



UNIVERZITET U NIŠU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



**Marija S. Genčić**

**IZOLOVANJE, SINTEZA I BIOLOŠKA AKTIVNOST  
SEKUNDARNIH METABOLITA ODABRANIH BILJNIH  
VRSTA RODOVA *Lycopus* (Lamiaceae) I *Inula* (Asteraceae)**

doktorska disertacija

Niš, 2015



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF SCIENCE AND MATHEMATICS



**Marija S. Genčić**

**ISOLATION, SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY  
OF SECONDARY METABOLITES OF SELECTED PLANT  
SPECIES FROM THE GENERA *Lycopus* (Lamiaceae) AND**

***Inula* (Asteraceae)**

doctoral thesis

Niš, 2015

**SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

---

**MENTOR:**

**dr Niko S. Radulović,**

vanredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu

**ČLANOVI KOMISIJE:**

**1. dr Rastko D. Vukićević,**

redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu

**2. dr Polina D. Blagojević,**

vanredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu

**DATUM ODRBANE:**

---



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ  
НИШ**

**КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА**

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Марија С. Генчић
Ментор, МН:	Нико С. Радуловић
Наслов рада, НР:	Изоловање, синтеза и биолошка активност секундарних метаболита одабраних биљних врста родова <i>Lycopus</i> (Lamiaceae) и <i>Inula</i> (Asteraceae)
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	енглески
Земља публиковања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2015.
Издавач, ИЗ:	авторски репринг
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО:	12 поглавља; 270 стране; 272 цитата; 21 табела; 62 слике; 50 прилога
Научна област, НО:	хемија
Научна дисциплина, НД:	органска хемија и биохемија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	<i>Lycopus europaeus</i> L., <i>Lycopus exaltatus</i> L.f., <i>Inula helenium</i> L., етарска уља, екстракти, антимикробна активност, хемотаксономија, комбинаторна библиотека, лантанидни реагенси хемијског померања, еуроабиенол, елеменал, 3-метил-2-алканони, везане масне киселине, алканы, Гаусова расподела, биосинтеза
УДК	615.3220 : (534.054 + 54.057)
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	Део истраживања на пројекту ев. бр. 172061 надлежног Министарства
Извод, ИЗ:	У овом раду су испитивани екстракти плодова биљне врсте <i>Lycopus europaeus</i> L., при чему је изолован нови фенолни абиетански дитерпен (еуроабиенол), који поседује добра антимикробна својства, и одређен је састав и садржај везаних масних киселина и епикутиуларних алкана. Утврђено је и да се параметри квалитативне и квантитативне расподеле епикутиуларних алкана могу довести у везу са карактеристикама ензимског система који учествује у њиховој биосинтези. Извршена је и хемијска карактеризација етарског уља надземног дела ове врсте из различитих фенофаза, а тестирањем антимикробне активности уља утврђено је да селективно делује на две Грам-негативне бактерије ( <i>Escherichia coli</i> и <i>Klebsiella pneumoniae</i> ). Детаљном фитохемијском анализом (етарског уља и екстракта надземног дела) још једног представника овог рода у флори Србије - <i>Lycopus exaltatus</i> L.f. утврђено је да ову врсту осим продукције (поли)фенолних једињења, који су уобичајени секундарни метаболити за овај род, одликује и биосинтеза тритерпенских киселина. Мултиваријантном статистичком анализом састава етарских уља врста рода <i>Lycopus</i> добијене су неке додатне информације везане за сложене инфрагенеричке. Одређен је и састав малозаступљене фракције етарског уља корена биљне врсте <i>Inula helenium</i> L. за коју је утврђено да је изразито активна према бактерији <i>Staphylococcus aureus</i> . Том приликом, 3-метил-2-алканони (C <sub>11</sub> -C <sub>19</sub> ) су идентификовани, по први пут као биљни природни производи, применом методологије комбинаторних синтетских библиотека. Тестирањем антимикробне активности синтетисаних 3-метил-2-алканона је утврђено да нису активни према соју <i>S. aureus</i> . Структура главног, и највероватније активног састојка ове фракције, ретког сесквитерпена елеменала је одређена помоћу нове NMR методе за анализу сложених смеша која заснована на примени лантанидних реагенаса хемијског померања.
Датум прихватања теме, ДП:	24.12.2012.
Датум одбране, ДО:	
Чланови комисије, КО:	Председник: Растко Вукићевић Члан: Полина Благојевић Члан, ментор: Нико Радуловић



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ  
НИШ**

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

Accession number, ANO:		
Identification number, INO:		
Document type, DT:	monograph	
Type of record, TR:	textual / graphic	
Contents code, CC:	doctoral dissertation	
Author, AU:	Marija S. Gencic	
Mentor, MN:	Niko S. Radulovic	
Title, TI:	Isolation, synthesis and biological activity of secondary metabolites from selected plant species from the genera <i>Lycopus</i> (Lamiaceae) and <i>Inula</i> (Asteraceae)	
Language of text, LT:	Serbian	
Language of abstract, LA:	English	
Country of publication, CP:	Serbia	
Locality of publication, LP:	Serbia	
Publication year, PY:	2015	
Publisher, PB:	author's reprint	
Publication place, PP:	Niš, Višegradska 33.	
Physical description, PD:	12 chapters/ 270 pages/ 272 ref./ 21 tables/ 62 pictures/ 50 appendices	
Scientific field, SF:	chemistry	
Scientific discipline, SD:	organic chemistry and biochemistry	
Subject/Key words, S/KW:	<i>Lycopus europaeus</i> L., <i>Lycopus exaltatus</i> L.f., <i>Inula helenium</i> L., essential oils, extracts, antimicrobial activity, chemotaxonomy, combinatorial library, lanthanide chemical shift reagents, euroabienol, elemenal, 3-methyl-2-alkanones, bound fatty acids, alkanes, Gaussian distribution, biosynthesis	
UC	615.3220 : (534.054 + 54.057)	
Holding data, HD:	library	
Note, N:	This work is a part of the research performed within the Project No. 172061.	
Abstract, AB:	<p>Herein, we studied the chemical composition of <i>Lycopus europaeus</i> L. fruits. As a result, a new abietane-type diterpenoid (euroabienol), with moderate antimicrobial activity, was isolated. The composition of the bound fatty acids and epicuticular alkanes were determined, as well. It was found that the distribution of the relative amounts of the wax alkanes reflected the work of elongase enzyme systems. Furthermore, the detailed analyses of <i>L. europaeus</i> essential oils (aerial parts; two different phenophases) were performed. Antimicrobial screening of the oil revealed a selective action of the tested oil towards two Gram-negative strains (<i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i>). The detailed phytochemical study (essential oils and extracts; aerial parts) of another representative of this genus in the flora of Serbia - <i>Lycopus exaltatus</i> L.f, revealed that this taxon alongside (poly)phenolic compounds, that are common secondary metabolites of this genus, produced triterpene acids. Moreover, a multivariate statistical comparison of the essential-oil composition data for several <i>Lycopus</i> species revealed valuable information about a very complex infrageneric relationships within this genus. The analysis of a minor antistaphylococcal fraction of <i>Inula helenium</i> L. root essential oil was another aim of this PhD thesis. The creation of a small combinatorial library enabled the first unequivocal identification of long-chain 3-methyl-2-alkanones (C<sub>11</sub>-C<sub>19</sub>) as plant secondary metabolites. However, these synthetic 3-methyl-2-alkanones were found to be not active against <i>Staphylococcus aureus</i>. The major (and most probably active) component of the mentioned fraction, a rare sesquiterpene, elemenal, was identified applying a new structural elucidation methodology that employed lanthanide induced shifts in NMR analysis of complex samples comprising of several compounds.</p>	
Accepted by the Scientific Board on, ASB:	24.12.2012.	
Defended on, DE:		
Defended Board, DB:	President:	Rastko Vukićević
	Member:	Polina Blagojević
	Member, Mentor:	Niko Radulović

## ZAHVALNICA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

---

*Ova doktorska disertacija je urađena u okviru istraživanja na projektu ON 172061 „Kombinatorne biblioteke heterogenih katalizatora, prirodnih proizvoda, modifikovanih prirodnih proizvoda i njihovih analoga: put ka novim biološkim agensima” Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.*

*Ovom prilikom najiskrenije se zahvaljujem svom mentoru profesoru Niku Raduloviću na ukazanom poverenju, ogromnoj i nesebičnoj pomoći tokom izrade ove disertacije, kao i na prijateljskom odnosu tokom ovih godina.*

*Najsrdačnije se zahvaljujem i članovima komisije prof. dr Rastku Vukićeviću i prof. dr Polini Blagojević na nizu korisnih sugestija i saveta koji su u mnogome uticali na kvalitet same disertacije.*

*Zahvalnost dugujem i kolegama iz grupe, ne samo na predusetljivosti i saradnji u toku realizacije ove doktorske disertacije, već i na tome što su sam rad u laboratoriji često činili lakšim i veselijim.*

*Posebnu zahvalnost dugujem Zorici Taškov, profesoru hemije u Gimnaziji „Bora Stanković“ u penziji, koja mi je na najbolji mogući način usadila ljubav prema hemiji.*

*Naposletku, ne mogu, a da se, ne zahvalim i svojoj porodici na bezgraničnoj podršci, razumevanju i ljubavi.*

---

# OZNAKE I SKRAĆENICE

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

### OZNAKE I SKRAĆENICE

#### -NOMENKLATURA-

<b>Me</b> ili CH <sub>3</sub> –	Metil
<b>Et</b> ili C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> –	Etil
<b>Ac</b> ili CH <sub>3</sub> CO–	Acetil
<b>ACP</b>	Acyl Carrier Protein (protein nosač acil grupe)
<b>CoA</b>	Coenzyme A (koenzim A)
<b>Lys</b>	Lysine (lizin)
<b>NAD</b>	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (nikotinamid adenin dinukleotid)
<b>NADP</b>	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat)
<b>n</b>	normalni niz
<b>o</b>	<i>ortho</i>
<b>m</b>	<i>meta</i>
<b>p</b>	<i>para</i>
<b>a</b>	aksijalni
<b>e</b>	ekvatorijalni
<b>gem</b>	geminalni
<b>E</b>	Entgegen (stereodeskriptor)
<b>Z</b>	Zuzammen (stereodeskriptor)
<b>D</b>	Dexter
<b>L</b>	Laevus
(–)	levorotatori

#### -REAGENSI I RASTVARAČI-

<b>AcOH</b>	Sirćetna kiselina
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Deuterohloroform
<b>DCC</b>	<i>N,N'</i> -DiCyclohexylCarbodiimide ( <i>N,N'</i> -dicikloheksilkarbodiimid)
<b>DMAP</b>	4-(DiMethylAmino)Pyridine (4-(dimetilamino)piridin)
<b>DMSO</b>	DiMetilSulfOksid
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	Deuterodimetilsulfoksid

# OZNAKE I SKRAĆENICE

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

<b>Et<sub>3</sub>N</b>	Trietilamin
<b>Et<sub>2</sub>O</b>	Dietil-atar
<b>EtOAc</b>	Etil-acetat
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>Eu(fod)<sub>3</sub></b>	<i>tris</i> (6,6,7,7,8,8,8-Heptafluor-2,2-dimetil-3,5-oktandionat)europijum(III)
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MeONa</b>	Natrijum-metoksid
<b>'BuOH</b>	<i>terc</i> -Butanol
<b>'BuOK</b>	Kalijum- <i>terc</i> -butoksid
<b>TMS</b>	TetraMethylSilane (Tetrametilsilan)
<b>TMSCl</b>	TriMethylSilyl Chloride (Trimetilchlorsilan)

## -HRMATOGRAFIJA I MASENA SPEKTROMETRIJA-

<b>A</b>	Površina istod pika u gasnom hromatogramu
<b>ACL</b>	Average Chain Length (prosečna dužina ugljovodoničnog niza)
<b>AMDIS</b>	Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (automatizovani sistem za identifikaciju i dekonvoluciju masenih spektara)
<b>C</b>	Koncentracija
<b>CPI</b>	Carbon Preference Index (ugljenični preferencijalni indeks)
<b>EI</b>	Electron Ionization (elektronska ionizacija)
<b>FID</b>	Flame Ionization Detector (plameno-jonizacioni detektor)
<b>GC</b>	Gas Chromatography (gasna hromatografija)
<b>GC-MS</b>	Gas Chromatography-Mass Spectrometry (gasna hromatografija-masena spektrometrija)
<b>HP</b>	Hewlett-Packard
<b>HRMS</b>	High Resolution Mass Spectrometry (masena spektrometrija visoke rezolucije)
<b>[M]<sup>+</sup></b>	Molekulski jon
<b>m/z</b>	Mass-to-charge-ratio (odnos mase i nakelektrisanja)
<b>MPLC</b>	Medium Pressure Liquid Chromatography (tečna hromatografija pri srednjim pritiscima)

# OZNAKE I SKRAĆENICE

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

---

<b>rel. int.</b>	Relativni intenzitet
<b>RI</b>	Retention Index (retencioni indeks)
<b>ΔRI</b>	Razlika u retencionim indeksima
<b>R<sub>t</sub></b>	Retention Time (retencionalno vreme)
<b>TLC</b>	Thin-Layer Chromatography (tankoslojna hromatografija)
<b>TIC</b>	Total Ion Chromatogram (ukupni jonski hromatogram)

## -INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA I ULTRALJUBIČASTA I VIDLJIVA SPEKTROSKOPIJA-

<b>ATR</b>	Attenuated Total Reflectance
<b>FT</b>	Fourier Transform (Fourier-ova transformacija)
<b>FTIR</b>	Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (Furije-transformisana infracrvena spektroskopija)
<b>IR</b>	InfraRed (infracrvena)
<b>UV</b>	UltraViolet
<b>UV-Vis</b>	UltraViolet–Visible spectroscopy (spektroskopija u UV i Vis oblasti)
<b>ν</b>	Frekvencija valencione vibracije
<b>δ</b>	Frekvencija deformacione vibracije
<b>λ<sub>max</sub></b>	Talasna dužina maksimuma apsorpcije

## -NUKLEARNA-MAGNETNA REZONANTNA SPEKTOSKOPIJA-

<b>1D</b>	jednodimenzionalni
<b>2D</b>	dvodimenzionalni
<b>br. d</b>	<b>broad doublet</b> (široki dublet)
<b>br. dd</b>	<b>broad doublet of doublets</b> (široki dublet dubleta)
<b>br. pseudo-d quint</b>	<b>broad pseudo doublet of quintets</b> (široki pseudo dublet kvinteta)
<b>br. s</b>	<b>broad singlet</b> (široki singlet)
<b>br. tt</b>	<b>broad triplet of triplets</b> (široki triplet triplata)
<b><sup>13</sup>C NMR</b>	<b>Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy</b> (nuklearna-magnetna rezonantna spektroskopija ugljenika-13)
<b>d</b>	<b>dublet</b>
<b>dd</b>	<b>dublet dubleta</b>

