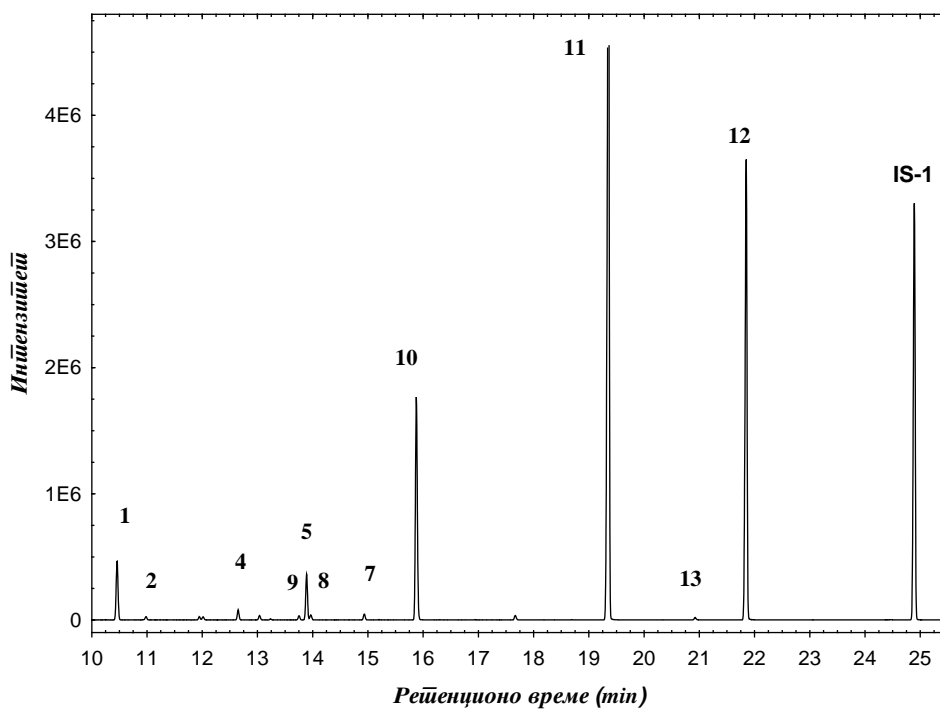
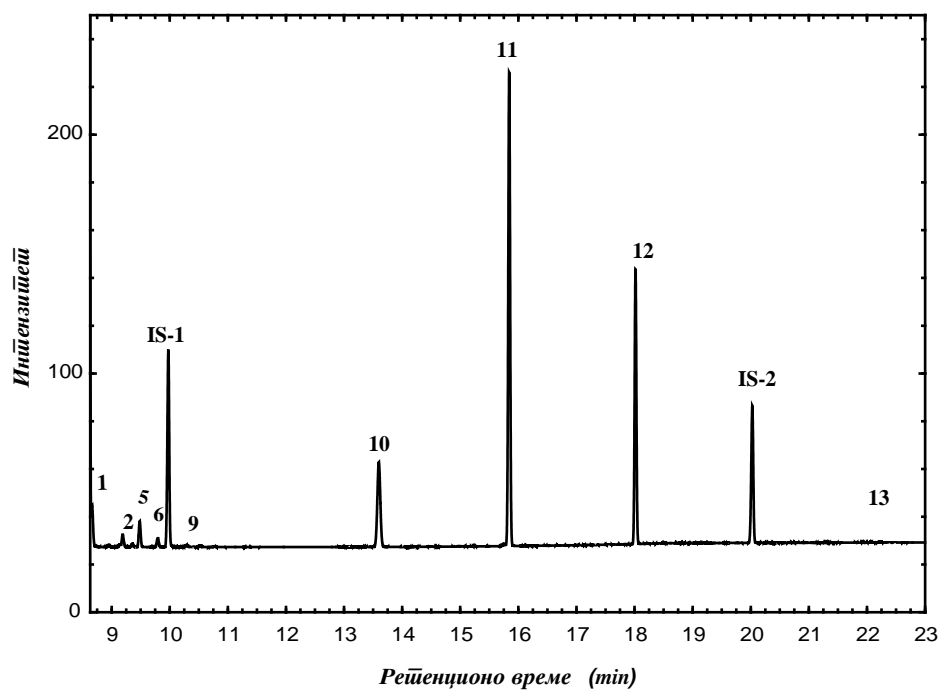


Слика 4.4. SHS-GC-FID хроматограм на испарливи компоненти од плодот на сладок анасон.

#### 4.1.4. Споредба на резултатите добиени од GC анализа на испарливите компоненти од плодот на *Foeniculum vulgare* Mill.

Според хроматограмите добиени од анализа со трите споменати гасно-хроматографски техники, општо може да се забележат очекувани разлики во редоследот на елуирање на компонентите, заради разликите во составот и поларноста на применетите стационарни фази. Разлики во редоследот на елуирање се забележуваат

кај монотерпенските структури при споредба на стационарните фази со различна поларност. 1,8-Цинеол елиура веднаш после лимонен и  $\gamma$ -терпинен на поларната стационарна фаза SP2560, додека на неполарната HP-5MS, истиот елуира веднаш после лимонен (слика 4.5). *p*-Цимен кој структурно претставува алкилбензен, биосинтетизиран од  $\gamma$ -терпинен, е гранична компонента меѓу монотерпенските и фенилпропаноидните структури. Оваа компонента на поларната стационарна фаза е задржана подолго и елуира после 1,8-цинеол и лимонен, додека на неполарната стационарна фаза елуира пред двете споменати компоненти. Забележителна разлика во елуирањето на фенилпропаноидите е и елуирањето на анисалдехид, кој на поларната стационарна фаза е најдолго задржан и елуира последен, додека на неполарната фаза најдолго задржана компонента е *trans*-анетол. Анисалдехид на неполарната колона елуира пред *trans*-анетол. Анализата и споредбата на сложени органски смеси/етерични масла на стационарни фази со различна поларност е оправдана и пожелна, заради потврда на целосното разделување на компонентите, односно докажување дека нема препокривање, т.е коелуирање на определени компоненти од анализираната смеса.



Слика 4.5. Гасни хроматограми на етерично масло од див анасон (12WFF) добиени на SP-2560 (100 m × 0,25 mm i.d., 0,20 μm дебелина на стационарната фаза) (горе) и HP5-MS (30 m × 0,25 mm i.d., 0,25 μm дебелина на стационарната фаза) (долу).

Во табела 4.3, дадени се масените удели на главните компоненти од етеричното масло определени со примена на GC-FID на поларна стационарна фаза. Вредностите беа определени преку пресметување на факторите на корекција од податоци добиени од анализирана автентична смеса од стандарди, составена од главните компоненти на етеричното масло и внатрешни стандарди *n*-тетрадекан метил естер на хептадеканска киселина (за пресметките *n*-тетрадекан беше земен како внатрешен стандард со фактор на одговор 1). Врз основа на добиените хроматографски податоци, етеричното масло изолирано од култивирани примероци содржи повеќе од 80,0 % *trans*-анетол, помалку од 6,0 % естрагол и помалку од 1,0 % фенхон. Овие резултати го потврдуваат вариететот на анализираните примероци како *F. vulgare* subsp. *vulgare* var. *dulce* (сладок анасон) и воедно се во согласност со барањата од Европската фармакопеја 8.5. Дополнително, овие примероци имаат висок квалитет, заради високата содржина на *trans*-анетол и ниската содржина на фенхон и естрагол.

**Табела 4.3.** Хемиски состав на етерични масла добиени со хидродестилација и анализирани со GC-FID на колона SP-2560 (100 m × 0.25 mm i.d., 0.20 μm дебелина на стационарната фаза).

				13UF*	13RF*	13SF*	12KF*	12A2F*	12WFF**	13WFF**
	Соединение	<i>t<sub>r</sub></i> (min)	RI	<i>m/m</i> (%)	<i>m/m</i> (%)	<i>m/m</i> (%)	<i>m/m</i> (%)	<i>m/m</i> (%)	<i>m/m</i> (%)	<i>m/m</i> (%)
1	α-пинен	8,668	1047	0,38±0,01	0,42±0,01	0,41±0,14	0,81±0,05	0,58±0,10	0,21±0,01	0,21±0,03
2	β-пинен	9,139	1175	0,42±0,01	0,57±0,04	0,45±0,00	0,32±0,01	0,24±0,02	1,48±0,08	0,84±0,01
4	мирцен	9,300	1196	0	0	0,16±0,00	0	0	0,28±0,00	0,23±0,00
5	лимонен	9,426	1326	3,76±0,03	3,84±0,06	4,97±0,06	3,64±0,00	3,04±0,02	2,52±0,02	0,84±0,00
6	<i>trans</i> -оцимен	9,514	1352	1,10±0,00	1,14±0,01	1,02±0,01	0,27±0,00	0,62±0,00	0	0
7	γ-терпинен	9,721	1392	0,47±0,00	0,68±0,01	0,50±0,00	0	0,37±0,00	0,87±0,00	1,25±0,00
8	1,8-цинеол	10,232	1437	0,17±0,00	0,23±0,01	0,23±0,01	0,29±0,00	0,35±0,02	0,25±0,00	0,19±0,00
9	<i>p</i> -цимен	10,421	1490	0,11±0,01	0	0	0,60±0,01	0,10±0,01	0,09±0,00	0,10±0,00
10	фенхон	13,470	1784	0,46±0,01	0,31±0,01	0,70±0,01	0,47±0,00	0,51±0,01	14,79±0,03	9,69±0,01
11	естрагол	15,665	1998	4,47±0,01	4,85±0,00	5,87±0,00	5,77±0,36	5,77±0,01	51,43±0,06	3,80±0,01
12	<i>trans</i> -анетол	17,839	2242	87,41±0,01	87,11±0,14	84,68±0,26	82,88±0,42	87,07±0,21	27,35±0,06	82,37±0,14
13	анисалдеhid	22,098	2820	0,90±0,01	0,44±0,00	0,73±0,00	4,79±0,05	1,1±0,01	0,17±0,01	0,13±0,11

\*Примероци од сладок анасон; \*\*Примероци од див анасон; Средни вредности ± SD од три одделни експерименти. Содржината е изразена како *m/m* (%).

Диворастечките примероци, иако класифицирани како ист подвид, потврдија значителна разлика во застапеноста на главните компоненти. Имено, застапеноста на компонентите добиена со анализа на примерокот од етерично масло WF1 изнесува: α-

пинен 0,28 %, лимонен 2,52 %, 14,79 % фенхон, 51,43 % естрагол, 27,35 % *trans*-анетол и анисалдехид 0,17 %. Споредувајќи ги вредностите на содржината на секоја компонента со границите дадени во Европската фармакопеја 8.5 за подвидот *vulgare*, само вредностите на  $\alpha$ -пинен, естрагол и *trans*-анетол не се во согласност со барањата зададени во споменатата монографија. Од друга страна, било објавено дека се познати неколку хемотипови кои имаат ниска содржина на *trans*-анетол (помалку од 50 %), висока содржина на фенхон (повеќе од 30 %) и висока содржина на естрагол (повеќе од 30 %) (Teuscher, 2005). Вториот примерок од див анасон (13WFF), кој беше собран во близина на Скопје, има висока содржина на *trans*-анетол (82,37 %), ниска содржина на естрагол (3,80 %) и релативно ниска содржина на фенхон (9,69 %). Процентуалната застапеност на другите компоненти изнесува:  $\alpha$ -пинен 0,21 %, лимонен 0,84 % и анисалдехид 0,13 %. Споредени со барањата на Европската фармакопеја 8.5 за вариететот *vulgare*, овие вредности не се во согласност, примарно заради високата содржина на *trans*-анетол и пониска содржина на фенхон. Овие вредности се многу поблиску до граничните вредности зададени за вариететот *dulce*. Единствената вредност која не е во согласност е вредноста на содржината на фенхон, која според овие барања не треба да биде поголема од 7,5 %. Во поголемиот број случаи, застапеноста на *trans*-анетол и фенхон се сметаат за определувачки кога е во прашање определувањето на вариететот. Големиот број анализи кои биле направени заради разрешување на ова прашање укажуваат на фактот дека определувањето на хемискиот состав на етеричното масло секогаш не е доволно за разграничување на видовите/вариететите. Причината е значителната варијабилност на содржината на соединенијата кои го карактеризираат вариететот. За вакви гранични случаи (примерок 13WFF), класификацијата е сè уште отежната и неопходни се дополнителни параметри, вклучувајќи и ботаничка идентификација.

#### **4.2. Развивање метода за едновремена екстракција на фиксното и етеричното масло и идентификација на компонентите со GC-FID и GC-MS**

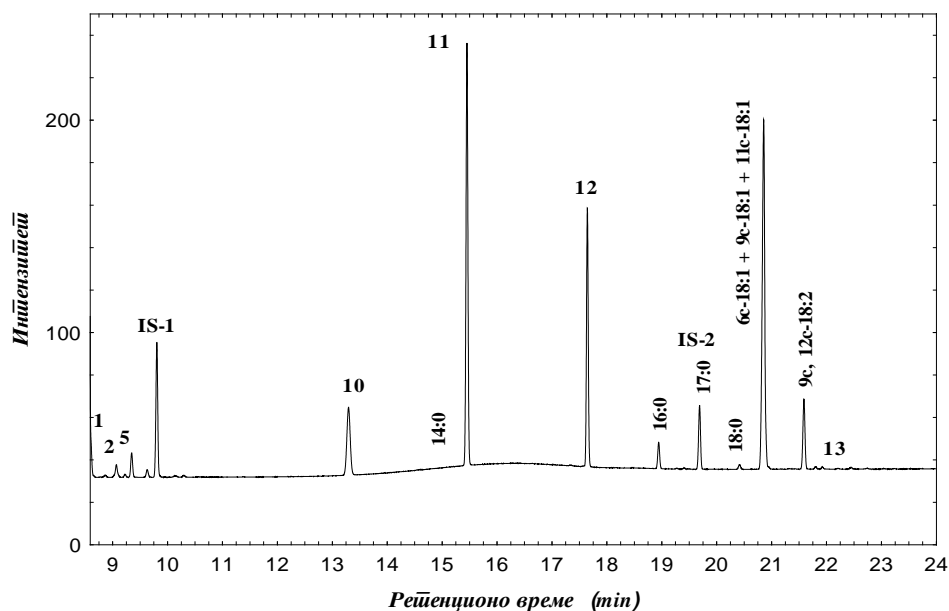
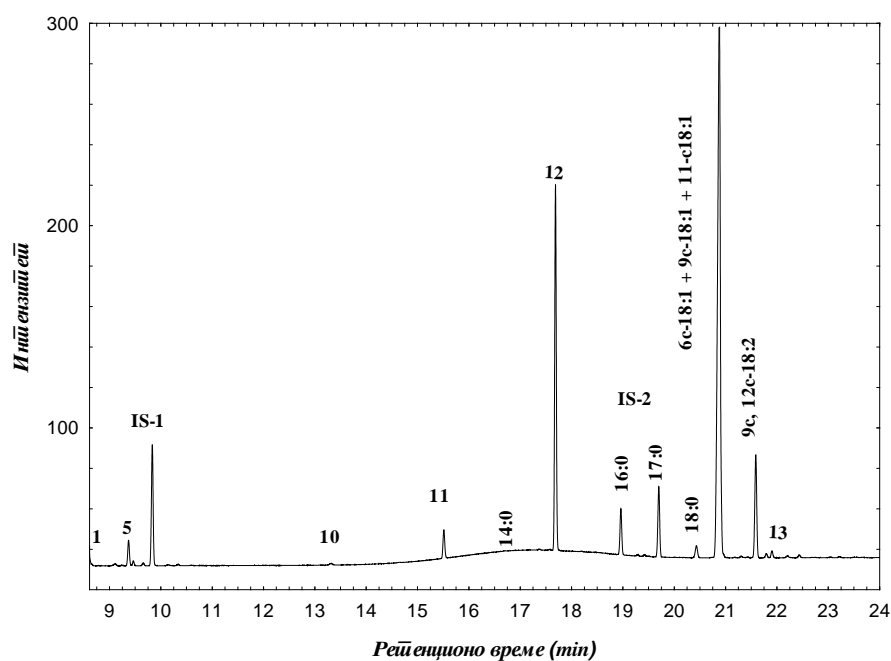
Со цел да се изведе едновремена анализа на компонентите од етеричното масло и компонентите од фиксното масло, неопходна беше дериватизација на масните киселини во нивни естери, пред да биде извршена анализа со GC метода. Најчесто, профилот на масните киселини се определува со конверзија на триглицеридите во

соодветните метил естери на масни киселини (FAMES). Во литературата опишани се повеќе процедури за овој вид реакции кои за нашите цели беа исцрпно ревидирани (Haslam, 1980; Christie, 1993). Овие реакции може да се поделат на кисело и базно катализираните трансестерификации. За предвидената анализа, кисело катализираната трансформација не е соодветна бидејќи може да предизвика *cis/trans* изомеризација на незаситените масни киселини, како и образување на алилни метокси продукти. Исто така, при овие услови можна е и изомеризација на естрагол во неговиот постабилен изомер *trans*-анетол, или пак изомеризација до *cis/trans*-анетол.

Од друга страна, базно-катализираната трансестерификација може да биде изведена при благи реакциони услови со  $\text{NaOCH}_3$  или  $\text{KOCH}_3$ , кои воедно се и најчесто користени реагенси за ваков вид трансестерификација. Овие услови нема да предизвикаат структурни промени кај компонентите од етеричното масло (екстрахирани истовремено со фиксното масло), но ќе овозможи квантитативна трансформација на триглицеридите до соодветните естери. За квантитативна трансформација два фактори од кои зависи ефикасноста треба да бидат оптимизирани: условите на екстракција (со цел да се добие потполна екстракција на компонентите од етеричното масло и триглицеридите) и реакционите услови за трансестерификација на триглицеридите (со цел да се обезбеди квантитативна конверзија до соодветните метил естери. После неколку обиди, без претходно сушење на примерокот, се покажа дека смесата од *n*-хексан и метилен хлорид (V/V, 3:1) е соодветна за едновремена и квантитативна екстракција на испарливите компоненти и триглицеридите.

Заради едновремено определување на хемискиот состав на етеричното и фиксното масло изолирани од плодовите на *Foeniculum vulgare* Mill. со помош на метода која овозможува нивна истовремена екстракција и хроматографска анализа, беше развиена GC-FID метода со користење на 100 m поларна силика капиларна колона со поли(бисцијанопропилсилоксан) стационарна фаза. За оваа цел беа направени обиди за разделување со смеси од растворувачи со примена на веќе опишаната метода за разделување на етеричните масла. Иако природата на компонентите од испарливата и неиспарливата фракција е сосема различна, висока почетна температура и низок проток не се задоволителни за да постигне целосно разделување. Развиената метода потребно е да овозможи и целосно разделување на анисалдехид од метил линолеат, кои на приложената стационарна фаза елуираат со мала разлика во ретенционите времиња. Заради постигнување на подобра сепарација за

што пократко време на анализа, беше тестирана смеса од хексан и бензен (V/V, 3:1), која во понатамошните анализи не беше користена бидејќи  $\alpha$ -пинен елуира помеѓу двете компоненти од смесата од растворувачи. Смесата од растворувачи, *n*-хексан и метилен хлорид е соодветна заради тоа што  $\alpha$ -пинен елуира на повисоко ретенционо време од двете компоненти од смесата, што покажува дека истата е оптимална за подготовка и на места од стандарди за идентификација и квантификација на изолираните компоненти. Со цел да се провери дали можеби се јавува коелуирање меѓу екстрахираните компоненти, стандардна смеса од FAMES и компонентите од етеричното масло беше анализирана под истите услови како и стандардната смеса од компонентите од етеричното масло. Со споредбата на добиените хроматограми може да се потврди соодветноста на приложените хроматографски услови за разделување на компонентите од етеричното масло и FAMES. Споредбата на добиените хроматограми укажува на добро разделени монотерпени, фенилпропаноиди и метил естери на масни киселини. Земајќи ја предвид поларноста на поли(бисцианопротилсилоксан) стационарната фаза, беше очекувано дека сите компоненти од етеричното масло ќе елуираат пред метил естерите на масните киселини. Исклучок од очекуваното се *trans*-анетол и анисалдехид, кои според хроматограмите се компоненти кои се најдолго задржани на стационарната фаза. Помеѓу метил миристант и метил палмитат елуира *trans*-анетол, додека најдолго задржан е анисалдехид кој се јавува како компонента која последна елуира со ретенционо време повисоко од ретенционото време на метил линолеат. Во продолжение, дадена е слика 4.6 на која се прикажани хроматограмите добени од GC-FID анализа на целокупната неполарна фракција на примероци од див и сладок анасон. Анализата на стандардната смеса од компоненти од етерично масло, FAMES и интерни стандарди е дадена во прилог на слика 7.16d.



Слика 4.6. Гасни хроматограми на екстрахиран/трансестерифициран примерок од сладок анасон (горе) и екстрахиран/трансестерифициран примерок од див анасон (долу) добиени на 100 m силика SP-2560 колона.

Од хроматограмите се забележува редоследот на елуирање на FAMES на SP2560 колона. FAMES имаат поголеми вредности на ретенционите времиња отколку компонентите од етеричното масло (слика 4.6) (со исклучок на метил миристант кој елуира пред *trans*-анетол) со редослед на елуирање: метил естери на заситени масни киселини (14:0), (16:0) и (18:0), метил естери на мононезаситени масни киселини (18:1) и метил естери на полинезаситени масни киселини (18:2). Според литературните податоци (Reiter et al., 1998), од плодовите на *Foeniculum vulgare* Mill. изолирани биле трите положбени изомери на октадекенска киселина (18:1): петроселинска (6с-18:1), олеинска (9с-18:1) и ваценска киселина (11с-18:1). Според литературните податоци содржината на петроселинската киселина (6с-18:1) е во опсег од 70,4-78,9 %. Содржините на олеинската киселина (9с-18:1) и ваценската киселина (11с-18:1) се во опсег од приближно 5,0 % и 0,3-0,4 %, соодветно, што сумирано изнесува приближно 80,0 % мононезаситени положбени изомери на октадекенска киселина (18:1) во плодот од *Foeniculum vulgare* Mill.

За квантификација на компонентите екстрахирани со соодветната метода, иницијално беше избран метил хептадеканоат (метил маргарат) како внатрешен стандард. Доколку е присутна вода во реакционата смеса дури и во занемарливи концентрации, метил маргаратот ќе хидролизира, како и сите останати метил естери во реакционата смеса. За максимална сигурност дека интерниот стандард не хидролизирал во текот на реакцијата, беше додаден *n*-тетрадекан како втор внатрешен стандард со иста концентрација како и метил хептадеканоат. *n*-Тетрадекан не е подложен на хидролиза и е стабилен при приложените реакциони услови. Вредностите за содржината на компонентите од целокупната неполарна фракција се дадени во табела 4.4. Според добиените податоци содржините на масните киселини во анализираните примероци од сладок анасон се во согласност со податоците дадени во литературата. Имено, Cosge et al., (2008b) нашле 0,67 % миристинска киселина (14:0), 4,76 % палмитинска киселина (16:0), 1,53 % стеаринска киселина (18:0), 75,18 % петроселинска киселина (6с-18:1), 6,15 % олеинска киселина (9с-18:1) и 11,18 % линолна киселина (9с,12с-18:2). Анализираните екстракти од сладок анасон покажуваат присуство на миристинска киселина (14:0) во опсег од 0,12-0,27 %, палмитинска киселина (16:0) во опсег од 4,27-5,15 %, стеаринска киселина (18:0) во опсег од 1,44-1,77 %, вкупни положбени изомери 18:1 од 80,94-83,04 % и линолна киселина 10,79-11,87 %. Примероците од див анасон имаат слични вредности на

вкупната содржина на положбените изомери на октадекенска киселина (18:1), 80,27 % (12WFF) и 79,51 % (13WFF) и слични вредности на содржината на палмитинска (4,75 % и 4,90 %) и линолна киселина (13,23 % и 13,27 %). Содржината на миристинска киселина (14:0) изолирана од овие примероци е 0,22 % и 0,77 % соодветно, додека содржината на стеаринска киселина (18:0) е приближно 1,0 %. Со користење на различна температурна програма можно е да се разделат положбените изомери 18:1 (слика 7.16<sub>z</sub>, во прилог), но самото зголемување на вредноста на почетната температура предизвикува коелуирање на монотерпените  $\alpha$ -пинен и  $\beta$ -пинен со растворувачот.

**Табела 4.4.** Хемиски состав на етерично масло изолирано со: а) хидродестилација и б) Soxhlet екстракција проследена со трансестерификација анализирана со GC-FID (резултатите се дадени како *m/m* (%)).

	Соединение	$t_r$ (min)	13UF*	13RF*	13SF*	12KF*	12A2F*	12WFF**	13WFF**
<b>а) Хидродестилација</b>									
1	$\alpha$ -пинен	8,668	0,38±0,01	0,42±0,01	0,41±0,14	0,81±0,05	0,58±0,10	0,21±0,01	0,21±0,03
2	$\beta$ -пинен	9,139	0,42±0,01	0,57±0,04	0,45±0,00	0,32±0,01	0,24±0,02	1,48±0,08	0,84±0,01
4	мирцен	9,300	н.д.	н.д.	0,16±0,00	н.д.	н.д.	0,28±0,00	0,23±0,00
5	лимонен	9,426	3,76±0,03	3,84±0,06	4,97±0,06	3,64±0,00	3,04±0,02	2,52±0,02	0,84±0,00
6	<i>trans</i> -оцимен	9,514	1,10±0,00	1,14±0,01	1,02±0,01	0,27±0,00	0,62±0,00	н.д.	н.д.
7	$\gamma$ -терпинен	9,721	0,47±0,00	0,68±0,01	0,50±0,00	н.д.	0,37±0,00	0,87±0,00	1,25±0,00
8	1,8-цинеол	10,232	0,17±0,00	0,23±0,01	0,23±0,01	0,29±0,00	0,35±0,02	0,25±0,00	0,19±0,00
9	<i>p</i> -цимен	10,421	0,11±0,01	н.д.	н.д.	0,60±0,01	0,10±0,01	0,09±0,00	0,10±0,00
10	фенхон	13,470	0,46±0,03	0,31±0,01	0,70±0,01	0,47±0,00	0,51±0,01	14,8±0,03	9,69±0,02
11	естрагол	15,665	4,47±0,01	4,85±0,00	5,87±0,00	5,77±0,36	5,77±0,01	51,4±0,1	3,80±0,01
12	<i>trans</i> -анетол	17,839	87,4±0,03	87,1±0,1	84,7±0,3	82,9±0,4	87,1±0,2	27,3±0,1	82,4±0,1
13	анисалдехид	22,098	0,90±0,01	0,44±0,00	0,73±0,00	4,79±0,05	1,1±0,01	0,17±0,01	0,13±0,11
<b>б) Soxhlet екстракција проследена со трансестерификација</b>									
1	$\alpha$ -пинен	8,668	0,36±0,11	0,41±0,07	0,28±0,07	0,39±0,10	0,77±0,02	0,22±0,02	0,26±0,12
2	$\beta$ -пинен	9,139	1,02±0,03	н.д.	0,72±0,02	0,80±0,07	0,46±0,03	1,61±0,02	1,21±0,01
4	мирцен	9,300	0,27±0,03	0,53±0,02	0,30±0,01	н.д.	н.д.	0,33±0,01	0,31±0,01
5	лимонен	9,426	5,47±0,08	5,42±0,08	6,40±0,08	5,68±0,01	7,03±0,08	2,64±0,04	1,10±0,01

	Соединение	$t_r$ (min)	13UF*	13RF*	13SF*	12KF*	12A2F*	12WFF**	13WFF**
6	<i>trans</i> -оцимен	9,514	1,66±0,05	2,93±0,05	1,32±0,03	0,92±0,01	1,69±0,02	н.д.	н.д.
7	$\gamma$ -терпинен	9,721	0,81±0,05	1,22±0,03	0,68±0,05	0,69±0,01	1,0±0,06	0,87±0,01	1,56±0,01
8	1,8-цинеол	10,232	0,36±0,03	0,46±0,07	н.д.	0,39±0,07	0,32±0,04	0,26±0,02	0,22±0,02
9	<i>p</i> -цимен	10,421	н.д.	н.д.	н.д.	0,35±0,02	0,28±0,00	0,24±0,01	0,23±0,01
10	фенхон	13,470	0,52±0,06	0,44±0,07	0,80±0,02	0,78±0,02	0,43±0,03	15,0±0,1	8,71±0,05
11	естрагол	15,665	4,00±0,14	4,75±0,27	6,54±0,07	6,96±0,06	5,07±0,11	50,1±0,04	3,56±0,09
12	<i>trans</i> -анетол	17,839	83,9±0,7	83,5±0,6	81,6±0,1	80,8±0,8	82,2±0,2	28,2±0,1	82,4±0,1
13	анисалдехид	22,098	1,59±0,09	0,33±0,07	1,34±0,05	1,85±0,07	0,74±0,04	0,30±0,01	0,34±0,03
24	14:0 (метил миристат)	17,525	0,13±0,01	0,12±0,01	н.д.	0,13±0,01	0,27±0,05	0,22±0,03	0,77±0,04
25	16:0 (метил паламитат)	19,107	4,40±0,25	4,27±0,11	4,81±0,4	4,57±0,01	5,15±0,19	4,75±0,10	4,90±0,10
26	18:0 (метил стеарат)	20,554	1,44±0,07	1,33±0,08	1,68±0,05	1,51±0,01	1,77±0,11	0,95±0,03	0,96±0,18
28,29,30	18:1 положбени изомери	20,995	82,8±0,3	83,0±0,1	81,8±0,5	82,4±0,1	80,9±0,5	80,3±0,2	79,5±0,4
31	9c, 12c-18:2 (метил линолеат)	21,763	10,8±0,1	10,8±0,1	11,1±0,0	10,8±0,0	11,9±0,2	13,2±0,1	13,3±0,1

\*Примероци од сладок анасон; \*\*Примероци од див анасон; Дадените вредности се изразени како средна вредност  $\pm$  SD од три одделни експерименти; н.д. означува дека компонентата не е детектирана.

Следен важен чекор беше споредбата на содржината на компонентите од етеричното масло добиени со хидродестилација и со Soxhlet екстракција. Резултатите добиени со GC-FID анализи на етеричните масла (табела 4.4) и трансестерифицираните примероци се многу слични, со незначителни разлики во содржината на монотерпените. Разликите меѓу главните компоненти (*trans*-анетол, естрагол, фенхон, лимонен и анисалдехид) се незначителни, што потврдува дека испарливите компоненти од етеричното масло не биле хемиски трансформирани во текот на екстракцијата и реакцијата на трансестерификација. Ваквото однесување на испарливите компоненти беше очекувано, бидејќи монотерпеноидите и фенилпропаноидите присутни во плодот од анасон немаат кисели и/или функционални групи подложни на хидролиза. Врз основа на добиените резултати може да се заклучи дека компонентите од етеричното масло биле целосно изолирани и не биле структурно променети при приложените реакциони услови.

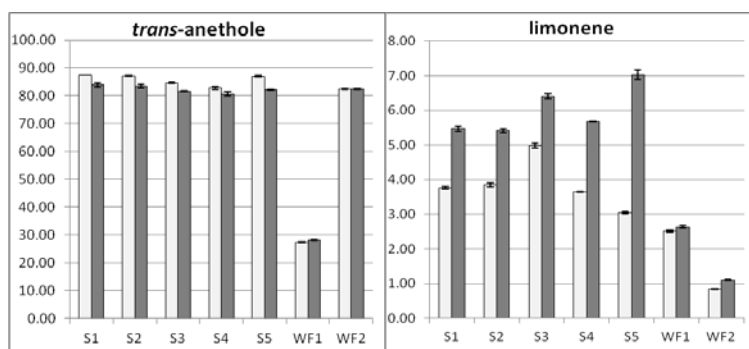
Добиените резултати од анализата беа споредени со резултатите веќе објавени во литературата. Во нивните истражувања Vernath et al., (1994) нашле дека плодовите од *Foeniculum vulgare* Mill. содржат 14,9 % фиксно масло, додека Reiter et al., (1998) и Cosge et al., (2008b) потврдиле застапеност од 20,0 % фиксно масло во плодовите од анасон.

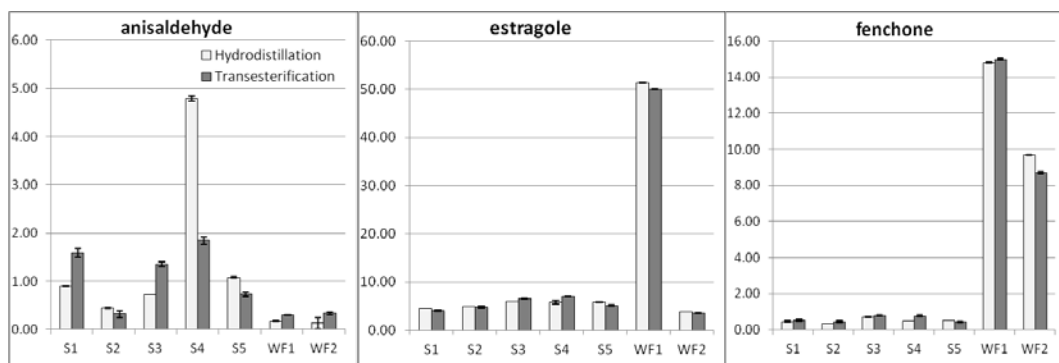
Важно е да се напомене дека оваа постапка беше изведена на 15,0 g почетен хербален примерок, но може да се изведе и на тројно помала почетна маса. Во случаи кога количеството почетен материјал е ограничено за изолација со примена на стандардна хидродестилација, развиената метода е значајна алтернатива за определување на хемискиот состав етеричното масло. Освен тоа, едновремено може да се определи и профилот на масните киселини, кој исто така може да биде важен параметар при определувањето на вариететот на *Foeniculum vulgare* Mill. Процедурата за подготовка на примерокот не вклучува испарување на растворувачот, што често е применувано заради концентрирање на примерокот. Причината е селективната загуба на повеќе испарливите монотерпени при зголемување на температурата заради испарување на растворувачот/смесата од растворувачи.

#### 4.3. Споредба на методите преку статистичка обработка на добиените податоци

Важен составен дел на истражувањето беше и споредбата на содржините на компонентите од етеричното масло изолирани со хидродестилација и со примена на Soxhlet екстракција проследена со трансестерификација (табела 4.4). Споредбата на содржините на главните компоненти од етеричното масло (*trans*-анетол, естрагол, фенхон, лимонен и анисалдехид) направена преку статистичка обработка е прикажана на слика 4.7. Мали разлики при споредбата на вредностите добиени од хидродестилација и Soxhlet екстракција, може да се забележат кај *trans*-анетол, естрагол и фенхон, кои се трите значајни компоненти за определување на квалитетот на плодот од сладок анасон. Разликите во содржините на *trans*-анетол, естрагол и фенхон се незначителни, додека повисока содржина на лимонен се забележува при примена на Soxhlet екстракција, што укажува на повисока ефикасност на екстракцијата. Единствено, кај анисалдехид се забележува поголема варијабилност во ефикасноста на двете применети методи.

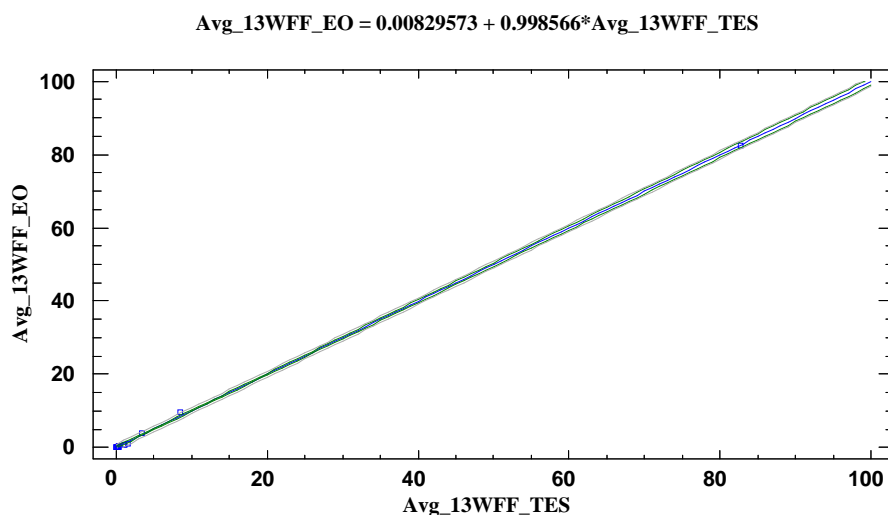
Со цел да се тестира ефикасноста на Soxhlet екстракцијата проследена со трансестерификација во однос на хидродестилација, во смисла на целосна екстракција на испарливите компоненти од етеричното масло, двете методи беа споредени со примена на ANOVA тест (анг. Analysis of Variance). Тестот дава можност за определување на линеарноста помеѓу стандардната метода на хидродестилација и Soxhlet екстракција проследена со трансестерификација. Податоците за изработка на тестот беа преземени од табела 4.4., во која истите се претставени како средни вредности (Avg)  $\pm$  стандардна девијација (SD) од три последователни инјектирања. Бидејќи P-вредноста добиена со овој тест е помала од 0,05, постои статистички значајна поврзаност меѓу двете методи со 95 % ниво на веродостојност. Равенката добиена од статистичката обработка, покажува линеарна зависност помеѓу двете методи. Овие податоци покажуваат дека во текот на Soxhlet екстракцијата проследена со трансестерификација, испарливите компоненти биле целосно изолирани и останале структурно непроменети. Ваквите резултати се очекувани, бидејќи монотерпените и фенилпропаноидите присутни во етеричното масло од анасон, не содржат кисели или хидролизирачки функционални групи кои при приложените услови на трансестерификација би довеле до образување на артефакти. Овие резултати го поткрепуваат тврдењето дека Soxhlet екстракцијата проследена со трансестерификација е соодветна за анализа на испарливите компоненти и може да биде добра алтернатива за анализа на испарливи компоненти во случаи кога нема доволно хербален примерок за изолација на испарливите компоненти (етерично масло) со хидродестилација, а потоа и за определување на неговиот хемиски состав.





Слика 4.7. Споредба на ефикасноста на Soxhlet екстракција/трансестерификација во однос на хидродестилација.

На слика 4.8 даден е график на примерок од див анасон (13WFF), на кој е прикажана за споредбата на добиените вредности за одделни компоненти изолирани со хидродестилација и Soxhlet екстракција проследена со трансестерификација. Вредностите за изведените пресметки се добиени како средна вредност (Avg)  $\pm$  стандардна девијација (SD) од три последователни инјектирања на етерично масло (изолирано со хидродестилација) и трансестерифициран Soxhlet екстракт. Графикот ја потврдува линеарната зависност помеѓу двете развиени методи, со што воедно се потврдува и можноста за искористување на Soxhlet екстракција/трансестерификација како метода за определување на хемискиот состав на на испарливите компоненти, но и на целокупната неполарна фракција.



Слика 4.8. Линеарна зависност меѓу двете методи за изолација.

Во табела 4.5. се сумирани податоците добиени од извршените статистички пресметки, кои се однесуваат на примерокот 13 WFF. Добиените вредности за содржините на испарливите компоненти изолирани со примена на двете методи покажуваат меѓусебна линеарна зависност, која е објаснета преку равенката:  $13WFF\_EO = 0.00829573 + 0.998566 * 13WFF\_TES$ .

**Табела 4.5.** Статистички податоци од ANOVA тест.

<i>Коефициенти</i>			
Параметар	Најмали квадрати	Грешка	P-Вредност
Пресек	0,00829753	0,10375	0,05
Наклон	0,998566	0,00482623	206,904
Коефициент на корелација	R <sup>2</sup>	Стандардна грешка	Средна апсолутна грешка
0,999848	99,9696%	0,381827	0,208985

#### 4.4. Определување на промената на хемискиот состав на етеричното масло како функција од степенот на старост на плодовите од *Foeniculum vulgare* Mill

Примерокот 07PFB од плод од *Foeniculum vulgare* Mill. култивиран во велешкиот регион, беше набран во август 2007 г. Растението беше идентификувано како *Foeniculum vulgare* Mill. subsp. *vulgare*, var. *dulce* (сладок анасон). После бербата, плодовите беа сушени на воздух три дена и потоа собрани. Дел од овој примерок беше веднаш анализиран, а потоа поделен на шест дела и чуван на амбиентални услови ( $25 \pm 4$  °C) во хартиени ќеси. Со цел следење на промените во составот на испарливата фракција при чување на цели несомелени плодови, секоја година по еден дел од почетниот примерок беше анализиран со примена на истата хроматографска метода која беше користена за иницијалната анализа. Пред самиот процес на хидродестилација, дел од примерокот беше свежо измелен и поставен за изолација со помош на апаратура по Clevenger, анализиран со гасно-хроматографски техники и директно анализиран со SHS-GC-FID.

#### 4.4.1. GC-FID и GC-MS анализи на етеричното масло изолирано од плодот на *Foeniculum vulgare* Mill

Податоците за приносите (mL/100g) добиени од секој примерок анализиран во различна година се сумирани во табела 4.6. Од податоците дадени во табелата може да се утврди дека содржината на етеричното масло постепено опаѓа, и после 3 години, почетната вредност е намалена до 2,0 mL/100 g. Оваа вредност е дадена во монографијата за сладок анасон како минимална граница за принос на етерично масло (Европска фармакопеја 8.5) и претставува почетен параметар за утврдување на вариететот и квалитетот на самиот плод. После поминати шест години сметано од времето на берба, приносот опаѓа за половина од вредноста добиена после првата хидродестилација, односно изнесува 1,4 mL/100 g. Следен чекор беше анализа на испарливите компоненти од етеричното масло, изолирани со хидродестилација, со помош на GC-FID и GC-MS техники. За оптимизирање на условите за сепарација беше користена стандардна смеса која ги содржи главните компоненти од етеричното масло и истата беше анализирана на поли(бисцианопропилсилоксан) стационарна фаза (SP 2560).

**Табела 4.6.** Принос на етерично масло од сладок анасон со стареење во тек на шест

ГОДИНИ	Ознака на примерокот	Година на анализа	Принос (mL/100 g)
	07PFB <sub>1</sub>	2007 (0 години)	3,10
	07PFB <sub>2</sub>	2008 (1 година)	2,80
	07PFB <sub>3</sub>	2009 (2 години)	2,30
	07PFB <sub>4</sub>	2010 (3 години)	1,95
	07PFB <sub>5</sub>	2011 (4 години)	1,75
	07PFB <sub>6</sub>	2012 (5 години)	1,60
	07PFB <sub>7</sub>	2013 (6 години)	1,40

Заради ова, квалитативна анализа со GC-MS беше извршена на HP-5MS 30 m капиларна колона (5% дифенил-95%-диметилполисилоксан) стационарна фаза, која е робустна и најчесто користена колона за анализа на етерични масла. Резултатите добиени од GC-FID анализите на етеричните масла од различните примероци на

SP2560 100 m колона се сумирани во табела 4.7. Главните компоненти на етеричните масла кои беа изолирани со хидродестилација од свежо набраните плодови од сладок анасон и потврдени со анализа на смесата од стандарди се: *trans*-анетол (86,30 %), естрагол (5,12 %) и лимонен (4,05 %). Како споредни компоненти, идентификувани беа *trans*-оцимен (1,28 %),  $\gamma$ -терпинен (0,69 %) фенхон (0,50 %) и анисалдеhid (0,26 %). Земајќи ги предвид приносот (3,1 mL/100g) и хемискиот состав на етеричното масло, квалитетот на иницијално анализираниот примерок е во согласност со барањата дадени во Европската фармакопеја 8.5. Забележителна карактеристика на анализираното етерично масло е значително ниската содржина на фенхон (< 1,0 %), кој е главна компонента која го дава горчливиот вкус на етеричното масло, доколку е застапена во поголеми концентрации. Според хемискиот состав, овој примерок од етерично масло е многу сличен со оној кој го анализирале и карактеризирале (Katsiotis, 1988; Telci et al., 2009; Cosge et al., 2008a). Резултатите добиени од овие анализи покажуваат дека застапеноста на *trans*-анетол во етеричното масло од плод од сладок анасон изнесува од 80 - 90 % (Katsiotis, 1988; Lawrence, 1994; Cosge et al., 2008a; Bernath et al., 1996; Miraldi, 1999; Telci et al., 2009) и според истражувањата на (Arslan et al., 1989; Cosge et al., 2008b; Miraldi, 1999) застапеноста на оваа компонента може да достигне и до 95,0 %. Анализираните етерични масла ги задоволуваат барањата поставени во однос хемискиот профил и застапеноста на одделните компоненти (> 80,0 % *trans*-анетол, 0,5 % фенхон и 5,12 % естрагол). Од податоците за хемискиот состав на етеричните масла анализирани со GC-FID (табела 4.7), освен застапеноста на секоја од карактеризираните компоненти и постепено намалување на приносот на етеричните масла, забележителна е и постепена промена на хемискиот состав на етеричните масла во текот на стареење на целите плодови. Содржината на монотерпените кои имаат најголеми парни притисоци значително се намалува, и после изминати 5 години од времето на берба,  $\alpha$ -пинен и  $\beta$ -пинен се застапени во етеричното масло со значително пониски концентрации. Со стареење, промените на релативната застапеност на лимонен, *p*-цимен и фенхон се незначителни.