# OZNAKE I SKRAĆENICE

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

<b>DEPT</b>	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
<b>gHMQC</b>	Gradient-enhanced Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
<b><math>^1\text{H}</math> - <math>^1\text{H}</math> COSY</b>	$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ Correlation Spectroscopy
<b><math>^1\text{H}</math> - <math>^1\text{H}</math> gDQCOSY</b>	Gradient-enhanced Double Quantum Filtered Correlation Spectroscopy
<b><math>^1\text{H}</math> - <math>^{13}\text{C}</math> gHMBC</b>	Gradient-enhanced Heteronuclear Multiple Bond Correlation
<b><math>^1\text{H}</math> NMR</b>	Hydrogen-1 Nuclear Magnetic Resonance (protomska nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija)
<b><i>hept</i></b>	<b>heptulet</b> (heptet)
<b>HMBC</b>	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
<b>HSQC</b>	Heteronuclear Single Quantum Coherence
<b><i>J</i></b>	Konstanta kuplovanja
<b>LSR</b>	Lanthanide Shift Reagents (lantanidni reagensi hemijskog pomeranja)
<b><i>m</i></b>	<b>multiplet</b>
<b>NMR</b>	Nuclear Magnetic Resonance (nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija)
<b>NOESY</b>	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
<b>ppm</b>	parts per million
<b><i>pseudo-dq</i></b>	<b>pseudo-doublet</b> of quartets (pseudo-dublet kvarteta)
<b><i>pseudo-dt</i></b>	<b>pseudo-doublet</b> of triplets (pseudo-dublet triplata)
<b><i>pseudo-td</i></b>	<b>pseudo-triplet</b> of doublets (pseudo-triplet dubleta)
<b><i>pseudo-t hept</i></b>	<b>pseudo-triplet</b> of <b>heptulets</b> (pseudo-triplet heptuleta)
<b><i>pseudo-t sext</i></b>	<b>pseudo-triplet</b> of <b>sextuplets</b> (pseudo-triplet sekstupleta)
<b><i>pseudo-q</i></b>	<b>pseudo-quartet</b> (pseudo-kvartet)
<b><i>pseudo-qd</i></b>	<b>pseudo-quartet</b> of doublets (pseudo-kvartet dubleta)
<b><i>pseudo-quint</i></b>	<b>pseudo-quintet</b> (pseudo-kvintet)
<b><i>s</i></b>	<b>singlet</b>
<b><i>sex</i>t</b>	<b>sextuplet</b> (sekstuplet)
<b><i>t</i></b>	<b>triplet</b>
<b><math>\delta</math></b>	Hemijsko pomeranje u NMR spektru
<b><math>\delta_{\text{H}}</math></b>	Hemijsko pomeranje u $^1\text{H}$ NMR spektru

# OZNAKE I SKRAĆENICE

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

<b>δ<sub>C</sub></b>	Hemijsko pomeranje u <sup>13</sup> C NMR spektru
<b>Δδ</b>	Razlika u hemijskim pomeranjima
<b>ΔEu</b>	Gradijent pomeranja
<b>Δ<sub>kal</sub></b>	Izračunate vrednosti hemijskih pomeranja indukovanih lantanidom na osnovu Mekonel-Robertsonove (McConnell-Robertson) jednačine

## -ANTIMIKROBNA I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST-

<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>CFU</b>	Colony-Forming Unit
<b>MBC</b>	Minimum Bactericidal Concentration (minimalna baktericidna koncentracija)
<b>MFC</b>	Minimum Fungicidal Concentration (minimalna fungicidna koncentracija)
<b>MIC</b>	Minimum Inhibitory Concentration (minimalna inhibitorna koncentracija)
<b>MHA</b>	Mueller Hinton Agar
<b>NCCLS</b>	National Committee for Clinical Laboratory Standards (američki nacionalni komitet za kliničke laboratorijske standarde)
<b>PDA</b>	Potato Dextrose Agar (krompir dekstrozni agar)
<b>SDA</b>	Sabouraud Dextrose Agar (Sabouraud dekstrozni agar)
<b>DPPH</b>	1,1-DiPhenyl-2-PicrylHydrazyl radical (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil radikal)
<b>ABTS</b>	2,2'-Azino-Bis(3-ethylbenzoThiazoline-6-Sulphonic acid)
<b>FRAP</b>	Ferric ion Reducing Antioxidant Power

## -STATISTIČKA ANALIZA-

<b>MVA</b>	Multivariate analysis (multivarijantna analiza)
<b>AHC</b>	Agglomerative Hierarchical Clustering (aglomerativna hijerarhijska klaster analiza)
<b>PCA</b>	Principal Component Analysis (analiza glavne komponente)

# OZNAKE I SKRAĆENICE

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

---

<b>D</b>	Diterpeni
<b>M</b>	Monoterpeni
<b>MMK</b>	Jedinjenja izvedena iz metabolizma masnih kiselina
<b>O</b>	Ostalo
<b>S</b>	Seskviterpeni
<b>SM</b>	Jedinjenja izvedena iz šikimatnog puta

### -MERNE JEDINICE-

<b>Å</b>	angstrom
<b>amu</b>	<b>atomic mass unit</b> (jedinica atomske mase)
<b>°C</b>	Celzijusov stepen
<b>cm</b>	centimetar
<b>dm</b>	decimetar
<b>eV</b>	electron Volt
<b>g</b>	gram
<b>h</b>	sat
<b>Hz</b>	herc
<b>K</b>	Kelvinov stepen
<b>kcal</b>	<b>kilocalorie</b> (kilokalorija)
<b>kHz</b>	kiloherc
<b>l</b>	litar
<b>M</b>	mol/dm <sup>3</sup>
<b>m</b>	metar
<b>MHz</b>	megaherc
<b>mg</b>	miligram
<b>min</b>	minut
<b>ml</b>	mililitar
<b>mm</b>	milimetar
<b>mmol</b>	milimol
<b>mmu</b>	<b>milli mass unit</b>
<b>nm</b>	nanometar
<b>rpm</b>	<b>revolutions per minute</b> (broj okretaja u minuti)

# OZNAKE I SKRAĆENICE

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

---

<b>s</b>	sekunda
<b>µl</b>	mikrolitar
<b>µm</b>	mikrometar

---

### -OSTALO-

<b>aq.</b>	Aqueous solution (vodeni rastvor)
<b>et al.</b>	<b>Et alia</b> (i drugi)
<b>eq.</b>	ekvivalent
<b>HBA</b>	<b>Hydrogen Bond Aceptor</b>
<b>HBD</b>	<b>Hydrogen Bond Donor</b>
<b>s.t.</b>	sobna temperatura
<b>sl.</b>	slično
<b>syn.</b>	sinonim
<b>tr</b>	trag
$\mu$	srednja vrednost, korišćena kod Gausove raspodele
$\sigma$	standardna devijacija, korišćena kod Gausove raspodele

**SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

---

<b>1.</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>CILJEVI RADA</b>	<b>5</b>
<b>3.</b>	<b>OPŠTI DEO</b>	<b>8</b>
3.1	SISTEMATIKA RODA <i>LYCOPUS</i>	9
3.2	SEKUNDARNI METABOLITI BILJNE VRSTE <i>LYCOPUS EUROPAEUS</i> L.	11
3.2.1	(POLI)FENOLNA JEDINJENJA	11
3.2.2	DITERPENI	15
3.2.3	SASTOJCI ETARSKOG ULJA	17
3.2.4	JEDINJENJA IZVEDENA IZ METABOLIZMA MASNIH KISELINA	18
3.3	SEKUNDARNI METABOLITI BILJNE VRSTE <i>LYCOPUS EXALTATUS</i> L.F.	19
3.4	SISTEMATIKA RODA <i>INULA</i>	23
3.5	SEKUNDARNI METABOLITI BILJNE VRSTE <i>INULA HELENIUM</i> L.	24
3.5.1	SESKVITERPENSKI LAKTONI	25
3.5.2	(POLI)FENOLNA JEDINJENJA	31
3.5.3	DRUGI SEKUNDARNI METABOLITI <i>I. HELENIUM</i>	34
<b>4.</b>	<b>EKSPERIMENTALNI DEO</b>	<b>35</b>
4.1	HEMIKALIJE	36
4.2	METODE ANALIZE	37
4.2.1	NUKLEARNO-MAGNETNA REZONANTNA (NMR) SPEKTROSKOPIJA	37
4.2.2	INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA (FTIR)	37
4.2.3	ULTRALJUBIČASTA I VIDLJIVA SPEKTROSKOPIJA (UV-VIS)	38
4.2.4	MASENA SPEKTROMETRIJA VISOKE REZOLUCIJE (HRMS)	38
4.2.5	GASNA HROMATOGRAFIJA-MASENA SPEKTROMETRIJA (GC-MS) I GASNA HROMATOGRAFIJA (GC)	38
4.2.5.1	GASNA HROMATOGRAFIJA-MASENA SPEKTROMETRIJA (GC-MS)	38
4.2.5.2	IDENTIFIKACIJA SASTOJAKA	39
4.2.5.3	GASNA HROMATOGRAFIJA SA PLAMENO-JONIZACIONOM DETEKCIJOM (GC-FID)	39
4.3	METODE RAZDVAJANJA	41
4.3.1	TANKOSLOJNA HROMATOGRAFIJA (TLC)	41
4.3.2	TEĆNA HROMATOGRAFIJA PRI SREDNJIM PRITISCIMA (MPLC)	41
4.3.3	DRY FLASH HROMATOGRAFIJA	41
4.3.4	HROMATOGRAFIJA NA KOLONI	41
4.3.5	GEL HROMATOGRAFIJA	42

---

**SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

---

4.4	BILJNI MATERIJAL I PRIPREMA UZORAKA	43
4.4.1	BILJNI MATERIJAL	43
4.4.2	DOBIVANJE ETARSKIH ULJA	43
4.5	IZOLOVANJE SEKUNDARNIH METABOLITA PLODOVA BILJNE VRSTE <i>LYCOPUS EUROPAEUS</i> L.	44
4.5.1	DOBIVANJE POVRŠINSKIH VOSKOVA PLODOVA	44
4.5.2	DOBIVANJE DIHLORMETANSKIH EKSTRAKATA PLODOVA	45
4.5.3	HROMATOGRAFSKO RAZDVAJANJE DIHLORMETANSKIH EKSTRAKATA PLODOVA	45
4.5.4	DERIVATIZACIJA IZOLOVANIH SEKUNDARNIH METABOLITA	46
4.5.4.1	TRANSESTERIFIKACIJA TRIGLICERIDA	46
4.5.4.1.1	PREVOĐENJE U METIL ESTRE	46
4.5.4.1.2	PREVOĐENJE U TERC-BUTIL ESTRE	46
4.5.4.2	SILIOVANJE EUROABIENOLA	47
4.5.4.3	BAZNO-KATALIZOVANO DEACETILOVANJE EUROABIENOLA	48
4.5.5	OPŠTA PROCEDURA ZA SINTEZU STANDARDA METIL I TERC-BUTIL ESTARA	48
4.6	IZOLOVANJE SEKUNDARNIH METABOLITA BILJNE VRSTE <i>L. EXALTATUS</i> L.F	50
4.6.1	DOBIVANJE DIETIL-ETARSKOG EKSTRAKTA NADZEMNIH DELOVA BILJNE VRSTE <i>L. EXALTATUS</i>	50
4.6.2	HROMATOGRAFSKO RAZDVAJANJE DIETIL-ETARSKOG EKSTRAKTA	50
4.6.3	SPEKTRALNI PODACI IZOLOVANIH JEDINJENJA (I NJIHOVIH DERIVATA) IZ EKSTRAKTA NADZEMNOG DELA BILJNE VRSTE <i>L. EXALTATUS</i>	53
4.7	IZOLOVANJE SEKUNDARNIH METABOLITA KORENA BILJNE VRSTE <i>INULA HELENIUM</i> L.	55
4.7.1	HROMATOGRAFKO RAZDVAJANJE ETARSKOG ULJA KORENA BILJNE VRSTE <i>I. HELENIUM</i>	55
4.7.2	SINTEZA 3-METIL-2-ALKANONA DUGOG UGLJOVODONIČNOG LANCA	55
4.7.2.1	DOBIVANJE DUGOLANČANIH ALKIL-HALOGENIDA	55
4.7.2.1.1	OPŠTA PROCEDURA ZA DOBIVANJE ALKIL-BROMIDA SA NEPARNIM BROJEM C-ATOMA U UGLJOVODONIČNOM NIZU	55
4.7.2.1.2	OPŠTA PROCEDURA ZA DOBIVANJE ALKIL-JODIDA SA PARNIM BROJEM C-ATOMA U UGLJOVODONIČNOM NIZU	56
4.7.2.2	OPŠTA PROCEDURA ZA DOBIVANJE METIL-2-ACETILALKANOATA	56
4.7.2.3	DOBIVANJE METIL-2-ACETIL-2-METILALKANOATA	58
4.7.2.4	OPŠTA PROCEDURA ZA DOBIVANJE 3-METIL-2-ALKANONA	60
4.7.3	ODREĐIVANJE KOLIČINE 3-METIL-2-ALKANONA U KORENU BILJNE VRSTE <i>I. HELENIUM</i>	63
4.7.4	ANALIZA FRAKCIJE ETARSKOG ULJA KOJA JE OBOGAĆENA NEPOZNATIM SESKVITERPENSKIM ALDEHIDOM POMOĆU NMR METODE ZASNOVANE NA PRIMENI REAGENASA HEMIJSKOG POMERANJA	63

---

**SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

---

4.8 ISPITIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI	66
4.8.1 KORIŠĆENI MIKROORGANIZMI	66
4.8.2 TESTIRANJE <i>IN VITRO</i> ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI	67
4.9 STATISTIČKA ANALIZA	69
4.9.1 MULTIVARIJANTNA ANALIZA: METODA ANALIZE GLAVNE KOMPONENTE I AGLOMERATIVNE HIJERARHIJSKE KLASTER ANALIZE	69
4.10 MOLEKULSKO MODELOVANJE	69
<b>5. REZULTATI I DISKUSIJA</b>	<b>70</b>
5.1 SEKUNDARNI METABOLITI BILJNE VRSTE <i>L. EUROPAEUS</i> L.	71
5.1.1 HEMIJSKI SASTAV ETARSKIH ULJA BILJNE VRSTE <i>L. EUROPAEUS</i>	71
5.1.1.1 ANTIMIKROBNA AKTIVNOST ETARSKOG ULJA BILJNE VRSTE <i>L. EUROPAEUS</i>	79
5.1.2 SEKUNDARNI METABOLITI PLODOVA BILJNE VRSTE <i>L. EUROPAEUS</i>	82
5.1.2.1 HEMIJSKI SASTAV POVRŠINSKIH VOSKOVA	82
5.1.2.2 HEMIJSKI SASTAV VEZANIH MASNIH KISELINA	88
5.1.2.3 GAUSOVA DISTRIBUCIJA POVRŠINSKIH ALKANA PLODOVA BILJNE VRSTE <i>L. EUROPAEUS</i>	94
5.1.2.4 IZOLOVANJE I ODREĐIVANJE STRUKTURE NOVOG FENOLNOG DITERPENA ABIETANSKOG SKELETA	100
5.1.2.5 ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EUROABIENOLA	106
5.2 SEKUNDARNI METABOLITI BILJNE VRSTE <i>L. EXALTATUS</i> L.F	110
5.2.1 HEMIJSKI SASTAV ETARSKIH ULJA BILJNE VRSTE <i>L. EXALTATUS</i>	110
5.2.2 SEKUNDARNI METABOLITI IZOLOVANI IZ NADZEMNIH DELOVA BILJNE VRSTE <i>L. EXALTATUS</i>	119
5.2.2.1 HEMIJSKI SASTAV ALKANSKE FRAKCIJE	119
5.2.2.2 (POLI)FENOLNA JEDINJENJA I TRITERPENSKE KISELINE	126
5.2.3 MULTIVARIJANTNA ANALIZA SASTAVA ETARSKIH ULJA BILJNIH VRSTA RODA <i>LYCOPUS</i>	131
5.3 SEKUNDARNI METABOLITI BILJNE VRSTE <i>I. HELENIUM</i> L.	139
5.3.1 IDENTIFIKACIJA I POTVRDA STRUKTURE 3-METIL-2-ALKANONA SINTEZOM	139
5.3.2 ODREDIVANJE SADRŽAJA 3-METIL-2-ALKANONA U KORENU BILJNE VRSTE <i>I. HELENIUM</i>	142
5.3.3 ANTIMIKROBNA AKTIVNOST 3-METIL-2-ALKANONA	143
5.3.4 GAUSOVA RASPODELA 3-METIL-2-ALKANONA I RAZMATRANJE BIOSINTEZE OVIH JEDINJENJA	144
5.3.5 RASVETLJAVANJE STRUKTURE NEPOZNATOG SESKVITERPENSKOG ALDEHIDA IZ ULJA <i>I. HELENIUM</i>	147

---

**SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

---

<b>6.</b>	<b>IZVOD</b>	<b>170</b>
<b>7.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>175</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>180</b>
<b>9.</b>	<b>PRILOZI</b>	<b>194</b>
<b>10.</b>	<b>BIOGRAFIJA AUTORA</b>	<b>248</b>
<b>11.</b>	<b>BIBLIOGRAFIJA AUTORA</b>	<b>249</b>
<b>12.</b>	<b>IZJAVE AUTORA</b>	<b>253</b>

# UVOD

---

**SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

---

Do sada je iz viših biljaka izolovano/identifikovano preko milion jedinjenja velike strukturne raznolikosti. Ovi molekuli veoma često imaju specifičnu funkciju u biljci, a mnogi od njih poseduju biološke aktivnosti koje mogu biti od koristi ljudima (Queiroz et al., 2005). Samonikle biljne vrste su nekada bile gotovo jedini ljudima dostupni (poznati) izvor lekovitih supstanci, i otuda su činile osnovu tradicionalne medicine mnogih naroda (De Pasquale, 1984). Međutim, relativno mali procenat od oko 250.000-500.000 poznatih biljnih vrsta je proučavan sa fitohemijskog, a još manji procenat i sa biološkog i farmakološkog aspekta (Rates, 2001). Stoga se može reći da je potencijal viših biljaka kao izvora novih (moguće i bioaktivnih) molekula i dalje slabo istražen i iskorišćen.