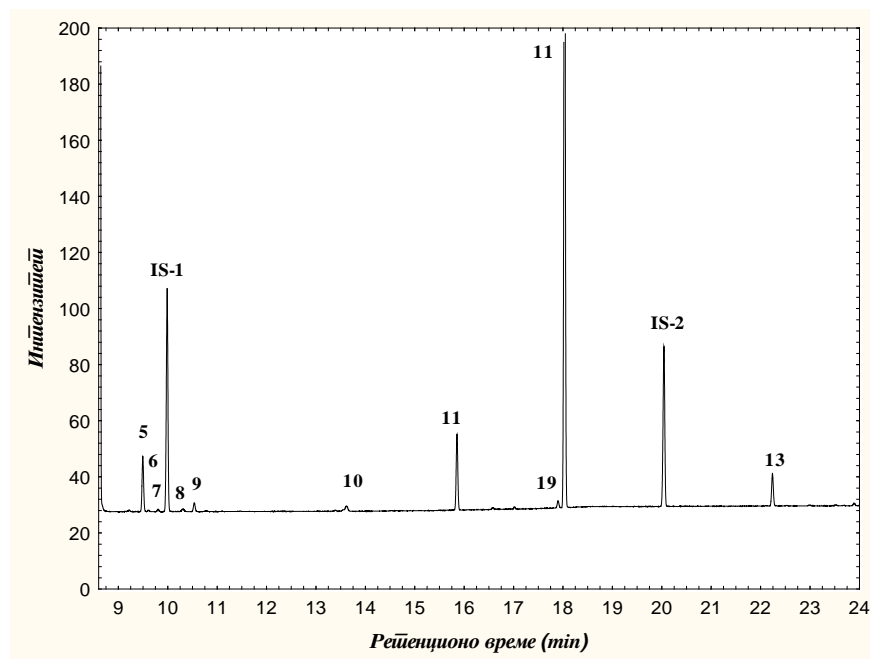
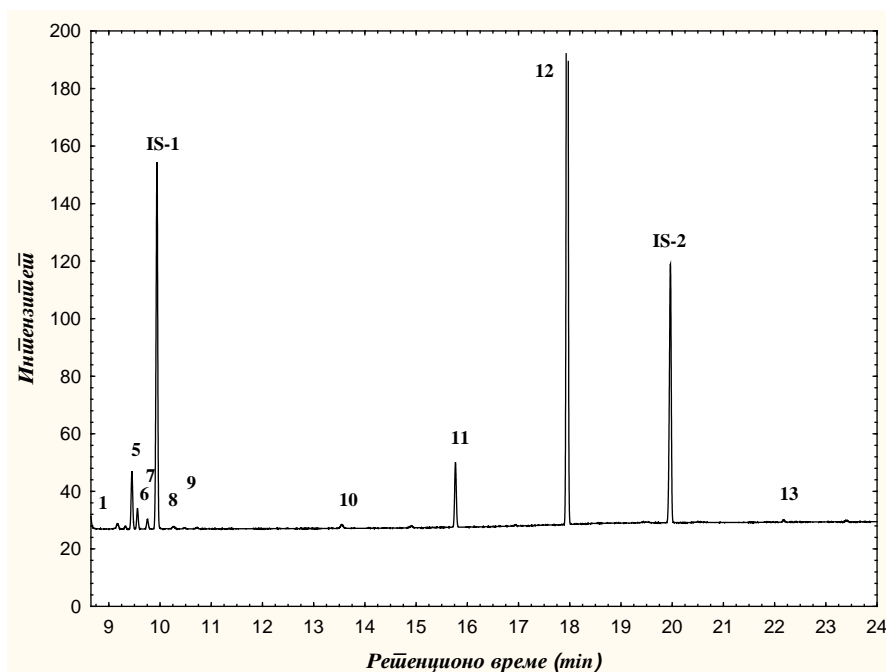
Табела 4.7. Хемски состав на етерично масло од сладок анансон со различна старост, на поларна колона SP2560.

Пик	Соединение	$t_R/min$	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
1	$\alpha$ -пинен	8,71	0,68±0,12	0,73±0,08	0,47±0,10	0,49±0,06	0,49±0,04	0,56±0,14	0,38±0,09
3	$\beta$ -феландрен	9,08	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
2	$\beta$ -пинен	9,22	0,49±0,02	0,48±0,00	0,44±0,02	0,12±0,01	0,12±0,02	0,11±0,02	0,23±0,01
4	мирцен	9,32	0,20±0,04	0,15±0,02	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
5	лимонен	9,50	4,05±0,06	5,30±0,06	5,07±0,08	3,30±0,03	3,31±0,09	3,03±0,06	2,91±0,05
6	<i>trans</i> -оцимен	9,61	1,28±0,08	1,12±0,04	0,98±0,09	0,10±0,01	0,10±0,02	0,16±0,01	0,15±0,03
7	$\gamma$ -терпинен	9,80	0,69±0,02	0,8±0,0	0,48±0,00	0,14±0,00	0,09±0,00	0,11±0,02	0,15±0,02
9	<i>p</i> -цимен	10,31	0,11±0,01	0,35±0,02	0,38±0,02	0,16±0,03	0,16±0,05	0,40±0,01	0,42±0,04
8	1,8-цинеол	10,54	0,11±0,00	0,23±0,02	0,31±0,06	0,27±0,00	0,11±0,01	0,55±0,04	0,94±0,06
Н	неидентификувано	10,78	н.д.	0,12±0,00	0,11±0,01	н.д.	н.д.	0,16±0,04	0,14±0,01
10	фенхон	13,62	0,50±0,02	0,49±0,01	0,45±0,06	0,70±0,02	0,85±0,03	0,69±0,06	1,08±0,03
11	естрагол	15,85	5,12±0,12	5,65±0,08	7,75±0,18	5,72±0,04	6,73±0,10	11,90±0,28	8,52±0,09
17/18	дихидрокарвон/ карвеол	17,55	н.д.	н.д.	0,14±0,02	0,23±0,01	н.д.	0,16±0,01	0,21±0,02
19	карвон	17,90	н.д.	н.д.	н.д.	0,84±0,02	0,84±0,02	0,14±0,00	0,74±0,04
12	<i>trans</i> -анетол	18,03	86,30±0,24	84,18±0,26	82,69±0,15	85,01±0,12	84,25±0,12	79,52±0,42	76,96±0,10
13	анисалдехид	22,24	0,26±0,04	0,41±0,00	0,73±0,04	1,92±0,04	2,08±0,02	2,37±0,11	4,25±0,06
20	анискетон	23,52	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0,14±0,03	0,13±0,02

\*Вредностите се дадени како средна вредност  $\pm$ SD од три последователни инјектирања. Резултатите се дадени како *m/m* (%).

Како најизразена промена беше забележано постепено опаѓање на содржината на *trans*-анетол, чија вредност во иницијално изолираното масло изнесува 86,30 %, а потоа опаѓа до 76,96 %. Овој процес на намалување на содржината на главната компонента е придружен со зголемување на содржината на анисалдехид, чија содржина во иницијалното етерично масло изнесува 0,26 % и расте до вредност од 4,25 % после шест години стареење на плодовите. Кај естрагол и фенхон се забележува низок пораст на застапеноста под применетите услови на чување. После изминување на 5 години од времето на берба на плодовите, во изолираното етерично масло беа карактеризирани компоненти кои не беа присутни во иницијално анализираното масло, ниту пак во маслата кои дотогаш беа изолирани и анализирани со примена на истите хроматографски методи. Анискетон беше детектиран со ниска застапеност (0,13-0,14 %), додека со користење на GC-MS беа одредени двата изомери на лимонен оксид, потоа, карвон и неговите деривати дихидрокарвон и карвеол. Релевантните структури на овие продукти се дадени на слика 2.5, прикажана во теоретскиот дел.

Содржината на фенхон и естрагол незначително се зголемува, но во овој процес на промени ова може да биде и на сметка на намалувањето на *trans*-анетол. Како објаснување за настанатите промени, би можело да се предложи можноста за сè уште непрекината ензимска активност. Во студиите на Matura et al., (2005) за промените кои настануваат со стареење на изолирани етерични масла од анасон, дадени се податоци за можната конверзија на лимонен во други соединенија со слична структура. Овие соединенија се најчесто крајни продукти на оксидациони процеси кои се одвиваат во присуство на кислородот од воздухот кој е во контакт со етеричното масло. Значителна промена во составот на етеричното масло беше забележана кај примероците кои се чувани 5 и 6 години. При анализа на добиените хроматограми од овие примероци, беше забележан лимонен како компонента која примарно елуира, без присуство на другите монотерпенски структури, кои кај иницијалното етерично масло елуираат пред лимонен (слика 4.9).



Слика 4.9. GC-FID хроматограми на етерично масло од примарна анализа ( $F_{ini}$ ) (горе) и шест години стар примерок (долу) од сладок анасон, добиени на SP-2560 колона (100 m  $\times$  0,25 mm i.d., 0,20  $\mu$ m дебелина на стационарната фаза).

Очигледно е дека со стареење на плодовите од слаткиот анасон се намалува приносот на етеричното масло изолирано со хидродестилација (табела 4.6). Губитокот на етерично масло може да се објасни со постепена и спонтана загуба на испарливите компоненти под приложените услови на чување. Другото објаснување е дека во текот на чувањето (стареењето) на примероците, ензимската активност во плодовите сè уште продолжува и како резултат на оваа активност се формираат секундарни продукти кои не се присутни во примероците кои се свежо набрани и набрзо анализирани со хроматографски методи. Исто така, како резултат на ензимската активност се формираат и секундарни неиспарливи продукти растворливи во вода и при хидродестилација остануваат присутни во водниот слој. Овие соединенија не може да бидат детектирани со гасно-хроматографски анализи на етеричното масло, но сепак ќе допринесат за намалување на приносот на етерично масло изолирано со хидродестилација.

#### **4.4.2. SHS-GC-FID метода за разделување на компонентите и докажување на биосинтетизирани поларни секундарни продукти кај старите примероци**

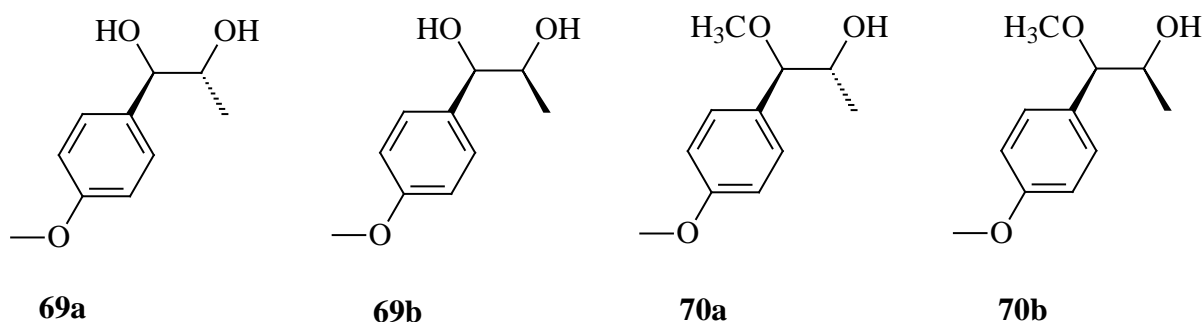
Со цел да се провери претходната претпоставка, примероците од сладок анасон паралелно беа анализирани со статична хедспејс гасно-хроматографски анализи (SHS-GC-FID). Свежо измелените примероци беа поставени во садче за SHS-GC-FID анализа и анализирани според претходно оптимизирани услови кои овозможуваат квантитативна анализа на испарливата фракција од *Foeniculum vulgare* Mill. (Križman et al., 2006). За квантитативно определување на испарливите неполарни компоненти беше додаден раствор од ментол во метанол. Со цел да се предизвика преминување на неполарните испарливи компоненти од плодот во гасната фаза, беше додаден метанол како истовремен растворувач на интерниот стандард ментол. Додавањето на вода според оригиналната SHS-GC-FID процедура беше елиминирано со цел да се избегнат хидролитичките процеси кои се одвиваат на повисоки температури (температура на термостатирање 145 °C, во времетраење од 35 min). Резултатите од анализите со SHS-GC-FID на примероците од сладок анасон се дадени во табела 4.8.

**Табела 4.8.** Хемиски состав на испарливата фракција означен со SHS (определен со SHS-GC-FID, HP5 колона) и со HD (етерично масло добиено со хидродестилација и анализирано со GC-MS, HP5-MS колона).

	Соединение Метода	2007		2008		2009		2010		2011		2012		2013	
		SHS	HD	SHS	HD	SHS	HD	SHS	HD	SHS	HD	SHS	HD	SHS	HD
1	$\alpha$ -пинен	0,86	0,31	0,39	0,14	1,09	0,52	0,43	0,53	0,46	0,24	0,63	н.д.	0,21	0,17
3	$\beta$ -феландрен	0,41	н.д.	0,27	0,05	0,53	0,15	0,25	0,18	0,29	н.д.	0,33	н.д.	0,19	0,05
2	$\beta$ -пинен	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0,05	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
4	мирцен	0,21	н.д.	0,10	н.д.	0,12	0,06	0,05	0,09	0,04	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
9	<i>p</i> -цимен	н.д.	н.д.	н.д.	0,27	0,26	0,33	0,31	0,43	0,55	0,13	0,55	0,09	0,42	0,71
5	лимонен	4,64	3,01	4,39	2,98	5,75	5,39	3,30	4,42	4,82	3,47	4,63	0,31	3,06	3,46
8	1,8-цинеол	1,57	0,18	н.д.	0,21	1,19	0,37	0,41	0,27	0,36	н.д.	н.д.	0,09	н.д.	0,36
6	<i>trans</i> -оцимен	н.д.	0,51	1,05	0,38	0,06	0,67	н.д.	0,38	н.д.	0,08	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
7	$\gamma$ -терпинен	0,51	0,23	0,56	0,20	0,59	0,23	0,19	0,22	0,17	н.д.	0,14	н.д.	0,13	0,05
10	фенхон	0,40	н.д.	0,42	0,45	0,59	0,45	0,90	0,52	0,66	1,65	0,56	0,41	0,42	0,94
11	естрагол	4,78	3,22	5,39	5,61	5,41	7,76	7,87	6,74	8,85	4,77	8,68	11,53	5,76	8,59
13	анисалдеhid	0,37	н.д.	1,28	1,07	1,33	0,66	3,75	1,18	6,23	1,67	7,66	5,01	7,88	5,76
12	<i>trans</i> -анетол	85,94	92,16	84,58	87,76	80,95	83,21	77,65	84,95	69,01	87,40	67,99	81,39	73,05	78,51
20*	анискетон	*0,10	н.д.	*0,27	н.д.	*0,18	н.д.	*0,47	0,09	*0,76	н.д.	*0,83	0,36	*0,78	0,27
16a	лимонен оксид	н.д.	н.д.	0,05	н.д.	0,08	н.д.	0,15	н.д.	0,07	н.д.	0,30	н.д.	0,26	0,05
16b	лимонен оксид	н.д.	0,37	0,11	н.д.	0,07	н.д.	0,20	н.д.	0,34	н.д.	0,17	н.д.	0,25	0,10
17	дихидрокарвон	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0,14	н.д.	н.д.	н.д.	0,04	0,04
18	карвеол	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0,02	н.д.	н.д.	н.д.	0,05	н.д.	0,16	н.д.	0,08	0,07
19	карвон	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0,21	0,51	0,05	0,04	0,26	0,44
21*	анетол епоксид	*	н.д.	*	0,88	*	0,07	*	н.д.	*	н.д.	*	0,62	*	0,22
69a, 69b	анетол диол	н.д.	н.д.	0,17	н.д.	0,13	н.д.	0,34	н.д.	0,56	н.д.	1,26	н.д.	1,55	н.д.
70a	<i>threo</i> -анетол $\beta$ -хидрокси метилетер	0,22	н.д.	0,62	н.д.	0,94	н.д.	2,29	н.д.	4,09	н.д.	3,80	н.д.	3,49	н.д.
70b	<i>erythro</i> -анетол $\beta$ -хидрокси метилетер	н.д.	н.д.	0,36	н.д.	0,72	н.д.	1,44	н.д.	2,33	н.д.	2,23	н.д.	2,17	н.д.
72	4-метоксипропио- фенон	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0,15	н.д.	0,21

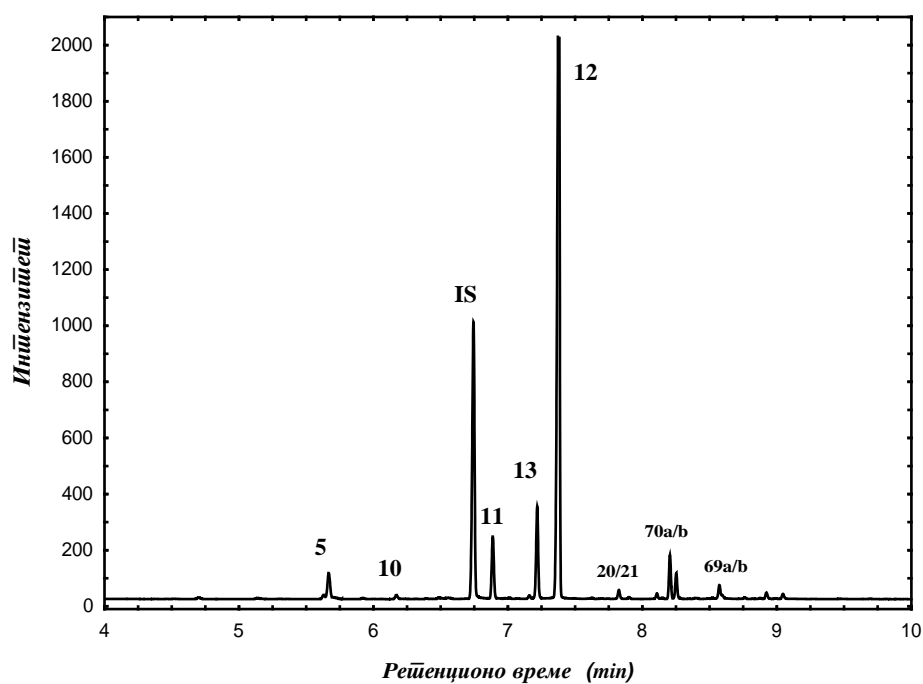
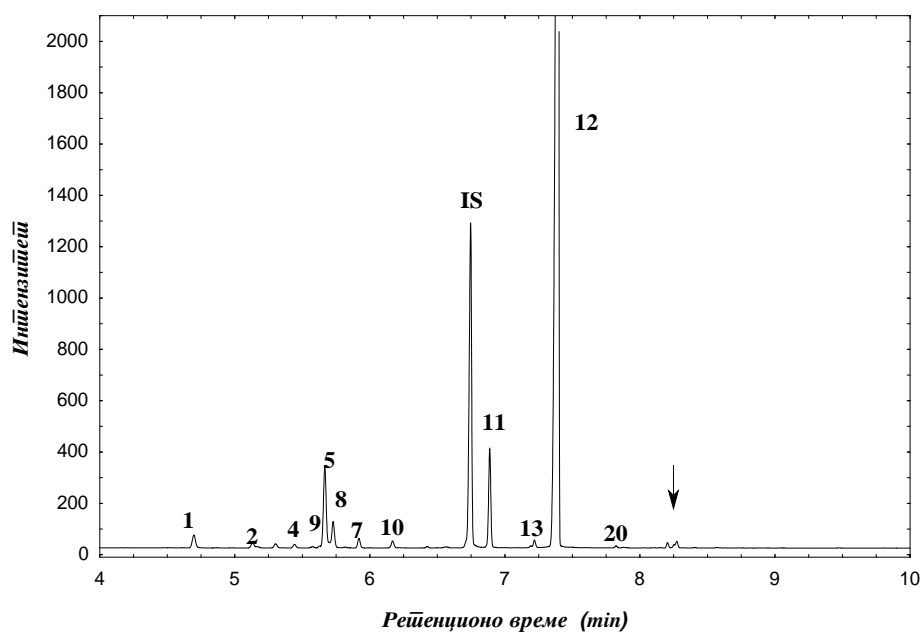
\*Со примена на SHS-GC-FID метода, соединението 14 коелуира со соединението 19. Резултатите се дадени како *m/m* (%).

Со споредба на составот на испарливата фракција добиена со хидродестилација/GC-FID и SHS-GC-FID, може да се заклучи дека во првите три години хемискиот состав е многу сличен. Аналоген тренд на промена во составот беше забележан и при анализа на хроматограмите добиени за испарливата фракција со SHS-GC-FID и споредени со анализата на етерични масла. Содржината на *trans*-анетол постепено се намалува од 85,94 % до 73,05 %. Овој процес е придружен со аналогно зголемување на содржината на анисалдехид (0,37 % до 7,88 %). Анализите покажуваат присуство и на неколку други компоненти во присутни во испарливата фракција на примероците од 2012 и 2013 година. Нивниот идентитет беше одреден преку споредба на добиените масени спектри со библиотечните податоци. Имено, изомерите на лимонен оксид (**16a**, **16b**) се формирани како резултат на оксидациски процеси на лимонен кои се одвиваат со текот на времето. Овие изомери имаат повисоки ретенциони времиња од лимонен и елуираат веднаш после фенхон. Секундарно образуваните продукти дихидрокарвон, карвеол и карвон елуираат на повисоки ретенциони времиња ( $t_R = 6,976$ ,  $t_R = 7,011$  и  $t_R = 7,016$  min), пред анисалдехид и *trans*-анетол. Содржината на карвон изнесува 0,26 %, додека содржината на другите два продукти изнесува помалку од 0,10 %. Преку споредба со автентични стандарди и синтетизирани соединенија, дополнително беа идентификувани анискетон (**20**), анетол епоксид (**21**), *threo/erythro* анетол диоли (**69a**, **69b**) и дијастереомерни *threo/erythro*- $\beta$ -хидрокси метилетери (**70a**, **70b**) (слика 4.10 и слика 4.11). Разликата во составот станува многу поголема после третата година на чување. Застапеноста на *trans*-анетол определена со SHS-GC-FID е поголема споредено со вредноста определена со стандардната хидродестилација, проследена со анализа со GC-FID.



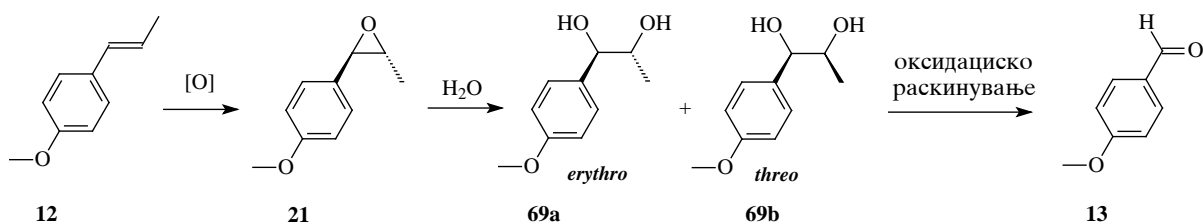
Слика 4.10. Дијастереомерни *threo/erythro*-анетол диоли (**69a**, **69b**) и *threo/erythro*- $\beta$ -хидрокси метилетери (**70a**, **70b**).

Содржината на анисалдехид расте како функција од времето на чување, и вредностите добиени со SHS-GC-FID после 3 години стареење се приближно двапати поголеми отколку оние добиени со хидродестилација/GC-FID. Исто така, кај примероците со старост 5 и 6 години, присутни се и други компоненти кои елуираат на повисоки ретенциони времиња и кои може да се детектираат со SHS-GC-FID, но не се детектирани кај истите примероци дестилирани во водна пара и анализирани со GC-FID. Имено, освен очекуваните компоненти од етеричното масло, се детектираат уште три компоненти кои елуираат на повисоки ретенциони времиња од *trans*-анетол. Идентификацијата на овие секундарни продукти беше извршена со помош на синтетизирани автентични стандарди, проследено со GC-MS анализа за нивна карактеризација (табела 4.8, **69a/b** и **70a/b**). Идентитетот на секоја компонента беше одреден врз основа на фрагментациите добиени од масените спектри и нивна споредба со масените спектри добиени од анализа на автентичните стандарди. Содржината на овие продукти, кои имаат високи ретенциони времиња детектирани со SHS-GC-FID, се зголемува како функција од времето и може да достигне и до 8,0 % сметано во однос на вкупната содржина на испарливи компоненти. Едно од можните објаснувања за зголемувањето на содржината на анисалдехид (споредено со другите компоненти од етеричното масло) е дека тој се формира од *trans*-анетол, кој претставува биосинтетски прекурсор за дополнителното формирање на анисалдехид. Од друга страна, *trans*-анетол подлежи на процес на автооксидација во периодот на стареење на плодовите од анасон (Kitajima et al., 1999). Заради тоа, не е изненадувачки фактот што многу автори ја користат застапеноста на анисалдехид како водич за утврдување на квалитетот на плодовите од анасон (Mohan и Whalen, 1993).



**Слика 4.11.** SHS-GC-FID анализа на свежо набран примерок од сладок анасон (иницијална анализа, горе). SHS-GC-FID анализа на сладок анасон после 6 години чување (долу). Соодветно обележани секундарни производи со повисоки ретенциони времиња кај старите примероци.

Kitajima et al., (1999) директно од плодовите на анасон со помош на повеќекратна екстракција изолирале анетол епоксид (**21**), *erythro*-анетол диол (**69a**) и *threo*-анетол диол (**69b**), кои според структурата потекнуваат од оксидациони процеси во кои учествувал *trans*-анетол (слика 4.12). Според досега наведеното, може да се претпостави дека застапеноста на продуктите **21**, **69a** и **69b** се зголемува во текот на стареење на плодовите. Под применетите експериментални услови на изолација на етеричното масло со хидродестилација, не беа детектирани споменатите компоненти **21**, **69a** и **69b**. Причината за ваквото однесување е фактот дека анетол епоксидот (**21**) е подложен на реакции при кои доаѓа до отворање на прстенот во присуство на вода (Mohan и Whalen, 1993; Mohan et al., 2000) и се трансформира во **69a** и **69b**. Според структурата, овие соединенија се диоли (растворливи во вода) и нивното издвојување со другите хидрофобни компоненти од етеричното масло не е можно. Во зависност од експерименталните услови, епоксидот **21** може да се преуреди преку Meinwald-ово преуредување на епоксиди, (Meinwald, 1963; Wang, 2010) до анискетон (**20**) или до 4-метокси пропиофенон (**72**), кои може во траги да се детектираат кај изолираните етерични масла анализирани со GC-MS. Во отсуство на вода, со загревање или третирање под силно базни услови формирањето на анискетон (**20**) може да стане доминантно. Во нашите анализи анискетон беше детектиран во етеричните масла изолирани со хидродестилација од примероците 07PFB<sub>6</sub> и 07PFB<sub>7</sub>.



Слика 4.12. Предложена авто-оксидација на *trans*-анетол (**12**) до анисалдеhid (**13**) преку епокси-анетол (**21**) од Kitajima и неговите соработници (1999).

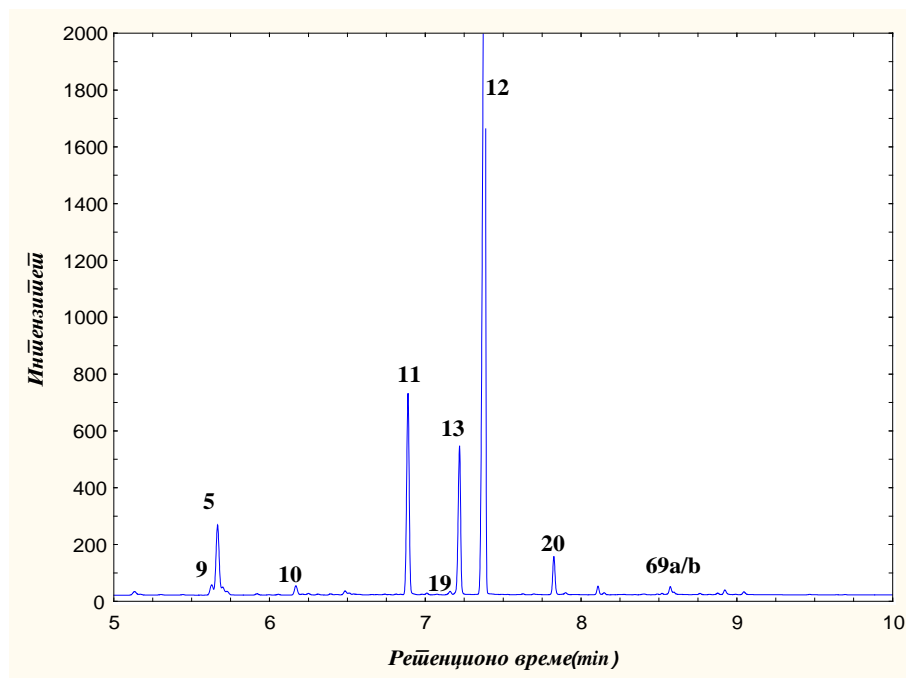
За SHS-GC-FID анализите беше елиминирано додавањето на вода со цел да се избегне одвивање на хидролитички процеси на повисоки температури, но беа користени други хидроксилни растворувачи според оригиналната SHS-GC-FID метода за квантитативно определување на компонентите од етерично масло од *Foeniculum*

*vulgare* Mill. Целта беше да се определи потеклото на соединенијата кои се појавуваат на  $t_R = 8,205$  и  $t_R = 8,252$  min. Од табелата се гледа дека нивната содржина се зголемува како функција од стареењето на плодот (табела 4.8, SHS-GC-FID, соединенија **70a/70b**).

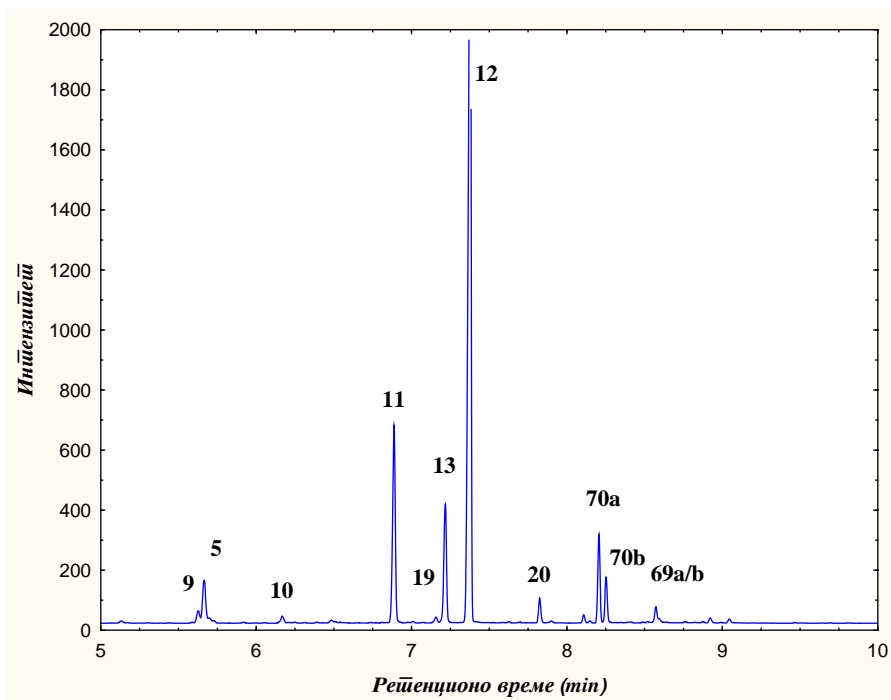
#### 4.4.3. Докажување на потеклото на поларните компоненти присутни во етеричното масло

Со цел да се одреди потеклото и структурата на соединенијата кои елуираат со ретенциони времиња 8,205 и 8,252 min (**70a/70b**), беше спроведена контролна студија на примерок од анасон од 2007 г. Најверојатно, овие две компоненти потекнуваат од анетол епоксид (**21**) и се обрзуваат преку отворање на епоксидниот прстен со метанол (додаден како растворувач на интерниот стандард ментол). Оваа теза беше индиректно докажана преку анализа на примерокот со користење на истата SHS-GC-FID метода, додека примероците за анализа беа подготвени на следниот начин: свежо измелен дел од примерокот беше поделен на четири дела. Првиот дел беше анализиран без додаден растворувач (слика 4.13а), додека вториот беше анализиран во присуство на метанол (слика 4.13б). Третиот дел беше анализиран во присуство на етанол (слика 4.13в) и последниот беше анализиран во присуство на вода (слика 4.13г). Од прикажаните хроматограми, може да се заклучи дека соединенијата со ретенциони времиња 8,205 и 8,252 min, се присутни само кај примерокот анализиран во присуство на метанол. Соединенијата со ретенциони времиња 8,205 и 8,252 min не се присутни кај примероците анализирани без додаден растворувач, со додаден етанол и со додадена вода. Интересно е да се забележи дека кај примерокот анализиран во присуство на етанол, соединенијата со ретенциони времиња  $t_R = 8,393$  и  $t_R = 8,433$  min се етоксидни аналози на анетол  $\beta$ -хидрокси етери, имено *threo*-анетол  $\beta$ -хидрокси етилтер и *erythro*-анетол  $\beta$ -хидрокси етилтер (**71a/71b**). Нивниот однос изнесува 1,7, вредност која е приближна на вредноста на односот на соединенијата **70a/70b**. Односот на *erythro/threo* изомерите **70a/70b** е сличен со оној кој е прикажан во студиите на Carteau et al., (2007).

а)

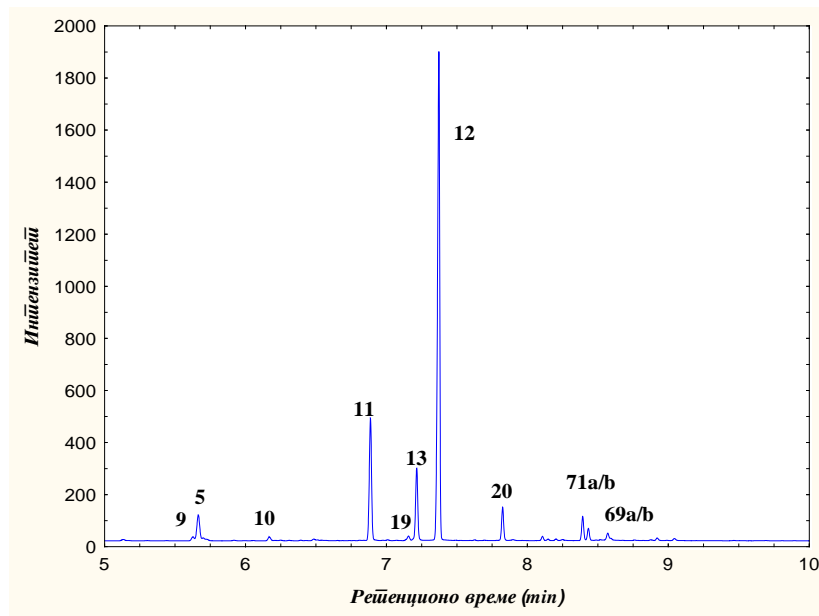


б)

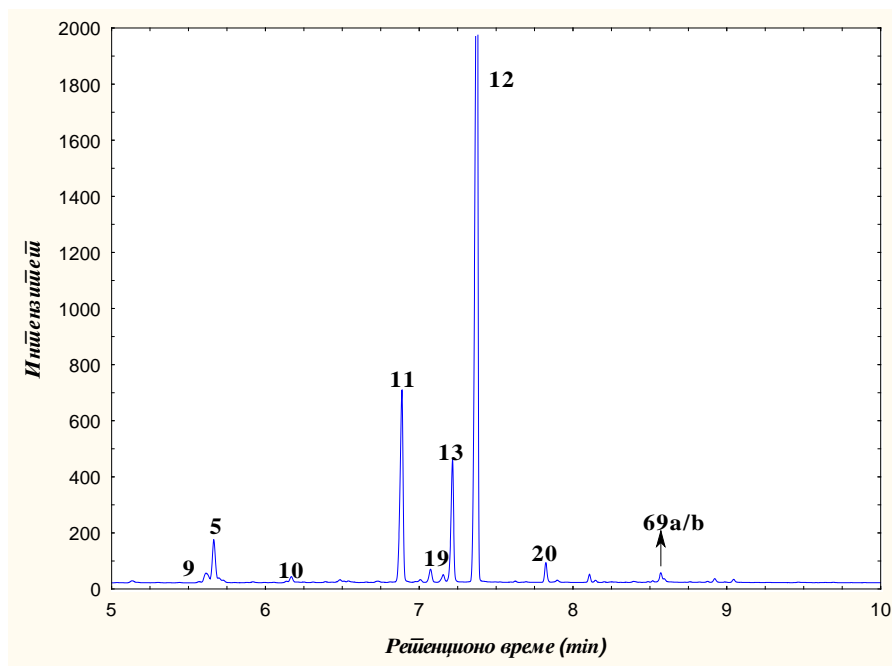


Слика 4.13а. Примерок од *Foeniculum vulgare*, анализиран со SHS-GC-FID, без додаден растворувач и Слика 4.13б примерок од *Foeniculum vulgare*, анализиран со SHS-GC-FID, во присуство на метанол.

в)

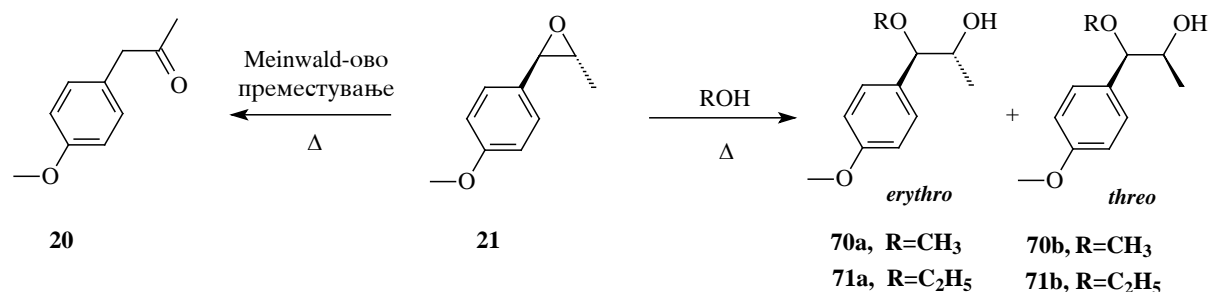


г)



**Слика 4.13в.** Примерок од *Foeniculum vulgare*, анализиран со SHS-GC-FID, во присуство на вода. **Слика 4.13г.** Примерок од *Foeniculum vulgare*, анализиран со SHS-GC-FID, во присуство на етанол. Броевите на пиковите кај хроматограмите 4.13, соодветствуваат на соединенијата дадени во табела 4.8.

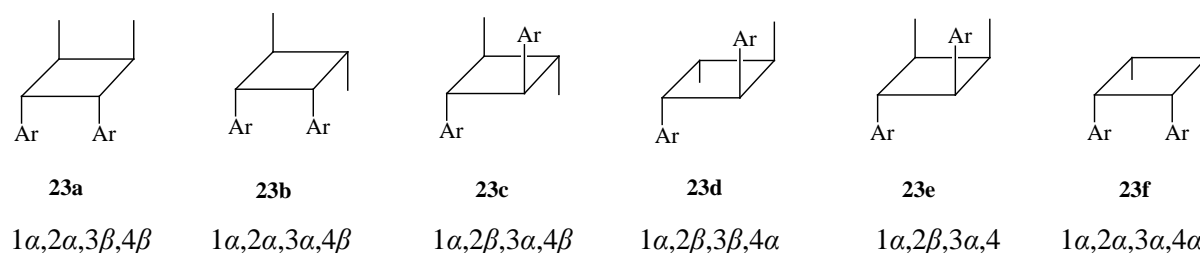
Според споменатиот автор, односот меѓу *erythro/threo* диолите и  $\beta$ -хидроксид етерите добиени со фотолиза на *trans*-анетол во водно/етанолни раствори изнесува 1,5. Авторите предложиле механизам на отворање на епоксидот преку конформационо еквилибрирани бензилни карбокатјонски интермедиери. Алтернативно, под условите приложени за спроведување на SHS-GC-FID анализа (температура на термостатирање 145 °C, 35 min), возможно е термално Meinwald-ово преместување на анетол епоксид (**21**) до анискетон (**20**) (Whalen, 2005) (слика 4.14). Овие податоци индиректно го докажуваат присуството на анетол епоксид (**21**) и можноста од негово акумулирање со текот на стареење на плодовите (Najdoska-Bogdanov et al., 2016).



**Слика 4.14.** Meinwald-ово преместување на анетол епоксид (**21**) до анискетон (**20**) и отворање на прстенот на епоксидот (**21**) со алкохол до дијастереомерни хидроксид етери (**70a**, **70b**) или (**71a**, **71b**).

#### 4.5. Фотохемиска стабилност на *trans*-анетол и етерично масло од *Foeniculum vulgare* Mill

Со примена на претходно развиените GC-FID и GC-MS методи за анализа на етеричното масло изолирано од сладок анасон, беше извршена анализа на продукти добиени после изложување на чист *trans*-анетол и етерично масло на сончева светлина. За оваа цел, чист *trans*-анетол (**12**) беше изложен на сончева светлина во добро затворено, целосно наполнето садче изработено од боросиликатно стакло. После 10 дена зрачење, степенот на конверзија изнесува приближно 4,0 %. Според Marquez et al., (2008), како резултат на зрачењето се одвиваат два главни процеси: процес на изомеризација до *cis*-анетол и [2+2] циклоадиција при која се добива суп-глава со глава димер (**23a**) (слика 4.15).



Слика 4.15. Изомерни циклобутани.

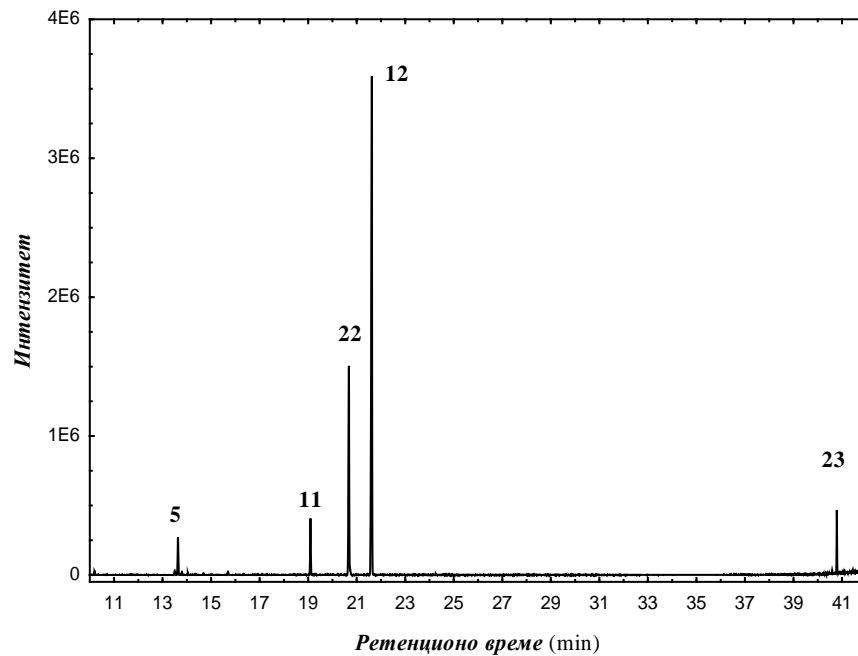
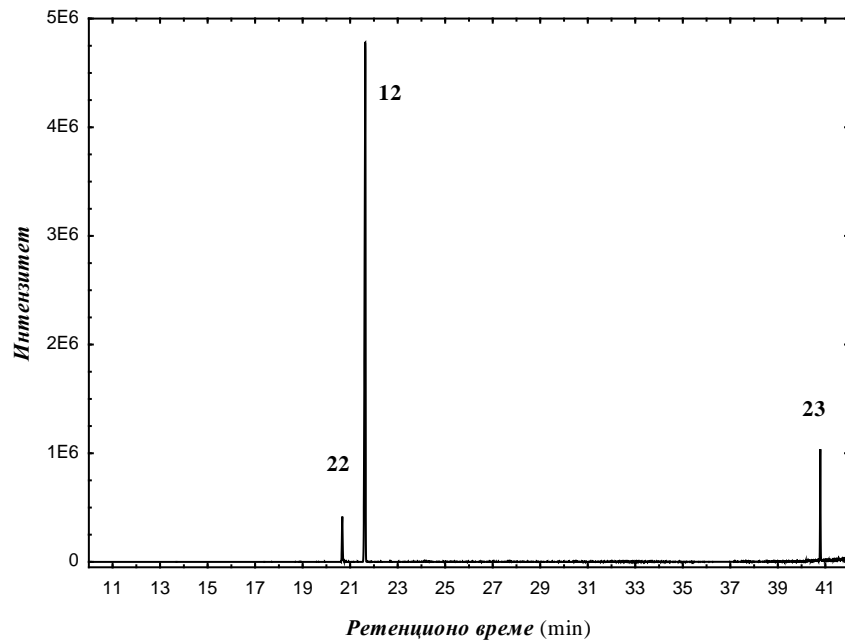
Освен споменатите продукти се образува и анисалдехид, чија застапеност е минорна и изнесува 0,06 %. Со продолжено време на изложеност на светлина (90 дена), се постигнува конверзија од приближно 15,0 %, при што количеството на анисалдехид се зголемува до 0,48 %, но присутни се и анискетон (**20**), чија застапеност изнесува 0,11 %, и анетол димер (**23b**), чија застапеност изнесува 0,13 %. Овој продукт може да потекнува од *cis*-анетол/*trans*-анетол димеризација (табела 4.9). Етеричното масло од сладок анасон беше изложено на сончева светлина под истите услови како и чистиот *trans*-анетол (10 дена и 90 дена). Со анализа на етеричното масло со хроматографски методи, беше определена застапеноста на следните компоненти: 85,08 % *trans*-анетол (**12**), 6,48 % естрагол (**11**), 4,17 % лимонен (**5**), 1,44 % анисалдехид (**13**), 0,46 % фенхон (**10**) и други компоненти со помала застапеност. После 10 дена изложеност на светлина степенот на конверзија изнесува 6,0 %, т.е. содржината на *trans*-анетол опаѓа до вредност од 79,0 % (табела 4.9). Промена во содржината на другите компоненти не беше забележана. Главни продукти на фотохемиските процеси се *cis*-анетол со застапеност од 4,49 %, проследен со формирање на анетол димер (**23a**), со застапеност од 0,7 %. Споредено со чист *trans*-анетол, каде односот *cis*-анетол/анетол димер изнесува 0,92 после 10 дена изложеност на светлина, односот на *cis*-анетол/анетол димер кај етеричното масло од сладок анасон изнесува 6,41. Во двата случаи после 10 дена изложеност на сончева светлина само димерот (**23a**) беше детектиран. Кога етеричното масло од сладок анасон е изложено на светлина во период од 90 дена може да се постигне приближно 30,0 % конверзија. Содржината на *trans*-анетол се намалува до 60,71 %, заради 21,63 % конверзија во *cis*-анетол и 4,50 % конверзија во димер (**23a**). Освен споменатите главни продукти, детектирани беа и другите два димери, (**23b**) и (**23c**) со застапеност од 0,23% и 0,24 %, соодветно.

Табела 4.9. Хемиски состав на почетните примероци и примероците изложени на сончева светлина, определен со GC-MS.

			<i>trans</i> -Анетол (почетен)	<i>trans</i> -Анетол во CH <sub>3</sub> OH (36 h hv)*	<i>trans</i> -Анетол 2400 h, hv	Анетол 90 ден, hv	EM почетно	EM 2400h, hv	EM 90 дена, hv
		Содржина	(m/m %)	(m/m %)	(m/m %)	(m/m %)	(m/m %)	(m/m %)	(m/m %)
#	Соединение	t <sub>R</sub> (min)							
1	$\alpha$ -пинен	10,437	/	/	/	/	0,48	0,47	0,42
2	$\beta$ -пинен	11,930	/	/	/	/	0,20	0,19	0,10
4	мирцен	12,636	/	/	/	/	0,11	0,08	н.д.
9	<i>p</i> -цимен	13,734	/	/	/	/	0,47	0,47	0,43
5	лимонен	13,874	/	/	/	/	4,17	4,32	3,87
8	1,8-цинеол	13,952	/	/	/	/	0,31	0,30	0,28
6	<i>trans</i> -оцимен	14,27	/	/	/	/	0,44	0,36	0,13
3	$\beta$ -феландрен	14,606	/	/	/	/	/	0,11	0,08
7	$\gamma$ -терпинен	14,924	/	/	/	/	0,26	0,26	0,17
10	фенхон	15,87	/	/	/	/	0,46	0,47	0,36
11	естрагол	19,317	/	/	/	/	6,48	6,68	5,74
22	<i>cis</i> -анетол	20,85	н.д.	6,10	1,71	5,27	н.д.	4,49	21,63
13	анисалдехид	20,906	0,08	0,2	0,06	0,48	1,44	1,40	1,04
12	<i>trans</i> -анетол	21,845	99,7	83,04	95,86	84,47	85,08	79,61	60,71
20	анискетон	24,465	0,18	/	0,2	0,11	0,10	н.д.	0,07
23a	димер* (1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,4 $\beta$ )	40,976	/	4,19	1,86	9,35	/	0,7	4,5
23b	димер* (1 $\alpha$ , 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,4 $\beta$ )	40,591	/	/	/	0,13	/	/	0,24
23c	димер* (1 $\alpha$ , 2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,4 $\beta$ )	41,279	/	/	/	/	/	/	0,23
21	анетол епоксид	24,144	/	/	/	0,19	/	/	/
73	1-метокси-4-(1-метоксипропил)бензен <sup>a</sup>		/	3,37	/	/	/	/	/
70a	<i>threo</i> изомер <sup>b</sup>		/	1,91	/	/	/	/	/
70b	<i>erythro</i> изомер <sup>c</sup>		/	1,19	/	/	/	/	/

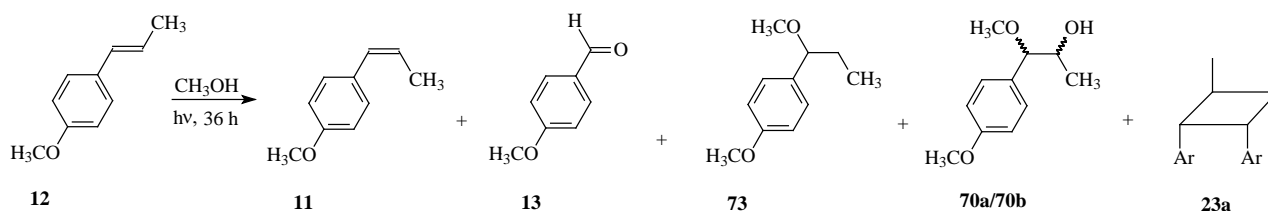
\* изведени во метанолен раствор во затворена кварцна кивета; **a**-1-метокси-1-(4-метоксифенил)-пропан; **b**-*threo*-1-метокси-1-(4-метоксифенил)-пропан-2-ол; **c**-*erythro*-1-метокси-1-(4-метоксифенил)-пропан-2-ол.

Тие беа асигнирани како  $(1\alpha,2\alpha,3\alpha,4\beta)$ -1,2-bis(метоксифенил)-3,4-диметилциклобутан и  $(1\alpha,2\beta,3\alpha,4\beta)$ -1,2-bis-(метоксифенил)-3,4-диметилциклобутан, соодветно според студиите на Lewis и Kojima, (1988) и Kojima et al., (1981), додека Ковачевите индекси беа преземени од Castro et al., 2010. Содржината на анисалдехид беше намалена за 1,04 %, додека застапеноста на естрагол беше променета од 6,48 % до 5,74 %. Споредено со продуктите од зрачењето на чист *trans*-анетол, каде односот на *cis*-анетол/анетол димер изнесува 0,56 после 90 дена период на зрачење, односот на *cis*-анетол/анетол димер во зраченото масло од сладок анасон изнесува 4,8. Од изведените експерименти може да се заклучи дека доминантен фотохемиски процес при зрачење на чист *trans*-анетол е димеризацијата, додека кај етеричното масло доминантен процес е *trans/cis* изомеризацијата. После 90 дена зрачење, фотохемиските процеси се доминантно поефикасни кај етеричното масло со степен на конверзија од приближно 30 %, наспроти 15 % конверзија на чист *trans*-анетол (слика 4.16). Важно е да се забележи дека после директно зрачење, фотоанетол (4,4-диметокси-*trans*-стилбен) не беше детектиран во чистиот *trans*-анетол, ниту пак кај етеричното масло од сладок анасон, што е во согласност со резултатите добиени од студијата на (Nozaki et al., 1968). Важно е да се напомене дека иницијално се формира димерот *syn*-глава со глава (**23a**). Исто така, продолжената изложеност на сончева светлина на *trans*-анетол, при поголемо количество на *cis*-анетол, доведува до образување на други димери (главно **23b**), преку *trans/cis* димеризација. Овој димер е детектиран во траги, според забелешките на Lewis и Kojima (1988), Kojima et al., (1981) и Castro et al., (2010).



Слика 4.16. Хроматограми добиени од GC-MS анализа на чист *trans*-анетол изложен на сончева светлина во период од 90 дена (горе) и етерично масло од сладок анасон (85% содржина на *trans*-анетол) изложено на сончева светлина во период од 90 дена (долу).

Познато е дека бензалдехидите (во овој случај анисалдехид) може да доведат до „гаснење“ (анг. quenching) на  $S_1$  состојбата на *trans*-анетол (која е преобладавајќа во формирањето на димерите). Доведувањето до триплет состојба на *trans*-анетол преку фотосензибилизирање (анг. photosensitization), предизвикано од анисалдехид ( $E_T = 72$  kcal/mol) (**13**) резултира со поефикасна фотоизомеризација. Ова ја објаснува разликата во односот помеѓу *cis*-анетол и било кој формиран димер, при дадените услови. Мало количество анисалдехид, присутно во етеричното масло ја поттикнува изомеризација на *trans*-анетол до *cis*-анетол (фотосензибилизирана изомеризација преку триплет состојба) и во исто време го забавува формирањето на димерот преку гаснење на  $S_1$  состојбата на *trans*-анетол. Дополнително, присуството на анисалдехид може да биде и причина за појава на димерот (**23c**) (после 90 дена зрачење) од *anti*-глава со глава димеризација на *trans*-анетол. Димерот (**23c**) беше детектиран само со сензибилизиран трансфер на електрони на *trans*-анетол (Lewis и Kojima, 1988), иако Basani et al., (2007) тврдат дека може да биде формиран и во присуство на кислород. Според ова, директно зрачење на чист *trans*-анетол и етерично масло од сладок анасон (кое содржи 85 % *trans*-анетол) во отсуство на фотосензибилизатор, резултира со формирање на *cis*-анетол и *syn*-глава со глава димер како единствен продукт кој може да се детектира при одвивање на умерени конверзии. За да се потврдат фотохемиските промени, беше изведен дополнителен експеримент според методата на Carreau et al., 2007. Разреден метанолен раствор на *trans*-анетол беше поставен во кварцна кивета, и потоа изложен на сончева светлина во времетраење од 36 h. Составот на добиената смеса беше одреден со GC-MS: *trans*-анетол, **12** (83,04 %), *cis*-анетол, **22** (6,10 %), анисалдехид, **13** (0,12 %), *syn* глава со глава димер, **23a** (4,19 %), метокси адукт, **73** (3,37 %), *threo*-анетол  $\beta$ -хидроксиметил етер **70a** (1,91 %), *erythro*-анетол  $\beta$ -хидроксиметил етер **70b** (1,19 %) (слика 4.17).



Слика 4.17. Продукти на фотохемиска реакција на метанолен раствор на *trans*-анетол.

Поголемиот број од истражувањата за фотохемиската стабилност на *trans*-анетол биле спроведени во раствор: циклохексан (Nozaki et al., 1968), ацетонитрил (Lewiss и Kojima, 1988), етанол/вода (Carteau, 2007), толуен (Castro et al., 2010). Во истражувањето на Misharina и Polshkov (2005), *cis*-анетол не бил детектиран кај аерирано етерично масло од анасон, чувано на темно во период од 120 дена. Овој изомер се јавува во траги само при изложување на аерираните примероци на светлина. Сепак, дури и на темно количеството на анисалдехид бавно опаѓа, но истиот процес е многу поизразен во присуство на светлина. Присуството на кислород резултира со побрзо исцрпување на иницијалниот изомер, но е одговорен за делумно згаснување на процесите на изомеризација и димеризација и доведува до формирање на оксигенирани продукти. Главниот продукт на оксидација е анисалдехид, додека минорен продукт е анетол епоксид. Во текот на оваа студија детектирани беа мали количества анисалдехид, како и траги од анетол епоксид и анискетон. Формираниот анетол епоксид може да претрпи Meinwald-ово преуредување до анискетон. Во смисла на практична примена, колку е поголема количината на *trans*-анетол и помала количината на анисалдехид (или други триплет сензибилизатори) во етеричното масло, поголема е фотостабилноста и продолжен рокот на употреба на *trans*-анетол и етерично масло од сладок анасон. Избегнување на контакт со воздух е најважниот чекор, заради тоа што ќе предизвика промена во составот на етеричното масло која ќе се одвива бавно при чување на темно, но промената ќе биде многу побрза ако етеричното масло е изложено на светлина.

#### **4.6. Хемиски состав на испарлива фракција од диворастечки *Foeniculum vulgare* Mill. од Македонија**

Бидејќи немаше доволно растителен материјал (плод) за изолација на етерично масло, беше пристапено кон анализа на испарливата фракција со развиената SHS-GC-FID метода на HP5 капиларна колона (табела 4.10). Репрезентативен примерок беше измелен и директно изваган во садче за хедспејс анализи. Примероците 1МВР до 8МВР (Валандово, Боданци, Нов Дојран) и 15МВР (Канео, Охрид) се слични по хемиски состав на испарливите компоненти и според поделбата на Krüger и Hammer (1999) спаѓаат на естрагол хемотип (II). Во овие примероци застапеноста на  $\alpha$ -пинен е

од 0,79-2,23%, на лимонен од 1,60-6,38%, на фенхон од 7,84-19,21%, на естрагол од 66,94-81,98% и на *trans*-анетол од 0,17-3,06%. Важно е да се нагласи ниската содржина на *trans*-анетол (0-3%) и високата содржина на естрагол. Хемискиот состав на примероците 1МВР до 8МВР (Валандово, Боданци, Нов Дојран) и 15МВР (Канео, Охрид) е многу сличен на хемискиот состав на примероци од див анасон од Сицилија (Napoli, 2010). Во оваа студија биле анализирани 56 примероци од див анасон од различни локации во Сицилија (изолација на етерично масло проследено со гасно хроматографска анализа) и кај 46 примероци главна компонента со над 60 % застапеност е естрагол.

Авторите по кластер анализа ги делат примероците на 5 групи според застапеноста на главните компоненти естрагол, анетол, фенхон, лимонен и  $\alpha$ -пинен. Хемискиот состав на спомнатите примероци од Македонија одговараат на група 3 (40 примероци) од студијата на Napoli et al., (2010) ( $\alpha$ -пинен од 1-6 %, лимонен од 1-4 % фенхон од 12-21 %, и *trans*-анетол од 0-3 %). Кај примерокот од Баба планина (MBN-12WFF) застапеноста на  $\alpha$ -пинен изнесува 3,98 %, на фенхон 11,87 %, на естрагол 45,24 %, и на *trans*-анетол 31,58 %. Кога ќе се спореди со студијата на Napoli et al., 2010 тогаш овој примерок влегува во естрагол/анетол хемотип и одговара на групација 1 (слика 2.2 во теоретски дел).

**Табела 4.10.** Хемиски соста на испарливата фракција на примероци од плодови од *Foeniculum vulgare* од Македонија. Резултатите се дадени како *m/m* (%).

<i>t<sub>R</sub></i> (min)	Соединение	11WFF*	12WFF	13WFF	15MBP	1MBP	3MBP	4MBP	5MBP	6MBP	7MBP	8MBP
4,702	$\alpha$ -пинен (1)	2,25	3,98	1,25	1,74	2,23	1,06	1,61	1,67	1,22	0,79	1,17
4,858	камфен (74)	н.д.	0,26	0,09	0,25	0,24	0,11	0,20	н.д.	0,17	0,07	0,14
5,140	$\beta$ -феландрен (3)	1,83	0,32	0,17	0,27	н.д.	н.д.	н.д.	0,28	0,13	н.д.	н.д.
5,169	$\beta$ -пинен (2)	н.д.	0,27	0,10	0,23	0,59	0,43	0,60	0,26	0,08	0,31	0,40
5,297	неидентификувано	н.д.	1,03	0,56	1,11	1,51	1,09	1,58	1,43	1,48	0,65	0,81
5,442	мирцен (4)	н.д.	0,32	0,25	0,67	0,62	0,52	н.д.	0,05	1,29	0,44	0,38
5,630	<i>p</i> -цимен (9)	0,61	0,17	0,12	0,21	н.д.	0,18	н.д.	0,16	0,21	н.д.	0,53
5,668	лимонен (5)	1,76	3,56	1,40	2,77	3,75	2,84	6,38	2,66	2,94	4,56	1,60
5,728	1,8-цинеол (8)	н.д.	н.д.	н.д.	0,07	н.д.	0,75	н.д.	0,66	0,37	н.д.	0,39
5,818	<i>trans</i> -оцимен (6)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0,05	н.д.	н.д.	0,03	н.д.	н.д.
5,921	$\gamma$ -терпинен (7)	н.д.	0,41	0,97	0,28	1,46	0,59	0,45	0,65	0,22	0,69	2,06
6,171	фенхон (10)	13,86	11,87	7,15	15,95	12,37	10,96	15,91	14,95	19,21	7,84	11,77
6,381	неидентификувано	н.д.	н.д.	н.д.	1,37	0,24	0,22	0,69	0,13	0,48	0,10	0,74
6,576	камфор (75)	1,08	0,37	0,22	0,39	0,33	0,30	0,39	0,39	0,52	0,23	0,51
6,976	естрагол (11)	4,02	<b>45,24</b>	3,51	<b>73,73</b>	<b>75,46</b>	<b>75,31</b>	<b>70,21</b>	<b>71,19</b>	<b>66,94</b>	<b>81,98</b>	<b>72,40</b>
7,160	карвон (19)	н.д.	н.д.	0,10	н.д.	0,95	0,16	0,71	0,45	0,11	0,17	0,34
7,218	анисалдеhid (13)	6,07	0,25	0,09	0,04	0,03	0,17	0,07	0,12	0,06	0,05	0,13
7,378	<i>trans</i> -анетол (12)	<b>51,20</b>	31,58	<b>83,55</b>	0,38	0,17	3,06	0,26	0,98	1,36	1,05	1,48
7,826	анискетон (20)	1,15	н.д.	0,07	0,03	0,03	0,11	0,06	0,11	0,08	0,05	0,10
8,205	<i>threo</i> -анетол $\beta$ -хидрокси метил етер (70a)	4,27	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
8,252	<i>erythro</i> -анетол $\beta$ -хидрокси метил етер (70b)	2,74	0,16	0,27	0,19	н.д.	0,15	0,23	0,16	0,25	0,15	0,41
8,573	анетол диол (69a/b)	4,24	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0,06	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.

Во примерокот собран од Драчево, Скопје (13WFF) застапеноста на  $\alpha$ -пинен е 1,25 %, на лимонен 1,40 %, на фенхон 7,15 %, на естрагол 3,51 %, на *trans*-анетол 83,55 %. Според Krüger и Hammer (1999) овој примерок спаѓа во анетол хемотип 1. Овој диворастечки примерок се карактеризира со висок принос и висока застапеност на *trans*-анетол, вредности кои ги задоволуваат барањата на Европска фармакопеја 8.5 (интересен за испитување со гранични вредности за фенхон ~7,5 %). Примерокот од Кумановско (11WFF) кој иницијално не можеше да се класифицира, но подоцна со примена на развиената SHS-GC-FID метода се утврди дека примерокот е стар и содржи секундарни оксидациони продукти (>15% анисалдеhid, анискетон, *threo*-анетол  $\beta$ -хидрокси метил етер и анетол диол). Примероците што содржат поголемо количество *trans*-анетол се особено подложни на промени во текот на времето.

#### 4.7. Развивање HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> метода за разделување на поларните компоненти

Заради идентификација на компонентите екстрахирани со смеса од поларни растворувачи (70 % метанол во вода), важно е да се оптимизира составот на мобилната фаза, стационарната фаза и градиентот, што овозможува целосно разделување на компонентите од анализираната смеса. Првите обиди за разделување на компонентите изолирани од плодот на *Foeniculum vulgare* Mill., беа направени со примена на колона Eclipse C18 SDB (4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m дијаметар на честички од стационарната фаза) со користење на мобилна фаза како смеса од 0,1 % HCOOH (растворувач А) и ацетонитрил (ACN, растворувач В). Процесот на разделување започнува со удел на ACN од 20 % и достигнува до вредност од 80 % до крајно време за анализа од 50 min, проток од 0,35 mL/min и температура на колоната 30 °C. При овие услови, компонентите елуираат на повисоки ретенциони времиња и не се целосно разделени. Водејќи се според фактот дека со зголемување на уделот на растворувачот В во мобилната фаза, компонентите елуираат на пониски ретенциони времиња, беше променет уделот на истиот растворувач, што доведува до елуирање на пониски ретенциони времиња, но не овозможува целосно разделување. За протокот на мобилната фаза беше зададена вредност од 0,4 mL/min и зголемен уделот на растворувачот В во мобилната фаза. Резултат е очекуваното елуирање на компонентите

на пониски ретенциони времиња, но сепак недоволна сепарација. Промени, беа извршени и во составот на мобилната фаза и беа направени обиди за разделување со 0,1 % HCOOH (A) и метанол (B). Со цел подобро разделување, беше тестирана сепарацијата и на друга стационарна фаза, со користење на колона Zorbax SB C18 (4,6 × 150 mm, 5 μm дијаметар на стационарната фаза). За разделување на оваа колона беа задржани условите кои беа претходно зададени. Протокот беше задржан на 0,4 mL/min и зададена повисока вредност за уделот на растворувач B во мобилната фаза. Од добиените податоци, беше утврдено дека подобра сепарација на компонентите се постигнува кога ACN е дел од мобилната фаза. Заради ова, беше направена промена на мобилната фаза во 0,1 % HCOOH и ACN, и зголемен протокот на 0,5 mL/min.

Заради можноста од многу подобра сепарација и отсуство на компоненти кои коелуираат беше тестирана и колона Supelco, 25 cm со предколона, задржан оптималниот состав на мобилната фаза и вредност на протокот, но променета температурата на колоната до 25 °C. Конечно, најдобро разделување на поларните компоненти беше постигнато со колона Luna C18(2) 5μm, 100 A (250 × 4,6 mm i.d., 5 μm дебелина на стационарната фаза), со задржување на составот на мобилната фаза и вредноста на протокот од 0,5 mL/min и температура на колоната 25 °C. На оваа колона разделувањето на компонентите е целосно, во споредба со претходно користените. Почетните услови за сепарација се дадени во продолжение: [t (min), B (%): [0, 20], [10, 35], [20, 45], [30, 60], [40, 80], [50, 80] и променети заради постигнување на пониско време на елуирање на последната компонента. Заради ова беше зголемена вредноста на ACN до 90 % при време t = 40 min, до конечна вредност од 100 % B на крајот од хроматографскиот процес. Конечната метода со која беше постигната сепарација за време од 50 min е следна: состав на мобилна фаза [(0,1 % HCOOH, (A); ACN, (B)] вредности на градиентот: [t (min), B (%)] [0, 20], [10, 35], [20, 45], [30, 60], [40, 90], [45, 100], [50, 100], проток 0,5 mL/min, температура на колона 25 °C и волумен на инјектирање 50 μL.

За идентификација на компонентите разделени со претходно опишаната метода, беа користени DAD детектор и масен детектор со јонска стапица. UV спектрите беа снимани во подрачје на бранови должини од 190-600 nm, додека елуирањето на компонентите беше следено на бранова должина од 254, 280, 330 и 350 nm. За идентификација на компонентите со употреба на масените спектри, беше креирана метода на масениот детектор. Молекулите од анализот беа јонизирани со користење на

електроспреј јонизација (ESI) во негативен јонски мод, кој претставува помек мод за јонизација. Како гас за небулизирање и сушење се користи азот со притисокот од 50 psi и проток од 12 mL/min и температура на сушење од 325 °C, додека напонот на капиларата изнесува 3500 V. Масите на јоните беа следени со избор на „Smart” модот избран како почетен мод во подесување на параметрите на масениот анализатор со јонска замка.

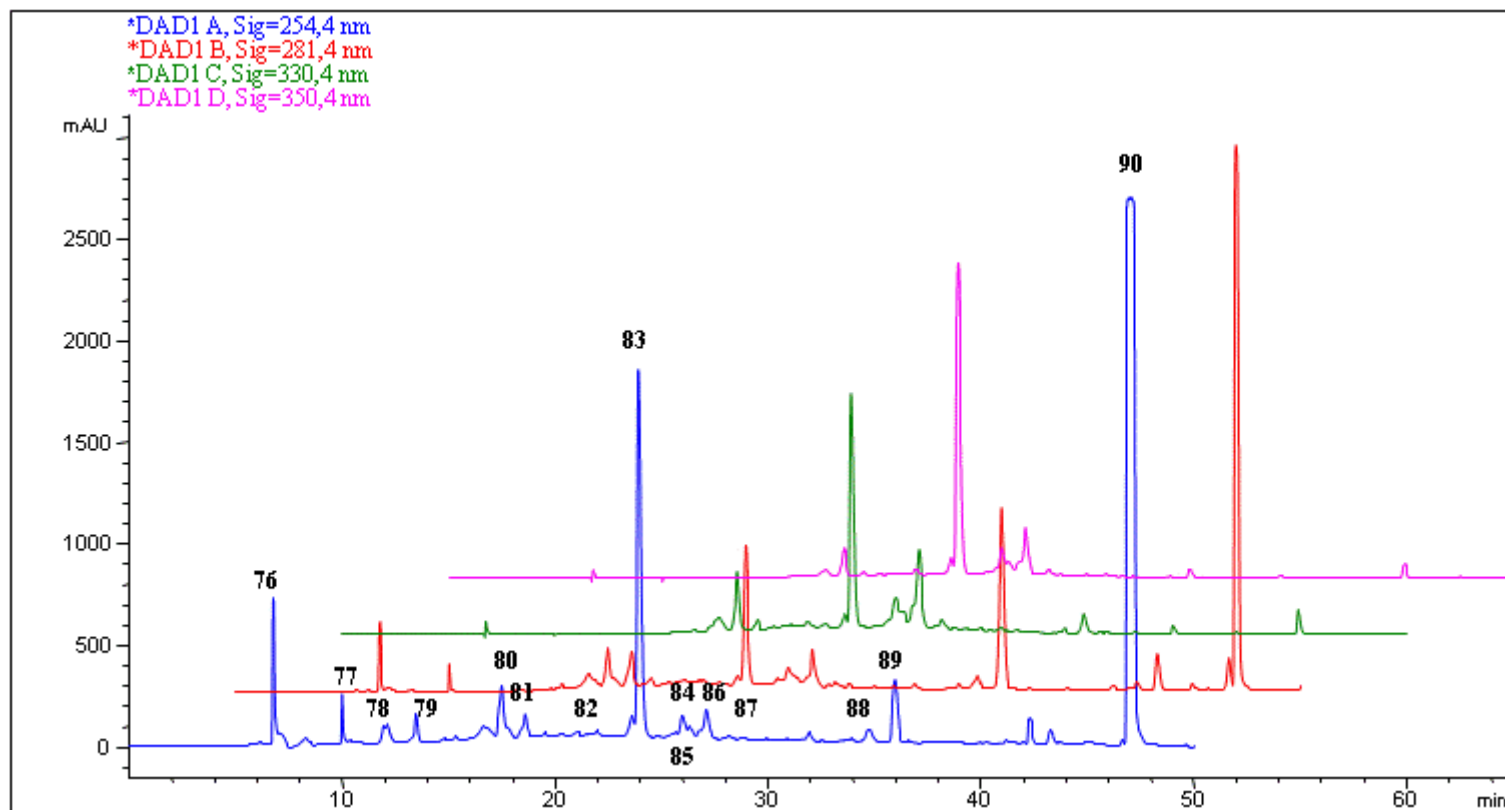
#### **4.8. Хемиски состав на поларната фракција изолирана од плодот на *Foeniculum vulgare* Mill.**

Анализата на метанолните екстракти добиени од плодот на *Foeniculum vulgare* Mill. покажа присуство главно на компоненти, кои според својата структура претставуваат естери на фенолни киселини. Идентификацијата на овие компоненти беше извршена со анализа на нивните UV и масени спектри. Поголем дел од идентификуваните соединенија се деривати на хидроксициметните киселини, додека од флавоноидите, идентификувани се деривати на флавоноли и флавони.

UV спектрите на едноставните фенолни киселини се карактеризираат со апсорпциони максимуми на 320 nm бранова должина, додека апсорпциони максимуми на флавоноидите се очекуваат на 350 nm бранова должина. Во табела 4.11 сумирани се податоци за апсорпционите максимуми на идентификуваните компоненти изолирани од плодот на *Foeniculum vulgare* Mill. var. *dulce*, како и масите на молекулските јони и нивните карактеристични фрагменти до MS<sup>3</sup> фрагментација. Масените спектри на секоја компонента се снимени во негативен јонски мод и се дадени за секоја компонента одделно. Во продолжение се дадени и хроматограми на *Foeniculum vulgare* Mill. var. *dulce*, снимени на 254, 320, 350 и 400 nm бранова должина (слика 4.18).

Табела 4.11. Идентификација на фенолни компоненти изолирани од *F. vulgare* var. *dulce* со HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>

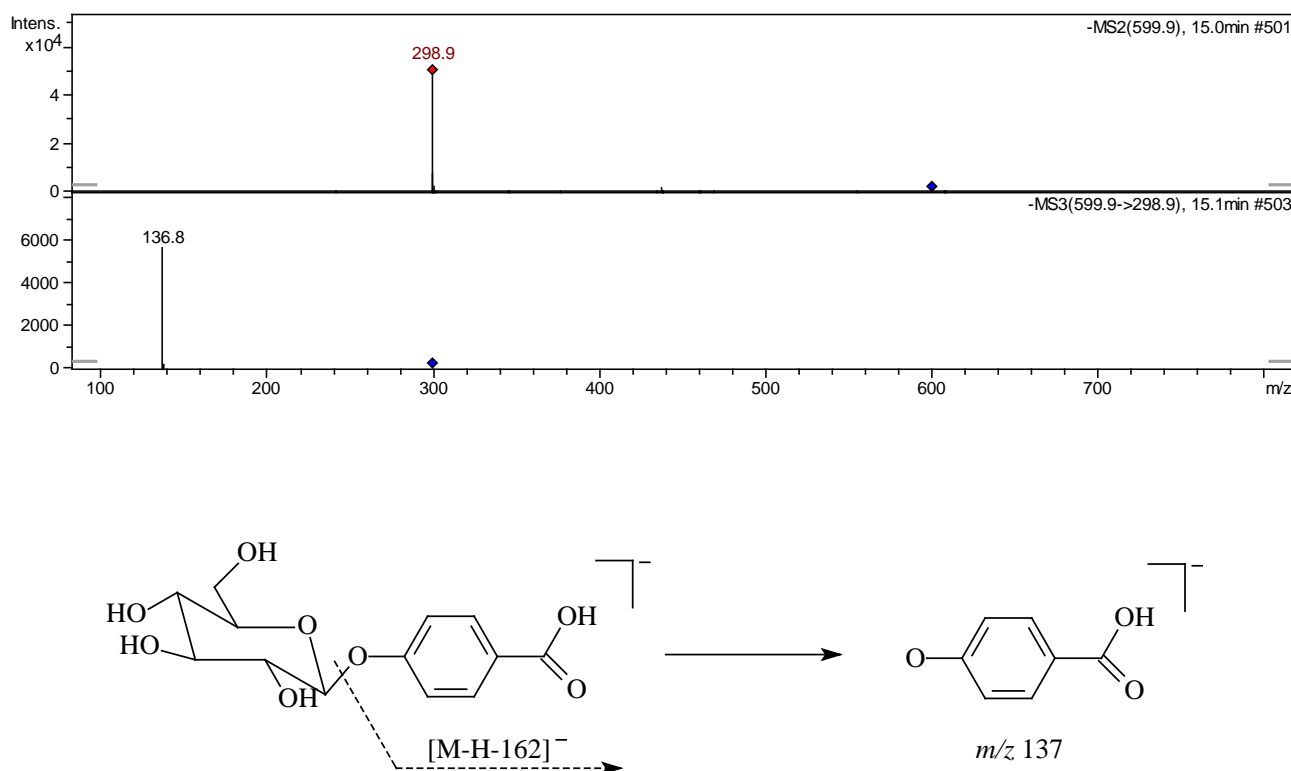
	Соединение	$t_R$ (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	[2M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	-MS <sup>2</sup> [M-H] <sup>-</sup> m/z; MS <sup>3</sup> [M-H] <sup>-</sup>
<b>76</b>	кафеоил- <i>O</i> -глюкозид	7,6	234sh, 308	683	341	<b>341</b> (→179,161,143,113);
<b>77</b>	протокатехинска киселина-4- <i>O</i> -глюкозид	8,4	230, 308	/	315	<b>625</b> (→608,479, 303); <b>546</b> (→625);
<b>78</b>	ферулна киселина	11,9	308	/	191	<b>191</b> (→173, 111);
<b>79</b>	<i>p</i> -хидроксибензоил- <i>O</i> -глюкозид	15,3	245, 320	599	299	<b>299</b> (→137);
<b>80</b>	кафеоилхинска киселина- <i>O</i> -хексозид	16,1	230, 256, 292	/	579	<b>533</b> (→179); <b>179</b> (→161,143,113);
<b>81</b>	димер на кафеоилхинска киселина	19,4	232, 298sh, 330	707	353	<b>353</b> (→191,173);
<b>82</b>	1,3,5-трикафеоил-4-сукциноилхинска киселина	21,9	230, 254,320	/	777	<b>615</b> (→453); <b>453</b> (→359);
<b>83</b>	кверцетин -3- <i>O</i> -глюкуронид	23,2	230, 256, 294sh, 356	/	477	<b>301</b> (→179, 151);
<b>84</b>	дикафеоил хинска киселина	24,7	230, 245sh, 295sh,330	/	515	<b>353</b> (→191,109);
<b>85</b>	1,5-дикафеоил хинска киселина	25,1	230, 245sh, 295sh,330	/	515	<b>353</b> (→191,179);
<b>86</b>	дикафеоил хинска киселина	25,4	240, 245sh, 295sh, 330	/	515	<b>353</b> (→191, 173);
<b>87</b>	малонил 3,5-дикафеоилхинска киселина	26,0	245sh, 295sh, 330	/	601	<b>515</b> (→353); <b>395</b> (→233,179);
<b>88</b>	акацетин-ацетил-глюкозил рамноглюкозид		230, 284, 320	/	795	<b>674</b> (→655, 523, 469), <b>631</b> (→455)
<b>89</b>	лутеолин-8- <i>C</i> -глюкозид	38,4	240, 320	/	447	<b>401</b> (→375, 357, 331);
<b>90</b>	дериват на елагова киселина	41,9	280	/	407	<b>405</b> (→257, 241), <b>241</b> (→211,181,167) <b>257</b> →(239)



Слика 4.18. Хроматограми на метанолен екстракт добиен од плод на *Foeniculum vulgare* Mill.var.*dulce*. на бранови должини 254, 281, 330 и 350 nm.

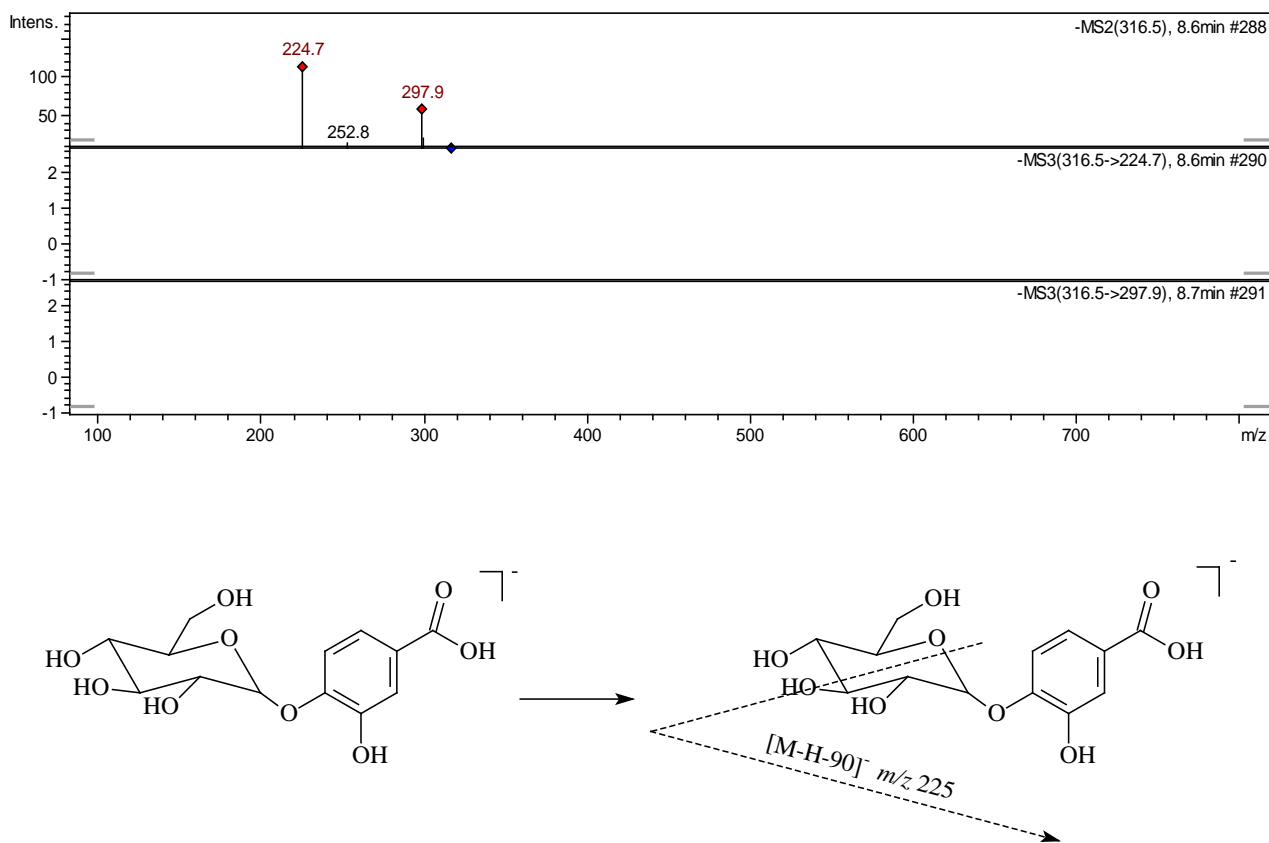
#### 4.8.1. Идентификација на хидроксibenзоеви и хидроксициметни киселини и нивни деривати

**Фенолни киселини и нивни деривати:** Еден од идентификуваните деривати на хидроксibenзоевата киселина беше *p*-хидроксибензоил-*O*-глукозид (**79**), кој при депротонирање дава молекулски јон при  $m/z$  599 кој одговара на  $[2M-H]^-$ . При фрагментација во  $MS^2$  се добива основен пик на  $[M-H]^-$  јон на  $m/z$  299 (100 %), кој одговара на масата на мономерот  $[M-H-299]^-$ . Во  $MS^3$  спектарот, основниот пик одговара на фрагментен јон со маса 137  $[(M-H-299)-162]^-$ , кој се образува заради загуба на хексозил остаток од 162 аму од молекулскиот јон на мономерот. Добиените фрагменти од овој дериват се во согласност со литературните податоци за фрагментација на *p*-хидроксибензоил-*O*-глукозид (Parejo et al., 2004). Масениот спектар и фрагментациониот профил се дадени на слика 4.19.



Слика 4.19. Масени спектри и фрагментационен профил на *p*-хидроксибензоил-*O*-глукозид (**79**).

Компонентата (77) е идентификувана како протокатехинска киселина 4-*O*-глукозид кој при депротонирање дава молекулски јон  $[M-H]^-$  при  $m/z$  315. При фрагментација во  $MS^2$  се добиваат три фрагменти, од кои како основен пик се јавува пикот на молекулскиот јон  $[M-H-90]^-$  при  $m/z$  225, кој одговара на типичното раскинување кај шеќерите со загуба на јон со  $m/z$  90. Пикот на вториот молекулски јон во  $MS^2$  при  $m/z$  297, одговара на молекулски јон кој се образува заради загуба на една молекула вода од молекулскиот јон  $[M-H-18]^-$ . Застапеноста на овој јон изнесува 48,51 %. Масениот спектар и фрагментациониот профил се дадени на слика 4.20.