Napredak modernih tehnika analize i metoda razdvajanja omogućio je i olakšao izolovanje i određivanje strukture čak i molekula koji se u biljnim tkivima nalaze u veoma malim količinama (Harvey, 2008). Može se reći da je ovo jedan od dva osnovna faktora koji je doveo do pronalaženja novih biološki aktivnih sekundarnih metabolita i kod biljnih vrsta koje su prethodno fitohemijski proučavane (Radulović et al., 2012). Drugi faktor je postojanje razlika u genetskom *pool-u* populacija određene biljne vrste koje se mogu odraziti na sastav njihovih sekundarnih metabolita. Takođe, do promene u profilu sekundarnih metabolita neke biljne vrste može doći i pod uticajem različitih ekoloških faktora (poput faze ontogenetskog razvića biljke, karakteristika staništa na kome se biljna populacija nalazi, postojanja infekcije, napada insekta, itd.) (Queiroz et al., 2005). Poznato je da se sastav sekundarnih metabolita često razlikuje u različitim biljnim organima (Wink, 2009), kao i da se molekuli koji obavljaju specifičnu funkciju u biljci (npr. hemijska odbrana od herbivora) u najvećoj meri akumuliraju u cvetovima i plodovima/semenu (Brown et al., 2003).

Imajući sve ovo u vidu nameće se potreba za kontinuiranom detaljnog fitohemijskom analizom kako biljnih vrsta koje do sada nisu proučavane, tako i dobro proučenih biljnih vrsta, i da se, ukoliko je to moguće, posebno ispita sastav sekundarnih metabolita svakog pojedinačnog organa. Potraga za novim biološki aktivnim prirodnim proizvodima biljnog porekla često može da dovede do izolovanja nepoznatog jedinjenja, određivanja njegove strukture i testiranja biološke aktivnosti Međutim, ukoliko iz nekog razloga (npr. mala zastupljenost u biljci) nije moguće izolovati nepoznato jedinjenje u čistom stanju tada se njegova prepostavljena struktura može potvrditi sintezom, koja, takođe, pruža i dovoljne količine supstance za razne biološke testove

---

**SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

---

*Lycopus* L. je rod familije Lamiaceae koji obuhvata šesnaest vrsta višegodišnjih cvetnica raspostranjenih pre svega u Evropi, Aziji i Severnoj Americi (Moon i Hong, 2006). U Srbiji je ovaj rod zastavljen sa samo dve vrste: *Lycopus europaeus* L. i *L. exaltatus* L.f. (Josifović, 1974). Smatra se da biljna vrsta *L. europaeus* poseduje određena lekovita svojstva, pa se u narodnoj medicini nadzemni deo biljke u cvetu koristi kao adstringens, sedativ, tonik i narkotik, u tretmanu tahikardije, hemoroida, gušavosti, Grejvsove (Graves) bolesti, kao i napetosti i bola u mlečnim žlezdama (Beer et al., 2008; Crellin i Philpott, 1997; Pinn, 2005; Tucakov, 1984). Više *in vitro* i *in vivo* farmakoloških studija potvrdilo je da tretman ekstraktom (npr. etanolnim) ove biljne vrste dovodi do ublažavanja ili suzbijanja određenih simptoma hipertireoze (Beer et al., 2008; Vonhoff et al., 2006). Antitireotropna i antigenadotropna aktivnost ekstrakta ove biljne vrste se pripisuje polifenolnim jedinjenjima, pre svega derivatima cimetne, kafene i ruzmarinske kiseline, kao i nekim flavonoidima i flavonoidnim glikozidima (Bucar et al., 1995; Fecka i Cisowski, 1999; Kartnig i Bucar, 1995). Prethodna fitohemijska ispitivanja pokazala su da je nadzemni deo ove biljne vrste, osim fenolnim jedinjenjima, bogat i izopimaranskim (Hussein et al., 1999; Jeremić et al., 1985; Milosavljević et al., 1986) i acikličnim diterpenima (Gibbons et al., 2003; Hussein i Rodriguez, 2000), a za neke od njih je utvrđeno da predstavljaju agense koji povećavaju osjetljivost više tipova multirezistentnih sojeva bakterije *Staphylococcus aureus* na standardne antibiotike (Gibbons et al., 2003). I pored brojnih fitohemijskih, farmakoloških i bioloških ispitivanja zanimljivo je da je hemijski sastav etarskog ulja ove biljne vrste analiziran samo dva puta do sada, pre više od dvadeset pet godina, kada je identifikovano svega 13 (Sharipov et al., 1969), odnosno 10 sastojaka (Lawrence, 1989), pa se nameće potreba za detaljnijom analizom koja bi mogla da dovede do identifikacije potencijalno farmakološki i biološki aktivnih supstanci, a koje bi, takođe, mogle da pruže dodatnu potvrdu raznovrsne etnofarmakološke upotrebe ove biljne vrste. Takođe, plodovi vrste *L. europaeus* su bili predmet svega dva fitohemijska ispitivanja tokom kojih je određen samo sadržaj najzastupljenijih vezanih masnih kiselina (Kozłowski et al., 1998; Lotti i Averna, 1969).

Za razliku od biljne vrste *L. europaeus*, drugi predstavnik ovog roda u flori Srbije, *L. exaltatus*, nema poznatu upotrebu u narodnoj medicini. Međutim, jedan od prihvaćenih pristupa odabiru biljne vrste koja bi bila predmet neke fitohemijske analize jeste da odabrana biljna vrsta, ukoliko sama nema etnofarmakološku upotrebu, bude iz roda koji je poznat po tome (Rates, 2001). U literaturi je dostupno veoma malo podataka o sekundarnim

---

**SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

---

metabolitima biljne vrste *L. exaltatus* jer je do sada sprovedeno svega nekoliko istraživanja, u kojima je, između, ostalog određen: (i) sastav i sadržaj slobodnih i vezanih masnih kiselina listova, cvetova i plodova ove biljne vrste (Maffei i Scannerini, 1993; Marin et al., 1991), (ii) sastav i sadržaj alkana prisutnih na površini listova (Maffei, 1994), (iii) sastav polifenolnih jedinjenja (Savina et al., 2013) i (iv) hemijski sastav etarskog ulja u kome je identifikovano svega 18 sastojaka (Lawrence, 1989).

*Inula helenium* L. (Compositae) je korovska višegodišnja biljna vrsta koja je u našoj zemlji široko rasprostranjena. U narodu je poznatija pod nazivom oman, a njen koren se u tradicionalnoj medicini često koristi kod digestivnih i respiratornih problema, urinarnih infekcija, kožnih oboljenja, itd. (Tucakov, 1984). Nedavno istraživanje je pokazalo da je etarsko ulje korena ove vrste izrazito aktivno prema bakteriji *Staphylococcus aureus* i da svoje baktericidno dejstvo ispoljava putem oštećenja ćelijske membrane. Frakcionisanje ulja je otkrilo da su seskviterpenski laktoni alantolakton, izoalantolakton i diplofilin glavni nosioci aktivnosti i omogućilo detekciju (i identifikaciju) malozastupljenih sastojaka koji nisu bili detektovani GC i GC-MS analizom nefrakcionisanog etarskog ulja. Najaktivnija frakcija, sa minimalnom inhibitornom koncentracijom (MIC) od svega 0,2 µg/ml, sadržavala je pomenute seskviterpenske laktone eudezmanskog skeleta. Veoma sličnu aktivnost (MIC = 0,8 µg/ml) posedovala je i frakcija eluirana sa 5% dietil-etrom u heksanu. Hemijski sastojci pomenute veoma aktivne frakcije su nažalost ostali neidentifikovani, a pretpostavljeno je samo, na osnovu fragmentacije u masenom spektru, da je njen glavni sastojak seskviterpenski aldehid germakranskog skeleta (Stojanović-Radić et al., 2012).

# CILJEVI RADA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

---

Imajući sve prethodno u vidu, za ciljeve ove doktorske disertacije postavljeno je ispitivanje biljnih vrsta *Lycopus europaeus* L., *Lycopus exaltatus* L.f. i *Inula helenium* L., koje obuhvata:

- ◆ dobijanje i detaljnu analizu hemijskog sastava etarskih ulja biljnih vrsta *L. europaeus* i *L. exaltatus*;
- ◆ uporednu statističku analizu isparljivih sastojaka biljnih vrsta iz roda *Lycopus*, na osnovu dobijenih, kao i prethodno objavljenih rezultata;
- ◆ dobijanje i analizu hemijskog sastava ekstrakata plodova biljne vrste *L. europaeus*;
- ◆ identifikaciju (sintezom ili izolovanjem i spektroskopskom analizom) nekih od sekundarnih metabolita iz frakcije (5% dietil-etal u heksanu) etarskog ulja korena biljne vrste *I. helenium*, koja je pokazala jaku antimikrobnu aktivnost;
- ◆ spektroskopsku i strukturnu karakterizaciju izolovanih i/ili sintetisanih jedinjenja;
- ◆ ispitivanje antimikrobne aktivnosti odabranih etarskih ulja i čistih jedinjenja.

Postavljeni ciljevi su ostvareni tako što je izvedeno sledeće:

- ◆ dobijanje i detaljna analiza hemijskog sastava etarskih ulja nadzemnih delova biljne vrste *L. europaeus* iz faze punog cveta i faze zrelih plodova;
- ◆ dobijanje i detaljna analiza hemijskog sastava etarskih ulja nadzemnih delova populacija biljne vrste *L. exaltatus* iz Srbije i Nemačke;
- ◆ uporedna statistička analiza isparljivih sastojaka biljnih vrsta roda *Lycopus*, pri čemu je baza podataka za ovu analizu formirana na osnovu rezultata dobijenih u ovom istraživanju i prethodno objavljenih rezultata;
- ◆ pripremanje i hromatografsko razdvajanje ekstrakata plodova biljne vrste *L. europaeus* pri čemu je određen sastav epikutikularnih alkana i vezanih masnih kiselina, a, takođe, je izolovan i spektralno okarakterisan novi diterpen abietanskog skeleta koji je nazvan euroabienol;
- ◆ pripremanje i hromatografsko razdvajanje ekstrakta nadzemnih delova biljne vrste *L. exaltatus* koje je rezultovalo izolovanjem i identifikacijom intrakutikularnih alkana, dve triterpenske kiseline: oleanolne i ursolne, tri derivata cimetne kiseline: *trans-p*-kumarinske, *trans*-ferulinske i *trans*-kafene kiseline, i dva flavona, apigenina i luteolina;
- ◆ dobijanje i hromatografsko razdvajanje etarskog ulja korena biljne vrste *I. helenium*;

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

- ◆ identifikacija 3-metil-2-alkanona dugog ugljovodoničnog lanca iz pomenute frakcije (5% dietil-etal u heksanu) etarskog ulja korena biljne vrste *I. helenium*, kreiranjem male kombinatorne biblioteke sintetskih standarda 3-metil-2-alkanona (C<sub>11</sub>–C<sub>19</sub>), a zatim i koinjekcijom ovih jedinjenja sa pomenutom frakcijom;
- ◆ identifikacija seskviterpenskog aldehida elemenala, glavnog sastojka aktivne frakcije (5% dietil-etal u heksanu) etarskog ulja korena biljne vrste *I. helenium*, primenom lantanidnih reagenasa hemijskog pomerenja u kvalitativnoj NMR analizi složenih smeša.
- ◆ spektroskopska i strukturna karakterizacija svih izolovanih i/ili sintetisanih jedinjenja;
- ◆ ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskog ulja biljne vrste *L. europaeus*, izolovanog abietanskog diterpena euroabienola i sintetskih standarda 3-metil-2-alkanona.

Predviđena ispitivanja su sprovedena korišćenjem sledećih metoda:

- ◆ *dobijanje etarskih ulja* - hidrodestilacija po Klevendžeru (Clevenger);
- ◆ *dobijanje ekstrakata* - ekstrakcija dihlormetanom i smešom hloroform-metanol (1:1) u ultrazvučnom kupatilu ili maceracija u dietil-etu;
- ◆ *derivatizacija* - sililovanje, bazno-katalizovana transesterifikacija i esterifikacija diazometanom;
- ◆ *analiza* - gasna hromatografija sa plameno-jonizacionom detekcijom (GC-FID), gasna hromatografija sa masenom detekcijom (GC-MS) i tankoslojna hromatografija na SiO<sub>2</sub> (TLC);
- ◆ *izolovanje* - kolonska hromatografija, *dry flash* hromatografija, tečna hromatografija pod srednjim pritiscima (MPLC) na SiO<sub>2</sub> i gel hromatografija na stubu SEPHADEX-a LH-20;
- ◆ *statistička analiza* – multivarijantna analiza pomoću programskog paketa *plug-in* XLSTAT za program EXCEL;
- ◆ *spektroskopska i strukturna karakterizacija* - nuklearna magnetna spektroskopija ugljenika-13 i vodonika (<sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C-NMR, jedno- i dvodimenzionalna), infracrvena spektroskopija (IR), ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija (UV-Vis) i masena spektrometrija (EI-MS i HRMS);
- ◆ *molekulsko modelovanje* - konformaciona analiza pomoću programa *ChemBio3D Ultra 12.0*;
- ◆ *antimikrobna aktivnost* - mikrodilucionna metoda po preporukama NCCLS-a.

# OPŠTI DEO

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*3.1. SISTEMATIKA RODA *LYCOPUS*

*Lycopus* L. je rod familije Lamiaceae (usnatice) koji obuhvata šesnaest vrsta rasprostranjenih pre svega u Evropi, Aziji i Severnoj Americi. U ovaj rod spadaju višegodišnje zeljaste biljke koje uglavnom naseljavaju vlažna, prevashodno močvarna staništa (Moon i Hong, 2006). Osnovne morfološke karakteristike ovog roda su:

- ◆ izduženi i bokorasti izdanci i nazubljeni do perasto deljeni listovi;
- ◆ sitni, beličasti, gotovo radijalni cvetovi sakupljeni u prividno pršljenastim cvastima u pazusima listova;
- ◆ zvonasta, skoro pravilna čašica sa 4 ili 5 zubaca koja je u unutrašnjosti gola;
- ◆ zvonasta, beličasta krunica sa skoro četiri jednaka režnja, koja je dlakava u delu u kome su pričvršćeni prašnici, a po dužini je jednaka čašici ili nešto duža od nje;
- ◆ četiri prašnika od kojih su dva zakrpljala i sterilna, a dva su potpuno razvijena i štrče iz krunice;
- ◆ tetraedrični oraščići koji su na vrhu ravni, a na ivici zadebljali (Josifović, 1974).

U tabeli 3.1 je prikazano filogenetsko stablo roda *Lycopus*.

TABELA 3.1. FILOGENETSKO STABLO<sup>†</sup> RODA *LYCOPUS*

TAKSONOMSKE KATEGORIJE	TAKSONI
<i>Regnum – Carstvo</i>	Plantae
<i>Subregnum – Podcarstvo</i>	Viridaeplantae
<i>Phylum – Odeljak</i>	Tracheophyta
<i>Subphylum – Pododeljak</i>	Euphyllophytina
<i>Classis – Klasa</i>	Spermatopsida
<i>Subclassis – Podklasa</i>	Magnoliidae
<i>Ordo – Red</i>	Lamiales
<i>Familia – Familija</i>	Lamiaceae
<i>Subfamilia – Podfamilija</i>	Nepetoideae
<i>Tribus – Plemе</i>	Mentheae
<i>Genus – Rod</i>	<i>Lycopus</i>

<sup>†</sup> Systema Naturae 2000 (<http://sn2000.taxonomy.nl/>).

**SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

U Srbiji je ovaj rod zastupljen sa samo dve vrste *L. europaeus* L. i *L. exaltatus* L.f. (Josifović, 1974). Njihova osnovna morfološka razlika je u nazubljenosti listova. Kod vrste *L. exaltatus* listovi perasto deljeni skoro do glavnog nerva (slika 3.1), a kod vrste *L. europaeus* oni su krupno nazubljeni i samo u donjem delu nešto krupnije usećeni (slika 3.2).



**SLIKA 3.1. IZGLED (CVETA, LISTA I PLODA) BILJNE VRSTE *L. EXALTATUS***



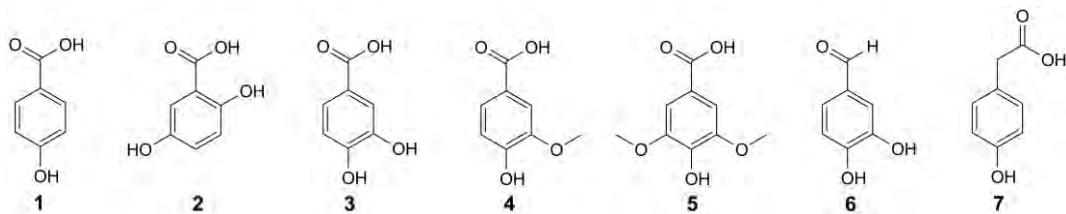
**SLIKA 3.2. IZGLED (CVETA I LISTA) BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS***

### 3.2. SEKUNDARNI METABOLITI BILJNE VRSTE *LYCOPUS EUROPAEUS* L.

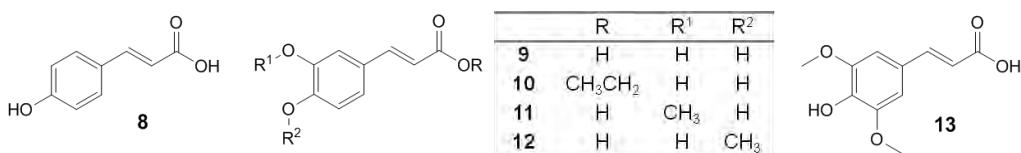
Biljna vrsta *L. europaeus* bila je predmet značajnog broja kako hemijskih, tako i bioloških i farmakoloških istraživanja. Većina ovih istraživanja je bila motivisana opštepoznatom upotrebom nadzemnog dela ove biljne vrste u narodnoj medicini za lečenje blata i oblika hipertireoze. Opravданost te etnofarmakološke upotrebe potvrđena je u više *in vivo* i *in vitro* farmakoloških studija, a ispitivanja hemijskog sastava ove biljne vrste su prevashodno bila usmerena ka identifikaciji jedinjenja koja su nosioci aktivnosti, što je dovelo do izolovanja velikog broja polifenolnih jedinjenja. Osim polifenolnih jedinjenja, iz nadzemnog dela je izolovan i značajan broj diterpena, a određen je i sastav etarskog ulja, površinskih alkana listova i vezanih masnih kiselina plodova.

#### 3.2.1. (POLI)FENOLNA JEDINJENJA

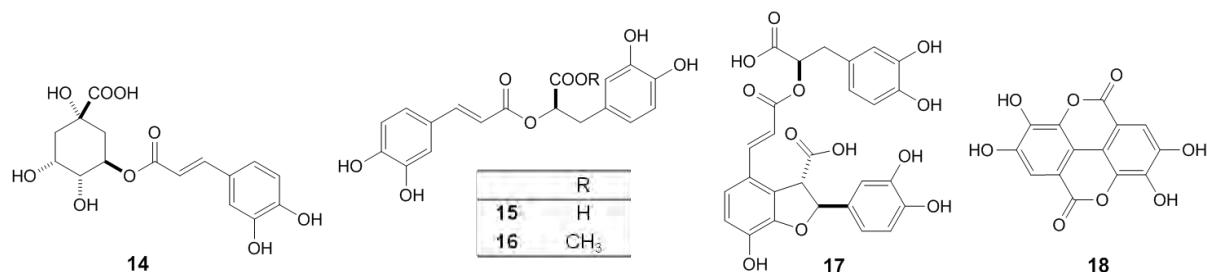
Nadzemni deo biljne vrste *L. europaeus* je izuzetno bogat (poli)fenolnim jedinjenjima: slobodnim (poli)fenolnim kiselinama, depsidima, lignanima, flavonoidima, flavonoidnim glikozidima, itd. Među jedinjenjima C<sub>6</sub>C<sub>1</sub> skeleta (**1-6**) najzastupljeniji su (poli)hidroksilovani derivati benzoeve kiseline **1-5** (slika 3.3), dok su od fenilpropanoidea (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub> skelet) nađeni samo derivati cimetne kiseline **8-13** (slika 3.4). Pored toga, izolovana su i tridepsida: hlorogenska kiselina (**14**), ruzmarinska kiselina (**15**) i njen metil estar (**16**), kao i dva lignana, litosperminska (**17**) i elaginska kiselina (**18**) (slika 3.5) (Fecka i Cisowski, 1999; Hoerhammer et al., 1962; Shelukhina et al., 2011; 2010; Swiatek et al., 1987; Wagner et al., 1970). (Polifeno)ne kiseline se kod ove biljne vrste akumuliraju u većoj količini u nadzemnom delu u odnosu na koren (Swiatek et al., 1987), a od gore navedenih, najzastupljenija je ruzmarinska kiselina (Fecka i Cisowski, 1999) kojoj se u najvećoj meri i pripisuje antioksidantna aktivnost ekstrakata ove biljne vrste (Lamaison et al., 1991).



**SLIKA 3.3.** DERIVATI C<sub>6</sub>C<sub>1</sub> I C<sub>6</sub>C<sub>2</sub> SKELETA NAĐENI U VRSTI *L. EUROPAEUS*: P-HIDROKSIBENZOVA (**1**), GENTIZINSKA (**2**), PROTOKATEUKARBOKSILNA (**3**), VANILINSKA (**4**) I SIRINGINSKA KISELINA (**5**), PROTOKATEHUALDEHID (**6**) I (P-HIDROKSIFENIL)SIRCETNA KISELINA (**7**)

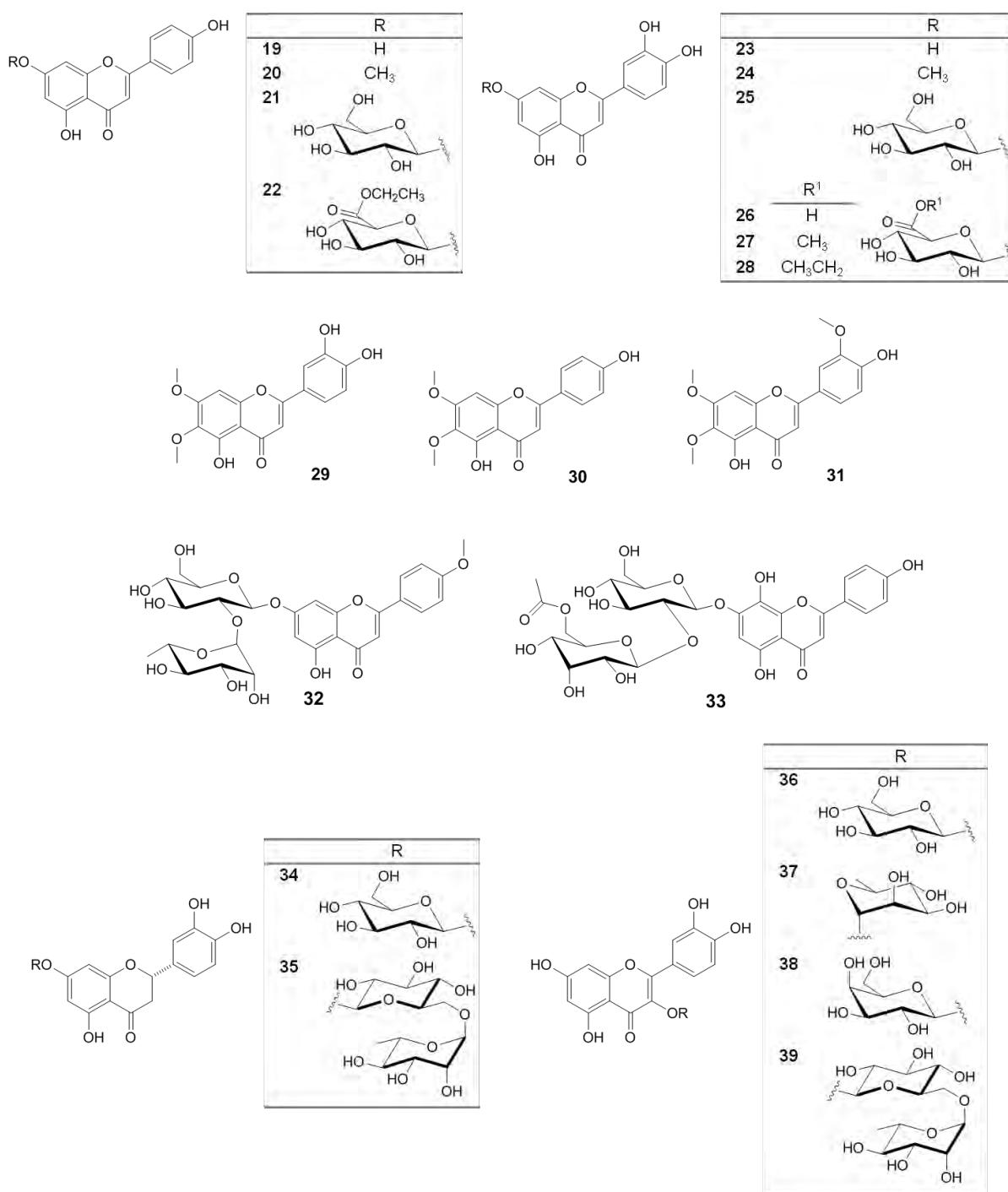
SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

**SLIKA 3.4.** (POLI)HIDROKSICIMETNE KISELINE NAĐENE U VRSTI *L. EUROPAEUS*: *TRANS-P*-KUMARINSKA KISELINA (**8**), *TRANS*-KAFENA KISELINA (**9**) I NJEN ETIL ESTAR (**10**), *TRANS*-FERULINSKA (**11**), *TRANS*-IZOFERULINSKA (**12**) I *TRANS*-SINAPINSKA KISELINA (**13**)



**SLIKA 3.5.** DEPSIDI I LIGNANI NAĐENI U BILJNOJ VRSTI *L. EUROPAEUS*

Iako su među flavonoidima detektovani samo flavoni, poput apigenina (**19**), luteolina (**23**) i njihovih 7-*O*-metilovanih derivata **20** i **24** (Kartnig i Bucar, 1995), u glikozidno vezanom obliku se pored flavona kao aglikoni javljaju i flavanon eriodiktiol (*eriodictyol*; **34** i **35**) i flavonol kvercetin (**36-39**) (Bucar et al., 1995; Shelukhina et al., 2010). Šećerni deo u ovim flavonoidnim glikozidima je strukturno veoma različit i obuhvata monosaharide glukuzu (**21**, **25**, **34** i **36**) i galaktozu (**38**), glukuronsku kiselinu i njene estre (**22** i **26-28**), deoksi šećer L-ramnozu (**37**), kao i neke disaharide (**32**, **33**, **35** i **39**) (slika 3.6) (Bucar et al., 1995; Bucar i Karting, 1994; Hoerhammer et al., 1962; Kartnig i Bucar, 1995; Shelukhina et al., 2011). Utvrđeno je da biljna vrsta *L. europaeus* na površini svojih listova akumulira flavone **29-31** i prepostavlja se da ovi površinski flavonoidi mogu imati različite funkcije poput hemijske zaštite od patogena i štetnog UV zračenja, ili u smanjenu transpiraciju pri adaptaciji biljne vrste na bezvodna staništa (Tomas-Barberan i Wollenweber, 1990).

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*SLIKA 3.6. FLAVONOIDI I FLAVONOIDNI GLIKOZIDI NAĐENI U VRSTI *L. EUROPAEUS*

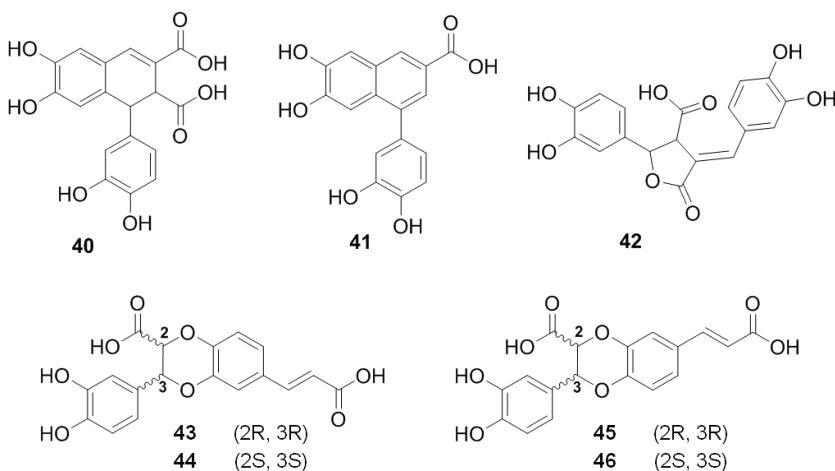
Jedna od najčešćih etnofarmakoloških upotreba biljne vrste *L. europaeus* je u lečenju blađih oblika hipertireoze (Tucakov, 1984). Pored antitireotropne, u više farmakoloških studija je dokazana i antigenadotropna aktivnost ekstrakta ove biljne vrste (Beer et al., 2008; Vonhoff et al., 2006; Winterhoff, 1988). Ovi efekti slični hormonima pripisuju se upravo

---

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

---

polifenolnim jedinjenjima, i to prevashodno derivatima kafene (**9**) i ruzmarinske kiseline (**15**) (Fecka i Cisowski, 1999). Međutim, načelo je da je aktivnost pojedinačnih fenolnih jedinjenja znatno slabija u odnosu na sirovi ekstrakt (Wojciechowski et al., 1995), pa se smatra da pravi aktivni principi nastaju bilo hemijskom ili enzimskom oksidacijom polifenolnih jedinjenja tokom procesa ekstrakcije (Winterhoff, 1988). U jednom od prvih radova koji se tiču ove problematike, Wagner i saradnici (Wagner et al., 1970) su objavili da litosperminska kiselina (**17**) iz ekstrakta listova vrste *L. europaeus* nije biološki aktivna, ali da, ukoliko se ona inkubira sa fenil-oksidazom iz listova ove biljne vrste, nastaje njen oksidacioni proizvod koji ima antigenadotropnu aktivnost. Ova aktivost se povećavala u prisustvu rutina (**37**) i hlorogenske kiseline (**14**). Takođe, pokazano je da kafena (**9**), hlorogenska (**14**), ruzmarinska (**15**) i elaginska kiselina (**18**) nemaju antitireotropnu aktivnost, ali da nakon procesa autooksidacije postaju aktivne (Aufmkolk et al., 1985). Načlost, zbog veoma male koncentracije u ekstraktima, struktura pravih aktivnih principa još uvek nije određena. Međutim, pokazano je da ciklolignani **40** i **41**, koji nastaju *in vitro* oksidacijom kafene kiseline (**9**) kalijum-permanganatom, poseduju izrazitu antigenadotropnu aktivnost (Nahrstedt et al., 1990). Ovi ciklolignani nastaju i pri oksidaciji kafene kiseline veoma aktivnom i selektivnom (prema *o*-difenolima) katehol-oksidazom koja je izolovana iz vrste *L. europaeus* (Rompel et al., 1999a; 1999b). Pored ova dva, detektovano je još šest proizvoda, od kojih je pet strukturno okarakterisano, a jedan predstavlja lakton dihidrokafene kiseline **42**, a preostala četiri su izomerni neolignani, tzv. kafeicini **43-46** (slika 3.7) (Rompel et al., 1999b). Pored toga, ustaljeno je da tokom hemijske oksidacije polifenola, može simultano doći i do reakcije nastalog hinona sa nekim polifenolom pri čemu nastaju agregati tzv. kvinhidroni (*quinhydrones*) koji, takođe, imaju jako antigenadotropno dejstvo, a posebno aktivnim su se pokazali agregati hinona ruzmarinske kiseline sa kafenom kiselinom ili kateholom (Gumbinger et al., 1990).