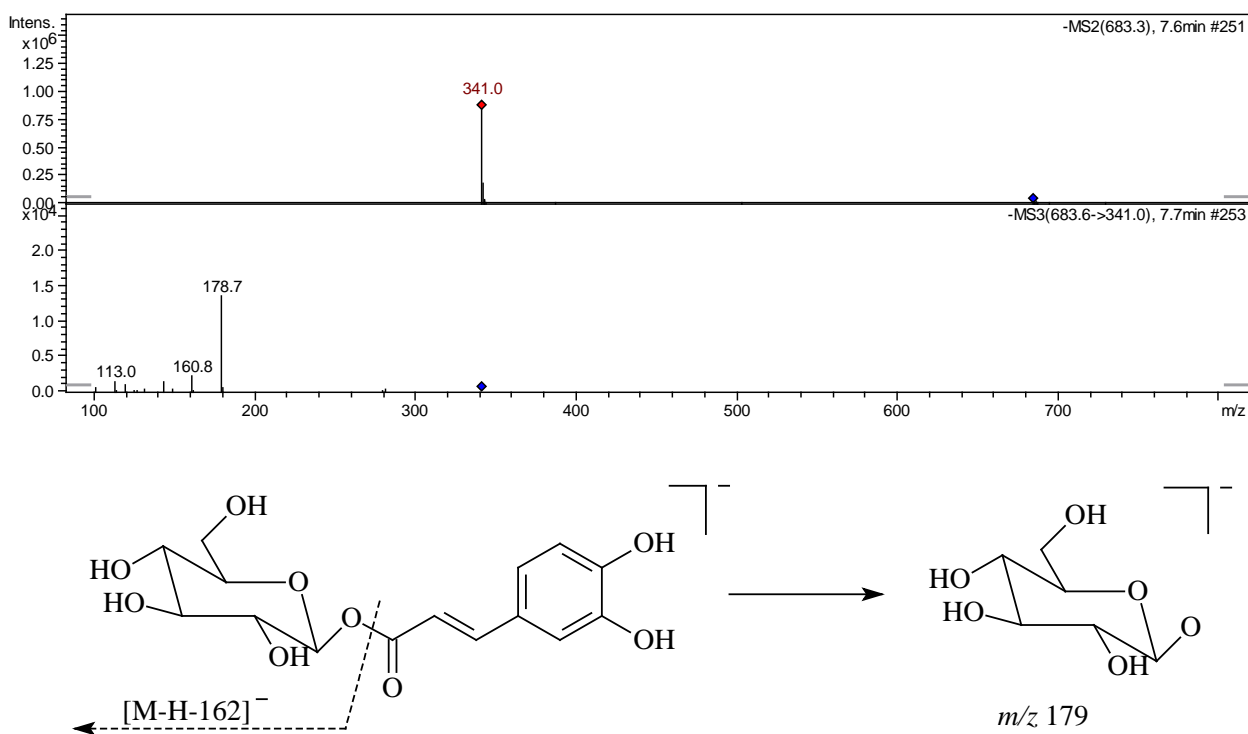


Слика 4.20. Масен спектар и фрагментационен профил на протокатехинска киселина-4-*O*-глукозид (77).

**Хидроксициметни киселини и нивни деривати:** Од групата на хидроксициметни киселини во анализираниот примерок беше идентификувана само ферулна киселина

(78), додека останатите идентификувани компоненти претставуваат нивни гликозилерани деривати или деривати со хинската киселина. Оваа компонента во масениот спектар дава молекулскиот јон  $[M-H]^-$  на  $m/z$  193. При понатамошна фрагментација на молекулскиот јон се образуваат два јони, од кои основен е јонот на  $m/z$  111 и јон кој одговара на  $m/z$  173.

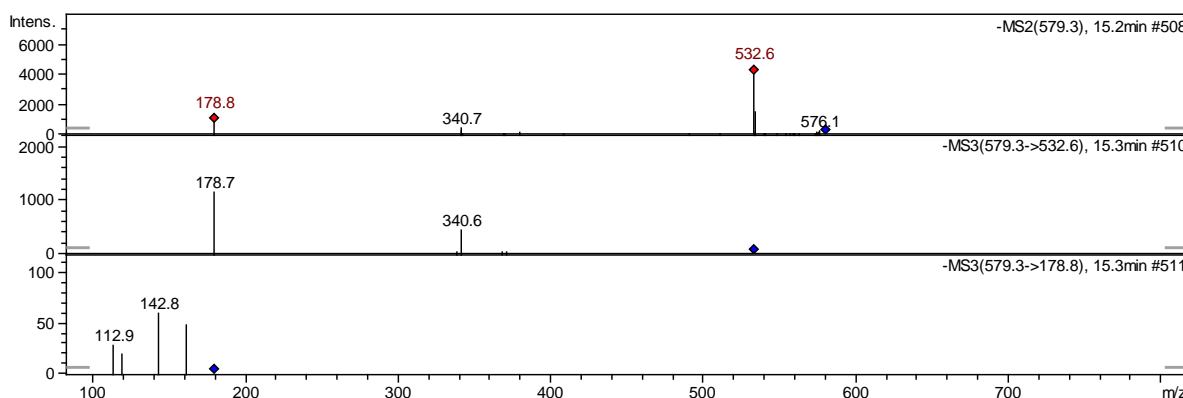
Од спомнатите деривати, идентификуван е кафеоил-*O*-глукозид (76), компонента која во масениот спектар дава молекулски јон  $[2M-H]^-$  на  $m/z$  683. Во  $MS^2$  добиениот основен пик одговара на  $[M-H]^-$  јон со  $m/z$  341  $[M-H-342]^-$ . Овој однос одговара на мономер од кафеоил-*O*-глукозид. Во  $MS^3$  фрагментација  $[M-H]^-$  јонот губи кафеоил остаток од 162 аму  $[(2M-H-341)-162]^-$ , при што се добиваат фрагменти со маса 179 (100 %), 161 (15,79 %), 143 (9,37 %) и 113 (8,79 %). Добиените вредности се карактеристични за јони кои се добиваат при фрагментација на остаток од глюкоза. Добиените податоци од масените спектри се во согласност со литературните податоци (Figuera et al., 2015). Масените спектри и фрагментациониот профил се дадени на (слика 4.21).



Слика 4.21. Масени спектри и фрагментационен профил на кафеоил-*O*-глукозид (76).

Од дериватите на кафената киселина, детектирани беа кафеоилхинска киселина-*O*-хексозид (80) и кафеоилхинска киселина (81). Во масениот спектар на компонентата

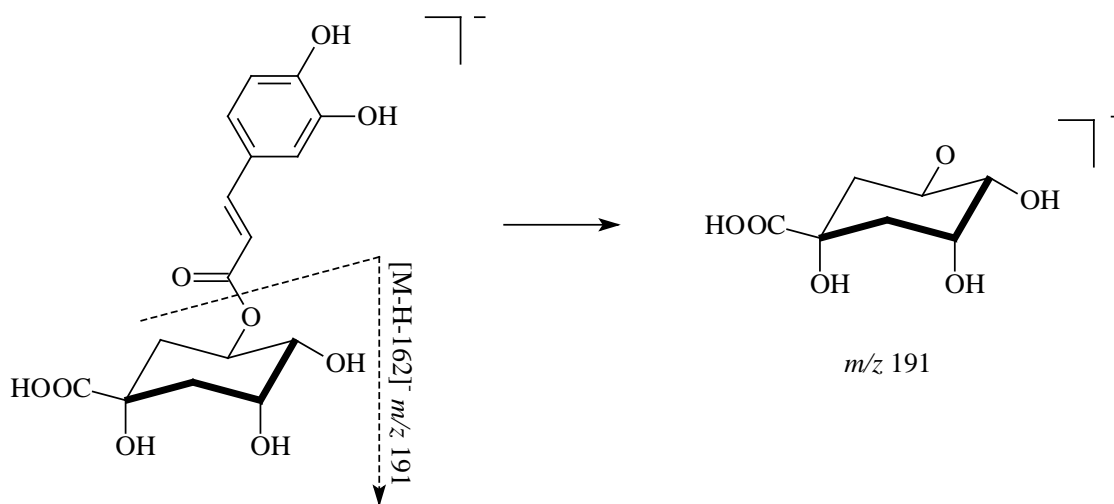
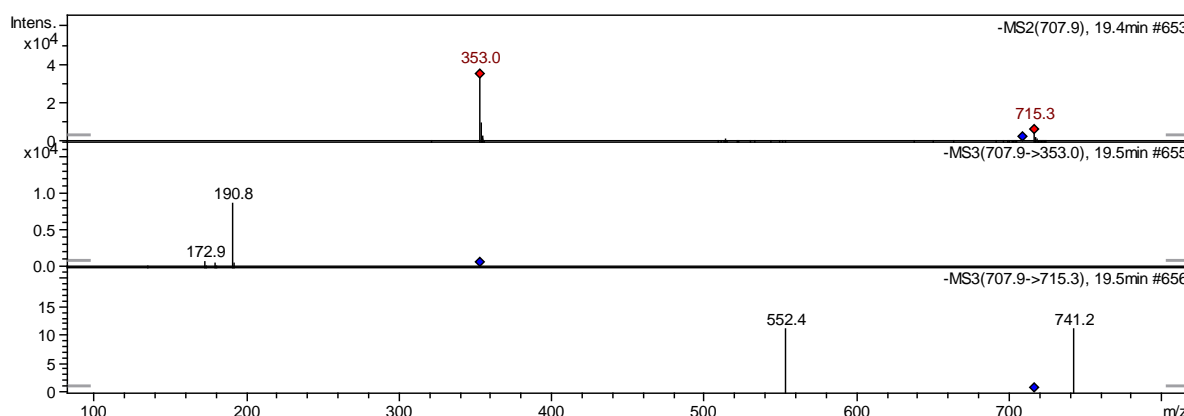
(80), пикот на молекулскиот јон  $[M-H]^-$  е на  $m/z$  579 (слика 4.22). При  $MS^2$  фрагментацијата на молекулскиот јон се одвиваат два процеси: првиот е декарбоксилација, при што се образува јон, кој во  $MS^2$  дава основен пик со маса  $m/z$  533  $[M-H-COO]^-$  и при вториот процес молекулскиот јон губи кафеоил остаток од 162 ати, што резултира со фрагментен јон со маса 179  $[(M-H-COO)-162]^-$ , кој дава пик со застапеност од 36,82 %. При  $MS^3$  фрагментација на јонот со маса 533, се забележува дополнителен пик на јон со  $m/z$  341 (45,10 %), кој одговара на загуба на остаток од хинска киселина (191). Дополнително, при  $MS^3$  фрагментација на јонот со  $m/z$  179 се добиваат јони со  $m/z$  161 (100 %), 143 (43,01 %) и 113 (37,02 %), карактеристични за фрагментација на глюкоза кои се документирани во литературата (Pacífico et al., 2015).



Слика 4.22. Масен спектар на кафеоилхинска киселина-*O*-хексозид (80).

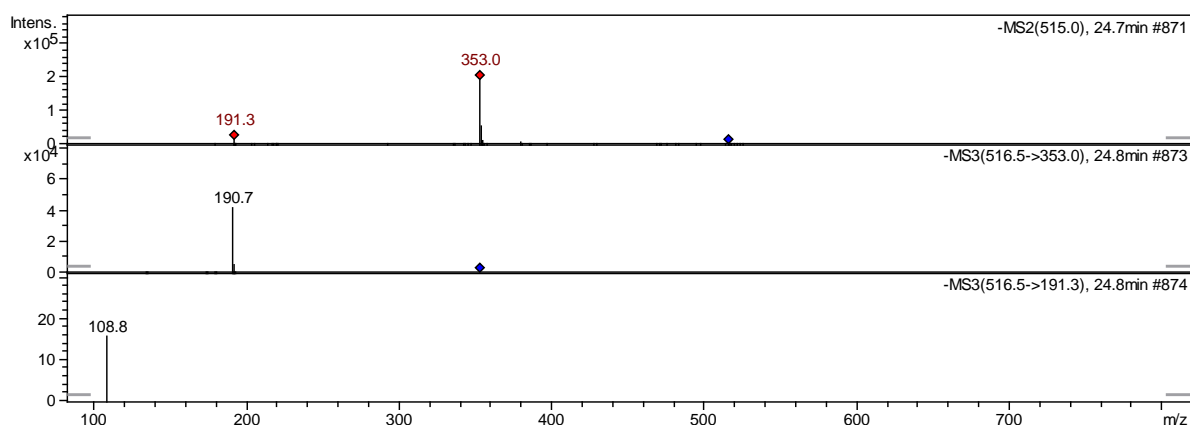
Кај кафеоилхинската киселина (81), карактеристичен е молекулскиот јон  $[2M-H]^-$  со  $m/z$  707, кој во  $MS^2$  дава  $[M-H]^-$  јон со  $m/z$  353 (100 %). Вредноста  $m/z$  353 е карактеристична за депротонираните изомери на кафеоилхинската киселина. Во  $MS^3$ , јонот со  $m/z$  353 дава фрагментен јон со  $m/z$  191  $[(2M-H-353)-162]^-$ , чија застапеност изнесува 100 %. Образувањето на овој јон се должи на загубата на остаток од кафена киселина со маса од 162 ати. Во  $MS^3$  се детектираат и фрагментни јони со  $m/z$  173 (6,89 %), 179 (5,03 %) и 135 (0,93 %) (слика 4.23). За определување на точната позиција на остатокот од кафена киселина беа користени податоците за идентификација на позиционите изомери на кафеоилхинските киселини дадени од Clifford et al., (2005). Според ова истражување, 4-кафеоилхинската киселина е единствениот изомер кој во

MS<sup>2</sup> фрагментација дава основен пик кој одговара на јон со  $m/z$  173, додека при фрагментирање на 1-кафеоилхинска киселина не е забележано образување на јон со однос  $m/z$  135. 3-кафеоилхинска киселина и 5-кафеоилхинска киселина, во MS<sup>3</sup> се разликуваат по интензитетот на јоните со  $m/z$  173 и 135. Кај 5-кафеоилхинската киселина, интензитетот на јонот  $m/z$  173 е поголем, додека интензитетот на јонот со  $m/z$  135 е понизок во однос на истите кај 3-кафеоилхинската киселина. Според ова, детектираниот изомер во анализот е 5-кафеоилхинска киселина.



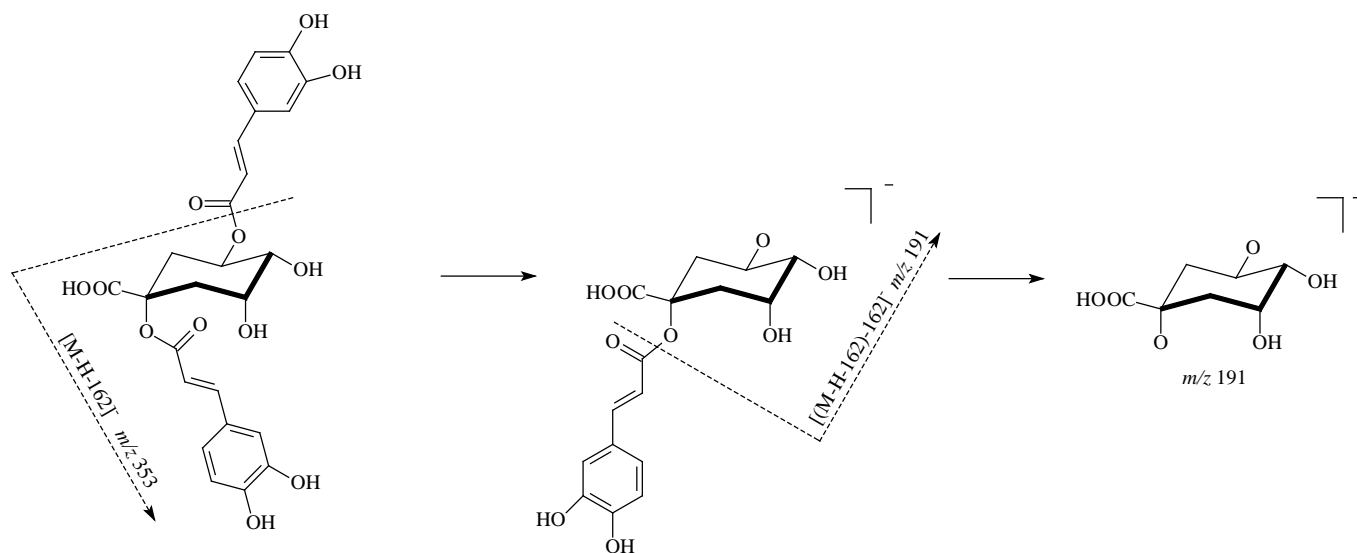
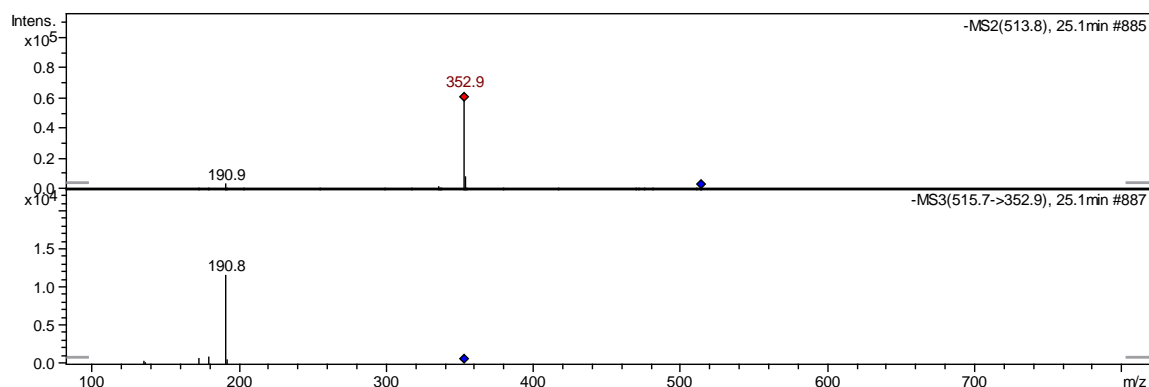
Слика 4.23. Масени спектри и фрагментационен профил на 5-кафеоилхинска киселина (81).

Од детектираните изомери на дикафеоилхинската киселина (**84**, **85**, **86**), изомерот кој елуира на најниско ретенционо време (**84**) при фрагментација во негативен јонски мод дава масени спектри прикажани на слика 4.24. Според масите на добиените јони, не може да се определи за точно кој изомер станува збор. При споредба на овој масен спектар со масените спектри на компонентите **85** и **86**, во MS<sup>3</sup> веднаш се забележува основен пик на јон со  $m/z$  109, но и отсуство на пикови кои одговараат на јони со однос  $m/z$  179 и 173, карактеристични за изомерите на кафеоилхинската киселина.



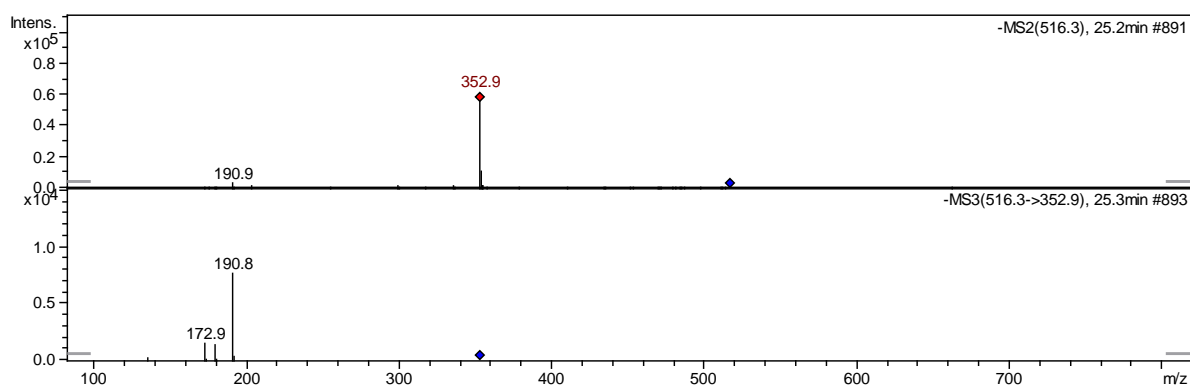
Слика 4.24. Масени спектри на дикафеоилхинска киселина (**84**).

Изомер на дикафеоилхинска киселина (**85**) дава карактеристичен молекулски јон  $[M-H]^-$  на  $m/z$  515, кој во MS<sup>2</sup> се фрагментира до јон со маса 353 (100 %), заради загуба на остаток од кафена киселина  $[M-H-162]^-$ . Во MS<sup>3</sup> јонот на  $m/z$  353 се фрагментира до  $m/z$  191 (100 %), вредност која одговара на загуба на 162 ати (вториот кафеоил остаток), давајќи го јонот на хинска киселина ( $m/z$  191). Во MS<sup>3</sup>, фрагментацијата на молекулскиот јон на хинската киселина ( $m/z$  191) продолжува до  $m/z$  179 (16,10 %), 173 (19,20 %) и 135 (1,53 %). Овој изомер е идентификуван како 1,5-дикафеоилхинска киселина, заради основниот јон на  $m/z$  191 во MS<sup>3</sup> фрагментација и отсуство на јон на  $m/z$  135. Интензитет од 100 % на  $m/z$  191 во MS<sup>2</sup> фрагментација, укажува на тоа дека нема супституција во положба 4 кај хинската киселина. Кога еден кафеоил остаток е врзан во оваа положба, основниот пик во MS<sup>2</sup> се регистрира на  $m/z$  173. Според ова, трите изомери кои имаат еден кафеоил остаток врзан во положба 4 на хинската киселина се исклучени. (Cliford et al., 2005) (слика 4.25).



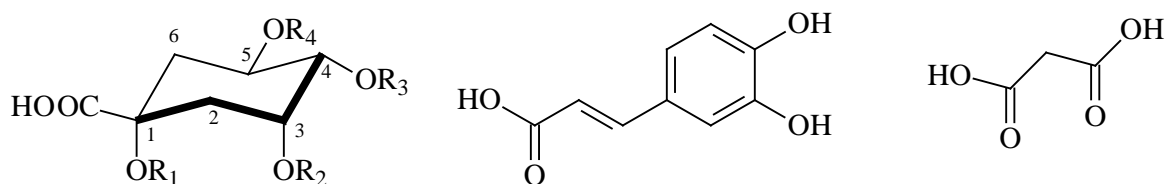
Слика 4.25. Масени спектари и фрагментација на 1,5-дикафеоилхинска киселина (**85**).

За разлика од изомерот (**85**) кај масениот спектар на изомерот на дикафеоилхинската киселина (**86**), во MS<sup>3</sup> фрагментацијата на јонот на хинската киселина ( $m/z$  191) продолжува до  $m/z$  179 (16,10 %), 173 (19,20 %) и 135 (1,53 %). Според литературните податоци (Parejo et al., (2004a), Clifford et al., (2005), Clifford и Knight, 2003) овој изомер може да биде 1,3-дикафеоилхинска киселина или 3,5-дикафеоилхинска киселина (слика 4.26).



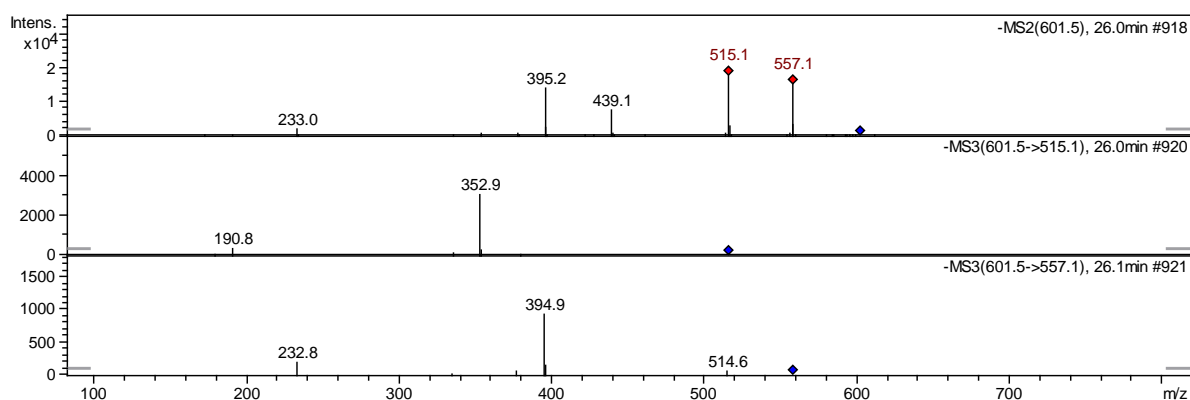
Слика 4.26. Масени спектри на дикафеоилхинска киселина (86).

Детектираната малонил дикафеоилхинска киселина (87) дава молекулски јон на  $m/z$  601  $[M-H]^-$ . Загубата на малонил остаток со 86 аму во  $MS^2$  резултира со образување на јон од дикафеоилхинска киселина кој дава основен пик на  $m/z$  515  $[M-H-86]^-$ . Исто така, во  $MS^2$  се гледа фрагмент добиен после декарбоксилација на молекулскиот јон, при што се добива јон на  $m/z$  557  $[M-H-COO]^-$ , со застапеност 82,86 %. Основен пик во  $MS^3$  од јонот со маса 515, е јонот на  $m/z$  353, кој повторно се добива со загуба од 162 аму карактеристични за остаток од кафена киселина  $[M-H-86-162]^-$ . Во  $MS^3$ , фрагментацијата на јонот со маса 353 продолжува до  $m/z$  191 (8,32 %) и 173. Споредено заради идентификација на изомерот на дикафеоилхинската киселина, јонот  $m/z$  191 има поголем интензитет од јонот  $m/z$  179 (слика 4.27). Според податоците дадени за идентификација на изомерите на хлорогените киселини предложени од Clifford et al., (2005), најверојатно е дека идентификуваниот изомер е 3,5-дикафеоилхинска киселина, додека во овој случај не беше можно да се идентификува позицијата на малонил групата. Податоците добиени од масените спектри се во согласност со литературните податоци (Petreska et al., 2011).



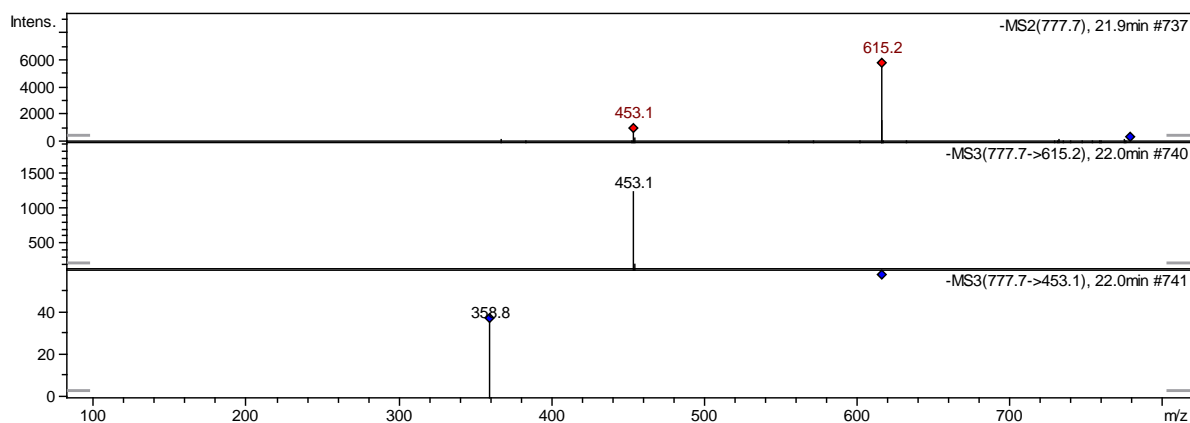
$R_1, R_2, R_3, R_4 = H \rightarrow$  хинска киселина

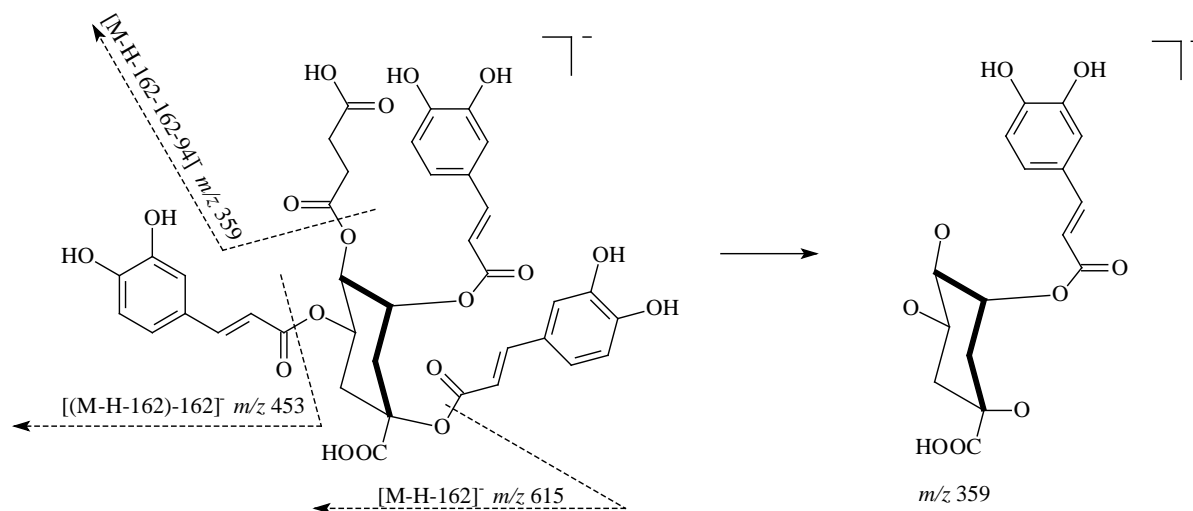
$R_1=H, R_2=$  кафеоил,  $R_3=H, R_4=$  кафеоил  $\rightarrow$  3,5-дикафеоилхинска киселина



Слика 4.27. Масен спектар на малонил дикафеоилхинска киселина (87).

Од дериватите на хидроксициметните киселини, идентификуван е и 1,3,5-трикафеоил-4-сукциноилхинска киселина (82). Масениот спектар на оваа компонента дава карактеристичен молекулски јон  $[M-H]^-$  при  $m/z$  777. Во  $MS^2$ , фрагментацијата продолжува до формирање на јонот  $[M-H-162]^-$  кој дава основен пик при  $m/z$  615, што се должи на загуба на кафеоил остаток од 162 аму. Понатаму, фрагментацијата продолжува со загуба на вториот кафеоил остаток, што резултира со образување на фрагментен јон  $[(M-H-162)-162]^-$  при  $m/z$  453 (11,68 %). Во  $MS^3$  фрагментацијата, пикот од  $[(M-H-162)-162]^-$  е основен пик, кој продолжува да се фрагментира до фрагмент кој во масениот спектар се забележува при  $m/z$  359 (слика 4.28). Добените податоци од UV и масените спектри на оваа компонента се во согласност со податоците од литературата (Lin и Harnly., 2008).

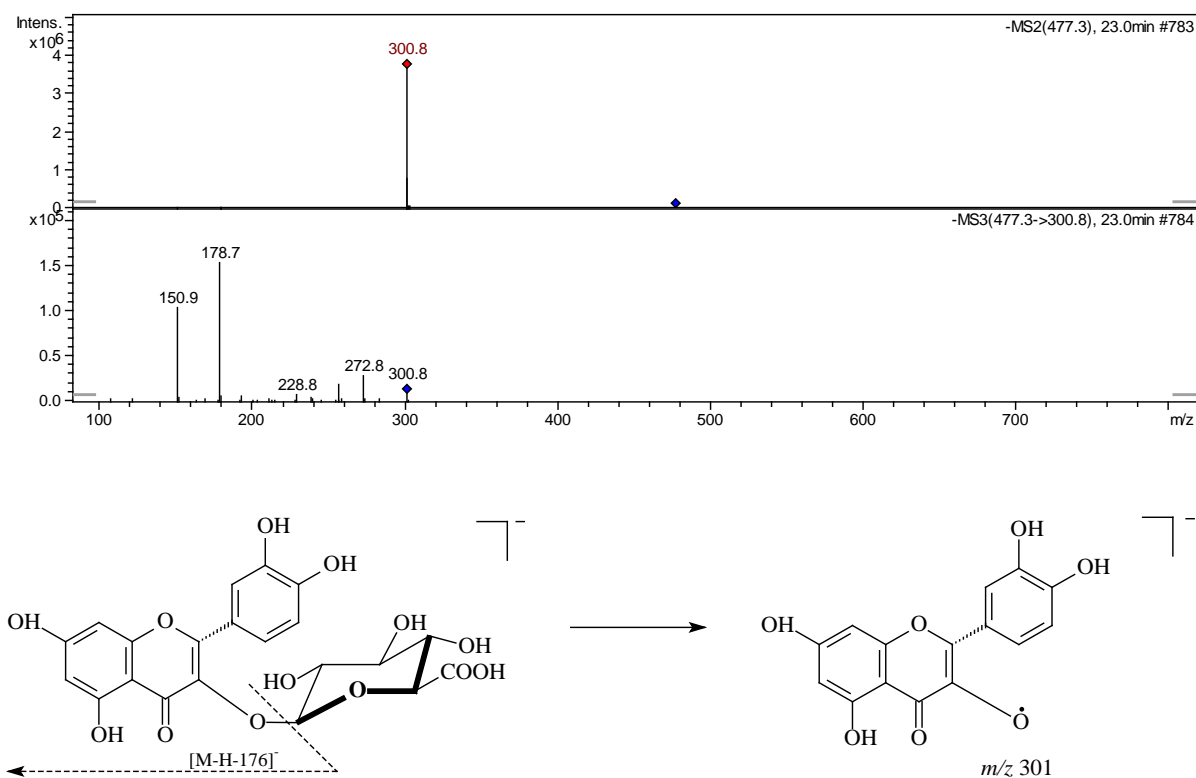




Слика 4.28. Масени спектри и фрагментационен профил на 1,3,5-трикафеоил-4-сукциноилхинска киселина (82).

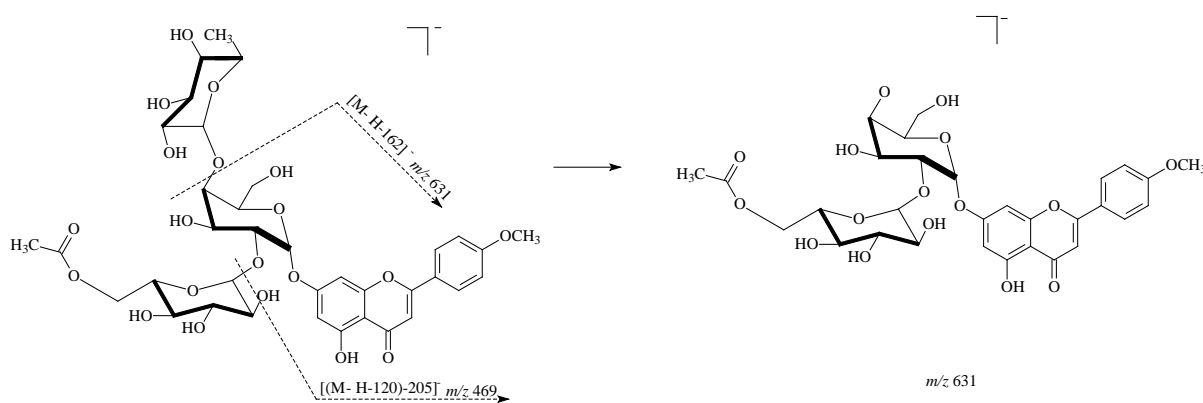
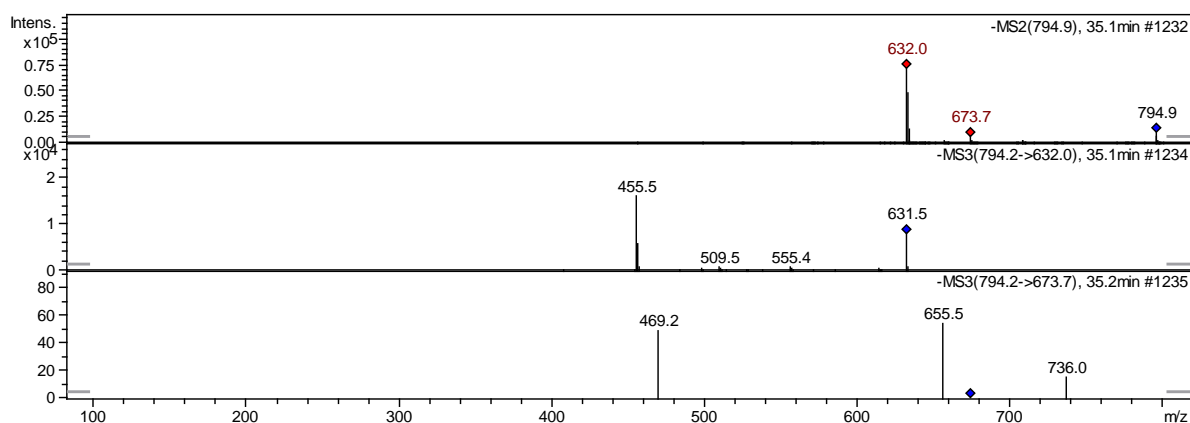
#### 4.8.2. Идентификација на флавоноиди

Од флавоноидните структури, во анализираниите примероци на *Foeniculum vulgare* Mill. беа идентификувани три компоненти, од групата на флавоноли и флавоноли. Како главна компонента идентификуван е кверцетин-3-*O*-глукуронид (83). Молекулниот јон  $[M-H]^-$  во  $MS^1$  е на  $m/z$  477, кој во  $MS^2$  се фрагментира до јон кој дава основен пик на  $m/z$  301. Оваа вредност е карактеристична за депротонирана молекула на кверцетин. Во  $MS^3$ , фрагментацијата продолжува до јони со  $m/z$  179 (100 %) и 151 (67 %), кои произлегуваат од retro-Diels-Alder-ово преместување кај кверцетинот. Вакво преместување може да се одвива и кај циклохексанскиот прстен кај шеќерите. Масените спектри и фрагментациониот профил се дадени на слика 4.29.



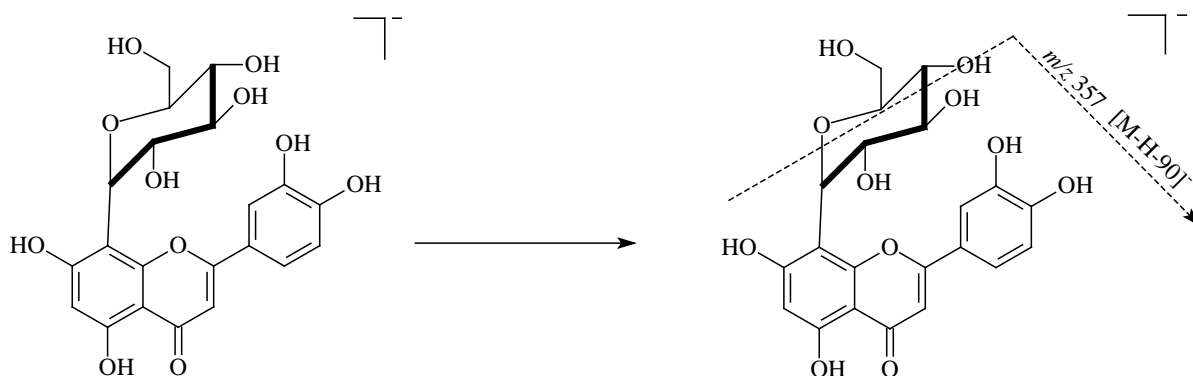
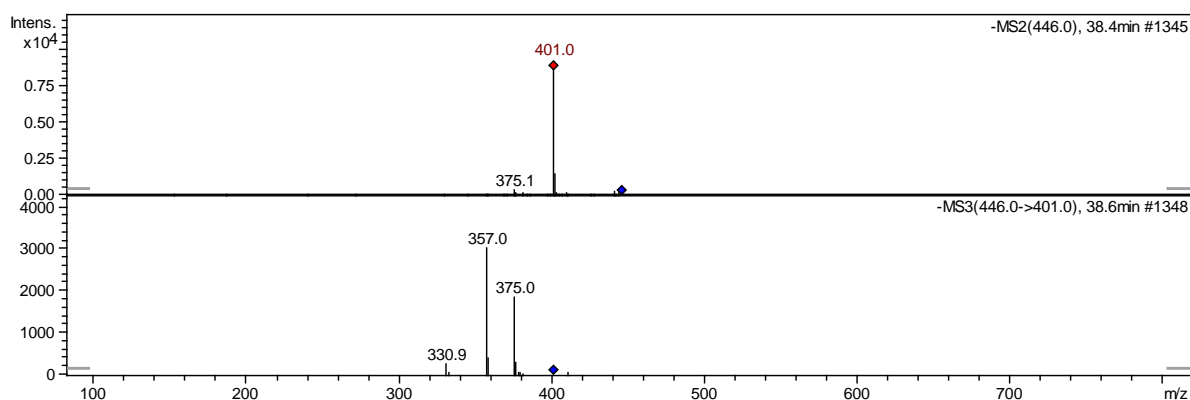
Слика 4.29. Масени спектри и фрагментационен профил на кверцетин-3-*O*-глукуронид (83).

Компонентата (88) е идентификувана како акацетин-ацетилглюкозил-рамнозил-глюкозид и спаѓа во групата на *O*-метириани флавоноиди кои се и *O*- и *C*-гликозилирани. Оваа компонента дава молекулски јон  $[M-H]^-$  на  $m/z$  795, кој во  $MS^2$  се фрагментира до јон кој дава основен пик на  $m/z$  631, карактеристичен за загуба на остаток од хексоза од 162 аму (врзана преку кислород за флавоноидот) и јон со  $m/z$  674 (7,39 %) кој одговара на загуба од 120 аму типична за фрагментација на шеќерите во *C*-гликозиди. Во  $MS^3$ , фрагментацијата на основниот јон со  $m/z$  631 продолжува до јон кој дава основен пик при  $m/z$  455, кој одговара на загуба од 176 аму  $[(M-H-162)-176]^-$ . Во  $MS^3$ , фрагментацијата на молекулскиот јон  $m/z$  674 продолжува до образување на основен пик при  $m/z$  655  $[(M-H-120)-18]^-$  и јон со застапеност од 90,32 % при  $m/z$  469  $[(M-H-120)-205]^-$  кој одговара на загуба на ацетилглюкозил остаток. Фрагментациониот профил на оваа компонента е во согласност со податоци од литературата (Cserháti, 2007). Масен спектар и фрагментациониот профил на овој дериват е дадени на (слика 4.30).



Слика 4.30. Масен спектар и фрагментационен профил на акацетин-ацетил-глукозил-рамноглукозид (**88**).

Компонентата (**89**) е идентификувана како лутеолин 8-*C*-глукозид (ориентин) и претставува единствен *C*-супституиран глукозид во анализираните примероци. Молекулскиот јон  $[M-H]^-$  во  $MS^1$  е на  $m/z$  447, кој во  $MS^2$  се фрагментира до јон кој дава основен пик во масениот спектар на  $m/z$  401. Оваа вредност одговара на карактеристичното раскинување кај шеќерите во *C*-гликозидите  $[M-H-90]^-$ . Во  $MS^3$ , фрагментацијата продолжува до јони со  $m/z$  357 (100 %) и 375 (67,01 %), (Brito et al., 2014, Sakalem et al., 2012; Piccineli et al., 2008, Pereira et al., 2012, Qiao et al., 2011). Масените спектри и фрагментациониот профил се дадени на слика 4.31.



Слика 4.31. Масен спектар и фрагментационен профил на лутеолин 8-С-глукозид (**89**).

Дополнително, од примерокот од *Foeniculum vulgare* Mill. var. *dulce* изолирана е компонента која не беше целосно идентификувана, но според вредностите за  $m/z$  на јоните во  $MS^2$  и  $MS^3$  фрагментациони степени беше делумно карактеризирана како дериват на веќе познато соединение. Компонентата (**90**) најверојатно е дериват на елагова киселина, заради фрагментација на основниот молекулски јон при  $m/z$  407 до фрагментен јон со  $m/z$  257, т.е. загуба од 150 аму, карактеристични за елагова киселина.

Литературните податоци кои беа користени за споредба на добиените резултати, како и за поткрепа при идентификацијата на компонентите од поларната фракција на *Foeniculum vulgare* Mill., генерално идентификуваат поголем број флавоноидни структури отколку фенолни киселини. Parejo et al., (2004a) анализирале различни

фракции од плодот на анасон и притоа освен хидроксициметни киселини и нивни деривати, идентификувале метилирани флаванони и нивни деривати, потоа флавоноли и нивни деривати (рутин и кверцетин) и *O*-метилирани флавоноли (акацетин и акацетин рутинозид). Овој флавонол и неговиот дериват со рутиноза не беа детектирани, но сепак најверојатно *C*-глукозилиран и *O*-(ацетил)глукозил акацетин е идентификуван во анализираните екстракти од сладок анасон. Од флавоноидните структури, единствениот *C*-глукозилиран флавонол (лутеолин 8-*C*-глукозид) бил и претходно идентификуван кај екстракти од анасон. Главна компонента на анализираниот екстракт е кверцетин-3-*O*-глукуронид, кој претходно бил детектиран кај екстракти од плод од анасон (Parejo et al., 2004a; Pacifico et al., 2015; Faudale et al., 2008). Важно е да се напомене дека во анализираните примероци рутин не беше детектиран, иако досега низ литературата е потврден како дел од компонентите со флавоноидна структура изолирани од плодот од анасон (Parejo et al., 2004a; Pacifico et al., 2015; Faudale et al., 2008; Park, 1996).

Присуството на хидроксициметните киселини и нивните деривати не е изненадувачко, бидејќи тие се застапени кај скоро сите растителни видови (Fraga, 2009; Petreska et al., 2011). Од друга страна пак, во примероците од сладок анасон, малонил дикафеоилхинската киселина беше идентификувана и карактеристичните фрагментации и апсорпциони UV максимуми беа потврдени со споредба со податоци од литературата (Gavrilova et al., 2011). Оваа компонента не е објавена во литературата достапна за хемискиот состав на поларната фракција од плод од анасон. Исто така, досега низ литературата не е споменато присуството на протокатехинска киселина или нејзини деривати со глюкоза. Сепак, кај анализираниот примерок, врз основа на фрагментациите од масениот спектар и апсорпционите UV максимуми, потврдено е присуството на протокатехинска киселина 4-*O*-глукозид. Поголем број студии укажуваат на присуство на розмаринска киселина (Faudale et al., 2008; Park 1996; Parejo et al., 2004a) во екстракти од плодот од анасон, која во анализираните примероци не беше детектирана.

## 5. ЗАКЛУЧОК

Оваа докторска дисертација содржи податоци од прво целокупно истражување на хемискиот состав на плодот од *Foeniculum vulgare* Mill. од Р. Македонија. Истражувањето беше насочено кон целосно определување на испарливите секундарни метаболити, масно-киселинскиот состав и фенолни/полифенолни соединенија, преку кои е овозможено и карактеризирање на подвидовите на ова растение кои може да се сретнат на територијата на Р. Македонија. Со оваа студија се потврдува диверзитетот на самиот вид, како од морфолошка така и од хемиска гледна точка, што особено е изразено кај диворастечките видови. Од друга страна, култивираниот сорт *dulce* е со висок квалитет (според Европската фармакопеја) и покажува голема стабилност во хемискиот состав на етеричното масло. Главниот фокус на оваа работа беше да се проучи хемискиот состав на плодот од анасон, кој претставува дел од самото растението што најчесто се користи за подготовка на медицински чаеви, како зачини и за ароматизирање на алкохолни пијалоци.

За примероци каде што имаше доволно растителен материјал, етеричното масло беше изолирано со хидродестилација со Clevenger-ов тип на апаратура. Приносот и индексот на прекршување беа одредени, а потоа беа изведени и прелиминарни анализи со инфрацрвена спектроскопија. Приносот на етеричните масла на одгледуваните (комерцијално најбитни) примероци од сортот *dulce* се движеше од 22-35 mL/kg, додека за диворастечките примероци изнесуваше од 40-60 mL/kg. Одгледуваните сорте имаат најголема застапеност на *trans*-анетол (над 75 %) и ниска застапеност на горчливиот фенхон (под 2 %). Вредностите за индексот на прекршување на изолираните етерични масла укажуваат на висока содржина на *trans*-анетол и може да се користат како иницијален параметар за нивниот квалитет. Инфрацрвената спектроскопија (ATR-FTIR) е корисна за примарна квалитативна проценка на етеричното масло, и е особено корисна за детекција на фенхон и на анисалдехид.

Хемискиот состав на етеричните масла беше одреден со гасна хроматографија (GC-FID и GC-MS) со користење на автентични стандарди. Главните компоненти во етеричното масло од сладок анасон (сортот *dulce*) беа: *trans*-анетол (> 80 %), естрагол

(< 6%), лимонен (< 6%), анисалдехид (< 1%) и фенхон (< 1.5 %). Анализираниите примероци од диворастечкиот анасон имаат варијабилен состав и генерално имаат повисока содржина на фенхон (> 8%). Врз основа на хемискиот состав и содржината на главните компоненти беше одреден вариетот на анализираниите примероци.

Во ова истражување беше развиена алтернативна метода за екстракција и анализа истовремено на испарливата и неиспарливата неполарна фракција од плодовите на анасон. Екстракцијата од спрашен растителен материјал беше направена со смеса од 3:1 v/v *n*-хексан и дихлорометан и проследена со трансестерификација на екстрактот без испарување на растворувачот. Компонентите од двете неполарни фракции изолирани едновременно, беа сепарирани и карактеризирани со гасно-хроматографски методи (GC-FID, SP2560 колона и GC-MS, HP-5MS колона). Најмногу застапени масни киселини беа двата положбени изомери на октадекенска киселина 18:1 (одредени како смеса од петроселинска (6с-18:1) и олеинска (9с-18:1) киселина) чија вкупна содржина изнесува 75,0-82,8 %, потоа линолна киселина (9с,12с-18:2) со содржина од 10,8-16,2 %. Карактеризирани заситени масни киселини беа палмитинска киселина 16:0 (4,3-6,9 %), стеаринска киселина 18:0 (1,2-1,7%) и миристинска киселина 14:0 (0-2,9%). Разлика во масно-киселинскиот состав помеѓу одгледуваните и диворастечките примероци од анасон е незначителна. Добиените резултати за хемискиот состав на испарливата фракција по екстракција и трансестерификација беа многу слични со тие добиени од гасно-хроматографските анализи на изолираните етерични масла. Разликите во застапеноста на главните компоненти (*trans*-анетол, естрагол, фенхон, лимонен и анисалдехид) беа минорни. Ова укажува дека испарливите компоненти не претрпеле хемиска трансформација во текот на екстракцијата и дериватизацијата и развиената метода може да се користи за истовремена анализа на испарливите секундарни метаболити и масните киселини изолирани од плодовите од анасон.

Со цел да се овозможи анализа на испарливата фракција од анасон со мало количество на примерок беше развиена статична хедспејс гасно-хроматографска (SHS-GC) метода и споредена со „стандардната“ метода (хидродестилација/GC анализа). Резултатите за хемискиот состав на испарливата фракција добиени од SHS-GC-FID метода беа многу слични со резултатите добиени со хидродестилација/GC анализа кај свежо набраните примероци. Беа забележани само минорни разлики на застапеноста на главните компоненти (*trans*-анетол, естрагол, фенхон и лимонен) што претставува

доказ дека испарливите компоненти не претрпуваат хемиска промена во текот на екстракциониот процес.

Ова беше направено со цел да се анализираат испарливите компоненти во свежо набрани примероци од анасон и да се следат промените во текот на времето. Со стареење на плодовите од анасон, забележана е постепена загуба на испарливите компоненти од етеричното масло, што се манифестира со намалување на приносот на изолираното етерично масло, но и со намалување на количеството на испарливите компоненти при SHS-GC-FID анализа. Исто така, кај примероците постари од 3 години можно е да се детектираат нови продукти како лимонен оксид, карвон и карвеол. Кај овие примероци со текот на времето се појавуваат нови продукти со повисоко ретенционо време од *trans*-анетол и тоа *threo*-анетол  $\beta$ -хидроксиметил етер, *erythro*-анетол  $\beta$ -хидроксиметил етер и анетол диол кои се детектираат само со SHS-GC-FID метода. Понатаму, дадено е прелиминарно објаснување за варијацијата на содржината на анисалдехид и потеклото на другите соединенија. Релативната застапеност на главните компоненти добиена со двете методи (хидродестилација/GC и SHS-GC-FID) е доста споредлива до 3 години на чување на плодовите од анасон и може да се користи било која во зависност од намената и количеството на растителен материјал. Развиената SHS-GC-FID метода е погодна за одредување на максималното време на складирање и проценка за квалитетот на плодовите од анасон во контекст на безбедност за конзумирање. Со оваа метода беа анализирани и споредени сите собрани примероци особено од диворастечкиот анасон.

За да се заокружи целокупното истражување за стабилноста, беше изведено прелиминарно испитување за фотохемиското однесување на *trans*-анетол паралелно со етерично масло од сладок анасон кое содржи 85 % *trans*-анетол. Примероци од двете проби паралелно беа изложени на сончева светлина и анализирани на неколку временски интервали со GC-MS. Во двата случаи, изомеризација на *trans*-анетол до *cis*-анетол и димеризацијата на *trans*-анетол беа доминантни процеси. Овие фотохемиски процеси беа поефикасни во етеричното масло во споредба со чист *trans*-анетол. Кај чистиот *trans*-анетол доминантен процес беше димеризацијата, додека кај етеричното масло доминантен процес беше изомеризацијата до *cis*-анетол (потврдено од односот *cis*-анетол/димер). Ова сознание може да има практична вредност за соодветно чување

на етеричните масла од анасон и евентуално при чување на алкохолни пијалаци кои содржат *trans*-анетол.

Во последната фаза од испитувањата примероците од анасон беа екстрахирани со 70 % метанол и анализирани со развиена HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup> метода со цел да се утврди кои фенолни/полифенолни соединенија се застапени. Од едноставните фенолни киселини беше идентификувана хидроксibenзоевата киселина, додека изолираните хидроксициметни киселини беа идентификувани како естери со хинската киселина (деривати на дикафеоилхинска киселина), како и деривати на елагова и розмаринска киселина. Главната флавоноидна компонента застапена во најголемиот број од примероци беше кверцетин-3-*O*-глукуронид.

Од оваа студија добиена е солидна слика за компонентите присутни во плодот од анасон од нашето поднебје и може да се заклучи дека култивираниот македонски анасон е сличен по хемиски состав на етеричното масло со тој од Грција и Турција, додека диворастечкиот анасон е многу сличен со тој од Сицилија. Развиените методи, особено истовременото одредување на испарливите компоненти и масно-киселинскиот профил, како и развиената SHS-GC-FID метода имаат практична вредност. Истите може да се користат за одредување на квалитетот и автентичноста на плодовите и комерцијалните етерични масла, за следење на нивната стабилност, како и за одредување и следење на квалитетот на други комерцијални препарати од анасон.

## 6. ЛИТЕРАТУРА

- Akgul, A. and A. Bayrak (1988). Comparative volatile oil composition of various parts from Turkish bitter fennel (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*). *Food Chem.* **30**(4): 319-323.
- Andersen, O. M. and K. R. Markham, Eds. (2006). *Flavonoids chemistry, biochemistry and applications*. Boca Raton, Fl, CRC Press, Francis & Taylor.
- Anwar, F., M. Ali, A. I. Hussain and M. Shahid (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan. *Flavour Fragr. J.* **24**(4): 170-176.
- Arai, T., H. Sakuragi and K. Tokumaru (1982). Photosensitized cis-trans isomerization of beta-alkylstyrenes. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **55**: 2204-2206.
- Arslan, N., A. Bayrak and A. Akgul (1989). The yield and components of essential oil in fennels of different origin (*Foeniculum vulgare* Mill.) grown in Ankara conditions. *Herba Hungarica* **28**(3): 27-31.
- Azeez, S. (2008). Fennel. *Chemistry of spices*. V. A. Parthasaraty, B. Chempakam and T. J. Zachariah. New Delhi, CAB International: 227-241.
- Badgujar, S. B., V. V. Patel and A. H. Bandivdekar (2014). *Foeniculum vulgare* Mill: A review of its botany, phytochemistry, pharmacology, contemporary application, and toxicology. *Biomed. Res. Int.* **2014**: 842674.
- Badoc, A., G. Deffieux, A. Lamarti and G. C. Bourgeois, J. (1994). Essential oil of *Foeniculum vulgare* Mill. (fennel) subsp. *piperitum* (Ucria) Cout. fruit. *J. Essent. Oil Res.* **6**: 333-336.
- Barazani, O., Y. Cohen, A. Fait, S. Diminshtein, N. Dudai, U. Ravid, E. Putievsky and J. Friedman (2002). Chemotypic differentiation in indigenous populations of *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* in Israel. *Biochem. Syst. Ecol.* **30**(8): 721-731.
- Bernath, J., A. Kattaa, E. Nemeth and R. Frank (1994). Production-biological investigation of fennel (*Foeniculum vulgare*) populations of different genotypes. *Atti del Convegno Internazionale*: 287-292.
- Bernath, J. and E. Nemeth (2007). Chemical systematization of the genus *Foeniculum* Mill. based on the accumulation and qualitative differentiation of the essential oil. *Nat. Prod. Commun.* **2**: 309-314.
- Bernath, J., E. Nemeth, A. Kataa and E. Hethelyi (1996). Morphological and chemical evaluation of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) populations of different origin. *J. Essent. Oil Res.* **8**: 247-253.

- Bilia, A. R., M. Fumarola, S. Gallori, G. Mazzi and F. F. Vincieri (2000). Identification by HPLC-DAD and HPLC-MS analyses and quantification of constituents of fennel teas and decoctions. *J. Agric. Food Chem.* **48**(10): 4734-4738.
- Brand, N. (1993). *Foeniculum*. *Hagers Handbuch for Pharmazeutischen Praxis, 5th ed. Volume 5: Drogen E-O*. R. Hansel, K. Keller, H. Rimpler and G. Schneider. Berlin-Heidelberg-New York-London, Springer-Verlag. **Vol. 5: Drogen E-O**: 156-181.
- Brared-Christensson, J., P. Forsstrom, A.-M. Wennberg, A.-T. Karlberg and M. Matura (2009). Air oxidation increases skin irritation from fragrance terpenes. *Contact Derm.* **60**: 32-40.
- Bristol, D. W. (2011). NTP 3-month toxicity studies of estragole (CAS No. 140-67-0) administered by gavage to F344/N rats and B6C3F1 mice. *Toxic. Rep. Ser.* **82**: 1-111.
- Brito, A., Ramirez, E. J., Areche, C., Sepulveda, B., Simirgiotis, M. J. (2014). "HPLC-UV-MS Profiles of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fruits from Three Citrus Species Consumed in Northern Chile." *Molecules* 19(11): 17400-21.
- Carteau, D., P. Brunerie, B. Guillemat and D. M. Bassani (2007). Photochemistry in everyday life: The effect of spontaneous emulsification on the photochemistry of trans-anethole. *Photochem. Photobiol. Sci.* **6**(4): 423-430.
- Castro, H. T., J. R. Martinez and E. Stashenko (2010). Anethole isomerization and dimerization induced by acid sites or UV irradiation. *Molecules* **15**(7): 5012-5030.
- Çetin, B., H. Özer, A. Cakir, T. Polat, A. Dursun, E. Mete, E. Öztürk and M. Ekinici (2010). Antimicrobial activities of essential oil and hexane extract of florence fennel [*Foeniculum vulgare* var. *azoricum* (Mill.) Thell.] against foodborne microorganisms. *J. Med. Food* **13**(1): 196-204.
- Council of Europe (2015). *European Pharmacopoeia 8<sup>th</sup> ed.*, Strasbourg: Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare of the Council of Europe.
- Charvet, A. S., L. C. Comeau and E. M. Gaydou (1991). New preparation of pure petroselinic acid from fennel oil (*Foeniculum vulgare*). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**(8): 604-607.
- Choe, E. and D. B. Min (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **5**: 169-186.
- Choi, E. and J. Hwang (2004). Antiinflammatory analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. *Fitoterapia* **75**: 557-565.
- Christie, W. W., Ed. (1993). *Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis*. Advances in Lipid Methodology – Two. Dundee, Oily Press.

- Clifford, M. N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **79**(3): 362-372.
- Clifford, M. N. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric.* **80**(7): 1033-1043.
- Clifford, M. N., K. L. Johnston, S. Knight and N. Kuhnert (2003). Hierarchical scheme for LC-MS<sup>n</sup> identification of chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem.* **51**(10): 2900-2911.
- Clifford, M. N. and S. Knight (2004). The cinnamoyl-amino acid conjugates of green robusta coffee beans. *Food Chem.* **87**: 457–463.
- Clifford, M. N., S. Knight and N. Kuhnert (2005). Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS<sup>n</sup>. *J. Agric. Food Chem.* **53**(10): 3821-3832.
- Coelho, J. A. P., A. P. Pereira, R. L. Mendes and A. M. F. Palavra (2003). Supercritical carbon dioxide extraction of *Foeniculum vulgare* volatile oil. *Flavour Fragr. J.* **18**(4): 316-319.
- Cosge, B., B. Gürbüz, H. Kendir and A. Ipek (2008a). Composition of essential oil in sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *dulce*) lines originated from Turkey. *Asian J. Chem.* **20**(2): 1137-1142.
- Cosge, B., M. Kiralan and B. Gurbuz (2008b). Characteristics of fatty acids and essential oil from sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *dulce*) and bitter fennel fruits (*F. vulgare* Mill. var. *vulgare*) growing in Turkey. *Nat. Prod. Res.* **22**(12): 1011-1016.
- Czygan, F. C. (1989). Fenchel. *Teedrogen*. M. Wichtl. Stuttgart, Germany, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: 171-173.
- Damjanovic, B., Z. Lepojevic, V. Zivkovic and A. Tolic (2005). Extraction of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds with supercritical CO<sub>2</sub>: Comparison with hydrodistillation. *Food Chem.* **92**(1): 143-149.
- De Marino, S., F. Gala, N. Borbone, F. Zollo, S. Vitalini, F. Visioli and M. Iorizzi (2007). Phenolic glycosides from *Foeniculum vulgare* fruit and evaluation of antioxidative activity. *Phytochemistry* **68**(13): 1805-1812.
- Dervendji, V. (1986). *Prirodni Lekoviti i Aromaticni Surovini*. Skopje, Nasa Kniga.
- Diaz-Maroto, M. C., I. J. Diaz-Maroto Hidalgo, E. Sanchez-Palomo and M. S. Perez-Coello (2005). Volatile components and key odorants of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil extracts obtained by simultaneous distillation-extraction and supercritical fluid extraction. *J. Agric. Food Chem.* **53**(13): 5385-5389.
- Diaz-Maroto, M. C., M. S. Perez-Coello, J. Esteban and J. Sanz (2006). Comparison of the Volatile Composition of Wild Fennel Samples (*Foeniculum vulgare* Mill.) from Central Spain. *J. Agric. Food Chem.* **54**(18): 6814-6818.

- EMEA (2010). European Medicines Agency, HMPC.
- Faudale, M., F. Viladomat, J. Bastida, F. Poli and C. Codina (2008). Antioxidant activity and phenolic composition of wild edible and Medicinal fennel from different Mediterranean countries. *J. Agric. Food Chem.* **56**(6): 1912-1920.
- Figueredo, G., M. M. Ozcan and J. C. Chalchat (2011). Effect of harvest years on chemical composition of essential oils of bitter fennel (*Foeniculum vulgare* mill. subsp. *piperitum*) fruits. *J. Food Biochem.* **35**(4): 1223-1230.
- Forster, H. B., H. Niklas and S. Lutz (1980). Antispasmodic effects of some medicinal plants. *Planta Med.* **40**: 309-319.
- Fraga, C. G., Ed. (2009). *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*. Hoboken, NJ, John Wiley & Sons, Inc.
- Gavrilova, V., Kajdzanoska, M., Gjamoski, V., and M. Stefova (2011). Separation, characterization and quantification of phenolic compounds in blueberries and red and black currants by HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>, *J. Agric. Food. Chem.* **59**(8): 4009-4018.
- Goodwin, T. W. and E. I. Mercer (1983). *Introduction to plant biochemistry*. Oxford, Pergamon Press.
- Grosch, W. (2007). Key odorants of food identified by aroma analysis. *Flavourings*. H. Ziegler. Weinheim, Germany, Wiley-VCH: 704-743.
- Gross, M., E. Lewinsohn, Y. Tadmor, E. Bar, N. Dudai, Y. Cohen and J. Friedman (2009). The inheritance of volatile phenylpropenes in bitter fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *vulgare*, Apiaceae) chemotypes and their distribution within the plant. *Biochem. Syst. Ecol.* **37**(4): 308-316.
- Grotewold, E. (2007). *The Science of Flavonoids*. Berlin, Springer.
- Gudi, G., A. Kraemer, H. Kruger, L. Hennig and H. Schulz (2014). Discrimination of fennel chemotypes applying IR and Raman spectroscopy: Discovery of a new gamma-asarone chemotype. *J. Agric. Food Chem.* **62**(16): 3537-3547.
- Guenther, T. M. and G. Luo (2001). Investigation of the role of the 2',3'-epoxidation pathway in the bioactivation and genotoxicity of dietary allylbenzene analogs. *Toxicology* **160**(1-3): 47-58.
- Guillén, M. D. and M. J. Manzanos (1996). A study of several parts of the plant *Foeniculum vulgare* as a source of compounds with industrial interest. *Food Res. Int.* **29**(1): 85-88.
- Harborne, J. B. and N. W. Simmonds (1964). The natural distribution of phenolic aglycones. *Biochemistry of Phenolic Compounds*. J. B. Harborne. New York, Academic Press.

- Haslam, E. (1980). Recent Developments in Methods for the Esterification and Protection of the Carboxyl Group. *Tetrahedron* **36**: 2409-2433.
- He, W. and B. Huang (2011). A review of chemistry and bioactivities of a medicinal spice: *Foeniculum vulgare*. *J. Med. Plant. Res.* **5**(16): 3595–3600.
- Hoering, P. and K. P. Grälert (1909). Über das sogenannte Photoanethol. Ein Beitrag zur chemischen Lichtwirkung. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **42**(1): 1204-1207.
- Ishikawa, T., J. Kitajima, Y. Tanaka, M. Ono, Y. Ito and T. Nohara (1998). Water-soluble constituents of fennel. VI. 1, 8-Cineole type glycosides. *Chem. Pharm. Bull.* **46**(11): 1738-1742.
- Jodral, M. M. (2004). *Illicium, Pimpinella and Foeniculum. Medicinal and aromatic plants-Industrial profiles.* R. Hardman. Boca Raton, FL, CRC Press. **40**.
- Karlberg, A.-T., L. P. Shao, U. Nilsson, E. Gafvert and J. L. G. Nilsson (1994). Hydroperoxides in oxidized d-limonene identified as potent contact allergens. *Arch. Dermatol. Res.* **286**: 97-103.
- Katsiotis, S. T. (1988). Study of different parameters influencing the composition of hydrodistilled sweet fennel oil. *Flavour Fragr. J.* **4**: 221-224.
- Kitajima, J., T. Ishikawa and Y. Tanaka (1998a). Water-soluble constituents of fennel. II. Four erythro-anethole glycol glycosides and two p-hydroxyphenylpropylene glycol glycosides. *Chem. Pharm. Bull.* **46**(10): 1591-1594.
- Kitajima, J., T. Ishikawa and Y. Tanaka (1998b). Water-soluble constituents of fennel. I. alkyl glycosides. *Chem. Pharm. Bull.* **46**(10): 1643-1646.
- Kitajima, J., T. Ishikawa, Y. Tanaka and Y. Ida (1999). Constituents of Fennel. X. New Chromanone and Phenylethanoid Glycosides, and threo-Epoxyanethole. *Chem. Pharm. Bull.* **47**(10): 1448-1450.
- Kleiman, R. and G. F. Spencer (1982). Search for new industrial oils: XVI. Umbelliflorae-seed oils rich in petroselinic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **59**(1): 29-38.
- Kojima, M., H. Sakuragi and K. Tokumaru (1981). The role of oxygen as an electron acceptor in dimerization of some styrene derivatives. *Tetrahedron Lett.* **22**(30): 2889-2892.
- Kramer, J. G., V. Fellner, M. R. Dugan, F. Sauer, M. Mossoba and M. Yurawecz (1997). Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *Lipids* **32**(11): 1219-1228.

- Križman, M., D. Baričević and M. Prošek (2006). Fast quantitative determination of volatile constituents in fennel by headspace-gas chromatography. *Anal. Chim. Acta* **557**(1-2): 267-271.
- Križman, M., D. Baričević and M. Prošek (2007). Determination of phenolic compounds in fennel by HPLC and HPLC-MS using a monolithic reversed-phase column. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43**(2): 481-485.
- Krüger, H. and K. Hammer (1999). Chemotypes of fennel. *J. Essent. Oil Res.* **11**(1): 79-82.
- Kunzemann, J. and K. Herrmann (1977). Isolation and identification of flavon(ol)-O-glycosides in caraway (*Carum carvi* L.), fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.), anise (*Pimpinella anisum* L.), and coriander (*Coriandrum sativum* L.), and of flavon-C-glycosides in anise—I. Phenolics of spices. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **164**(3): 194-200.
- Lawrence, B. M. (1994). Progress in essential oils. *Perfume Flavor* **19**: 31-32.
- Lewis, F. D., D. M. Bassani, R. A. Caldwell and D. J. Unett (1994). Singlet state cis,trans photoisomerization and intersystem crossing of 1-arylpropenes. *J. Am. Chem. Soc.* **116**(23): 10477-10485.
- Lewis, F. D. and M. Kojima (1988). Photodimerization of singlet trans- and cis-anethole. Concerted or stepwise? *J. Am. Chem. Soc.* **110**(26): 8660-8664.
- Lin, L.-Z. and J. M. Harnly (2007). Screening Method for the Identification of Glycosylated Flavonoids and Other Phenolic Compounds Using a Standard Analytical Approach for All Plant Materials. *J. Agric. Food Chem.* **55**(4): 1084-1096
- Mabry, T. J., K. R. Markham and M. B. Thomas (1970). *The systematic identification of flavonoids*. New York, Heidelberg, Berlin, Springer-Verlag.
- Marquez, C. A., H. Wang, F. Fabbretti and J. O. Metzger (2008). Electron-transfer-catalyzed dimerization of trans-anethole: Detection of the distonic tetramethylene radical cation intermediate by extractive electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **130**(51): 17208-17209.
- Martins, C., R. Cacao and K. J. Cole (2012). Estragole: a weak direct-acting food-borne genotoxin and potential carcinogen. *Mutat. Res.* **747**(1): 86-92.
- Matevski, V. (2005). *The Flora of Republic of Macedonia. Vol. 1(6)*. K. Micevski. Skopje, Macedonian Academy of Sciences and Art. **1**: 1584-1585.
- Mattila, P., J. Hellstorm and R. Torronen (2006). Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *J. Agric. Food Chem.* **54**(19): 7193-7199.
- Matura, M., M. Skold, A. Borje, K. E. Andersen, M. Bruze, P. Frosch, A. Goossens, J. D. Johansen, C. Svedman, I. R. White and A. T. Karlberg (2005). Selected oxidized fragrance terpenes are common contact allergens. *Contact Derm.* **52**(6): 320-328.

- Miraldi, E. (1999). Comparison of the essential oils from ten *Foeniculum vulgare* Miller samples of fruits of different origin. *Flavour Fragr. J.* **14**(6): 379-382.
- Mimica-Dukic, N., S. Kujundzic, M. Sokovic and M. Couladis (2003). Essential oil composition and antifungal activity of *Foeniculum vulgare* Mill. obtained by different distillation conditions. *Phytother. Res.* **17**: 368-371.
- Misharina, T. A. and A. N. Polshkov (2005). Antioxidant properties of essential oils: Autoxidation of essential oils from laurel and fennel and of their mixtures with essential oil from coriander. *Appl. Biochem. Microbiol.* **41**(6): 610-618.
- Mockute, D., G. Bernotiene and J. A. (2005). Storage-induced changes in essential oil composition of *Leonurus cardiaca* L. plants growing wild in Vilnius and of commercial herbs. *Chemija* **16**: 29-32.
- Mohan, R. S., K. Gavardinas, S. Kyere and D. L. Whalen (2000). Spontaneous hydrolysis reactions of cis- and trans-beta-methyl-4-methoxystyrene oxides (anethole oxides): Buildup of trans-anethole oxide as an intermediate in the spontaneous reaction of cis-anethole oxide. *J. Org. Chem.* **65**(5): 1407-1413.
- Mohan, R. S. and D. L. Whalen (1993). Acid-catalyzed hydrolysis of cis- and trans-anethole oxides: Discrete carbocation intermediates and syn/anti hydration ratios. *J. Org. Chem.* **58**(10): 2663-2669.
- Moura, L. S., R. N. J. Carvalho, M. B. Stefanini, L. C. Ming and M. A. A. Meireles (2005). Supercritical fluid extraction from fennel (*Foeniculum vulgare*): global yield, composition and kinetic data. *J. Supercrit. Fluids* **35**(3): 212-219.
- Muckensturm, B., D. Foechterlen, J.-P. Reduron, P. Danton and M. Hildenbrand (1997). Phytochemical and chemotaxonomic studies of *Foeniculum vulgare*. *Biochem. Syst. Ecol.* **25**(4): 353-358.
- Najdoska-Bogdanov, M., J. B. Bogdanov and M. Stefova (2015). Simultaneous determination of essential oil components and fatty acids in fennel using gas chromatography with a polar capillary column. *Nat. Prod. Commun.* **10**(9): 1619-1626.
- Najdoska-Bogdanov, M., Bogdanov, J.B. Stefova, M. (2016). "Changes in Volatile Compounds during Aging of Sweet Fennel Fruits- Comparison of Hydrodistillation and Static Headspace Sampling Methods." *Natural Product Communications* 11(2): in press.
- Napoli, E. M., G. Curcuruto and G. Ruberto (2010). Screening the essential oil composition of wild Sicilian fennel. *Biochem. Syst. Ecol.* **38**(2): 213-223.
- Naves, Y. R. (1958). Sur la recherche et l'évaluation de l'anéthole cis dans des huiles essentielles et dans des préparations de anéthole. *C. R. Acad. Sci.*: 1734-1736.

- Nozaki, H., I. Otani, R. Noyori and M. Kawanisi (1968). Photochemical reactions of trans-anethole. *Tetrahedron* **24**(5): 2183-2192.
- Ozbek, H., U. S. and H. Dulger (2003). Hepatoprotective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil. *Fitoterapia* **74**(3): 317-319.
- Ozcan, M. M. and J.-C. Chalchat (2006a). Effect of collection time on chemical composition of the essential oil of *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* growing wild in Turkey. *Eur. Food Res. Technol.* **224**(2): 279-281.
- Ozcan, M. M., J.-C. Chalchat, D. Arslan, A. Ates and A. Unver (2006b). Comparative essential oil composition and antifungal effect of bitter fennel (*Foeniculum vulgare* ssp. *piperitum*) fruit oils obtained during different vegetation. *J. Med. Food* **9**(4): 552-561.
- Parejo, I., O. Jauregui, F. Sanchez-Rabaneda, F. Viladomat, J. Bastida and C. Codina (2004a). Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (*Foeniculum vulgare*) using Liquid Chromatography-Negative Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **52**(12): 3679-3687.
- Pacifico, S., S. Galasso, S. Piccolella, N. Kretschmer, S.-P. Pan, P. Nocera, A. Lettieri, R. Bauer and P. Monaco (2015). Winter wild fennel leaves as a source of anti-inflammatory and antioxidant polyphenols. *Arabian J. Chem.*: doi: 10.1016/j.arabjc.2015.1006.1026.
- Parejo, I., F. Viladomat, J. Bastida and C. Codina (2004b). Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the analysis of antioxidative phenolic compounds in fennel using a narrow bore reversed phase C18 column. *Anal. Chim. Acta* **512**(2): 271-280.
- Pereira, O. R., Silva, A. M. S., Domingues, M. R. M. Cardoso, S. M. (2012). "Identification of phenolic constituents of *Cytisus multiflorus*." *Food Chemistry* **131**(2): 652-659.
- Petreska, J., Stefkov, G., Kulevanova, S., Alipieva, K., Bankova, V and M. Stefova (2011). Phenolic compounds of mountain tea from the balkans: LC/DAD/ESI/MS<sup>n</sup> profile and content, *Nat. Prod. Commun.* **6**(1): 21-30.
- Piccaglia, R. and M. Marotti (2001). Characterization of some Italian types of wild fennel (*Foeniculum vulgare*). *J. Agric. Food Chem.* **49**(1): 239-244.
- Piccinelli, A. L., Garcia Mesa M., Armenteros, D. M., Alfonso, M. A., Arevalo, A. C., Campone, L. Rastrelli, L. (2008). HPLC-PDA-MS and NMR Characterization of C-Glycosyl Flavones in a Hydroalcoholic Extract of *Citrus aurantifolia* Leaves with Antiplatelet Activity. *J. Agric. Food Chem.* **56**(5): 1574-1581.
- Qiao, X., He, W. N., Xiang, C., Han, J., Wu, L. J., Guo, D. A., Ye, M. (2011). "Qualitative and quantitative analyses of flavonoids in *Spirodela polyrrhiza* by high-performance

- liquid chromatography coupled with mass spectrometry." *Phytochemical Analysis* **22**(6): 475-83.
- Raal, A., A. Orav and E. Arak (2011). Essential oil composition of *Foeniculum vulgare* Mill. fruits from pharmacies in different countries. *Nat. Prod. Res.* **26**(13): 1478-6427.
- Rather, M. A., B. A. Dar, S. N. Sofi, B. A. Bhat and M. A. Qurishi (2012). *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arabian J. Chem.*: dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.1004.1011.
- Ravid, U., E. Putievsky and N. Snir (1983). The volatile components of oleoresins and the essential oils of *Foeniculum vulgare* in Israel. *J. Nat. Prod.* **46**(6): 848-851.
- Reiter, B., M. Lechner and E. Lorbeer (1998). The fatty acid profiles – including petroselinic and cis-vaccenic acid – of different Umbelliferae seed oils. *Lipid / Fett* **100**(11): 498-502.
- Sakalem, M. E., Negri G., Tabach, R. (2012). "Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the Passiflora genus." *Revista Brasileira de Farmacognosia* **22**: 1219-1232.
- Schweiggert, U., R. Carle and A. Schieber (2007). Conventional and alternative processes for spice production – a review. *Trends Food Sci. Technol.* **18**: 260-268.
- Scott, R. P. W. (2005). Essential oils. *Encyclopedia of analytical science*. P. Worsfold, A. Townshend and C. Poole. Amsterdam, London, New York, Elsevier: 554–561.
- Shahat, A., A. Ibrahim, S. Hendawy, E. Omer, F. Hammouda, F. Abdel-Rahman and M. Saleh (2011). Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils from Organically Cultivated Fennel Cultivars. *Molecules* **16**(2): 1366-1377.
- Shahidi, F. and P. K. Wanasundara (1992). Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **32**(1): 67-103.
- Simandi, B., A. Deak, E. Ronyai, G. Yanxiang, T. Veress, E. Lemberkovics, M. Then, A. Sass-Kiss and Z. Vamos-Falusi (1999). Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of fennel oil. *J. Agric. Food Chem.* **47**(4): 1635-1640.
- Singh, G., S. Maurya, M. P. de Lampasona and C. Catalan (2006). Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food Control* **17**(9): 745-752.
- Soliman, F., A. Shehata, A. Khaleel and S. Ezzat (2002). An acylated kaempferol glycoside from flowers of *Foeniculum vulgare* and *F. Dulce*. *Molecules* **7**(2): 245-251.
- Strehle, M. A., P. Rösch, M. Baranska, H. Schulz and J. Popp (2005). On the way to a quality control of the essential oil of fennel by means of Raman spectroscopy. *Biopolymers* **77**(1): 44-52.

- Telci, I., I. Demirtas and A. Sahin (2009). Variation in plant properties and essential oil composition of sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) fruits during stages of maturity. *Ind. Crops Prod.* **30**(1): 126-130.
- Teucher, E., R. Anton and A. Lobstein (2005). Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et leurs huiles essentielles. *Editions Tec&Doc*: 236-241.
- Tisserand, R. and R. Young (2014). Essential oil composition. *Essential Oil Safety*. St. Louis, Churchill Livingstone: 5-22.
- Tognolini, M., V. Ballabeni, S. Bertoni, R. Bruni, M. Impicciatore and E. Barocelli (2007). Protective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil and anethole in an experimental model of thrombosis. *Pharmacol. Res.* **56**(3): 254-260.
- Tomas-Barberan, F. A. and M. N. Clifford (2000a). Dietary hydroxybenzoic acid derivatives—nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **80**: 1024–1032.
- Tomas-Barberan, F. A. and M. N. Clifford (2000b). Flavanones, chalcones and dihydrochalcones - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **80**: 1073-1080.
- Trenkle, K. (1972). Recent studies on fennel (*Foeniculum vulgare* M.) 2. The volatile oil of the fruit, herbs and roots of fruit-bearing plants. *Pharmazie* **27**(5): 319-324.
- Tschiggerl, C. and F. Bucar (2010). Volatile fraction of lavender and bitter fennel infusion extracts. *Nat. Prod. Commun.* **5**(9): 1431-1436.
- Turek, C. and F. C. Stintzing (2013). Stability of essential oils: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **12**(1): 40-53.
- Vermerris, W. and R. L. Nicholson (2006). *Phenolic compound biochemistry*. Dordrecht, Springer.
- Wang, Z. (2010). Meinwald Rearrangement. *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, John Wiley & Sons, Inc.: 1255-1257.
- Weiss, E. A. (2002). Umbelliferae. *Spice crops*. E. A. Weiss. Wallingford, UK, CAB International: 284-298.
- Weiss, R. F. (1997). *Lehrbuch der Phytotherapie*. Stuttgart, Hippokrates: 82-83, 443 and 463.
- Whalen, D. L. (2005). Mechanisms of hydrolysis and rearrangements of epoxides. *Adv. Phys. Org. Chem* **40**: 247-298.
- Wolff, R. and F. Vandamme (1992). Separation of petroselinic (cis-6 18:1) and oleic (cis-9 18:1) acids by gas-liquid chromatography of their isopropyl esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**(12): 1228-1231.

Yamini, Y., F. Sefidkon and S. M. Pourmortazavi (2002). Comparison of essential oil composition of Iranian fennel (*Foeniculum vulgare*) obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Flavour Fragr. J.* **17**(5): 345-348.

Zoubiri, S. and A. Baaliouamer (2011). Chemical composition and insecticidal properties of some aromatic herbs essential oils from Algeria. *Food Chem.* **129**(1): 179-182.

## **7. ПРИЛОГ**

## 7.1. ПРЕГЛЕД НА АНАЛИЗИРАНИ ПРИМЕРОЦИ FOENICULUM VULGARE MILL.

Табела 7.1. Преглед на извршените анализи на примероци од *F. vulgare* од Р. Македонија.

Реден број	Примерок	ЕМ <sup>а</sup> (mL/kg)	ЕМ <sup>а</sup> (n <sub>D</sub> 20)	ЕМ <sup>а</sup> (FTIR-ATR)	ЕМ <sup>а</sup> (GC-FID)	ЕМ <sup>а</sup> (GC-MS)	Soxhlet <sup>б</sup> (m/m %)	Sox/TRE <sup>в</sup> (GC-FID)	Директна SHS-GC-FID <sup>г</sup>
1	12AF	/	/	/	да	да	/	/	да
2	12A2F	30	1,5513	да	да		21,3	да	да
3	11BF	20	1,5480	да	да	да	/	да	да
4	11CF	30	1,5478	да	да	/	15,2	да	да
5	11DF	мало количество	/	/	/	/	/	/	да
6	12EF	22	1,5517	да	да	/	14,4	да	да
7	11GF	24	1,5511	да	да	/	13,8	да	да
8	12JF	20	1,5456	да	да	/	16,0	да	да
9	12LF	16	1,5518	да	да	/	/	/	да
10	11HFB	20	1,5476	да	да	да	18,2	да	да
11	11HFB1	28	/	/	да	да	/	да	да
12	11MFB	12	/	/	да	да	14,8	да	да
13	11MFB1	29	/	/	да	/	17,3	да	да
14	11KFB	28	1,5516	да	да	/	/	да	да
15	11LFB	10	/	/	да	/	19,5	да	да
16	11IFB	27	1,5515	да	да	/	20,2	да	да
17	07PFB	14	1,5456	да	да	да	19,4	да	да
18	08OFB	16	/	да	да	да	17,3	да	да
19	10NFB	/	1,5498	да	да	да	18,6	да	да
20	12KF	28	1,5496	да	да	да	19,3		да
21	12K2F	28	1,5519	да	да	да	14,7	да	да
22	13QF	30	1,5510	да	да	да	/	/	да
23	13RF	31	1,5509	да	Да	да	20,3	/	да

Реден број	Примерок	EM <sup>a</sup> (mL/kg)	EM <sup>a</sup> (n <sub>D</sub> 20)	EM <sup>a</sup> (FTIR-ATR)	EM <sup>a</sup> (GC-FID)	EM <sup>a</sup> (GC-MS)	Soxhlet <sup>b</sup> (m/m %)	Sox/TRE <sup>b</sup> (GC-FID)	Директна SHS-GC-FID <sup>c</sup>
24	13SF	34	1,5484	да	Да	да	19,9		да
25	13TF	32	1,5493	да	да	/	/	/	да
26	13IPF	/	/	/	/	/	/	/	да
27	11WFF	/	/	/	/	/	/	/	да
28	12WFF	55	1,5173	да		да	22,1		да
29	12FFA	56	1,5171	да	да	да	/	/	да
30	12YPF	30	1,5584	да	да	да	/	/	да
31	13IVF	/	/	/	/	/	/	/	да
32	13WFF	52	1,5437	да	да	да	18,4		да
33	13UF	34	1,5502	да	да	да	20,3		да
34	13XF	/	/	/	/	/	/	/	да
35	14ENF	30	1,5563	да	да	да	/	/	
36	14MBF	/	1,5533	да	да	да	/	/	да
37	1MBP	/	/	/	/	/	/	/	да
38	2MBP	/	/	/	/	/	/	/	да
39	3MBP	/	/	/	/	/	/	/	да
40	4MBP	/	/	/	/	/	/	/	да
41	5MBP	/	/	/	/	/	/	/	да
42	6MBP	/	/	/	/	/	/	/	да
43	7MBP	/	/	/	/	/	/	/	да
44	Sur-EO <sup>b</sup>	/	1,5354	да	да	да	/	/	да
45	14Bi-EO <sup>b</sup>	/	1,5496	да	да	да	/	/	да

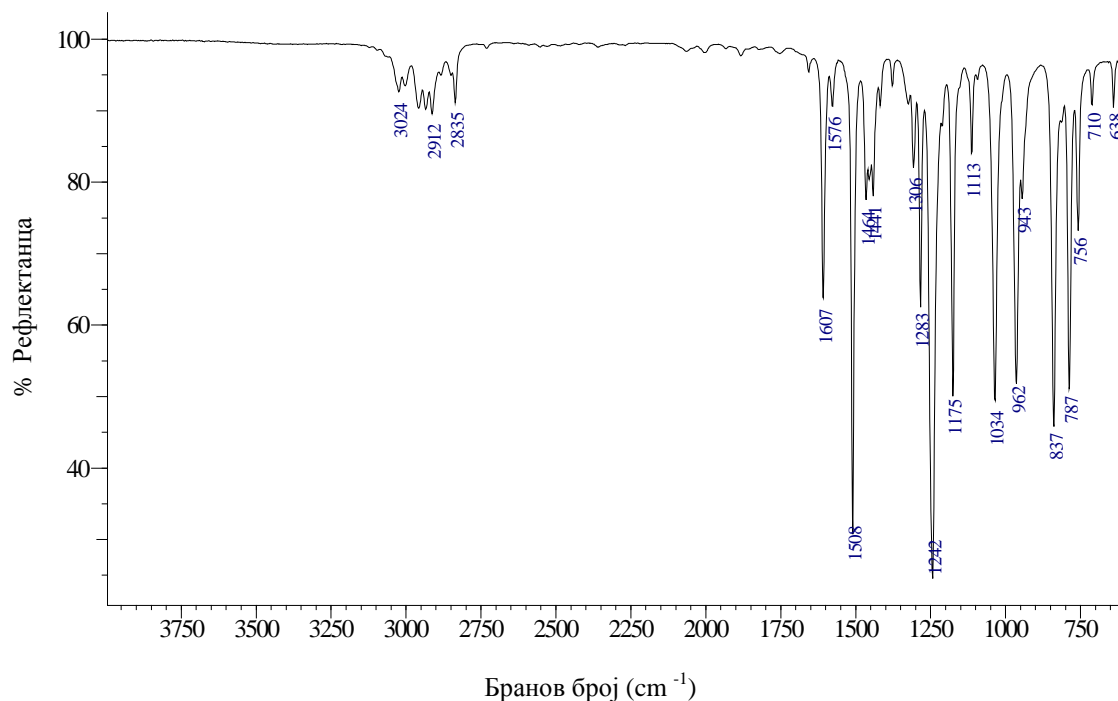
*a*-етерично масло (EM) изолирано со хидродестилација од растителен материјал.