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

SLIKA 3.7. PROIZVODI ENZIMSKE I HEMIJSKE OKSIDACIJE KAFENE KISELINE (9)

Ispitana je i antigenadotropna aktivnost tri flavonoidna glikozida koja su izolovana iz ove biljne vrste: apigenin-7-glukozida (**21**), luteolin-7-glukozida (**25**) i luteolin-7-glukuronida (**26**), i načelo je da je jedino aktivan pomenuti glukuronid **26**. Kako je pokazano da su svi glikozidi približno jednakim podložni oksidaciji nameće se zaključak da uočena aktivnost zavisi od strukture šećernog dela (Gumbinger et al., 1992). U prilog ovoj tvrdnji ide i činjenica da apigenin (**20**), luteonin (**23**) i njihovi 7-glukozidi, **21** i **25**, kao i proizvodi autooksidacije ovih jedinjenja nemaju antitireotropno dejstvo (Aufmkolk et al., 1985).

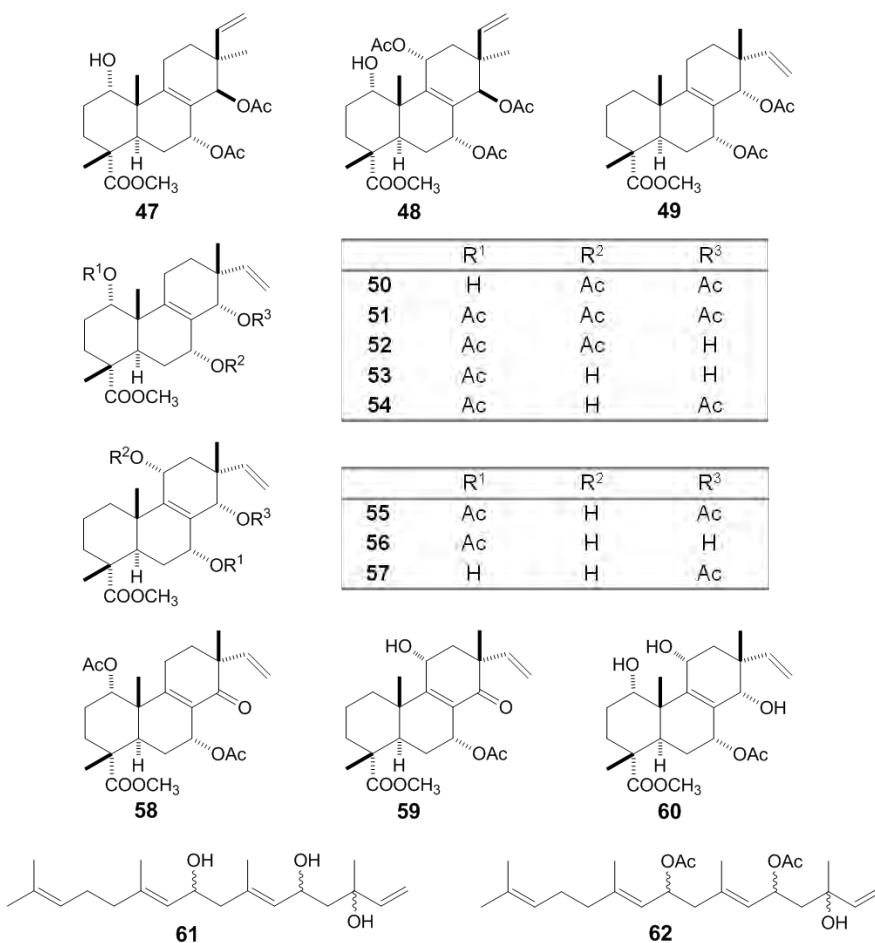
### 3.2.2. DITERPENI

Prvi diterpen, iz nadzemnog dela biljne vrste *L. europaeus*, izolovli su i strukturno okarakterisali kao metil-1 $\alpha$ -hidroksi-7 $\alpha$ ,14 $\beta$ -diacetoksi-8,15-pimaradien-18-oat (**47**) naučnici iz naše zemlje (Jeremić et al., 1985). Ista istraživačka grupa je izolovala još jedan, ali tetraoksigenovani, metil estar 8,15-pimaradienske kiseline **48** (Milosavljević et al., 1986). Međutim, narednih nekoliko istraživanja pokazalo je da ova biljna vrsta u svom nadzemnom delu akumulira diterpene izopimaranskog skeleta sa različitim položajem, stepenom i vrstom oksigenacije na prstenovima A i C (**49-60**) (slika 3.8) (Gibbons et al., 2003; Hussein et al., 1999; Hussein i Rodriguez, 2000). Ova razlika bi se mogla objasniti postojanjem dva različita hemotipa vrste *L. europaeus*, od kojih jedan raste u Srbiji, a drugi u Španiji i Velikoj Britaniji. Međutim, Husein i saradnici (Hussein et al., 1999) su izolovali diterpen **50** čiji su  $^1\text{H}$ - i  $^{13}\text{C}$ - NMR spektralni podaci bili potpuno identični sa prethodno objavljenim za pimaranski diterpen **47** (Jeremić et al., 1985), ali je na osnovu kristalografske analize

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

(difrakcijom X-zraka na monokristalima) utvrđeno da jedinjenje **50** nema pimaranski već izopimaranski skelet (Hussein et al., 1999). Pored cikličnih diterpena, izolovana su još dva aciklična diterpena **61** i **62** koji se smatraju prekursorima u biosintezi terpena izopimaranskog skeleta (Gibbons et al., 2003; Hussein i Rodriguez, 2000).

Iako je do sada izolovano petnaestak diterpena, u samo jednom istraživanju je ispitana njihova biološka aktivnost i tom prilikom je ustanovljeno da jedinjenja **51-54**, **61** i **62** (slika 3.8), pri koncentraciji od 512 µg/ml, nisu aktivna prema multirezistetnim sojevima bakterije *Staphylococcus aureus*: IS-58 (TetK-rezistentan prema tetraciklinu), RN4220 (MsrA-rezistentan prema eritromicinu) i SA-1199B (NorA- rezistentan prema norfloksacinu). Međutim, njihova primena u dozi od 10 µg/ml u kombinaciji sa tetraciklinom ili eritromicinom je snažavač dva puta minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIC) ovih antibiotika, odnosno, smanjivala rezistenciju odgovarajućih sojeva *S. aureus* (Gibbons et al., 2003).



SLIKA 3.8. STRUKTURE DITERPENA IZLOGOVANIH IZ BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS*

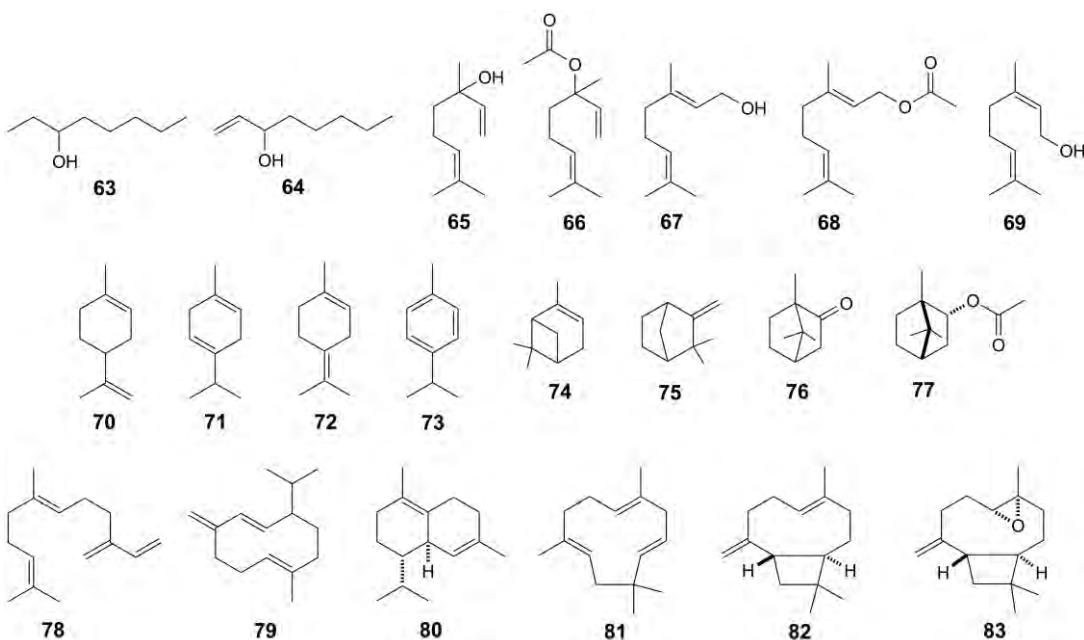
SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

## 3.2.3. SASTOJCI ETARSKOG ULJA

Sastav etarskog ulja biljne vrste *L. europaeus* je bio predmet dva istraživanja u okviru kojih je identifikovano ukupno 20 sastojaka (slika 3.9). Šaripov i saradnici (Sharipov et al., 1969) su odredili samo kvalitativni sastav ulja, a svih 13 jedinjenja koje su identifikovali pripadala su monoterpenima, od kojih je pet bilo acikličnih (linalool (**65**), linalil-acetat (**66**), geraniol (**67**), geranil-acetat (**68**) i nerol (**68**)), četiri sa *p*-mentanskim (limonen (**70**),  $\gamma$ -terpinen (**71**),  $\alpha$ -terpinolen (**72**) i *p*-cimen (**73**)) i četiri sa bicikličnim skeletom ( $\alpha$ -pinen (**74**), kamfen (**75**), kamfor (**76**) i bornil-acetat (**77**)). Dvadesetak godina kasnije Lorens (Lawrence, 1989) je izvršio i kvalitativnu i kvantitativnu analizu ulja i identifikovao 10 sastojaka, među kojima su (i po broju i po sadržaju) dominirali seskviterpeni (tabela 3.2). Glavni sastojci su bili (*E*)- $\beta$ -kariofilen (**82**), sa sadržajem od 24,9%, i (*E*)- $\beta$ -farnezen (**70**), sa sadržajem od 17,0%. Od monoterpena detektovani su samo linalool (**65**) i limonen (**70**), i ovo su jedina dva sastojka koja su načela prilikom obe analize.

TABELA 3.2. HEMIJSKI SASTAV ETARSKOG ULJA BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS* (LAWRENCE, 1989)

NAZIV JEDINJENJA	OZNAKA	SADRŽAJ [%]	KLASA
3-Oktanol	<b>63</b>	1,6	MMK
1-Okten-3-ol	<b>64</b>	1,0	MMK
Linalool	<b>65</b>	1,0	M
Limonen	<b>70</b>	2,0	M
( <i>E</i> )- $\beta$ -Farnezen	<b>78</b>	17,0	S
Germakren D	<b>79</b>	4,5	S
$\delta$ -Kadinen	<b>80</b>	2,0	S
$\alpha$ -Humulen	<b>81</b>	2,6	S
( <i>E</i> )- $\beta$ -Kariofilen	<b>82</b>	24,9	S
Kariofilen-oksid	<b>83</b>	3,2	S
UKUPNO		59,8 (10)	
JEDINJENJA IZVEDENA IZ METABOLIZMA MASNIH KISELINA (MMK)		2,6 (2)	
MONOTERPENI (M)		3 (2)	
SESKVITERPENI (S)		54,2 (6)	
PRINOS ULJA		<0,01%	

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*SLIKA 3.9. STRUKTURE SASTOJAKA ETARSKOG ULJA BILJNE VRSTE *L. europaeus*

## 3.2.4. JEDINJENJA IZVEDENA IZ METABOLIZMA MASNIH KISELINA

Kvalitativni i kvantitativni sastav alkana vrste *L. europaeus*, koji su deo voskova na površini listova, određen je u okviru istraživanja hemotaksonomskog značaja sastava ovih sekundarnih metabolita kod predstavnika familije Lamiaceae (Maffei, 1994). Tom prilikom su detektovani alkani normalnog niza (*n*-alkani) od C<sub>25</sub> do C<sub>35</sub> među kojima su *n*-alkani sa neparnim brojem bili zastupljeniji od *n*-alkana sa parnim brojem C-atoma u ugljovodoničnom nizu. Takson *L. europaeus* pripada grupi vrsta koja u najvećoj meri biosintetišu hentriakovitane (*n*-C<sub>31</sub>). Pored *n*-alkana nađeni su i predstavnici račvastih alkana: 2-metilalkani (tzv. *izo*-alkani) i 3-metilalkani (tzv. *anteizo*-alkani) (tabela 3.3).

Ispitivanje sadržaja vezanih masnih kiselina u plodovima ove biljne vrste pokazalo je da su najzastupljenije uobičajene masne kiseline: palmitinska, stearinska, oleinska, linolna i linolenska (Lotti i Vincenzo, 1969), a za poslednje dve je nađeno da ih ima najviše i u dijasporama (Kozlowski et al., 1998).

### 3.3. SEKUNDARNI METABOLITI BILJNE VRSTE *LYCOPUS EXALTATUS* L.F.

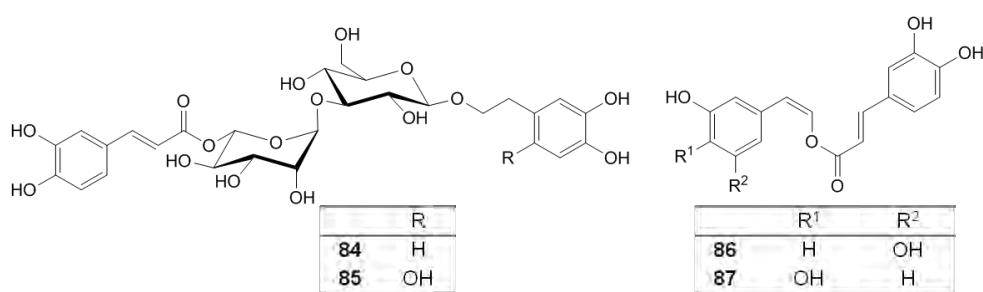
Za razliku od vrste *L. europaeus*, vrsta *L. exaltatus* je bila predmet svega nekoliko objavljenih hemijskih istraživanja, prevashodno u okviru nekih većih studija hemotaksonomskog značaja pojedinih klasa sekundarnih metabolita u okviru familije Lamiaceae. U već pomenutom istraživanju u kome je određen sastav površinskih alkana listova vrste *L. europaeus*, određen je i sastav alkana vrste *L. exaltatus* (tabela 3.3), a koji je veoma sličan onome opisanom za alkane vrste *L. europaeus* (Maffei, 1994). Ista istraživačka grupa je, takođe odredila sastav i ukupan sadržaj slobodnih i vezanih masnih kiselina listova i cvetova većeg broja vrsta iz familije Lamiaceae i razmatrala hemotaksonomski značaj dobijenih rezultata (Maffei i Scannerini, 1993). U listu i cvetu vrste *L. exaltatus* načene su samo ubičajene zasićene (sa parnim brojem C-atoma, C<sub>8</sub>–C<sub>20</sub>) i nezasićene masne kiseline (palmitooleinska, oleinska, linolna i linoleinska kiselina). Ukupni sadržaj masnih kiselina je bio veći u cvetovima nego u listovima, a u oba ova biljna organa bile su zastupljenije nezasićene od zasićenih kiselina, među kojima je najzastupljenija bila linoleinska kiselina (Maffei i Scannerini, 1993). Sličan sastav i sadržaj vezanih masnih kiselina, sa linoleinskom kiselinom kao najdominantnijom, načen je i u semenu ove biljne vrste tokom ispitivanja njihovog hemotaksonomskog značaja na nivou podfamilija u okviru familije Lamiaceae (Marin et al., 1991). Nedavno istraživanje je pokazalo da je i ova vrsta, poput vrste *L. europaeus*, bogat izvor polifenolnih jedinjenja, i da bi se stoga i ona eventualno mogla koristiti u lečenju hipertireoze. Izolovano je osam polifenolnih jedinjenja (protokatehualdehid (6), kafena kiselina (9), apeginin (19) i luteolin (23), kao i glukuronidi ova dva flavona 22 i 26–28, a sva su prethodno načena i kod vrste *L. europaeus* (Savina et al., 2013). Ispitan je i hemotaksonomski značaj pojedinih polifenolnih jedinjenja u okviru familije Lamiaceae. U istraživanju koje je obuhvatilo čak 355 vrsta iz 8 podfamilija iz familije Lamiaceae, uočeno je da ruzmarinska kiselina (15) predstavlja hemotaksonomski marker na nivou podfamilije Nepetoideae, kojoj pripadaju i vrste *L. europaeus* i *L. exaltatus*, dok su 3,4-dihidroksifenantanoidni glikozidi (akteozid (84) i 6-hidroksiakteozid (85), slika 3.10) karakteristični za podfamiliju Lamioideae. Prisustvo ili odsustvo upravo pomenutih polifenolnih jedinjenja kod vrsta familije Lamiaceae korelira i sa morfolojijom polena (Pedersen, 2000). Naime, ruzmarinska kiselina je načena kod svih vrsta koje imaju heksakolpatna polenova zrna, dok nije načena u vrstama sa trikolpatnim polenovim zrnima za