*b*-принос (m/m %) добиен по Soxhlet екстракција на растителен материјал со 3:1 хексан/дихлорометан.

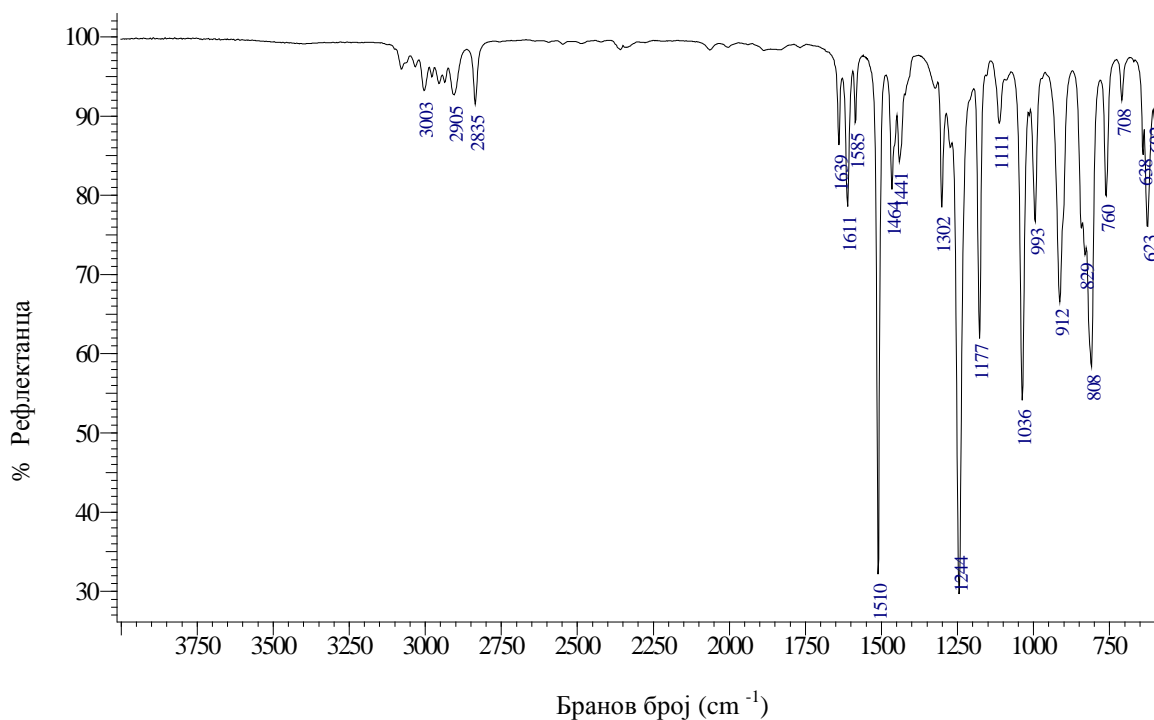
*c*-Soxhlet екстракција проследена со директна трансестерификација со 2M KOH и GC-FID анализа.

*d*-Директна анализа на свежо сомелен растителен материјал со статична хедспејс гасхроматографска анализа (SHS-GC-FID).

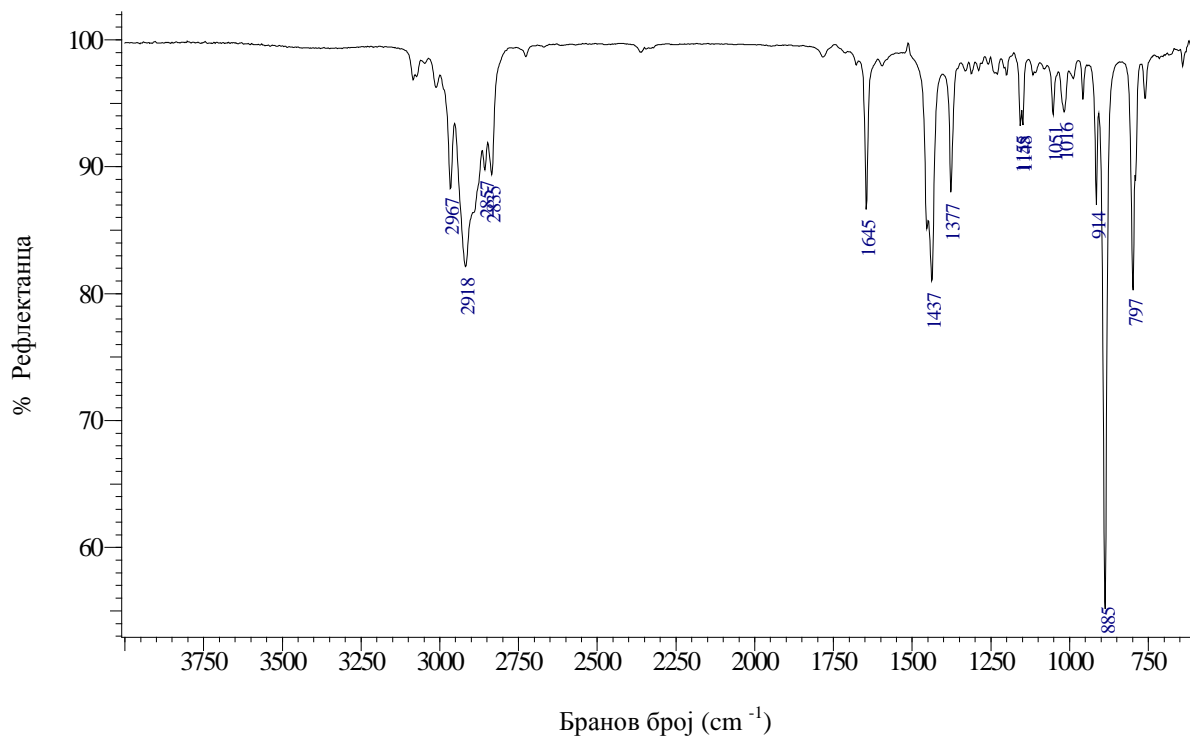
## 7.2 ИНФРАЦРВЕНИ СПЕКТРИ НА ЧИСТИ ГЛАВНИ КОМПОНЕНТИ ПРИСУТНИ ВО ЕТЕРИЧНО МАСЛО ОД АНАСОН И РЕПРЕЗЕНТАТИВНИ ПРИМЕРОЦИ ОД ИЗОЛИРАНИ ЕТЕРИЧНИ МАСЛА



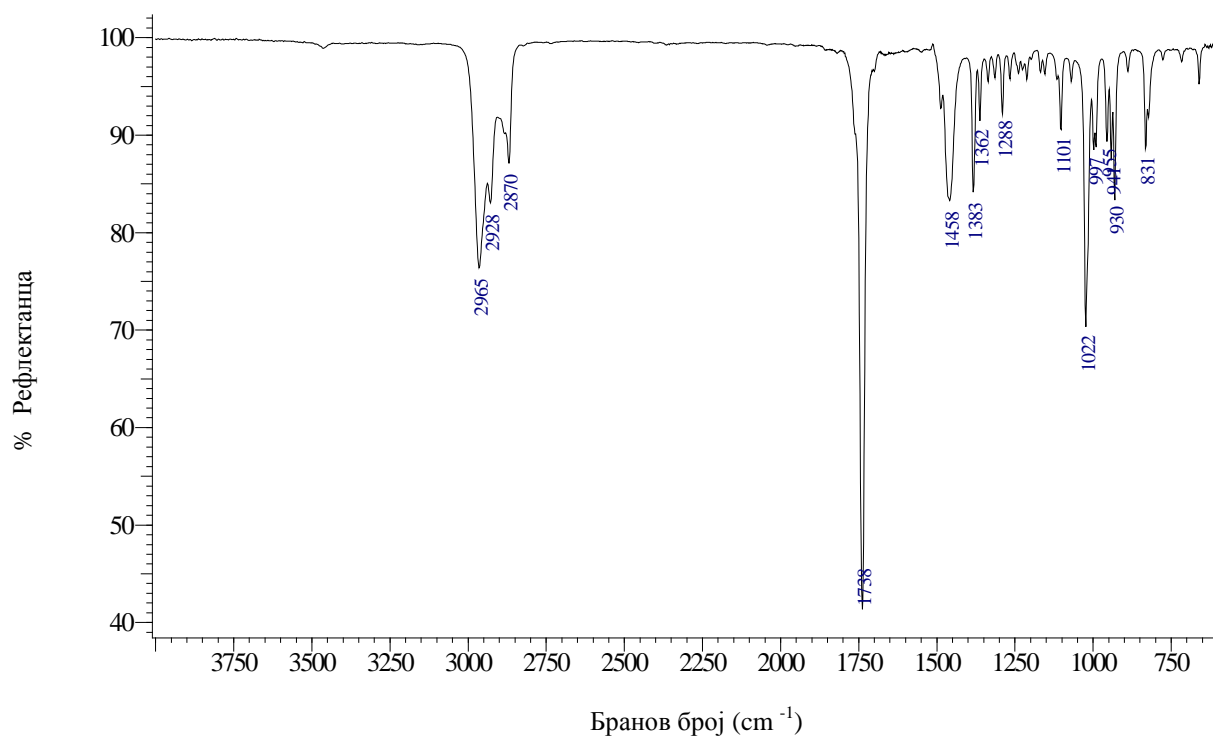
Слика 7.1. FTIR-ATR спектар на *trans*-анетол.



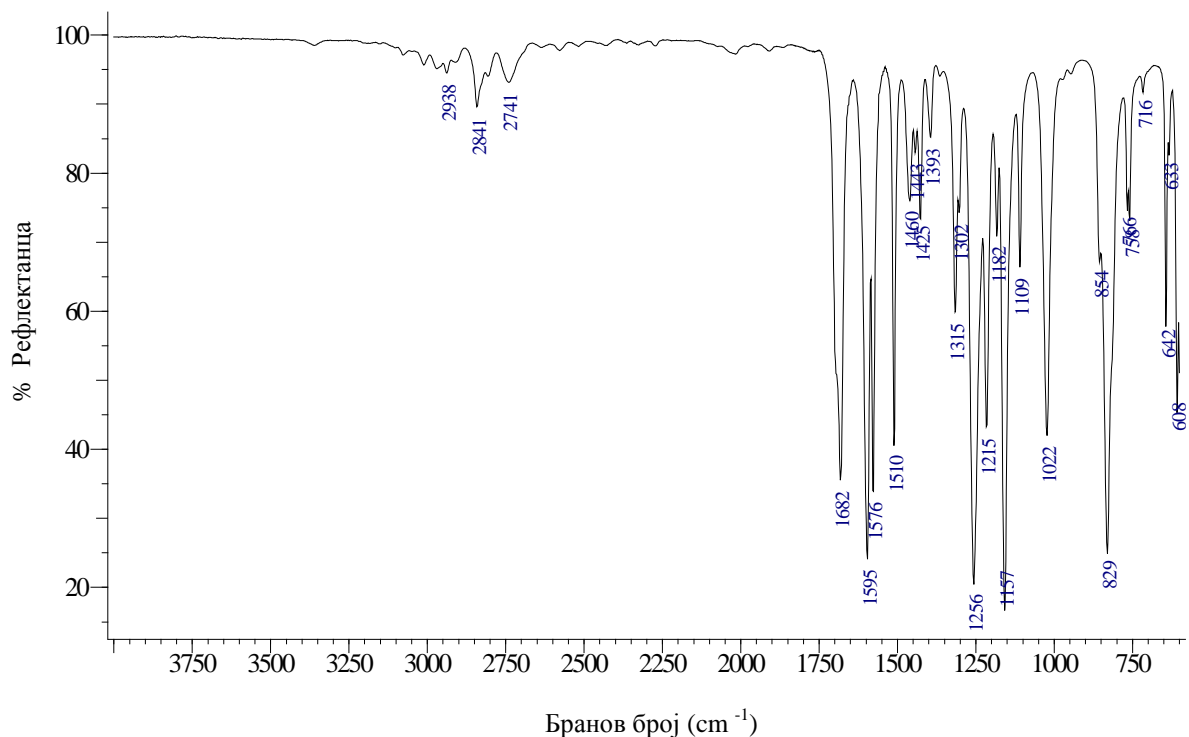
Слика 7.2. FTIR-ATR спектар на естрагол.



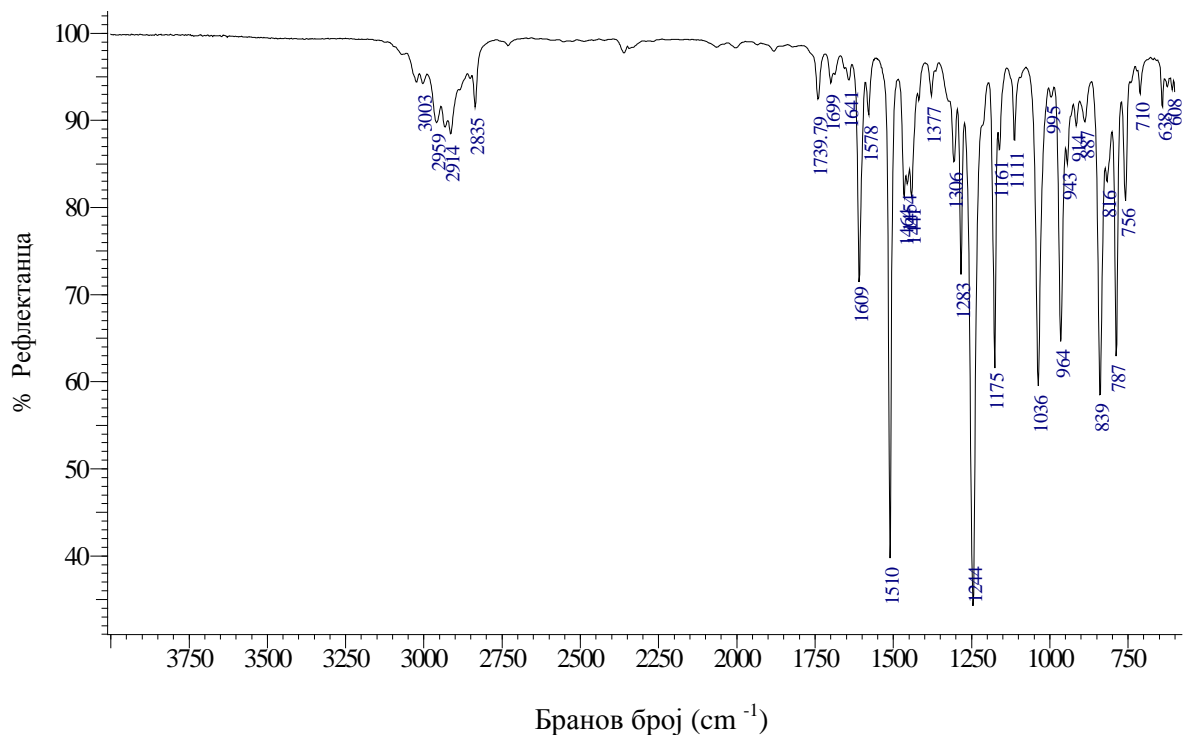
Слика 7.3. FTIR-ATR спектар на лимонен.



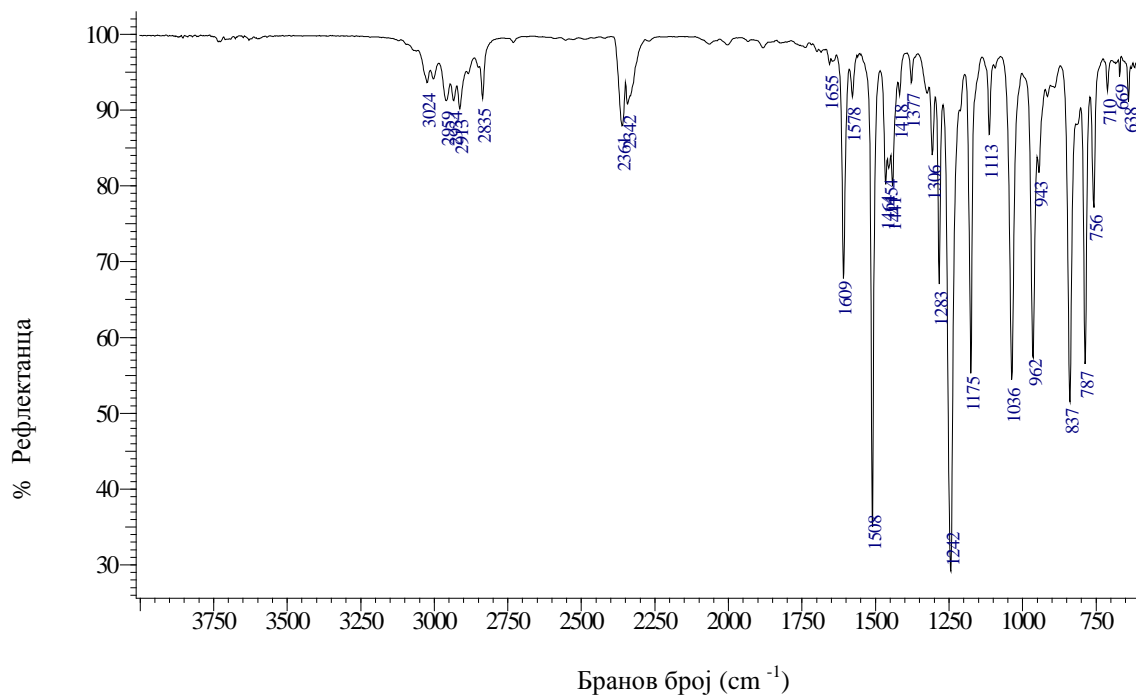
Слика 7.4. FTIR-ATR спектар на фенхон.



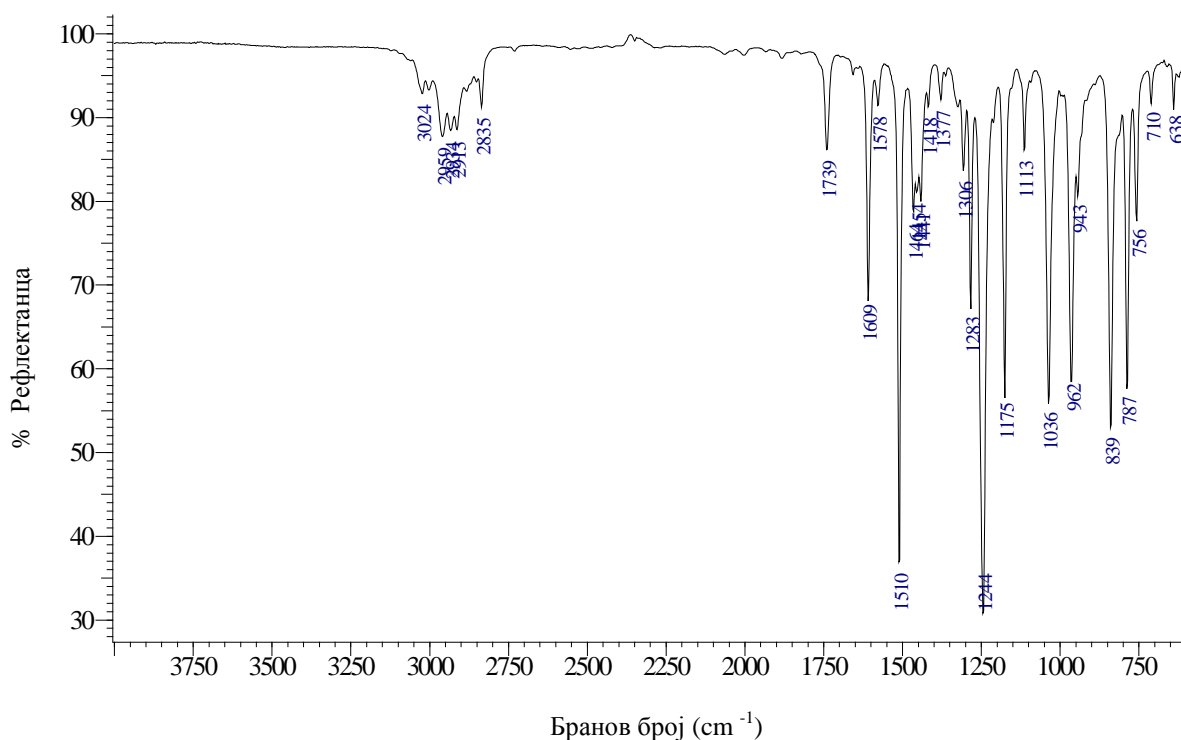
Слика 7.5. FTIR-ATR спектар на анисалдеhid.



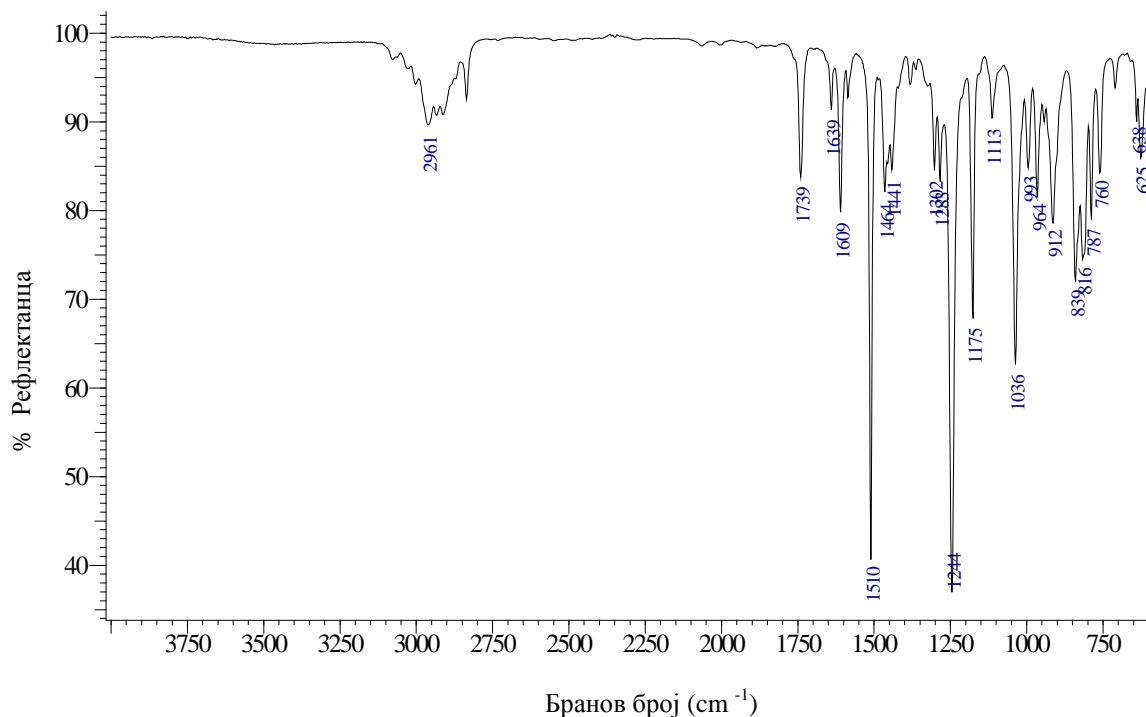
Слика 7.6. FTIR-ATR спектар на стандардна смеса (сурогатно етерично масло). Состав (m/m %): *trans*-анетол 64,6 %, естрагол 10,0 %, фенхон 5,0%, *p*-цимен 2,8 %, лимонен 10,0 %,  $\alpha$ -пинен 2,5 %,  $\beta$ -пинен-2,6 % и анисалдеhid 2,6 %.



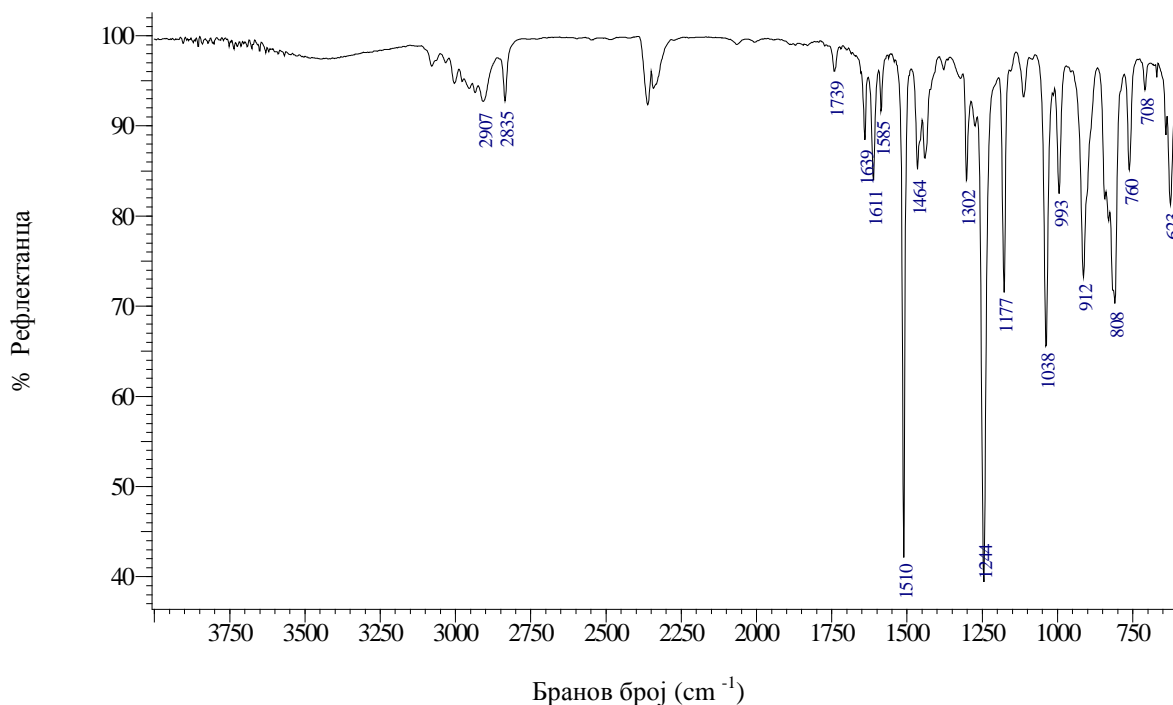
Слика 7.7. FTIR-ATR спектар на етерично масло од примерок **13UF** (*Foeniculum vulgare* Mill. subsp. *vulgare*, var. *dulce*) од с. Чашка, Велешко.



Слика 7.8. FTIR-ATR спектар на етерично масло од примерок **13WFF** (*Foeniculum vulgare* Mill. subsp. *vulgare*, var. *vulgare*) од Драчево, Скопје.



Слика 7.9. FTIR-ATR спектар на етерично масло од примерок **12WFF** (*Foeniculum vulgare* Mill. subsp. *vulgare*, var. *vulgare*) од Баба планина (Битолско).

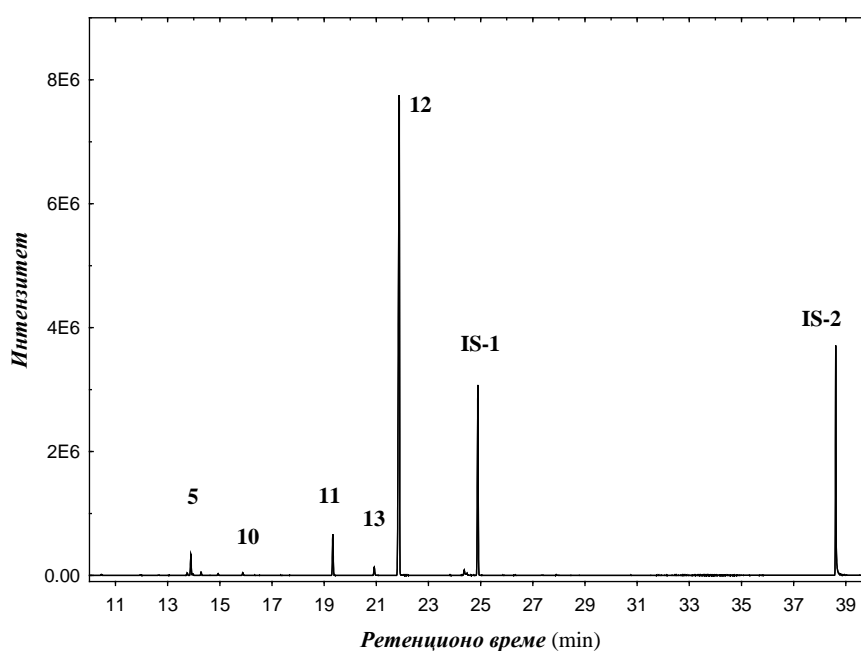


Слика 7.10. FTIR-ATR спектар на етерично масло од примерок **12FFA** (*Foeniculum vulgare* Mill. subsp. *vulgare*, var. *azoricum*) од Италија.

### 7.3. АНАЛИЗИРАНИ РЕПРЕЗЕНТАТИВНИ ПРИМЕРОЦИ ОД *F. VULGARE* MILL.

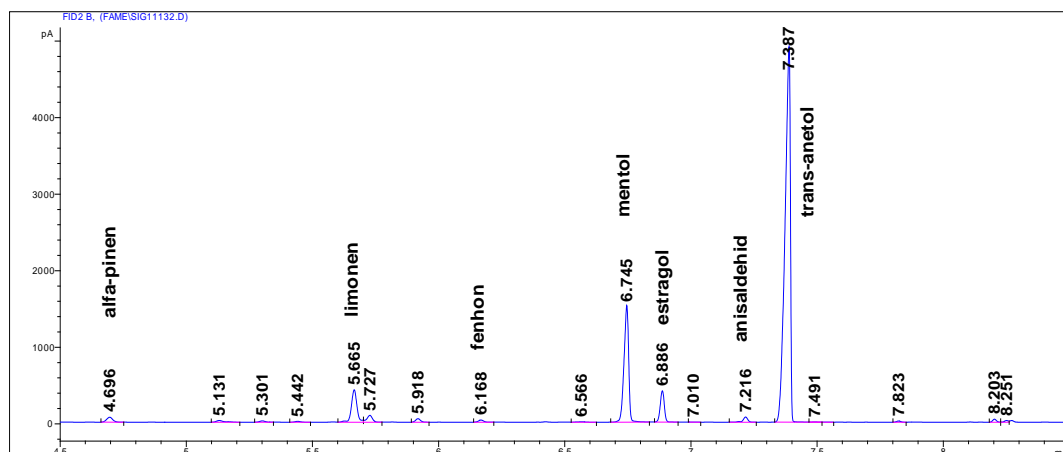
Бр.	Ознака на примерок	Вид/ Подвид/ вариетет	Потекло	Координати	Надморска височина (m)	(EM*) (принос mL/kg)	EM* $n_D^{20}$
3	12A2F	<i>F. vulgare</i> Mill. subsp. <i>vulgare</i> , var. <i>dulce</i>	с. Иванковци, Велешко	41°50'57.92"N 21°49'31.92"E	536	30	1,5513

\*EM-етерично масло.



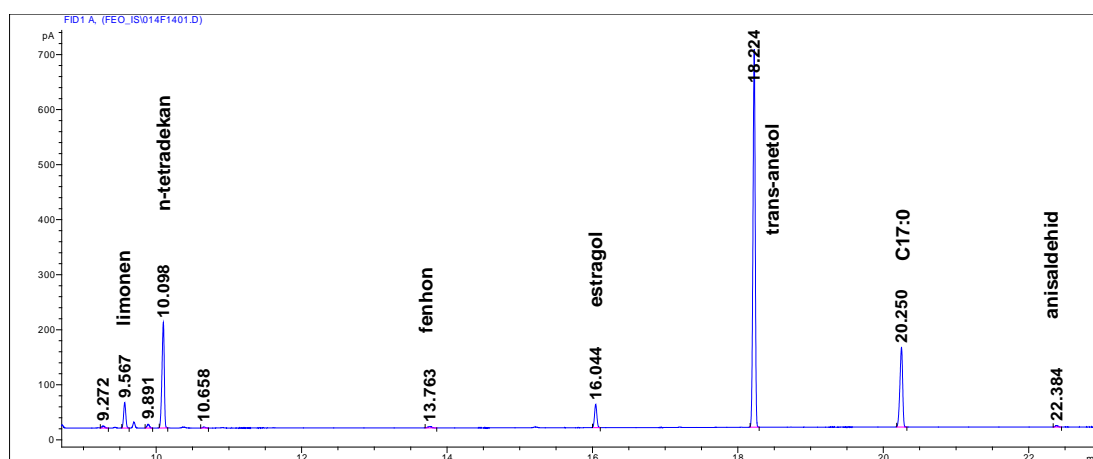
Слика 7.11а. GC-MS (колона HP-5MS) анализа на етерично масло од примерок 12A2F. Внатрешни стандарди: IS-1 [*n*-тетрадекан ( $n\text{-C}_{14}\text{H}_{30}$ )] и IS-2 [метил хептадеcanoат (17:0)].

	Соединение	$t_R$ (min)	Содржина (m/m %)
1	$\alpha$ -пинен	10,460	0,13
3	$\beta$ -феландрен	11,945	0,06
9	<i>p</i> -цимен	13,752	0,30
5	лимонен	13,889	2,77
8	1,8-цинеол	13,967	0,23
7	$\gamma$ -терпинен	14,281	0,43
6	<i>trans</i> -оцимен	14,935	0,23
10	фенхон	15,881	0,39
11	естрагол	19,332	5,41
13	анисалдехид	20,921	1,25
12	<b><i>trans</i>-анетол</b>	21,878	<b>87,85</b>
20	анискетон	24,373	0,95



Слика 7.11б. Директна SHS-GC-FID анализа на примерок 12A2F. Внатрешен стандард: ментол ( $t_R = 6,745$  min).

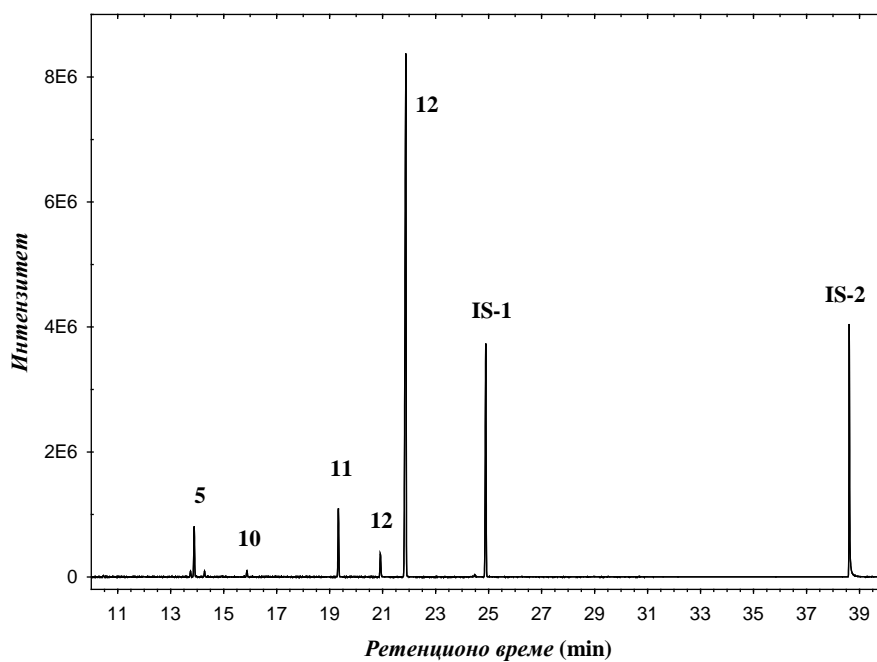
	Соединение	SHS-GC-FID $t_R$ (min)	SHS-GC-FID Содржина (m/m %)	GC-FID (EM) Содржина (m/m %)
1	$\alpha$ -пинен	4,696	1,23	0,58
3	$\beta$ -феландрен	5,131	0,53	0,24
4	мирцен	5,442	0,19	н.д.
5	лимонен	5,665	7,19	5,43
8	<i>trans</i> -оцимен	5,727	1,56	0,62
7	$\gamma$ -терпинен	5,918	0,68	0,37
10	фенхон	6,168	0,47	0,45
11	естрагол	6,886	5,16	5,38
13	анисалдехид	7,216	0,97	0,36
12	<i>trans</i> -анетол	7,387	<b>80,69</b>	<b>83,96</b>



Слика 7.11в. GC-FID (колона SP2560) анализа на етерично масло од примерок 12A2F. IS-1 [*n*-тетрадекан ( $n\text{-C}_{14}\text{H}_{30}$ )] и IS-2 [метил хептадеканоат (17:0)].

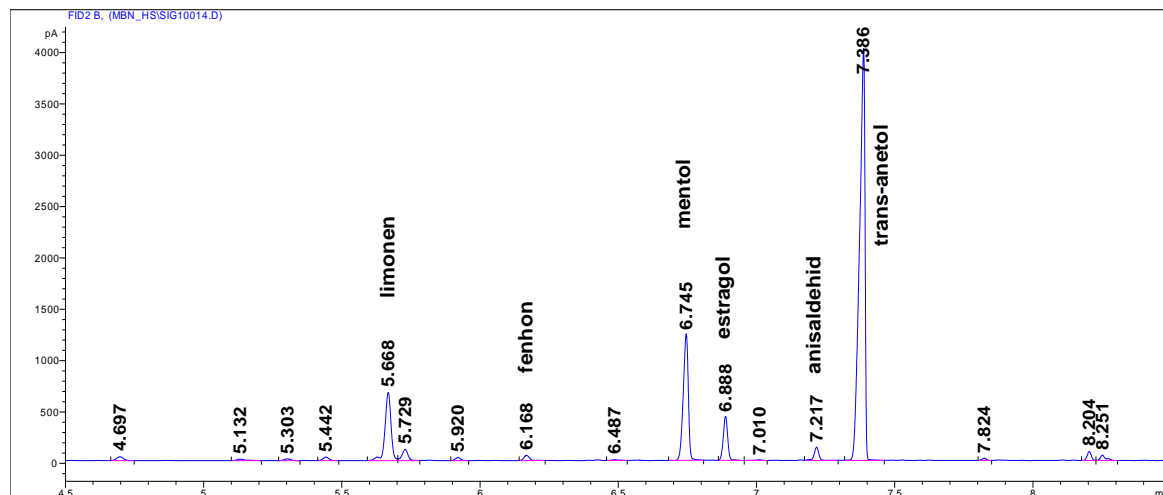
Бр.	Ознака на примерок	Вид/ Подвид/ вариетет	Потекло	Координати	Надморска височина (m)	(ЕМ*) (принос mL/kg)	ЕМ* $n_D^{20}$
7	12EF	<i>F. vulgare</i> Mill. subsp. <i>vulgare</i> , var. <i>dulce</i>	с. Конопиште, Кавадаречко	41°14' 55"N 22° 4' 41"E	718	22	1,5517

\*ЕМ-етерично масло.



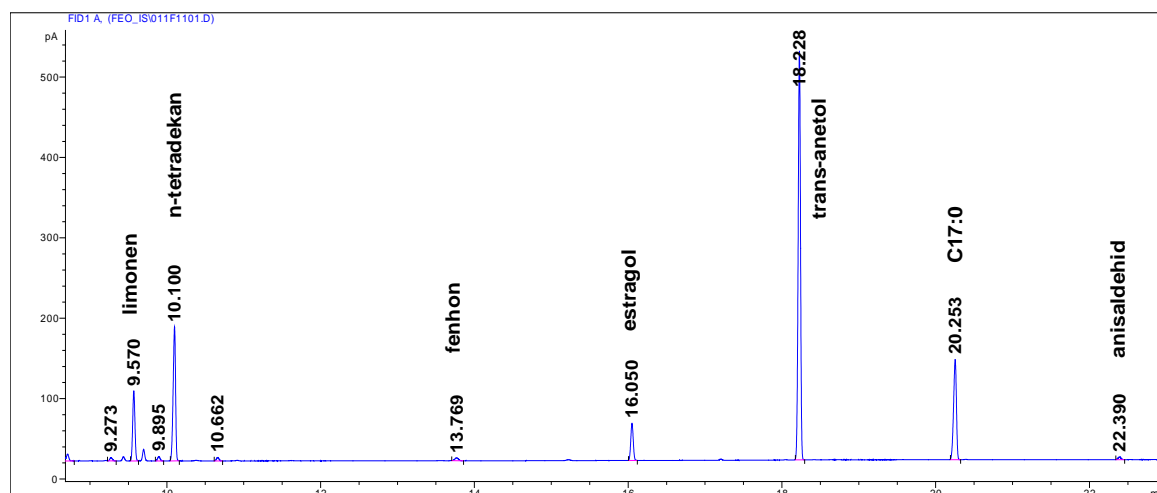
Слика 7.12а. Хроматограм добиен од GC-MS анализа (колона HP-5MS) на етерично масло од примерок 12EF. IS-1 [*n*-тетрадекан ( $n\text{-C}_{14}\text{H}_{30}$ )] и IS-2 [метил хептадеканоат (17:0)].

	Соединение	$t_R$ (min)	Содржина (m/m %)
1	$\alpha$ -пинен	10,460	0,16
9	<i>p</i> -цимен	13,749	0,67
5	лимонен	13,885	5,96
8	1,8-цинеол	13,963	0,10
7	$\gamma$ -терпинен	14,277	0,62
10	фенхон	15,877	0,77
11	естрагол	19,329	7,89
13	анисалдеhid	20,914	2,95
12	<b><i>trans</i>-анетол</b>	21,875	<b>80,56</b>
20	анискетон	24,476	0,31



Слика 7.12б. Директна SHS-GC-FID (колона HP-5) анализа на примерок 12EF. Внатрешен стандард: ментол ( $t_R = 6,745$  min).