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

koje su karakteristični 3,4-dihidroksifeniletanoidni glikozidi. Pored ruzmarinske kiseline (**15**) načena su još dva hemotaksonomska markera za podfamiliju Nepetoideae, nepetoidini A i B (**86** i **87**, slika 3.10), dva biološki aktivna estra kafene kiseline, koja se nalaze na površini listova pripadnika ove podfamilije. Ova dva estra detektovana su kod više od 95% ispitivanih vrsta podfamilije Nepetoideae (među kojima je i vrsta *L. exaltatus*), a nisu načeni ni kod jednog predstavnika ostalih podfamilija u okviru Lamiaceae, kao ni kod predstavnika srodnih familija (poput Scrophulariaceae, Verbenaceae, itd.). Imajući ovo u vidu, zajedno sa činjenicom da se drugi značajni hemotaksonomski karakteri (poput količine etarskog ulja ili prisustva ruzmarinske kiseline (**15**)) mogu naći i kod vrsta koje pripadaju ostalim podfamilijama, jedinjenja **86** i **87** možda predstavljaju i najvažnije hemotaksonomske markere po kojima se podfamilija Nepetoideae razlikuje od podfamilije Lamioideae. Prisustvo ovog para estara kafene kiseline je još jedan dokaz koji podržava stanovište da vrste iz podfamilije Nepetoideae čine specijalizovanu i monofiletsku grupu unutar familije Lamiaceae (Grayer et al., 2003).

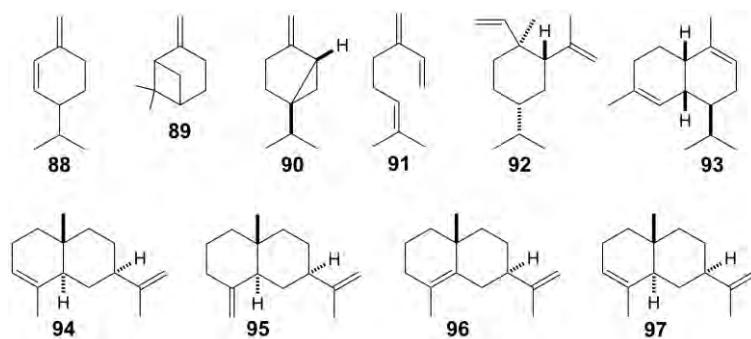
**TABELA 3.3.** UKUPNI SADRŽAJ I PROCENTNI SASTAV ALKANA SA POVRŠINE LISTOVA BILJNIH VRSTA *L. EUROPAEUS* I *L. EXALTATUS*

	BILJNA VRSTA	
	<i>L. EUROPAEUS</i>	<i>L. EXALTATUS</i>
<b>Ukupan sadržaj [mg/g]:</b>	0,38	0,28
	<b>SADRŽAJ [%]</b>	
<i>n-C<sub>25</sub></i>	0,1	0,1
<i>n-C<sub>26</sub></i>	0,1	0,1
<i>n-C<sub>27</sub></i>	1,0	2,1
<i>n-C<sub>28</sub></i>	0,9	1,4
<i>izo-C<sub>29</sub></i>	1,3	2,0
<i>n-C<sub>29</sub></i>	14,5	13,6
<i>izo-C<sub>30</sub></i>	-	0,2
<i>n-C<sub>30</sub></i>	4,1	4,0
<i>anteizo-C<sub>31</sub></i>	1,4	0,8
<i>n-C<sub>31</sub></i>	46,0	33,5
<i>izo-C<sub>32</sub></i>	0,4	1,9
<i>n-C<sub>32</sub></i>	6,2	6,9
<i>izo-C<sub>33</sub></i>	1,4	1,2
<i>n-C<sub>33</sub></i>	19,0	25,1
<i>anteizo-C<sub>34</sub></i>	0,4	2,6
<i>n-C<sub>34</sub></i>	0,7	1,4
<i>n-C<sub>35</sub></i>	0,2	0,9

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

SLIKA 3.10. NEKA OD HEMOTAKSONOMSKI VAĆNIH JEDINJENJA PODFAMILIJA LAMIOIDEAE I NEPETOIDEAE

Lawrence (1989) je u okviru svog ispitivanja sastava etarskog ulja predstavnika 37 rodova familije Lamiaceae, pored već pomenutog sastava ulja vrste *L. europaeus*, odredio i sastav etarskih ulja još 4 vrste ovog roda, među kojima je i *L. exaltatus*. Iako su u ovom ulju seskviterpeni i po broju i količinsko bili nešto zastupljeniji od monoterpena, glavni sastojak je bio biciklični monoterpen  $\alpha$ -pinen (74; 16,6%, tabela 3.4, slika 3.11), koji u svojoj strukturi sadrži [3.1.1] premošćeni sistem. Ukupni sadržaj monoterpena je bio znatno veći kod vrste *L. exaltatus* nego kod vrste *L. europaeus*, a zanimljivo je da monoterpeni pinanskog skeleta,  $\alpha$ -pinen (74) i  $\beta$ -pinen (89), uopšte nisu detektovani u ulju vrste *L. europaeus* (Lawrence, 1989). Međutim, Šaripov i saradnici (Sharipov et al., 1969) su detektovali  $\alpha$ -pinen (74) kao sastojak ulja vrste *L. europaeus*. Za razliku od etarskog ulja vrste *L. europaeus* gde je seskviterpen (*E*)- $\beta$ -kariofilen (82) bio glavni sastojak (24,9%), u ulju vrste *L. exaltatus* sadržaj ovog jedinjenja je bio znatno niži (7,0%), a među seskviterpenima su dominirala jedinjenja eudezmanskog skeleta 94-97.

SLIKA 3.11. NEKI OD SASTOJAKA ETARSKOG ULJA BILJNE VRSTE *L. EXALTATUS*<sup>‡</sup>

<sup>‡</sup> Na slici je data moguća struktura jedinjenja 97, odnosno pretpostavljeno je da je reč o epimeru  $\alpha$ -selinena (94).

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

Zanimljivo je da vrste roda *Lycopus*, iako pripadaju podfamiliji Nepetoideae i imaju heksakolpatna polenova zrna, odlikuje nizak sadr̄aj etarskog ulja, što se smatra karakteristikom vrsta podfamilije Lamioideae, odnosno vrsta sa trikolpatnim polenovim zrnima. Generalno, smatra se da etarskim uljem bogate vrste familije Lamiaceae karakteriše visok sadr̄aj monoterpena i nizak sadr̄aj seskviterpena, dok uljem siromašne vrste imaju obrnut odnos količina ove dve klase sekundarnih metabolita i, skoro neizostavno, germakren D (79) kao jedan od glavnih sastojaka (Lawrence, 1989).

TABELA 3.4. HEMIJSKI SASTAV ETARSKOG ULJA BILJNE VRSTE *L. EXALTATUS* (LAWRENCE, 1989)

NAZIV JEDINJENJA	OZNAKA	SADRŽAJ [%]	KLASA
<u>3-Oktanol</u> <sup>i</sup>	<b>63</b>	0,4	MMK
<u>Limonen</u>	<b>70</b>	0,7	M
$\gamma$ -Terpinen	<b>71</b>	1,4	M
$\beta$ -Felandren	<b>88</b>	0,6	M
<i>p</i> -Cimen	<b>73</b>	0,5	M
$\alpha$ -Pinen	<b>74</b>	16,6	M
$\beta$ -Pinen	<b>89</b>	12,5	M
Sabinen	<b>90</b>	1,5	M
$\beta$ -Mircen	<b>91</b>	14,5	M
$\beta$ -Elemen	<b>92</b>	2,0	S
$\gamma$ -Murolen	<b>93</b>	0,6	S
$\alpha$ -Selenen	<b>94</b>	15,5	S
$\beta$ -Selenen	<b>95</b>	0,5	S
Selina-4,11-dien	<b>96</b>	6,6	S
Selinadien <sup>ii</sup>	<b>97</b>	16,4	S
<u>Germakren D</u>	<b>79</b>	1,8	S
<u>(E)-<math>\beta</math>-Kariofilen</u>	<b>82</b>	7,0	S
<u>Kariofilen-oksid</u>	<b>83</b>	0,2	S
UKUPNO		99,3 (18)	
JEDINJENJA IZVEDENA IZ METABOLIZMA MASNIH KISELINA (MMK)		0,4 (1)	
MONOTERPENI (M)		48,3 (8)	
SESKVITERPENI (S)		50,6 (9)	
PRINOS ULJA		0,02%	

<sup>i</sup> Podvućeni sastojci su načeni i u etarskom ulju biljne vrste *L. europaeus*;<sup>ii</sup> Nije određen tačan položaj dvogubih veza u ovom jedinjenju.

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*3.4. SISTEMATIKA RODA *INULA*

*Inula* L. je rod familije Asteraceae (glavočike) koji obuhvata stotinak vrsta rasprostranjenih u umerenim i toplijim predelima Evrope, Azije i Afrike, a posebno duž obale Mediterana (Zhao et al., 2006). Ovaj rod obuhvata višegodišnje zeljaste biljke koje uglavnom naseljavaju vlažna staništa, poput vlažnih livada i obala šumskih potoka. Osnovne morfološke karakteristike ovog roda su:

- ◆ pojedinačne glavice ili u gronjastim ili metličastim cvastima koje su najčešće velike, heterogomne, sa mnogo cvetova i sa poluloptastim involukrumom;
- ◆ listići involukruma su porečani gusto kao crepovi na krovu, u mnogo redova, a spoljni su često slični listovima;
- ◆ cvetna loža je ravna i gola, središnji cvetovi (cvetovi diska) su hermafroditni, sa cevasto levkastim krunicama i sa 5 zubaca, dok su obodni cvetovi ţenski, jezičasti, na vrhu sa 3-5 zubaca, ţuti i u jednom redu;
- ◆ papus je sačinjen od čekinjastih, skoro jednakih dlačica, raspoređenih u jednom ili dva reda;
- ◆ ahenijska je gola ili sa dlakama, okruglasta ili sa 4-5 ivica (Josifović, 1974).

U tabeli 3.5 je prikazano filogenetsko stablo roda *Inula*.

TABELA 3.5. FILOGENETSKO STABLO<sup>§</sup> RODA *INULA*

TAKSONOMSKE KATEGORIJE	TAKSONI
<i>Regnum – Carstvo</i>	Plantae
<i>Subregnum – Podcarstvo</i>	Viridaeplantae
<i>Phylum – Odeljak</i>	Tracheophyta
<i>Subphylum – Pododeljak</i>	Euphylophytina
<i>Classis – Klasa</i>	Spermatopsida
<i>Subclassis – Podklasa</i>	Magnoliidae
<i>Ordo – Red</i>	Asterales
<i>Familia – Familija</i>	Compositae (Asteraceae)
<i>Subfamilia – Podfamilija</i>	Astroideae
<i>Tribus – Plemе</i>	Inuleae
<i>Genus – Rod</i>	<i>Inula</i>

<sup>§</sup>Systema Naturae 2000 (<http://sn2000.taxonomy.nl/>).

---

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

---

U Srbiji je ovaj rod zastupljen sa jedanaest vrsta među kojima je najrasprostranjenija vrsta *Inula helenium* L., u narodu poznata kao oman ili beli oman (Josifović, 1974; slika 3.12).



SLIKA 3.12. IZGLED (CVETA, LISTA I KORENA) BILJNE VRSTE *I. HELENIUM*

### 3.5. SEKUNDARNI METABOLITI BILJNE VRSTE *INULA HELENIUM* L.

Biljna vrsta *I. helenium* od davnina ima reputaciju izuzetno lekovite vrste sa veoma raznovrsnom entnofarmakološkom upotrebom. Čaj pripremljen od korena ove biljne vrste se širom Evrope, pa i u našoj zemlji, tradicionalno upotrebljava kao ekspektorant u tretmanu respiratornih problema (poput astme, bronhitisa i velikog kašlja), zatim kao stomahik, sredstvo protiv nadimanja kod poremećaja u varenju (poput hroničnog enterogastritisa) i kao diuretik kod urinarnih infekcija. Takođe smatra se da ima blagotvorno dejstvo i kod nekih kočnih bolesti (poput suvog lišaja i svraba), reumatizma i urečenja menstrualnog ciklusa (Čanadanović-Brunet et al., 2002; Huo et al., 2008b; Tucakov, 1984; Zhao et al., 2006).

---

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

---

Pored gore navedenog, u Kini i Severnoj Americi preparati na bazi korena ove biljne vrste korišćeni su i u lečenju tuberkuloze (Konishi et al., 2002).