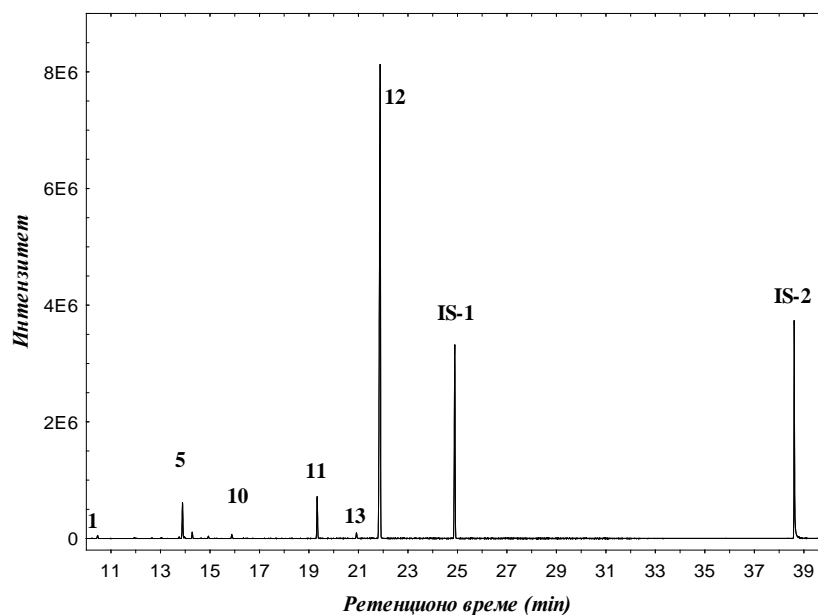
	Соединение	SHS-GC-FID $t_R$ (min)	SHS-GC-FID Содржина (m/m %)	GC-FID (EM) Содржина (m/m %)
1	$\alpha$ -пинен	4,697	0,81	0,52
3	$\beta$ -феландрен	5,131	0,38	0,45
4	мирцен	5,442	0,64	0,48
5	лимонен	5,665	12,85	12,21
6	<i>trans</i> -оцимен	5,729	2,07	1,90
7	$\gamma$ -терпинен	5,918	0,49	0,82
10	фенхон	6,168	0,94	0,81
11	естрагол	6,886	6,06	7,05
13	анисалдеhid	7,216	2,01	0,59
12	<i>trans</i> -анетол	7,387	71,02	73,56



Слика 7.12в. GC-FID (колона SP2560) анализа на етерично масло од примерок 12EF. Внатрешни стандарди: IS-1 [*n*-тетрадекан ( $n$ -C<sub>14</sub>H<sub>30</sub>)] и IS-2 [метил хептадеканоат (17:0)].

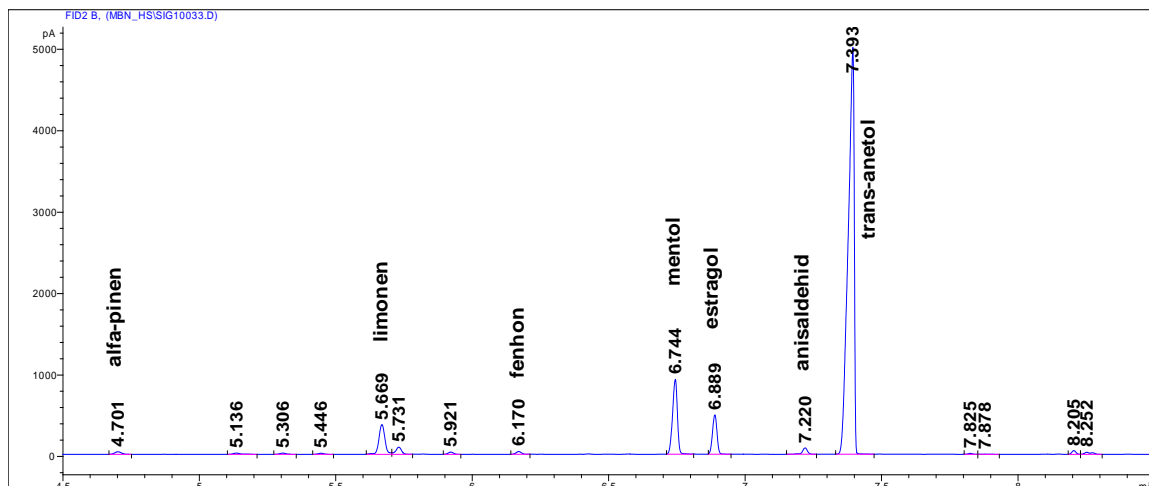
Бр.	Ознака на примерок	Вид/ Подвид/ вариетет	Потекло	Координати	Надморска височина (m)	(ЕМ*) (принос mL/kg)	ЕМ* $n_D^{20}$
26	13SF	<i>F. vulgare</i> Mill. ssp. <i>vulgare</i> , var. <i>dulce</i>	с. Тремник, Неготино	41°26'1.61"N 22° 9'26"E	225 m	34	1,5484

\*ЕМ-етерично масло.



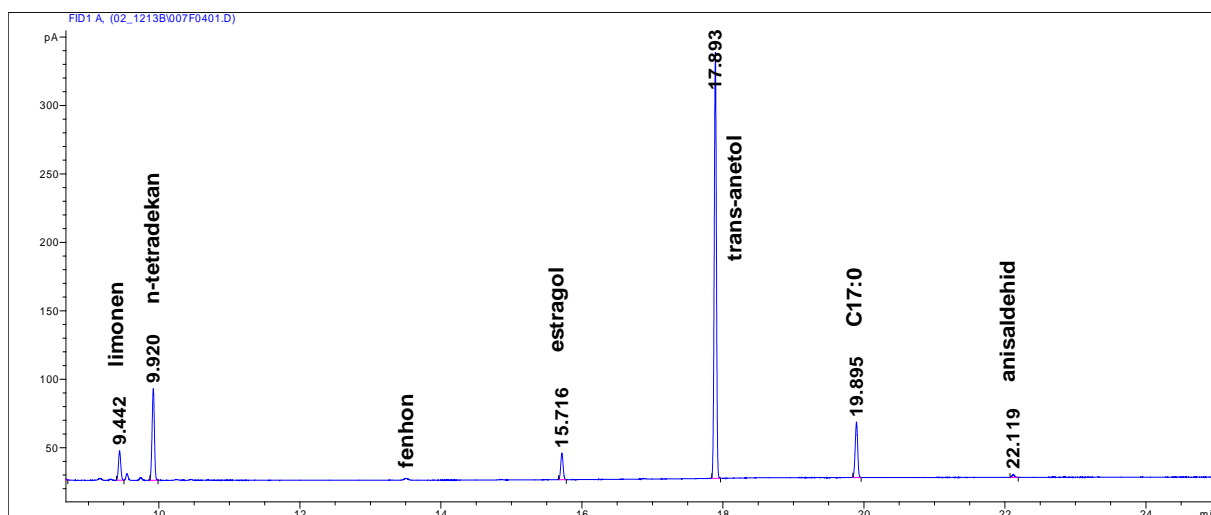
Слика 7.13а. Хроматограм добиен од GC-MS анализа (колона HP-5MS) на етерично масло од примерок 13SF. IS-1 [*n*-тетрадекан ( $n\text{-C}_{14}\text{H}_{30}$ )] и IS-2 [метил хептадеканоат (17:0)].

	Соединение	$t_R$ (min)	Содржина (m/m %)
1	$\alpha$ -пинен	10,460	0,43
3	$\beta$ -феландрен	11,945	0,13
9	<i>p</i> -цимен	13,752	0,20
5	лимонен	13,889	4,83
8	1,8-цинеол	13,967	0,23
7	$\gamma$ -терпинен	14,281	0,81
6	<i>trans</i> -оцимен	14,935	0,29
10	фенхон	15,881	0,59
11	естрагол	19,332	5,52
13	анисалдеhid	20,921	0,82
12	<b><i>trans</i>-анетол</b>	21,878	<b>85,88</b>
20	анискетон	24,373	0,04



Слика 7.136. Директна SHS-GC-FID (колона HP-5) анализа на примерок 13SF. Внатрешен стандард: ментол ( $t_R = 6,744$  min).

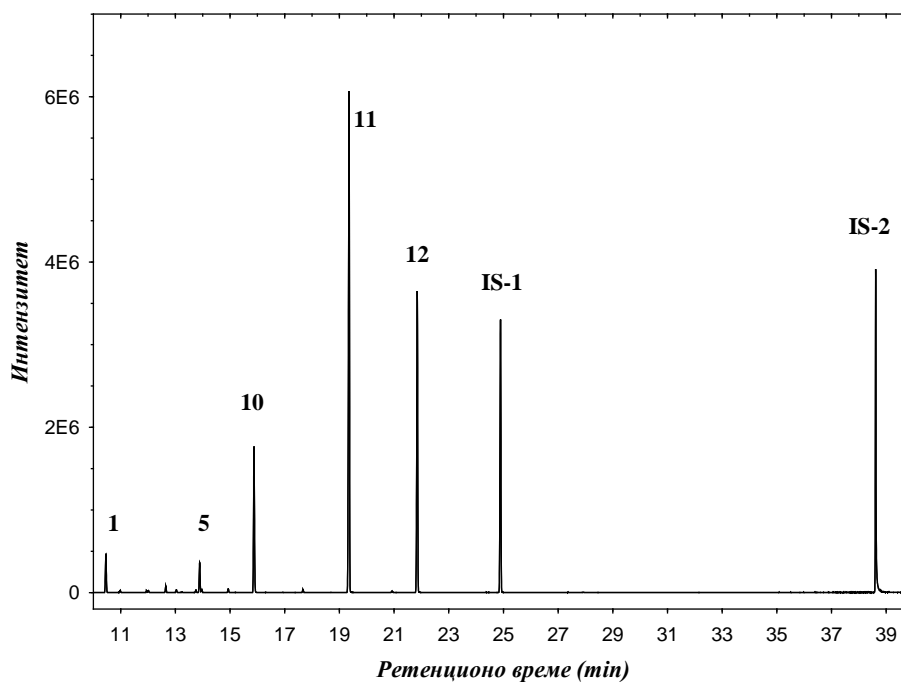
	Соединение	SHS-GC-FID $t_R$ (min)	SHS-GC-FID Содржина (m/m %)	GC-FID (EM) Содржина (m/m %)
1	$\alpha$ -пинен	4,701	0,57	0,41
3	$\beta$ -феландрен	5,136	0,32	0,45
5	лимонен	5,669	5,96	4,97
6	<i>trans</i> -оцимен	5,731	1,40	1,02
7	$\gamma$ -терпинен	5,921	0,39	0,50
10	фенхон	6,170	0,49	0,70
11	естрагол	6,889	5,89	5,87
13	анисалдеhid	7,220	1,06	0,73
12	<i>trans</i> -анетол	7,393	82,32	84,70



Слика 7.136. GC-FID (колона SP2560) анализа на етерично масло од примерок 13SF. IS-1 [*n*-тетрадекан ( $n\text{-C}_{14}\text{H}_{30}$ )] и IS-2 [метил хептадеканоат (17:0)].

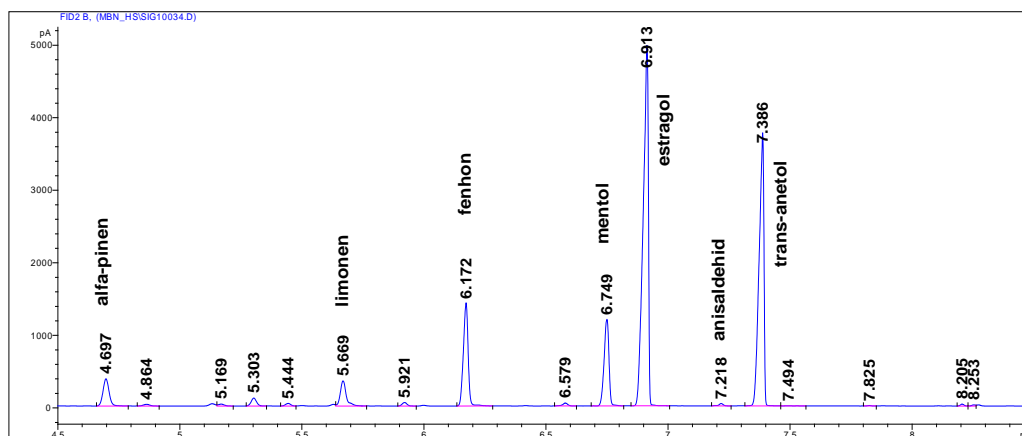
Бр.	Ознака на примерок	Вид/ Подвид/ вариетет	Потекло	Координати	Надморска височина (m)	(ЕМ*) (принос mL/kg)	ЕМ* $n_D^{20}$
31	12WFF	<i>F. vulgare</i> Mill. ssp. <i>vulgare</i> , var. <i>vulgare</i>	Баба пл., Битолско	41° 2'51"N 21° 16'42"E	740 m	55	1,5173

\*ЕМ-етерично масло.



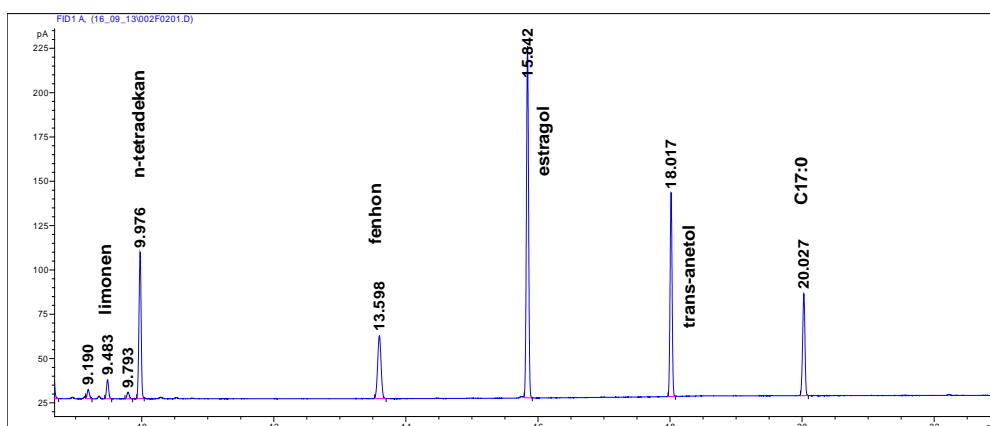
Слика 7.14а. Хроматограм добиен од GC-MS анализа (колона HP-5MS) на етерично масло од примерок 12WFF. IS-1 [*n*-тетрадекан ( $n\text{-C}_{14}\text{H}_{30}$ )] и IS-2 [метил хептадеканоат (17:0)].

	Соединение	$t_R$ (min)	Содржина (m/m %)
1	$\alpha$ -пинен	10,456	3,54
3	$\beta$ -феландрен	11,949	0,18
4	мирцен	12,648	0,56
9	<i>p</i> -цимен	13,749	0,26
5	лимонен	13,889	2,64
8	1,8-цинеол	13,959	0,30
7	$\gamma$ -терпинен	14,281	0,34
10	фенхон	15,874	13,41
74	камфор	17,669	0,18
11	<b>естрагол</b>	19,366	<b>49,51</b>
13	анисалдеhid	20,921	0,15
12	<b><i>trans</i>-анетол</b>	21,830	<b>28,14</b>



Слика 7.14б. Директна SHS-GC-FID (колони HP-5) анализа на примерок 12WFF. Внатрешен стандард: ментол ( $t_R = 6,749$  min).

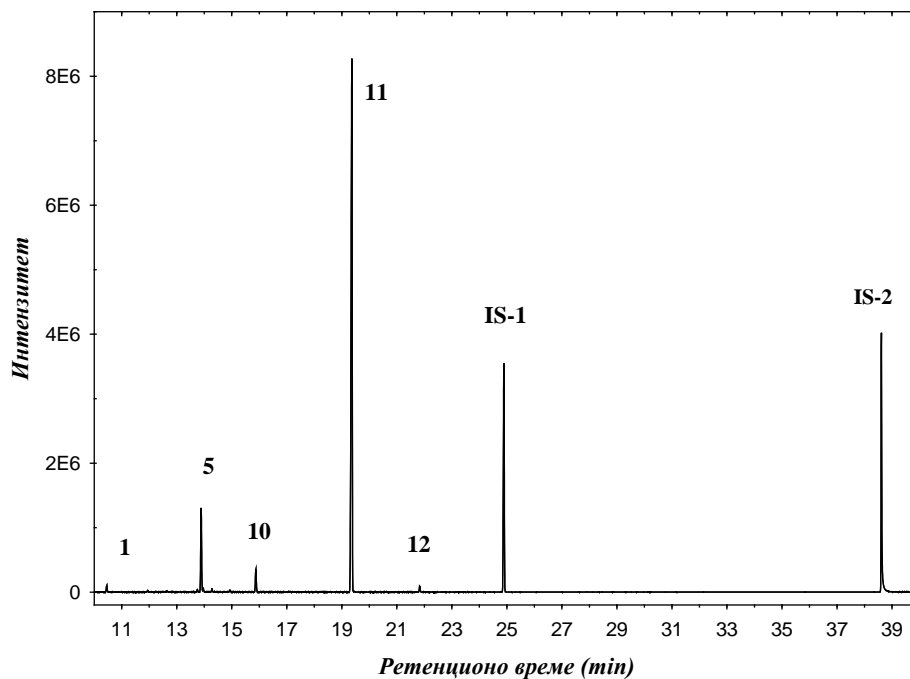
	Соединение	SHS-GC-FID $t_R$ (min)	SHS-GC-FID Содржина (m/m %)	GC-FID (EM) Содржина (m/m %)
1	$\alpha$ -пинен	4,697	3,99	2,21
3	$\beta$ -феландрен	5,132	0,32	0,84
2	$\beta$ -пинен	5,169	0,27	1,84
4	мирцен	5,444	0,33	0,28
9	<i>p</i> -цимен	5,629	0,17	0,09
5	лимонен	5,669	3,56	2,52
7	$\gamma$ -терпинен	5,921	0,41	0,87
10	фенхон	6,172	11,88	14,82
74	камфор	6,579	0,37	0,21
11	естрагол	6,913	45,28	51,40
13	анисалдеhid	7,218	0,25	0,17
12	<i>trans</i> -анетол	7,386	31,61	27,30



Слика 7.14 в. GC-FID (колони SP2560) анализа на етерично масло од примерок 12WFF. IS-1 [*n*-тетрадекан ( $n\text{-C}_{14}\text{H}_{30}$ )] и IS-2 [метил хептадеcanoат (17:0)].

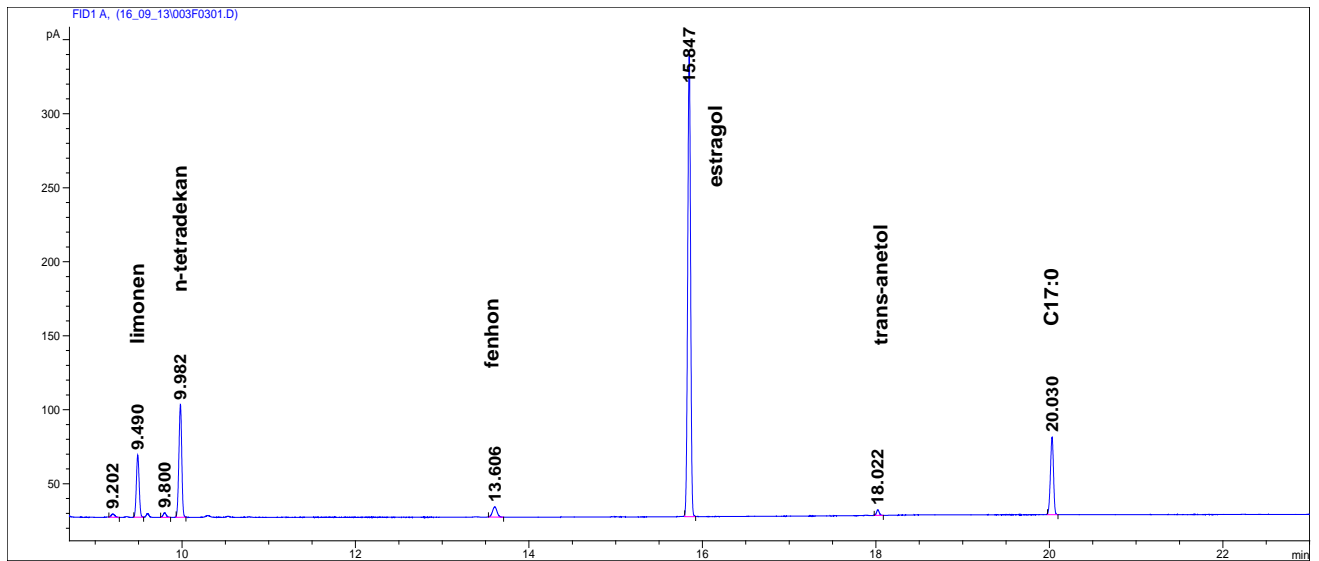
Бр.	Ознака на примерок	Вид/ Подвид/ вариетет	Потекло	Координати	Надморска височина (m)	(ЕМ*) (принос mL/kg)	ЕМ* $n_D^{20}$
32	12FFA	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill., subsp. <i>vulgare</i> var. <i>azoricum</i>	Италија	Непознати	Непозната	56	1,5171

\*ЕМ-етерично масло.



Слика 7.15а. Хроматограм добиен од GC-MS анализа (колони HP-5) на етерично масло од примерок 12FFA. IS-1 [*n*-тетрадекан ( $n\text{-C}_{14}\text{H}_{30}$ )] и IS-2 [метил хептадеканоат (17:0)].

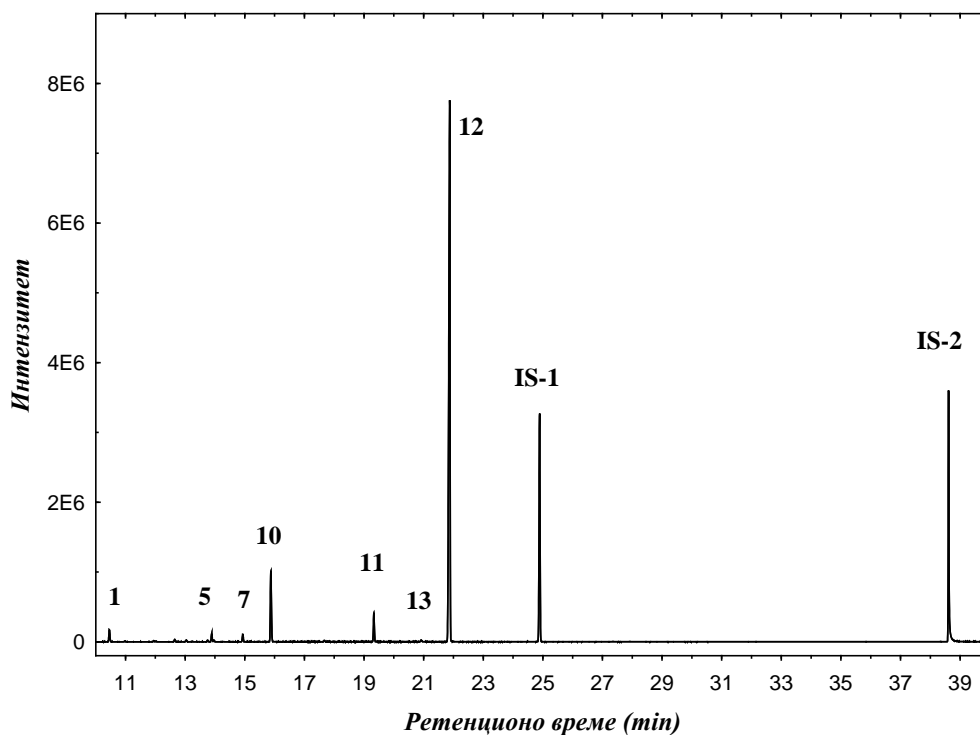
	Соединение	$t_R$ (min)	Содржина (m/m %)
1	$\alpha$ -пинен	10,456	0,84
3	$\beta$ -феландрен	11,945	0,21
4	мирцен	12,648	0,17
9	<i>p</i> -цимен	13,749	0,31
5	лимонен	13,889	10,39
8	1,8-цинеол	13,959	0,49
7	$\gamma$ -терпинен	14,281	0,40
6	<i>trans</i> -оцимен	14,935	0,25
10	фенхон	15,874	2,88
11	<b>естрагол</b>	19,366	<b>83,30</b>
12	<i>trans</i> -анетол	21,830	0,75



**Слика 7.15б.** GC-FID (колони SP2560) анализа на етерично масло од примерок **12FFA** (Италија). Хемиски состав: [соединение ( $t_R$ (min), застапеност ( $m/m$  %))]: *trans*-анетол (18,022 min, 0,91 %), **естрагол** (15,847 min, **82,73** %), фенхон (13,606 min, 2,88 %), лимонен (9,490 min 10,76 %),  $\alpha$ -пинен (8,694 min, 0,52 %). Внатрешни стандарди: *n*-тетрадекан ( $n$ -C<sub>14</sub>H<sub>30</sub>, 9,982 min) и метил хептадеканоат (17:0, 20,030 min).

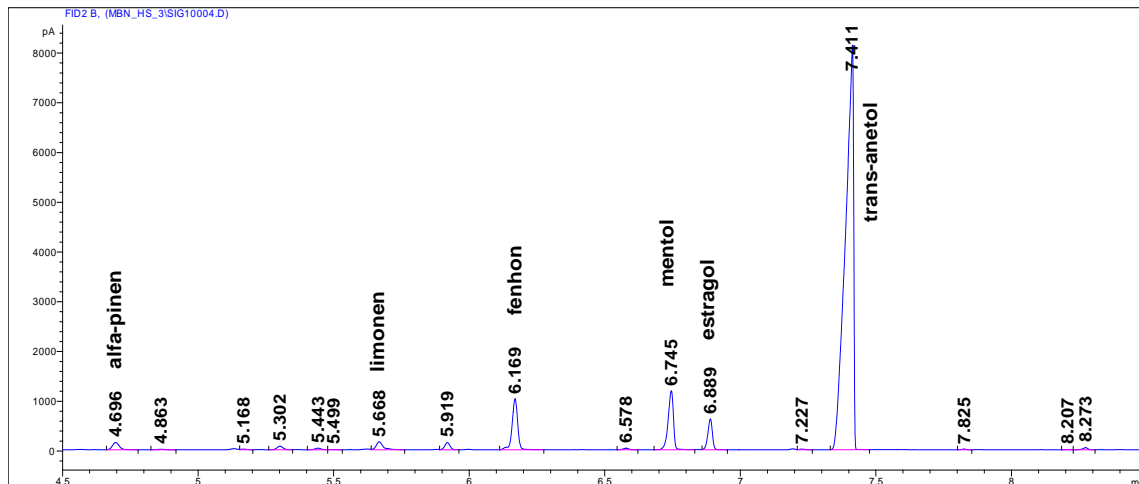
Бр.	Ознака на примерок	Вид/ Подвид/ вариетет	Потекло	Координати	Надморска височина (m)	(ЕМ*) (принос mL/kg)	ЕМ* $n_D^{20}$
35	13WFF	<i>F. vulgare</i> Mill. subsp. <i>vulgare</i> , var. <i>vulgare</i>	Драчево, Скопско	41°55'36" N 21°30'38" E	352 m	52	1,5437

\*ЕМ-етерично масло.



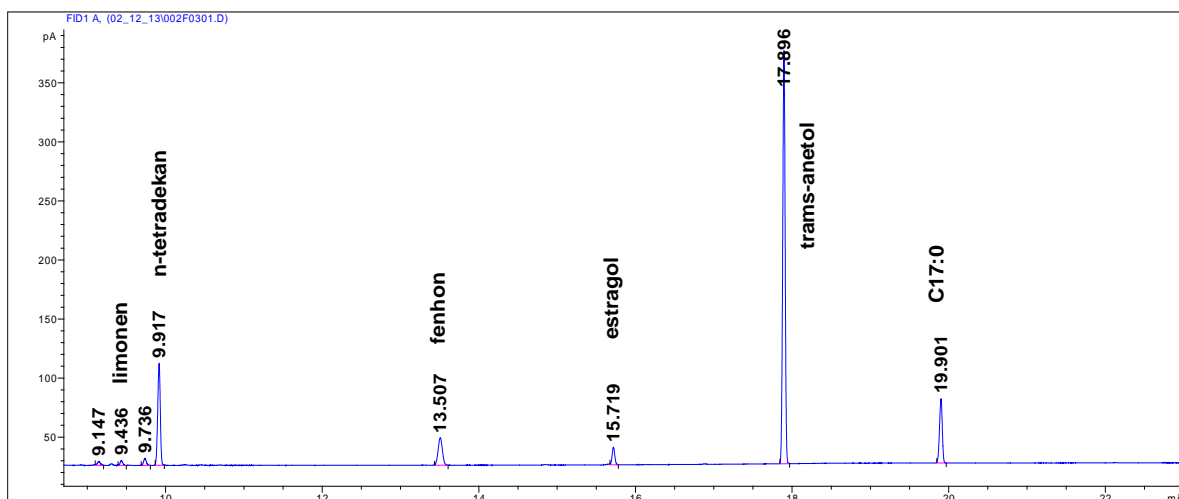
Слика 7.16а. GC-MS анализа (колона HP-5MS) на етерично масло од примерок 13WFF. IS-1 [*n*-тетрадекан (*n*-C<sub>14</sub>H<sub>30</sub>)] и IS-2 [метил хептадеcanoат (17:0)].

	Соединение	$t_R$ (min)	Содржина (m/m %)
1	$\alpha$ -пинен	10,456	1,46
3	$\beta$ -феландрен	11,949	0,11
4	мирцен	12,648	0,27
9	<i>p</i> -цимен	13,749	0,18
5	лимонен	13,889	0,96
8	1,8-цинеол	13,959	0,20
7	$\gamma$ -терпинен	14,281	0,88
10	фенхон	15,874	8,92
11	естрагол	19,366	3,30
13	анисалдехид	20,921	0,23
12	<i>trans</i> -анетол	21,830	<b>82,87</b>

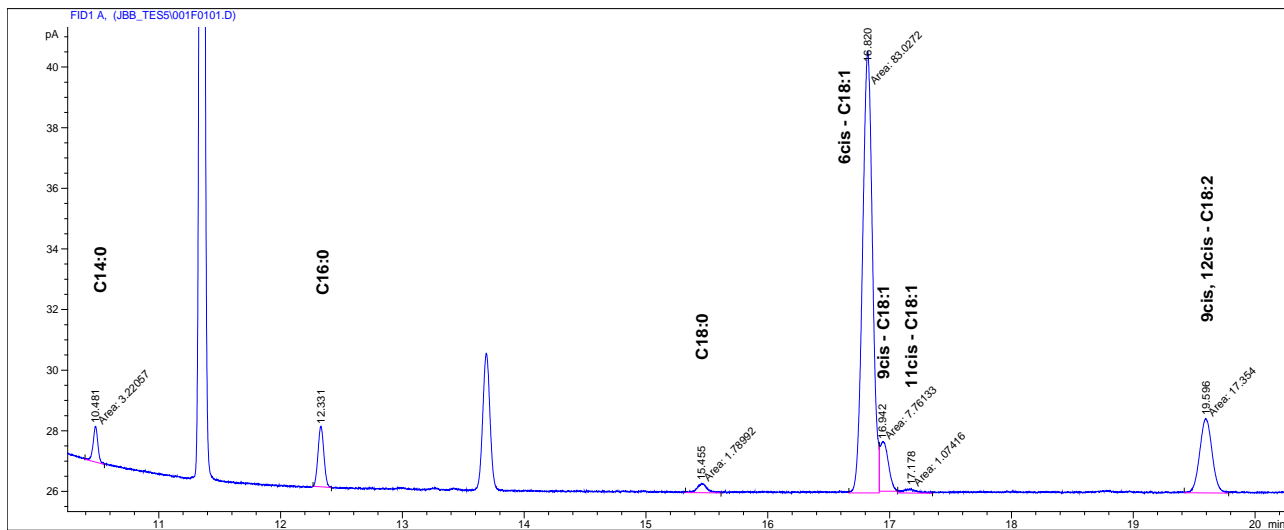


Слика 7.16б. Директна SHS-GC-FID (колона HP-5) анализа на примерок 13WFF.

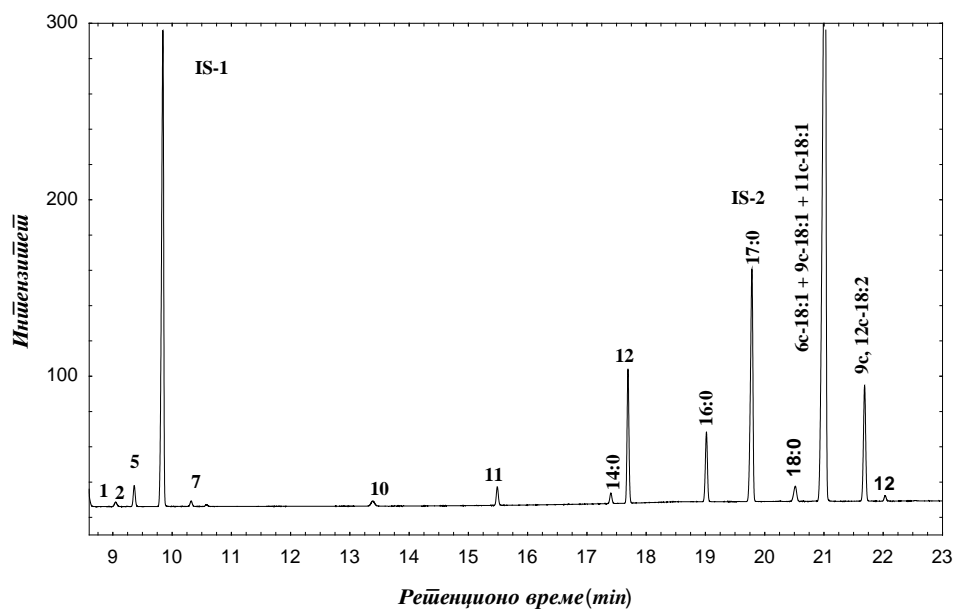
	Соединение	SHS-GC-FID $t_R$ (min)	SHS-GC-FID Содржина (m/m %)	GC-FID (EM) Содржина (m/m %)
1	$\alpha$ -пинен	4,696	1,25	0,70
3	$\beta$ -феландрен	5,132	0,17	0,48
4	мирцен	5,443	0,25	0,23
9	<i>p</i> -цимен	5,623	0,12	0,10
5	лимонен	5,668	1,40	0,84
7	$\gamma$ -терпинен	5,919	0,97	1,25
10	фенхон	6,169	7,18	9,69
74	камфор	6,578	0,22	0,11
11	естрагол	6,889	3,52	3,80
13	анисалдехид	7,227	0,09	0,13
12	<i>trans</i> -анетол	7,411	<b>83,81</b>	<b>82,40</b>



Слика 7.16в. GC-FID (колона SP2560) анализа на етерично масло од примерок 13WFF. IS-1 [*n*-тетрадекан ( $n\text{-C}_{14}\text{H}_{30}$ )] и IS-2 [метил хептадеканоат (17:0)].



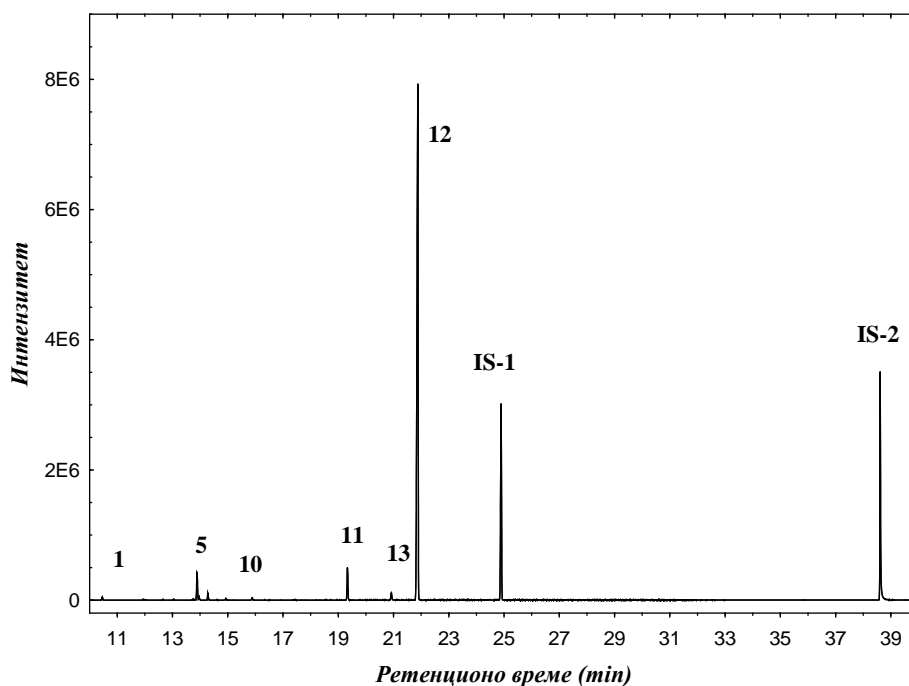
**Слика 7.16г.** GC-FID (колони SP2560) анализа на примерок **13WFF** после екстракција проследена со трансестерификација. Прикажани се само метил естерите на масните киселини и парцијалната сепарација на C18:1 дериватите. Хемиски состав: метил миристант (14:0, 0,77%), метил палмитат (16:0, 4,90 %), метил стеарат (18:0, 0,96 %), **метил петроселинат (6с-18:1, 71,6%)**, метил олеат (9с-18:1, 6,7%), метил ваценоат (11с-18:1, 0,92 %) метил линолеат (9с, 12с-18:2, 13,3%).



**Слика 7.16д.** Гасен хроматограм (GC-FID (колони SP2560) на стандардна смеса од компоненти од етерично масло, FAMES и внатрешни стандарди.

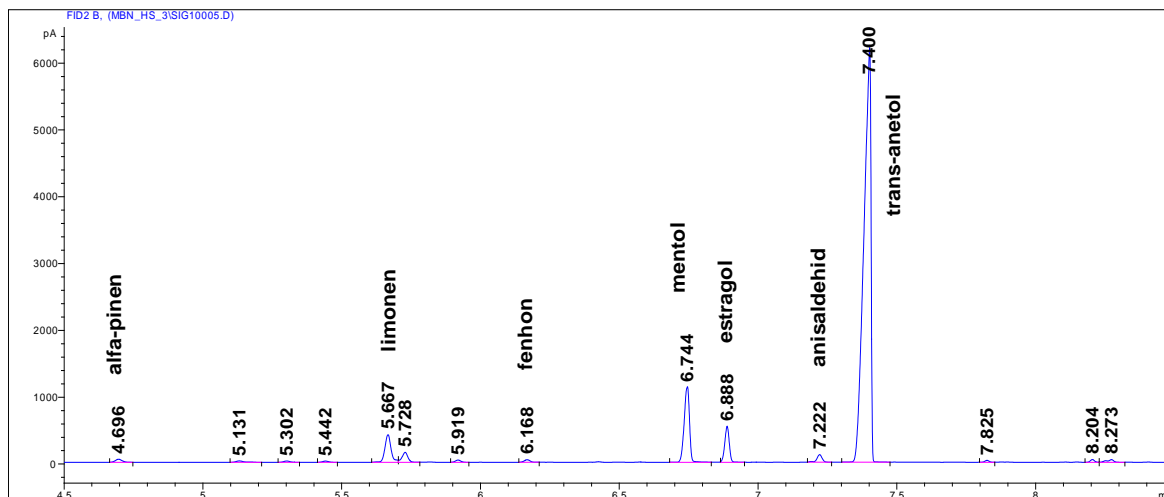
Бр.	Ознака на примерок	Вид/ Подвид/ вариетет	Потекло	Координати	Надморска височина (m)	(ЕМ*) (принос mL/kg)	ЕМ* $n_D^{20}$
36	13UF	<i>F. vulgare</i> Mill. subsp. <i>vulgare</i> , var. <i>dulce</i>	с. Чашка, Велешко	41°38'39"N 21°41'11"E	253 m	33	1,5502

\*ЕМ-етерично масло.



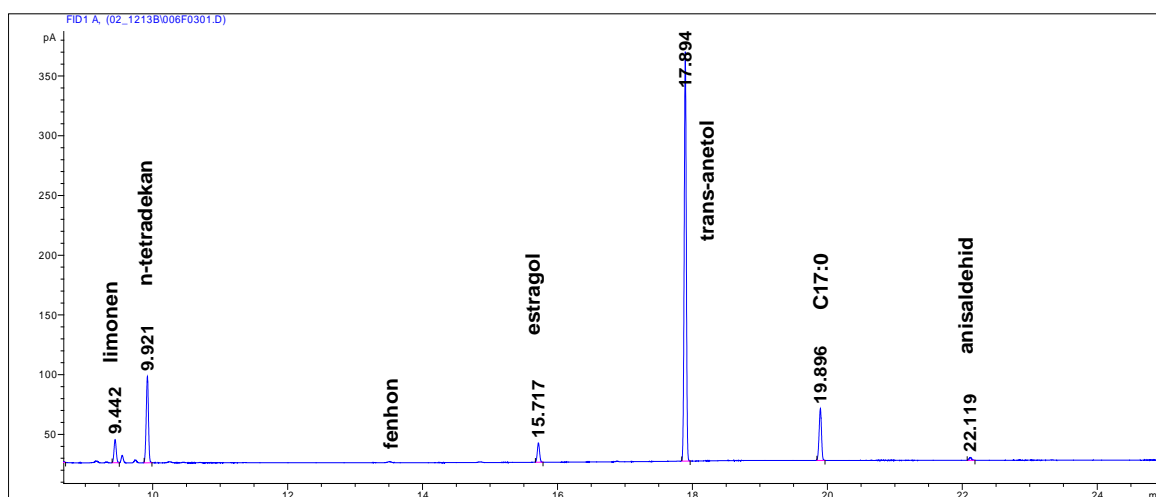
Слика 7.17а. GC-MS анализа (HP-5MS колона) на етерично масло од примерок 13UF. IS-1 [*n*-тетрадекан ( $n\text{-C}_{14}\text{H}_{30}$ )] и IS-2 [метил хептадеcanoат (17:0)].

	Соединение	$t_R$ (min)	Содржина (m/m %)
1	$\alpha$ -пинен	10,460	0,42
3	$\beta$ -феландрен	11,945	0,11
4	мирцен	12,651	0,06
9	<i>p</i> -цимен	13,752	0,15
5	лимонен	13,889	3,54
8	1,8-цинеол	13,967	0,35
6	<i>trans</i> -оцимен	14,285	0,85
7	$\gamma$ -терпинен	14,935	0,23
10	фенхон	15,881	0,34
11	естрагол	19,332	4,09
13	анисалдеhid	20,921	1,05
12	<b><i>trans</i>-анетол</b>	21,878	<b>88,59</b>
20	анискетон	24,373	0,09



Слика 7.176. Директна SHS-GC-FID (колони HP-5) анализа на примерок 13UF. Внатрешен стандард: ментол ( $t_R = 6,749$  min).