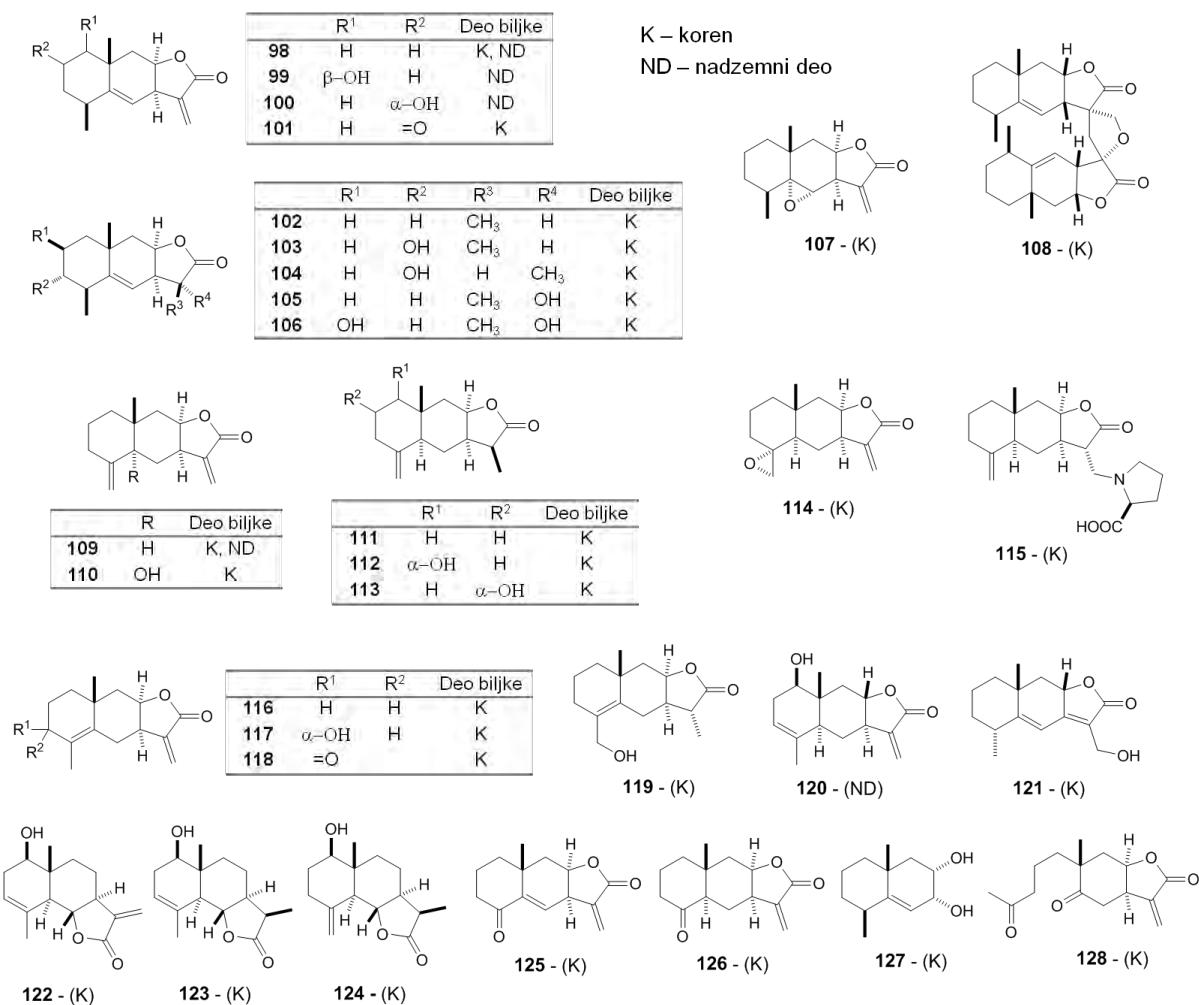
Intenzivna istraživanja hemijskog sastava i farmakološke aktivnosti ekstrakata i etarskog ulja korena ove biljne vrste počela su još 60-tih godina prošlog veka. Rezultati ovih istraživanja su u značajnoj meri potvrdili, odnosno opravdali široku upotrebu ove biljne vrste u narodnoj medicini. Naime, načelo je da i etarsko ulje i ekstrakti korena pokazuju široki spektar *in vitro* antimikrobne aktivnosti (Deriu et al., 2008; Stojanović-Radić et al., 2012), a potvrđeno je i da su heksanski, dihlormetanski i metanolni ekstrakti izuzetno aktivni prema bakteriji *Mycobacterium tuberculosis*, uzročniku tuberkuloze (Cantrell et al., 1998). Pored toga, utvrđeno je da ekstrakti korena ove biljne vrste poseduju i dobra antiinflamatorna (Park et al., 2013), antitumorska (Dorn et al., 2006; Spiridonov et al., 2005) i antioksidantna svojstva (Canadianović-Brunet et al., 2002; Spiridon et al., 2011). Navedene farmakološke aktivnosti su dovedene u vezu sa visokim sadržajem seskviterpenskih laktona, pre svega alantolaktona (98), dihidroalantolaktona (102), izoalantolaktona (109) i dihidroizoalantolaktona (111) (Canadianović-Brunet et al., 2002). Pored seskviterpenskih laktona, za koren ove biljne vrste karakterističan je i visok sadržaj inulina (preko 40%; Bell i Palmer, 1952), a izolovan je ili detektovan i značajan broj polifenolnih jedinjenja (Kolesnikov i Gins, 2001; Kowalewska i Lutomski, 1978; Nan et al., 2011; Spiridon et al., 2011; Wojdyło et al., 2007).

### 3.5.1. SESKVITERPENSKI LAKTONI

Do sada je iz korena i nadzemnog dela biljne vrste *I. helenium* izolovano i spektralno okarakterisano preko 50 seskviterpenskih laktona. Najbrojniji su seskviterpenski laktoni eudezmanskog skeleta (slika 3.13) i to derivati alantolaktona (100, 101 i 107), dihidroalantolaktona (103-106), izoalantolaktona (110 i 114), dihidroizoalantolaktona (112 i 113) i diplofilina (116-118) sa različitim položajem, stepenom i vrstom oksigenacije (Bohlmann et al., 1978; Cantrell et al., 2010; Cantrell et al., 1999; Jiang et al., 2011; Konishi et al., 2002; Li et al., 2012; Ma et al., 2008; Vajs et al., 1989; Yan et al., 2012, 2010; Zaima et al., 2014; Zhao et al., 2010b). Takođe izolovan je i dimer alantolaktona tzv. bialantolakton (108) (Jiang et al., 2011), nekoliko njegovih *nor* 125-127 (Huo et al., 2008a; Jiang et al., 2011) i jedan *seco* derivat 128 (Jiang et al., 2011), kao i adukt izoalantolaktona sa L-prolinom 115 koji je nazvan izoheliprolin (Zaima et al., 2014). Kod svih do sada pobrojanih jedinjenja

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

$\gamma$ -laktonski prsten je formiran između C atoma u položajima 8 i 12 na eudezmanskom skeletu ( $C(8)-O-C(12)=O$  serija) i, izuzev kod jedinjenja **108**, **120** i **121**, estarska C(8)-O veza ima  $\beta$ -konfiguraciju. Međutim, načina su i tri derivata (tzv. ciklokostunolidi) **122-124** kod kojih je  $\gamma$ -laktonski formiran između C atoma u položajima 6 i 12 na eudezmanskom skeletu pri čemu je konfiguracija C(6)-O veze  $\alpha$  (Li et al., 2012; Ma et al., 2008).

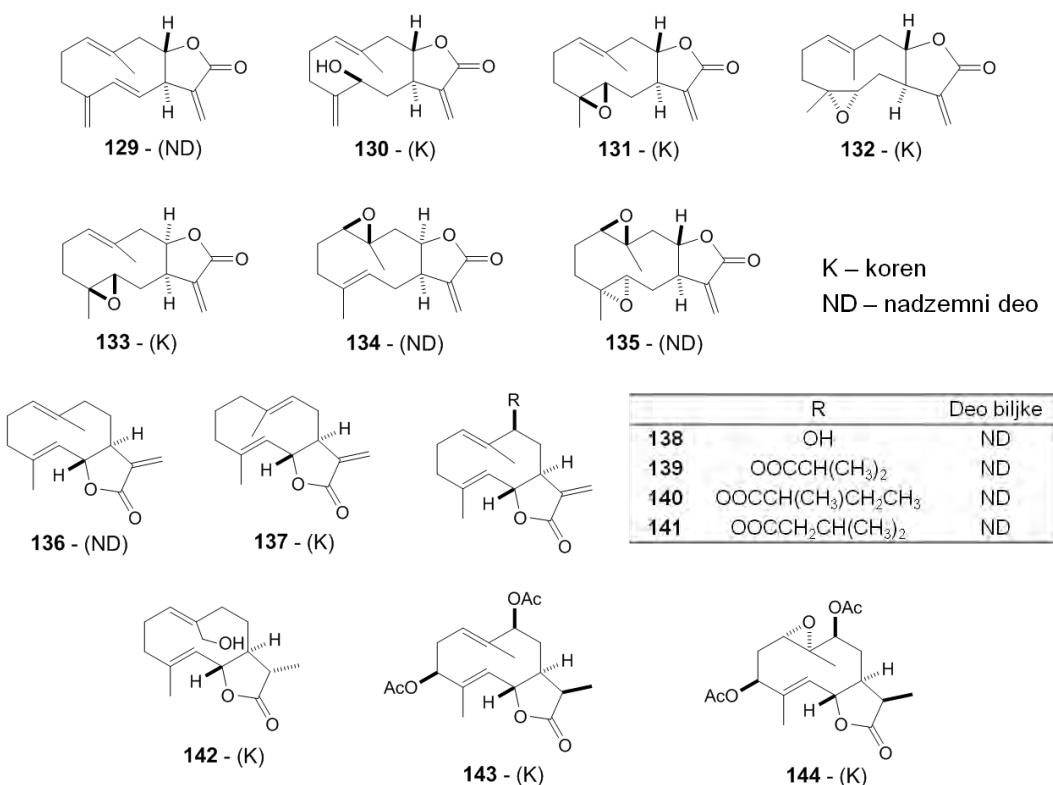


**SLIKA 3.13.** SESKVITERPENSKI LAKTONI EUDEZMANSKOG SKELETA I SRODNA JEDINJENJA IZOLOVANI IZ KORENA (K) I NADZEMNOG DELA (ND) BILJNE VRSTE *I. HELENIUM*

Pored seskviterpenskih laktona eudezmanskog skeleta, izolovan je i značajan broj onih sa germakranskim skeletom (**129-144**; slika 3.14) (Bohlmann et al., 1978; Chen et al., 2007; Huo et al., 2008; Jiang et al., 2011; Konishi et al., 2002; Li et al., 2012; Ma et al., 2008; Vajs et al., 1989). I u ovom slučaju se na osnovu položaja  $\gamma$ -laktonskog prstena mogu razlikovati dve serije:  $C(8)-O-C(12)=O$  i  $C(6)-O-C(12)=O$  (derivati kostunolida). U prvoj

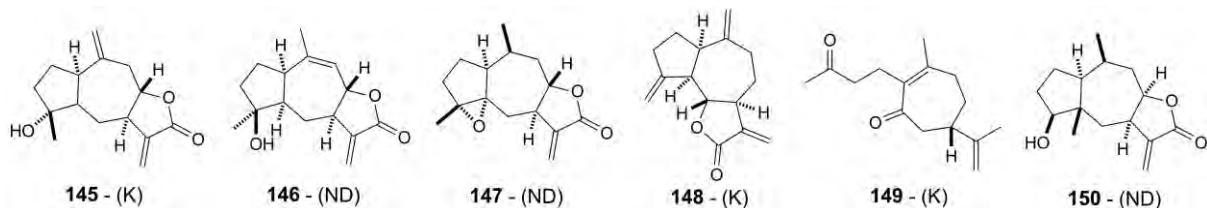
SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

seriji su načina jedinjenja i sa  $\alpha$  i sa  $\beta$  konfiguracijom C(8)-O veze, dok je kod predstavnika druge serije konfiguracija C(8)-O veze isključivo  $\alpha$ . Biosintetski gledano kod ove vrste seskviterpenskih laktona oksigenacija se uvodi epoksidacijom neke od dvogubih veza i/ili hidroksilacijom u određenom alilnom položaju, a uvedena OH grupa se najčešće dalje esterifikuje masnim kiselinama kratkog lanca.

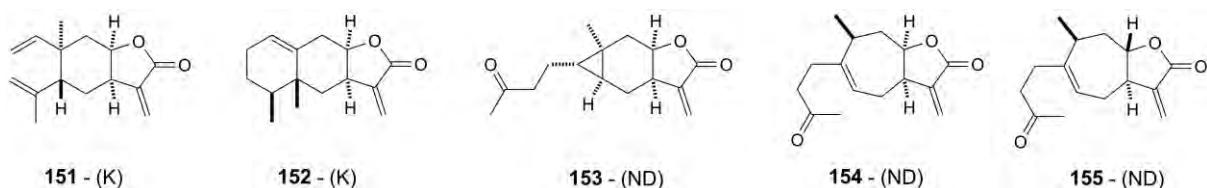


**SLIKA 3.14.** SESKVITERPENSKI LAKTONI GERMANKRANSKOG SKELETA IZOLOVANI IZ KORENA (K) I NADZEMNOG DELA (ND)  
BILJNE VRSTE *I. HELENIUM*

Od seskviterpenskih laktona drugih skeleta izolovana su četiri gvajanolida **145-148** (Bohlmann et al., 1978; Ma et al., 2008; Vajs et al., 1989; Zhao et al., 2010b), po jedan *secogenolid* **149** (Jiang et al., 2011) i *pseudo-gvajanolid* **150** (Bohlmann et al., 1978; slika 3.15), zatim po jedan elemanolid **151** (Konishi et al., 2002; Yan et al., 2010;), eremofilanolid **152** (Yan et al., 2010) i seskvikaranolid **153** (Bohlmann et al., 1978; Vajs et al., 1989), kao i dva ksantanolida **154** i **155** (Bohlmann et al., 1978; slika 3.16).

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

SLIKA 3.15. SESKVITERPENSKI LAKTONI GVAJANSKOG SKELETA I SRODNA JEDINJENJA IZOLOVANI IZ KORENA (K) I NADZEMNOG DELA (ND) BILJNE VRSTE *I. HELENIUM*



SLIKA 3.16. SESKVITERPENSKI LAKTONI DRUGIH SKELETA IZOLOVANI IZ KORENA (K) I NADZEMNOG DELA (ND) BILJNE VRSTE *I. HELENIUM*

Seskviterpenski laktoni predstavljaju veliku i izuzetno važnu grupu biološki aktivnih prirodnih proizvoda. Iako mogu imati veoma raznovrsnu strukturu zajednički fragment im je  $\gamma$ -laktonski prsten koji u  $\alpha$ -položaju najčešće ima egzo-metilensku grupu. Smatra se da je upravo  $\alpha,\beta$ -nezasićeni karbonilni sistem odgovoran za biološku aktivnost ove grupe jedinjenja jer predstavlja dobar Michael-ov akceptor koji lako može reagovati sa različitim (prirodnim) nukleofilima (Chaturvedi, 2011). Za seskviterpenske laktone izolovane iz biljne vrste *I. helenium* utvrđeno je da poseduju dobra antimikrobna (Cantrell et al., 1999; Qiu et al., 2011; Stojanović-Radić et al., 2012), antiviralna (Hwang et al., 2006), antialgalna (Cantrell et al., 2007) i antitumorska svojstva (Konishi et al., 2002; Li et al., 2012; Wei et al., 2013; Wu et al., 2013), kao i da pokazuju larvicidno dejstvo prema više vrsti komaraca (Cantrell et al., 2010; Konishi et al., 2008). Stoga se etnofarmakološka upoteba biljne vrste *I. helenium* povezuje sa visokim sadržajem (posebno u korenju) ove grupe prirodnih proizvoda.

Iako je načeno da ekstrakti i etarsko ulje ove biljne vrste pokazuju širok spektar *in vitro* antimikrobne aktivnosti (Deriu et al., 2008), njihovo dejstvo, a i dejstvo njihovih glavnih sastojaka – seskviterpenskih laktona, posebno je izraženo prema sojevima Gram-pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus* (Stojanović-Radić et al., 2012) uključujući i neke multirezistentne sojeve (O'Shea et al., 2009). U nedavnom istraživanju je utvrđeno da etarsko ulje korena *I. helenium* ispoljava baktericidno dejstvo prema soji *S. aureus* ATCC 6538 putem oštećenja ćelijske membrane, a hromatografsko frakcionisanje ulja je omogućilo