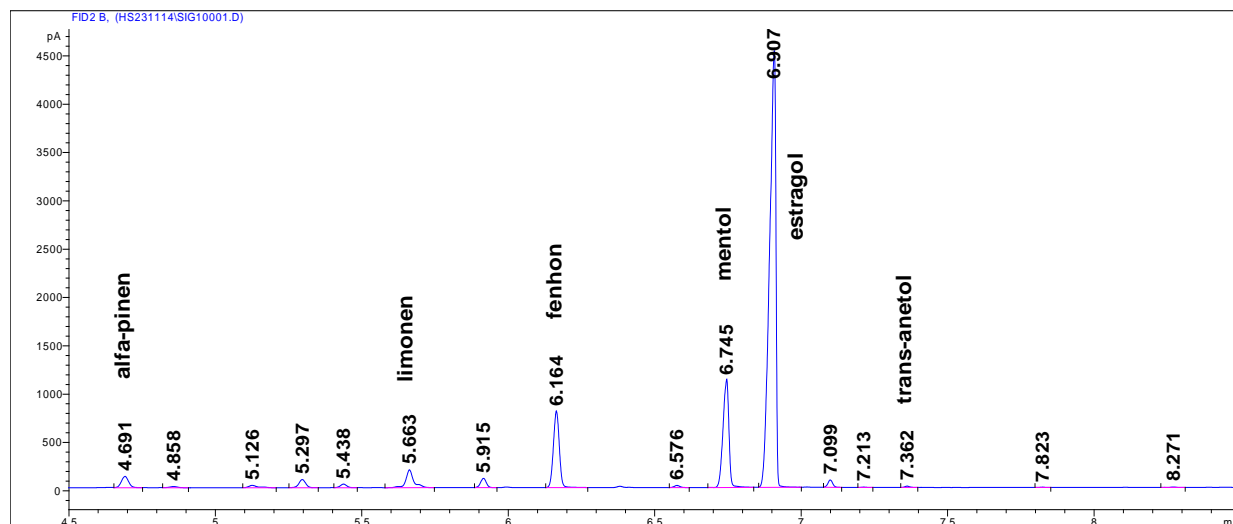
	Соединение	SHS-GC-FID $t_R$ (min)	SHS-GC-FID Содржина (m/m %)	GC-FID (EM) Содржина (m/m %)
1	$\alpha$ -пинен	4,696	0,59	0,38
3	$\beta$ -феландрен	5,131	0,34	0,42
4	мирцен	5,442	0,21	н.д.
5	лимонен	5,667	4,87	3,76
6	<i>trans</i> -оцимен	5,728	1,70	1,10
7	$\gamma$ -терпинен	5,919	0,35	0,47
10	фенхон	6,168	0,42	0,46
11	естрагол	6,888	4,61	4,47
13	анисалдеhid	7,222	1,16	0,90
12	<i>trans</i> -анетол	7,400	<b>84,44</b>	<b>87,40</b>



Слика 7.176. GC-FID (колони SP2560) анализа на етерично масло од примерок 13UF IS-1 [*n*-тетрадекан ( $n\text{-C}_{14}\text{H}_{30}$ )] и IS-2 [метил хептадеканоат (17:0)].

Бр.	Ознака на примерок	Вид/ Подвид/ вариетет	Потекло	Координати	Надморска височина (m)	(ЕМ*) (принос mL/kg)	ЕМ* $n_D^{20}$
40	1МВР	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill., subsp. <i>riperitum</i>	с. Богданци, Паљурци	41°12'39" N 22° 35'56" E	103 m	/	/

\*ЕМ-етерично масло.

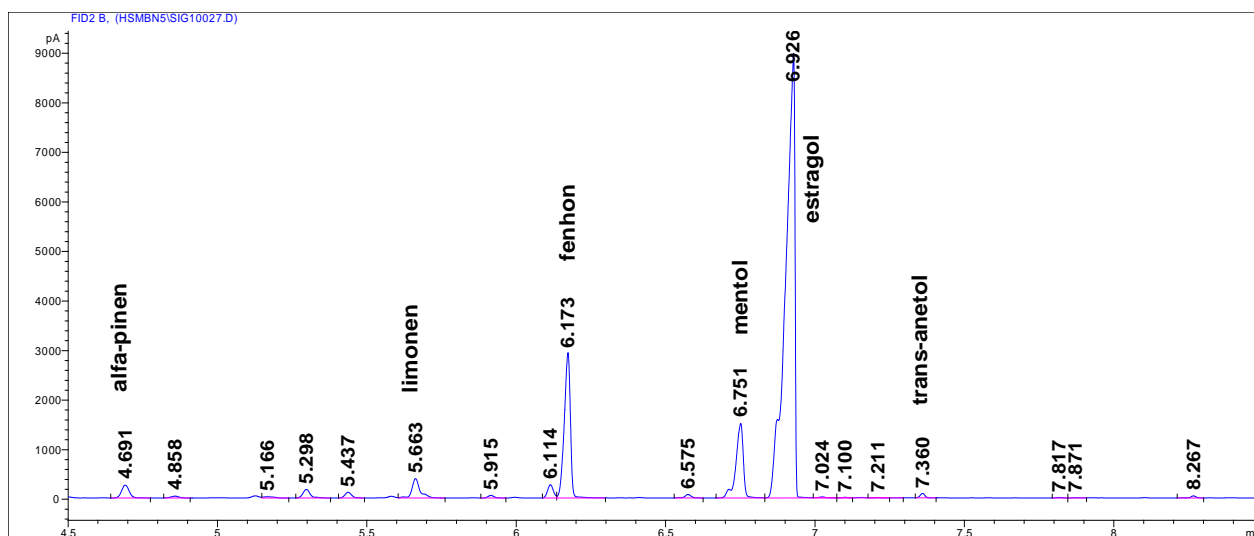


Слика 7.18. Директна SHS-GC-FID (колона HP-5) анализа на примерок 1МВР. Внатрешен стандард: ментол ( $t_R = 6,749$  min).

	Соединение	$t_R$ (min)	Содржина (m/m %)
1	$\alpha$ -пинен	4,702	2,23
2	$\beta$ -пинен	5,169	0,59
4	мирцен	5,442	0,62
9	<i>p</i> -цимен	5,630	н.д.
5	лимонен	5,668	3,75
7	$\gamma$ -терпинен	5,921	1,46
10	фенхон	6,164	12,37
74	камфор	6,578	0,33
11	естрагол	6,907	<b>75,46</b>
19	карвон	7,099	0,95
13	анисалдехид	7,213	0,03
12	<i>trans</i> -анетол	7,362	0,17
20	анискетон	7,823	0,03

Бр.	Ознака на примерок	Вид/ Подвид/ вариетет	Потекло	Координати	Надморска височина (m)	(ЕМ*) (принос mL/kg)	ЕМ* $n_D^{20}$
47	15WFF	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill., subsp. /	Канео, Охрид	41°06'40" N 20° 47'21" E	710 m	/	/

\*ЕМ-естерично масло.

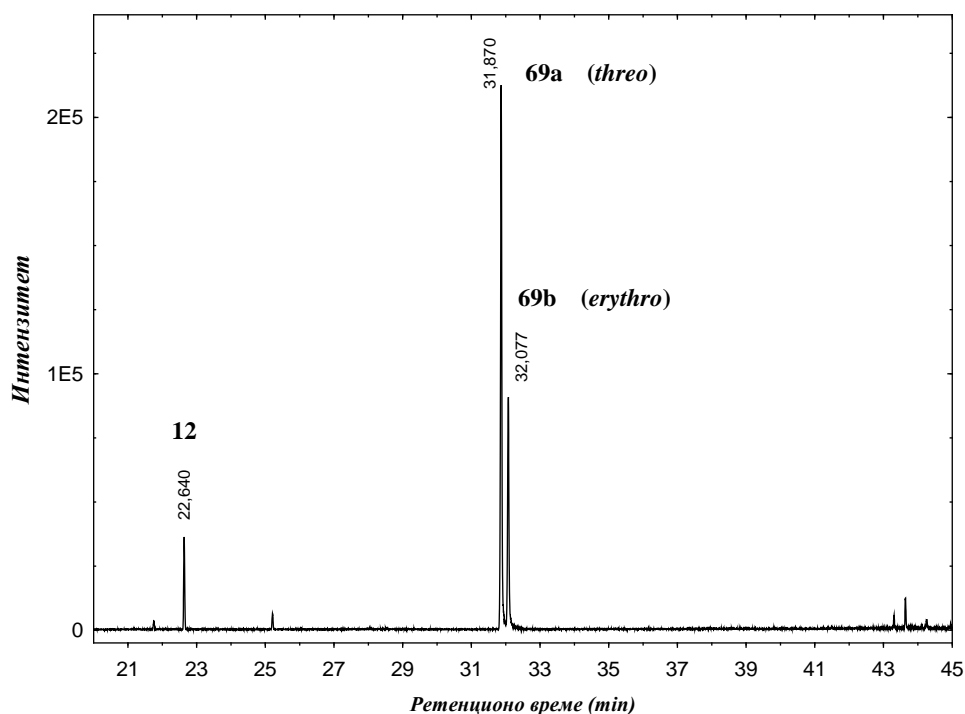
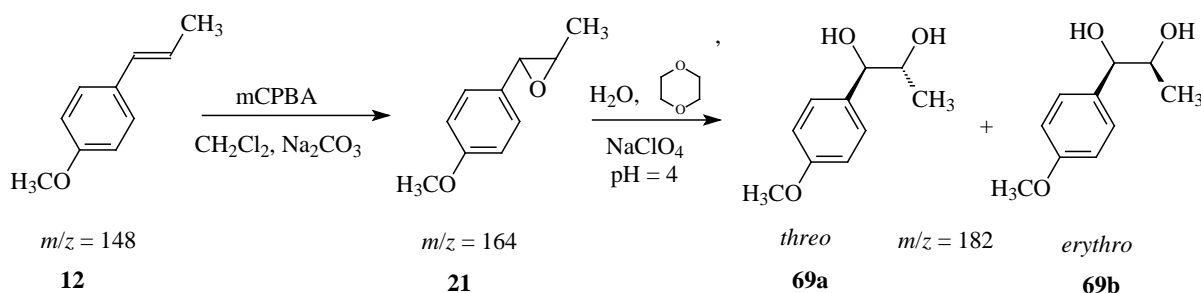


Слика 7.19. Директна SHS-GC-FID (колона HP-5) анализа на примерок 15WFF (Канео, Охрид). Внатрешен стандард: ментол ( $t_R = 6,749$  min).

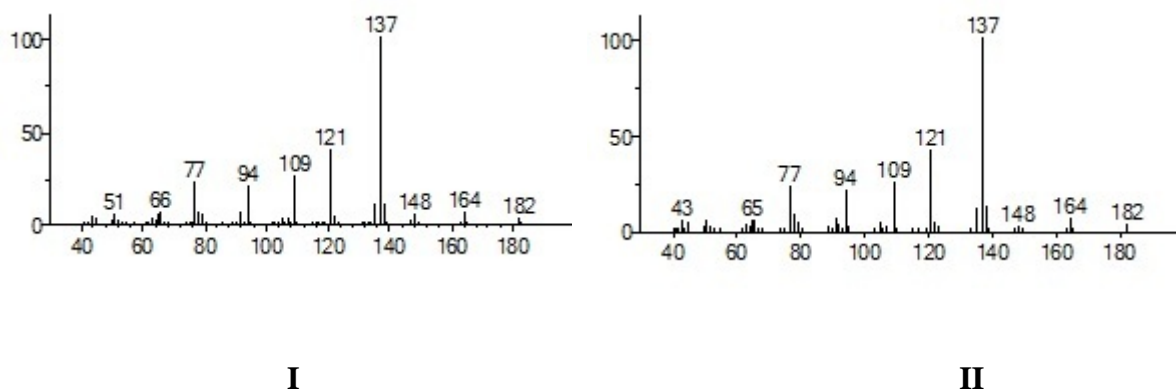
	Соединение	$t_R$ (min)	Содржина (m/m %)
1	$\alpha$ -пинен	4,702	1,74
3	$\beta$ -феландрен	5,140	0,27
2	$\beta$ -пинен	5,169	0,23
4	мирцен	5,442	0,67
9	<i>p</i> -цимен	5,630	0,21
5	лимонен	5,668	2,77
7	$\gamma$ -терпинен	5,921	0,28
10	фенхон	6,164	15,95
74	камфор	6,578	0,39
11	естрагол	6,907	<b>73,73</b>
13	анисалдехид	7,213	0,04
12	<i>trans</i> -анетол	7,362	0,38

## 7.4. СИНТЕТИЗИРАНИ СОЕДИНЕНИЈА ЗА ПОТВРДА НА ИДЕНТИТЕТОТ НА СЕКУНДАРНИТЕ ПРОДУКТИ

7.4.1. Подготовка на смеса од *threo/erythro*-1-(4-метоксифенил)-1,2-дихидрокси пропан (Carteau et al., 2007).



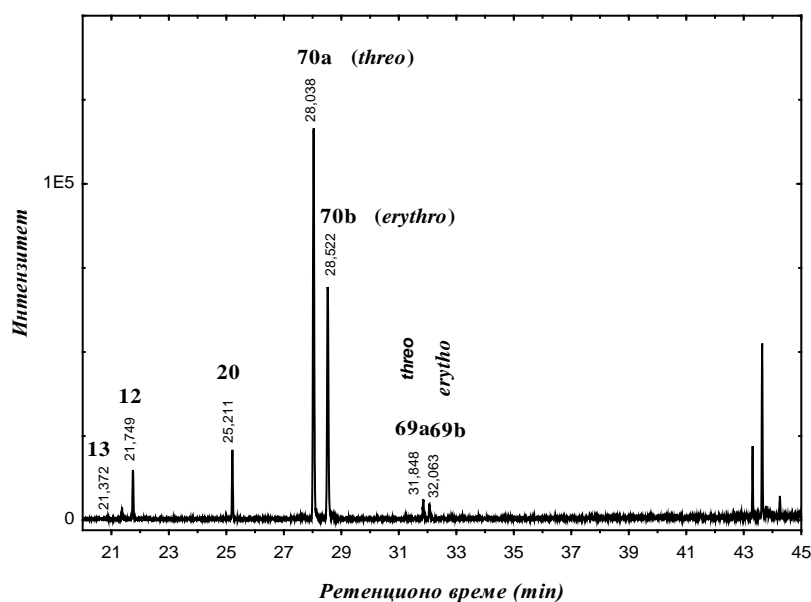
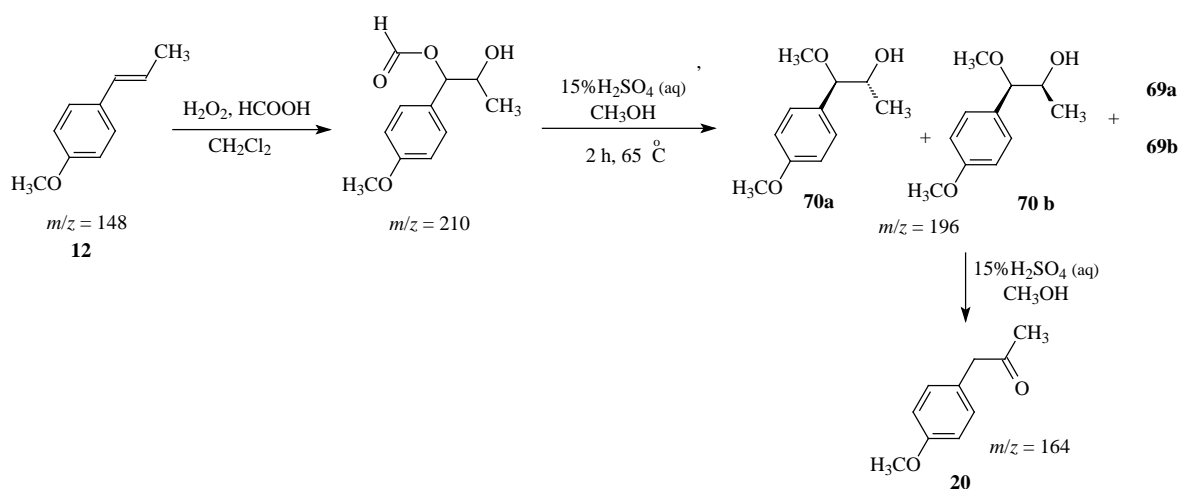
**Слика 7.20a.** GC-MS анализа на продукти добиени од реакција на епоксидација на *trans*-анетол, проследена со отворање на епоксидниот прстен со вода под слабо кисели услови. Како доминантни продукти се добиваат *threo*-1-(4-метоксифенил)-1,2-дихидроксипропан ( $t_R=31,870$  min) и *erythro*-1-(4-метоксифенил)-1,2-дихидроксипропан ( $t_R=32,077$  min).



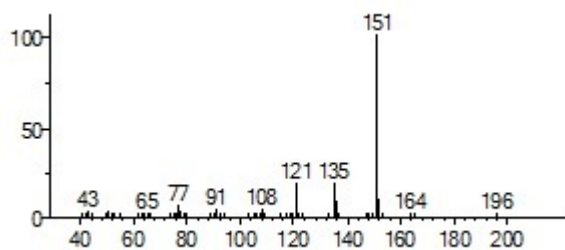
**Слика 7.20б.** I) Масен спектар добиен со електронска јонизација на *threo*-1-(4-метоксифенил)-1,2-дихидроксипропан (**69a**,  $t_R=31,870$  min) и II) масен спектар добиен со електронска јонизација на *erythro*-1-(4-метоксифенил)-1,2-дихидроксипропан (**69b**,  $t_R=32,077$  min).

### 7.4.2. Подготовка на смеса од *threo/erythro*-1-метокси-1-(4-метоксифенил)пропан-2-ол (Waumans et al., 2003)

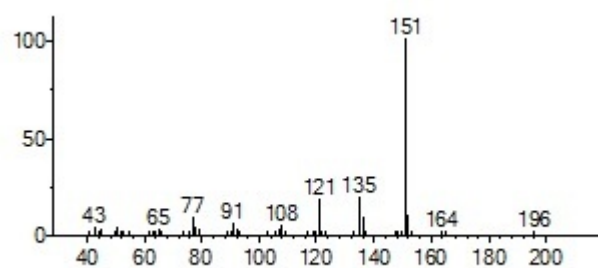
А) При оксидација на *trans*-анетол со водород пероксид во присуство на мравска киселина се добива  $\beta$ -хидрокси естер ( $m/z$  210) кој потоа беше третиран со воден раствор на сулфурна киселина во присуство на метанол. При парцијална конверзија се добива смеса од *threo/erythro*-1-метокси-1-(4-метоксифенил)пропан-2-ол ( $t_R=28,038$  min, 28,522 min), траги од *threo*-1,2-дихидрокси-1-(4-метоксифенил)пропан ( $t_R=31,848$  min), *erythro*-1,2-дихидрокси-1-(4-метоксифенил)пропан ( $t_R=32,063$  min) и анисетон ( $t_R=25,211$  min).



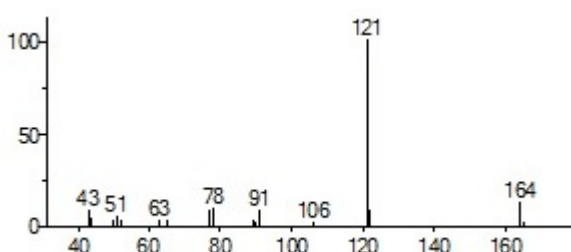
Слика 7.21a. GC-MS анализа на продукти добиени од реакција на анетол со водород пероксид и мравска киселина, проследено со третман со смеса од 15%  $H_2SO_4$  и метанол (Waumans 2003).



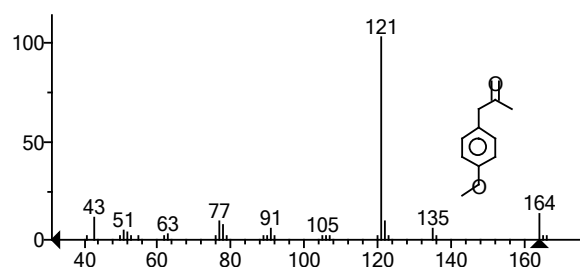
I



II



III



IV

Слика 7.21б. Масени спектри добиени со електронска јонизација на:

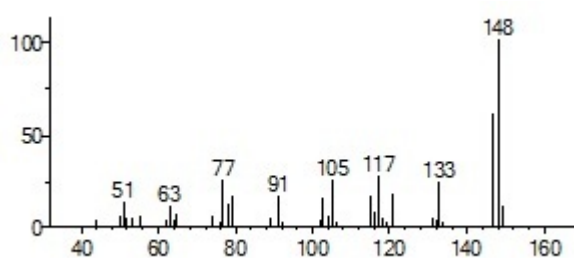
I) *threo*-1-метокси-1-(4-метоксифенил)пропан-2-ол, (**70a**,  $t_R=28,038$  min.)

II) *erythro*-1-метокси-1-(4-метоксифенил)пропан-2-ол (**70b**,  $t_R=28,522$  min.).

III) експериментално добиен масен спектар на анисетон (**20**,  $t_R=25,211$  min.).

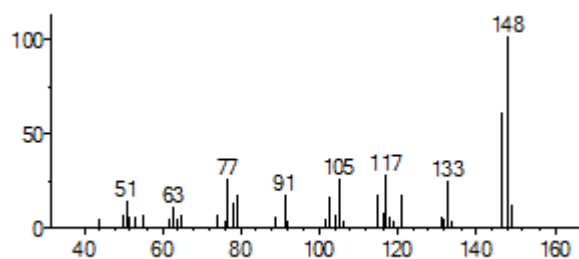
IV) масен спектар на анисетон од NIST 2011 база на спектри.





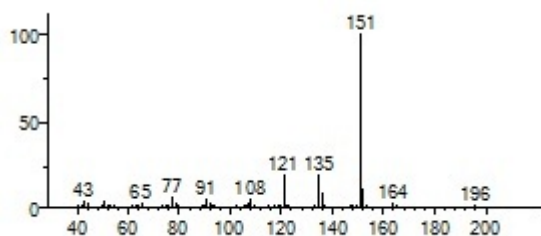
**22**

*cis*-анетол



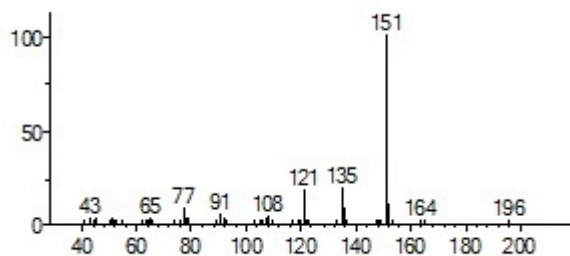
**12**

*trans*-анетол



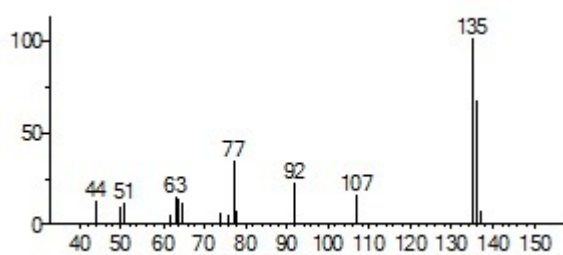
**70a**

*threo*-1-метокси-1-(4-метоксифенил)пропан-2-ол



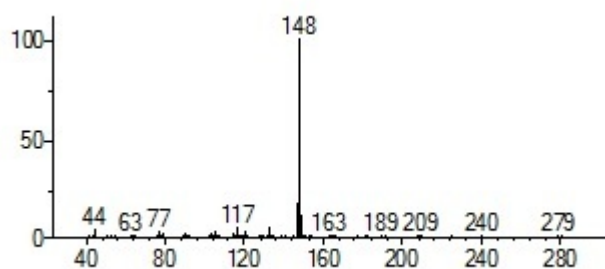
**70b**

*erythro*-1-метокси-1-(4-метоксифенил)пропан-2-ол



**13**

анисалдехид

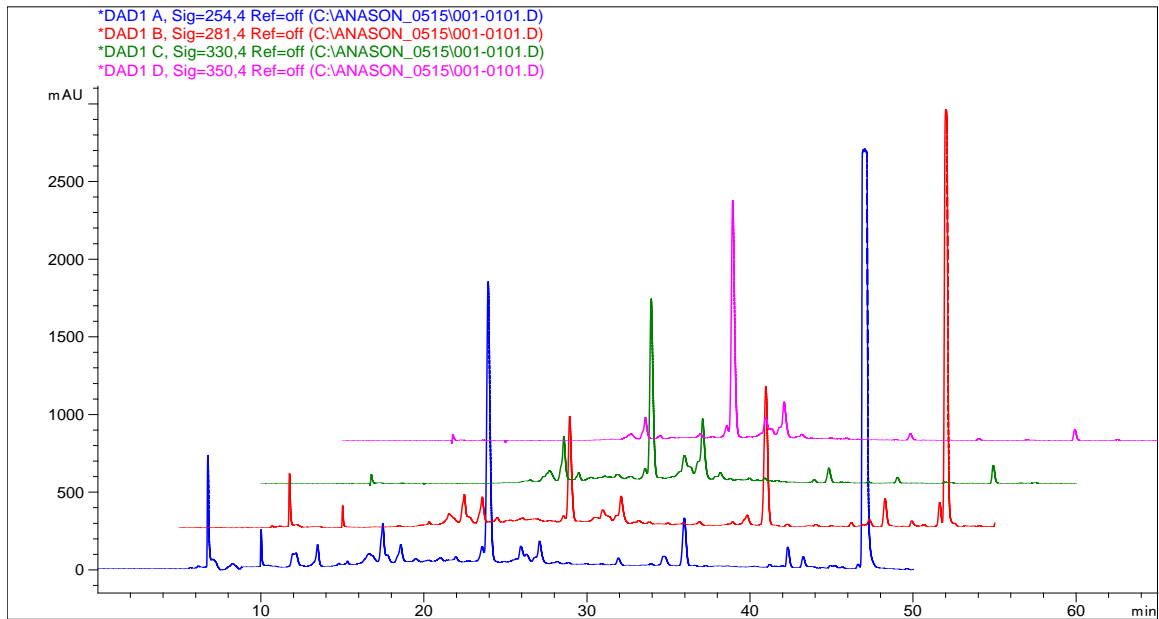


**23a**

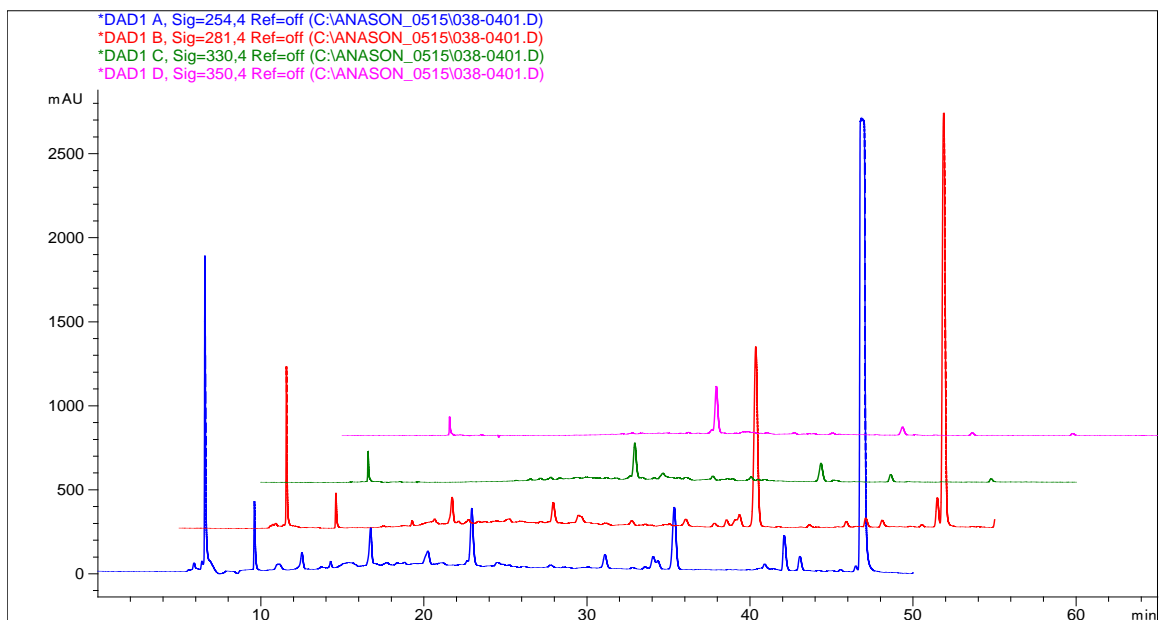
анетол фото димер

**Слика 7.23.** Масени спектри добиени со електронска јонизација на компоненти присутни во примерок од метанолен раствор на *trans*-анетол во кварцна кивета изложен на сончева светлина во времетраење од 36 h.

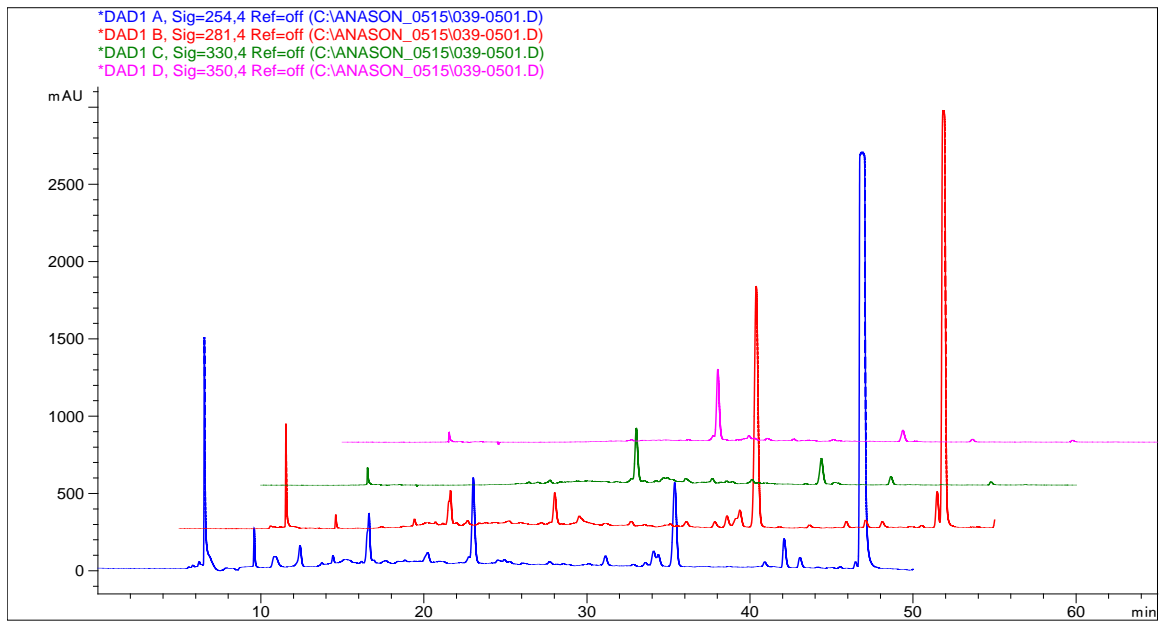
## 7. 5. Прилог репрезентативни хроматограми од HPLC-DAD анализи на дадени примероци *Foeniculum vulgare* Mill



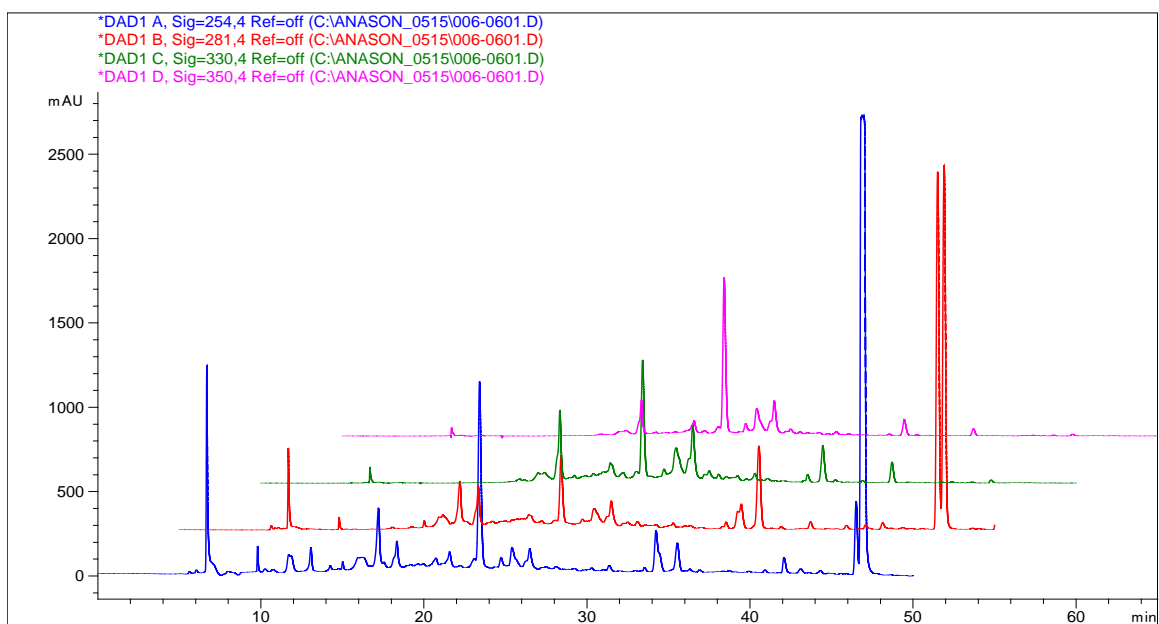
Слика 7.24. HPLC-DAD хроматограми на примерок од *Foeniculum vulgare* var. *dulce* (12A2F) на бранови должини 254, 281, 330 и 350 nm (примерок бр. 2, табела 7.1).



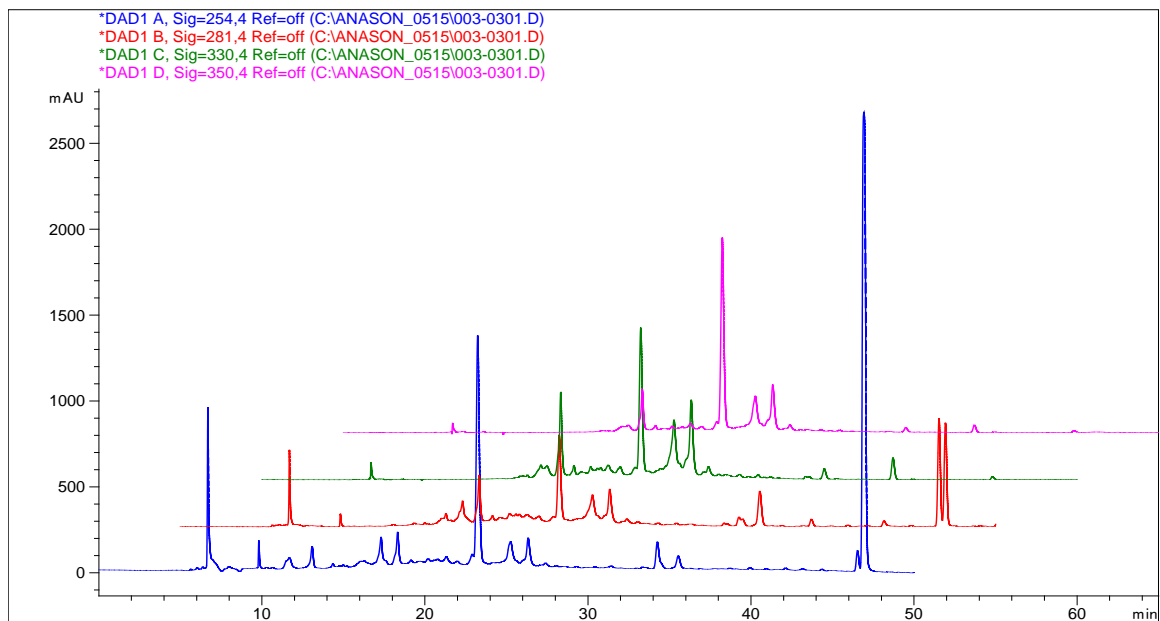
Слика 7.25. HPLC-DAD хроматограми на примерок од примерок од *Foeniculum vulgare* var. *dulce* (12EF) на бранови должини 254, 281, 330 и 350 nm (примерок бр.7, табела 7.1).



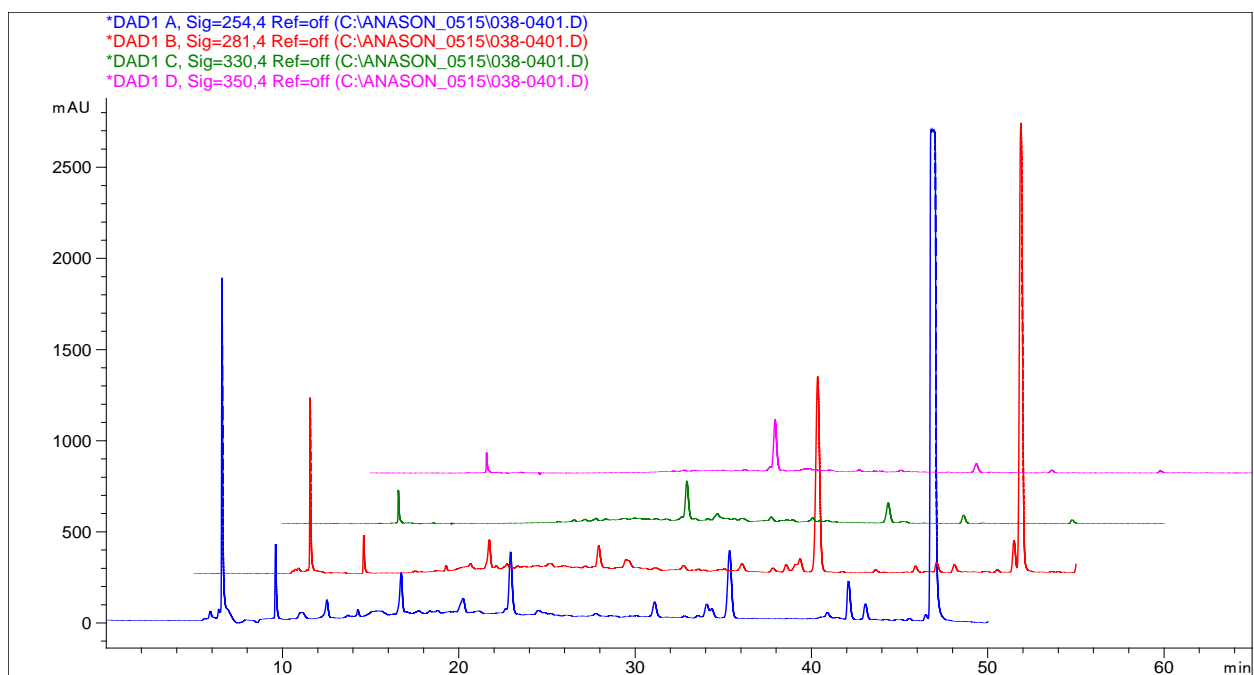
Слика 7.26. HPLC-DAD хроматограми на примерок од примерок од *Foeniculum vulgare* var. *dulce* (13SF) на бранови должини 254, 281, 330 и 350 nm (примерок бр. 24, табела 7.1).



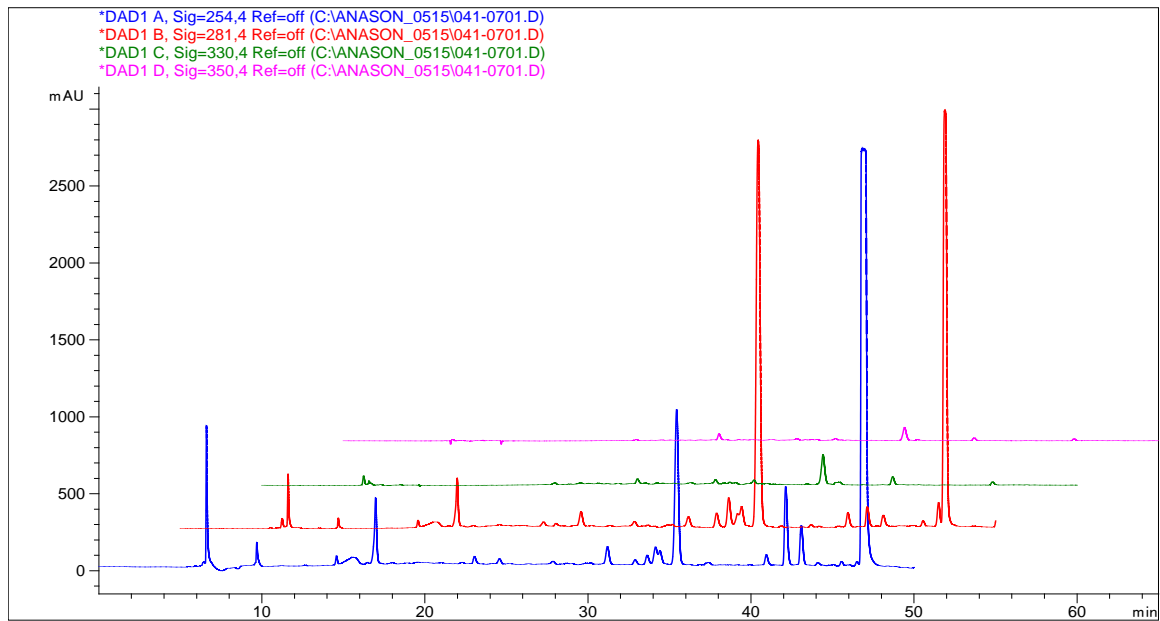
Слика 7.27. HPLC-DAD хроматограми на примерок од примерок од *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* (див анасон, 12WFF) на бранови должини 254, 281, 330 и 350 nm (примерок бр. 28, табела 7.1).



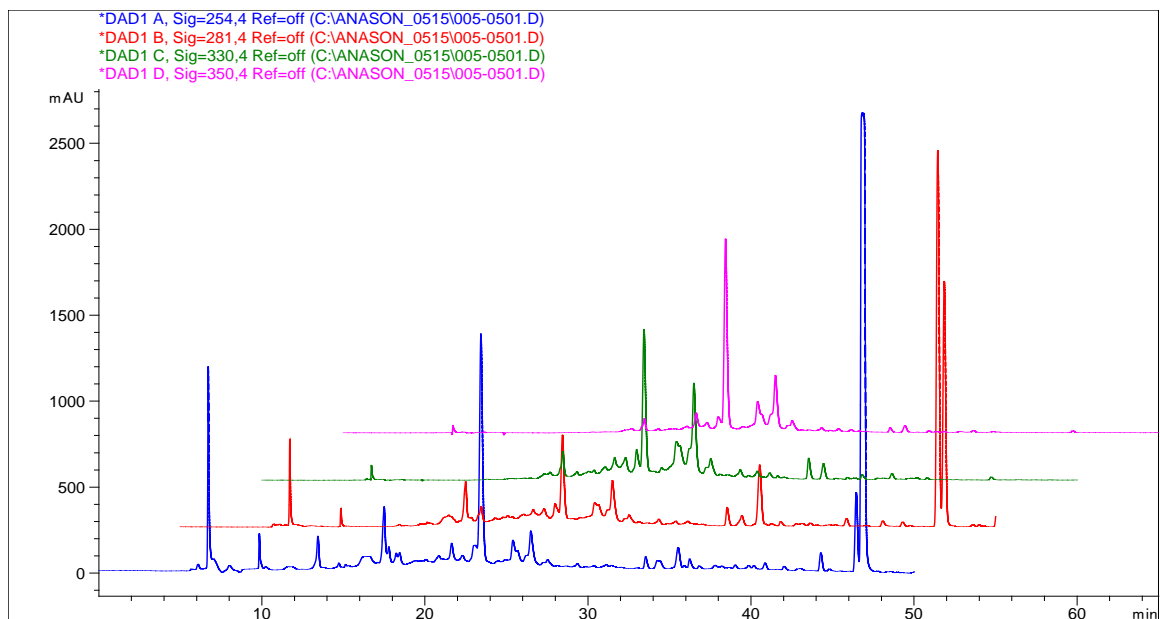
Слика 7.28. HPLC-DAD хроматограми на примерок од примерок од *Foeniculum vulgare* var. *azoricum* 12FFA на бранови должини 254, 281, 330 и 350 nm (примерок бр. 29, табела 7.1).



Слика 7.29. HPLC-DAD хроматограми на примерок од примерок од *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* 13WFF на бранови должини 254, 281, 330 и 350 nm (примерок бр. 32, табела 7.1).



Слика 7.30. HPLC-DAD хроматограми на примерок од *Foeniculum vulgare* var. *dulce* 13UF на бранови должини 254, 281, 330 и 350 nm (примерок бр. 33, табела 7.1).



Слика 7.31. HPLC-DAD хроматограми на примерок од примерок од *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* 1MPB на бранови должини 254, 281, 330 и 350 nm (примерок бр. 37, табела 7.1).