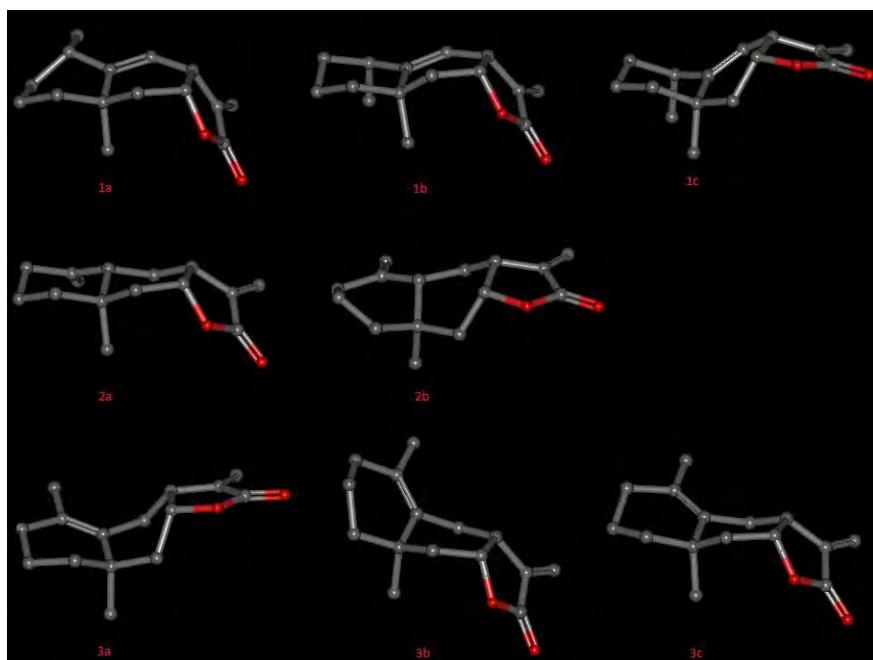
SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

identifikaciju alantolaktona (**98**), izoalantolaktona (**109**) i diplofilina (**111**) kao aktivnih sastojaka, pri čemu se smatra da je diplofilin najaktivniji jer je hromatografska frakcija najbogatija diplofilinom bila ujedno i najaktivnija (Stojanović-Radić et al., 2012; MIC = 0,2 µg/ml). U cilju lociranja farmakofore u ovim seskviterpenskim laktonima odgovorne za antistafilokokalnu aktivnost, etarsko ulje je, takođe podvrgnuto dvema hemijskim modifikacijama, katalitičkoj hidrogenizaciji (u cilju redukcije dvogubih veza) i redukciji natrijum-bor-hidridom (u cilju selektivog zasićenja dvogube veze konjugovane sa karbonilnom grupom), i daljem frakcionisanju dobijenih proizvoda. Kako su frakcije dobijene modifikacijom ulja i dalje pokazivale izuzetno dobru aktivnost, iako njihovi glavni sastojci (poput dihidroalantolaktona (**102**), dihidroizoalantolaktona (**111**), dihidrodiplofilina i izomernih eudesmen-8,12-diola) nisu više posedovali metilidensku grupu u  $\alpha$ -položaju na  $\gamma$ -laktonskom prstenu, zaključeno je da za aktivnost ovih seskviterpenskih laktona nije odgovoran isključivo pomenuti  $\alpha,\beta$ -nezasićeni karbonilni sistem (Stojanović-Radić et al., 2012). Konformaciona analiza najaktivnih sastojaka je pokazala da alantolakton (**98**) i izoalantolakton (**109**) pretežno zauzimaju tzv. „U” – konformaciju („zatvorene geometrije”) u kojoj je  $\alpha,\beta$ -nezasićeni karbonilni sistem sterno zaklonjen aksijalnom metil grupom u položaju 14, dok su cikloheksanski i  $\gamma$ -laktonski prsten u diplofilinu (**111**) međusobno tako orijentisani da zauzimaju tzv. „S” – konformaciju („otvorene geometrije”) u kojoj konjugovani sistem nije sterno zaklonjen (slike 3.17 i 3.18). Ove razlike u energetski najpovoljnijim konformacijama pomenutih laktona, tj. u sternoj zaklonjenosti karbonilne grupe, sigurno utiču i na način i jačinu njihove interakcije sa biomolekulima, pa se na ovaj način, makar delimično, može objasniti jača antistafilokokalna aktivnost diplofilina (**111**) u odnosu na alantolakton (**98**) i izoalantolakton (**109**) (Blagojević i Radulović, 2012). Interesantno je da su uporedno sa ovim istraživanjima Kui i saradnici (Qui et al., 2011) utvrdili da izoalantolakton (**109**) ne pokazuje *in vitro* antistafilokokalnu aktivnost, odnosno da ne inhibira rast više sojeva bakterije *S. aureus* (ATCC 29213, ATCC 10832, BAA-1717, 8325-4 i DU 1090) ni pri koncentraciji od 1024 µg/ml, ali i da istovremeno smanjuje *in vitro* produkciju faktora virulencije ( $\alpha$ -toksina<sup>\*\*</sup>) ovih sojeva pri veoma niskim koncentracijama (1-8 µg/ml), kao i da se u njegovom prisustvu smanjuju i oštećenja koja  $\alpha$ -toksin izaziva na

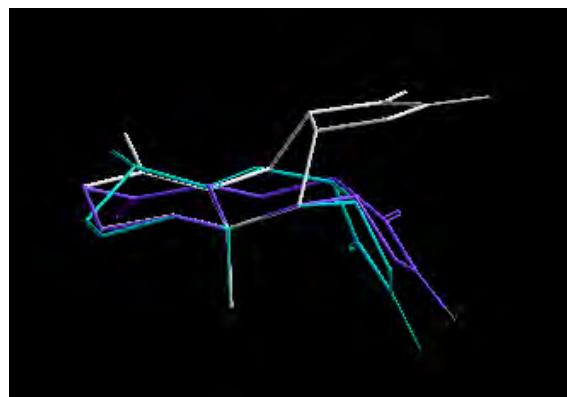
<sup>\*\*</sup>  $\alpha$ -Toksin je protein koji produkuju neke vrste soja *S. aureus* i koji oštećuje ćelijsku membranu tako što formira pore u njoj i dovodi do lize ćelije. Ovaj toksin pokazuje citotoksičnu, hemolitičku i dermonekrotičnu aktivnost prema više vrsta ćelija sisara uključujući eritrocite, monocite, limfocite i entotelialne ćelije (Qui et al., 2011).

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

Ijudskim A549 alveolarnim epitelnim ćelijama. Inače, smatra se da je  $\alpha$ -toksin jedan od glavnih činioča odgovornih za nastanak pneumonije kod infekcija bakterijom *S. aureus*, jer dovodi do oštećenja ćelija pluća. Takođe, u *in vivo* eksperimentu načeno je da izoalantolakton u dozi od 50 mg/kg sprečava nastanak pneumonije kod miševa inficiranih bakterijom *S. aureus* (Qui et al., 2011). Zanimljivo je da su Kantrel i saradnici (Cantrell et al., 1999) u istraživanju u kom su testirali jedanaest prirodnih i semisintetičkih eudezmanolida, u *in vitro* uslovima, na bakteriju *M. tuberculosis* našli da je  $\gamma$ -laktonski prsten koji u  $\alpha$ -položaju ima metilensku grupu neophodni strukturni fragment za aktivnost prema ovoj bakteriji. Naime, i alantolakton (98) i izoalantolakton (109) su bili aktivni pri koncentraciji (MIC) od 32  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , dok 11 $\alpha$ ,13-dihidroderivat izoalantolaktona (111) nije inhibirao rast ove bakterije ni pri koncentraciji od 128  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Kako su od svih testiranih eudezmanolida najaktivniji bili 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoksialantolakton (107) (MIC = 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) i encelin (3-okso-1(2),4(15),12-eudesmatrien-8 $\beta$ ,12-olid; MIC = 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zaključeno je da prisustvo dodatnog elektrofilnog centra poput epoksiда ili enona (osim pomenutog laktorskog prstena), a koje istovremeno ne dovodi do velikog smanjenja lipofilnosti molekula, može značajno povećati aktivnost seskviterpenskih laktona eudezmanskog skeleta prema bakteriji *M. tuberculosis* (Cantrell et al., 1999). Slični rezultati vezani za odnos strukture i aktivnosti dobijeni su i kod testiranja serije prirodnih i semisintetičkih germakranolida (Fischer et al., 1998).



**SLIKA 3.17.** ODABRANE DOMINANTNE KONFORMACIJE ALANTOLAKTONA (1A-C), IZOALANTOLAKTONA (2A I 2B) I DIPLOFILINA (3A-C; BLAGOJEVIĆ I RADULOVIĆ, 2012)

**SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

**SLIKA 3.18.** SUPERPONIRANE NAJSTABILNIJE KONFORMACIJE ALANTOLAKTONA (TIRKIZNO PLAVA STRUKTURA), IZOALANTOLAKTONA (PLAVA STRUKTURA) I DIPLOFILINA (BELA STRUKTURA)

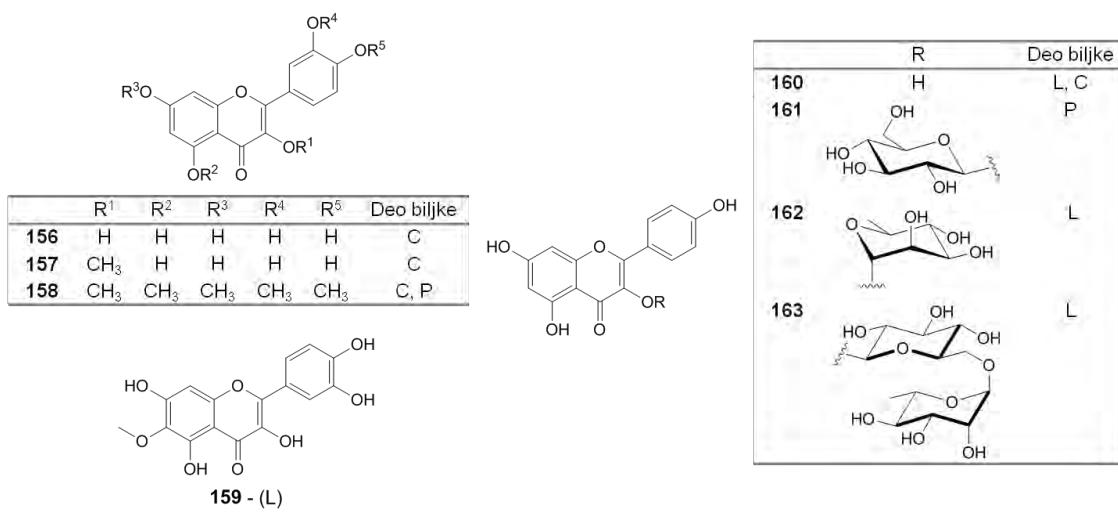
Nakon pionirskog istraživanja Konišija i saradnika (Konishi et al., 2002), tokom kog je utvrđeno da metanolni ekstrakt korena *I. helenium* i seskviterpenski laktoni izolovani iz njega, pokazuju značajnu antiproliferativnu aktivnost prema tri linije ćelija raka - ljudskog karcinoma tluca (MK-1) i materice (HeLa), i mišijeg melanoma (B16F10) - usledio je niz dodatnih istraživanja u kojima je ispitivana citotoksična aktivnost ekstrakata i njihovih glavnih sastojaka (seskviterpenskih laktona) i na druge linije ćelija raka, a donekle je rasvetljen i mehanizam njihovog delovanja. Dorn i saradnici (Dorn et al., 2006) su utvrdili da ekstrakti korena *I. helenium* pokazuju izuzetnu selektivnost prema različitim linijama ćelija raka (karcinoma debelog creva HT-29, pluća MCF-7, pankreasa Capan-2 i tzv. astrocitom G1) u odnosu na zdrave humane limfocite periferne krvi, dovodeći do promena na ćelijama raka sličnih nekrozi, pri čemu ne pokazuju mutagenična svojstva u Amesovom (Ames) testu. Što se tiče samog mehanizma delovanja, najveći broj istraživanja se odnosio na delovanje alantolaktona i izoalantolaktona (koji su obično i najzastupljeniji seskviterpenski laktoni u ovoj vrsti), pri čemu je utvrđeno da oba jedinjenja indukuju apoptozu, preko mitohondrijskog puta, kod različitih ćelija raka krvi, mozga, debelog creva itd. (Khan et al., 2012; Wei et al., 2013; Wu et al., 2013; Yang et al., 2013; Zhang et al., 2013; Zong et al., 2011), kao i da inhibiraju enzime za detoksifikaciju poput hinon-reduktaze i glutation-S-transferaze (Seo et al., 2009, 2008).

### 3.5.2. (POLI)FENOLNA JEDINJENJA

Predmet većeg broja prethodnih istraživanja bio je sastav, sadržaj i distribucija (poli)fenolnih jedinjenja u različitim organima biljne vrste *I. helenium*. Rezultati ovih

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

istraživanja su pokazali da su hidroksicimetne kiseline, kafena (**9**) i ferulinska (**11**), kao i konjugat kafene i hinske kiseline, hlorogenska kiselina (**14**), znatno zastupljeniji u korenju nego u ostalim biljnim organima (listovi i cvetovi). Takođe ekstrakti korena ove biljne vrste su, u više različitih testova (DPPH, ABTS, FRAP, itd.), pokazali umerena antioksidativna svojstva, u porečenju npr. sa ekstraktima nadzemnog dela biljnih vrsta *Origanum vulgare* L., *Salvia officinalis* L., *Rosmarinus officinalis* L. i *Hypericum perforatum* L., koja se pripisuju upravo ovim fenolnim kiselinama, jer je utvrđena mala zastupljenost flavonoida i flavonoidnih glikozida u korenju (Spiridon et al., 2011; Wojdylo et al., 2007). Za razliku od korena, nadzemni deo biljke (tj. listovi, cvetovi i polen) je znatno bogatiji flavonoidima i flavonoidnim glikozidima. Od flavonoida su prisutni samo flavonol kvercetin (**156**) i njegovi *O*-metilovani derivati **157** i **158** (slika 3.19; Kolesnikov i Gins, 2001; Kowalewska i Lutomski, 1978; Nan et al., 2011). Pored kvercetina (**159**), kao aglikoni, javljaju se još dva flavonola patuletin<sup>††</sup> i kempferol (**160**) i to glikozilovani u položaju C-3 monosaharidima, glukozom (**36**<sup>‡‡</sup> i **161**) ili ramnozom (**37** i **162**), ili disaharidom rutinozom ( $\alpha$ -L-ramnopiranozil-(1→6)- $\beta$ -D-glukopiranoza) izgrađenim od pomenuta dva monosaharida (**39** i **163**). Do sada je od derivata benzoeve kiseline detektovana samo gentizinska kiselina (**2**) i to slobodna samo u listovima, a u vezanom obliku pored listova i u cvetovima (Nan et al., 2011).



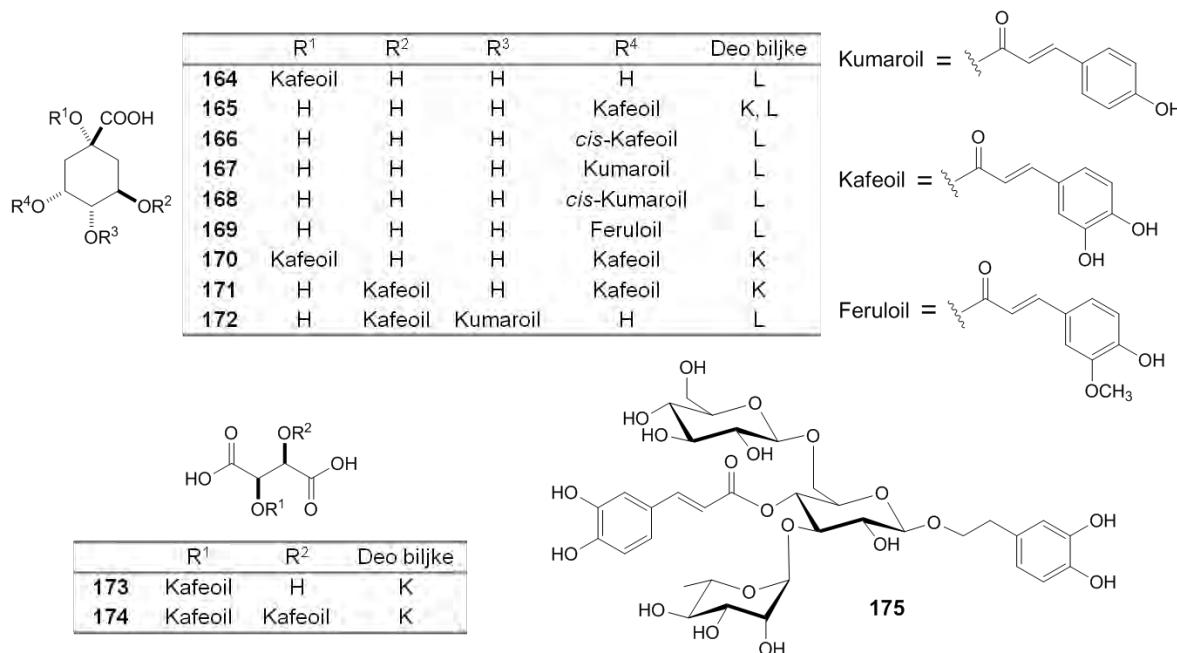
**SLIKA 3.19.** NEKI OD FLAVONOIDA I FLAVONOIDNIH GLIKOZIDA KOJI SU NAĐENI U LISTU (L), CVETU (C) I/ILI POLENU (P)  
BILJNE VRSTE *I. HELENIUM*

<sup>††</sup> Nije određen šećerni deo.

<sup>‡‡</sup> Kvercetin-3-*O*-glikozid (**36**) je detektovan u listovima, cvetovima i polenu, dok je ramnozid **37** nađen u listovima i cvetovima, a rutenozid **39** samo u listovima (Kolesnikov i Gins, 2001; Nan et al., 2011).

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

Pored već pomenute hlorogenske kiseline (**14**) (kod koje je  $R^2$  = kafeoil) detektovano je još nekoliko mono-estara hidroksicimetnih kiselina sa hinskom kiselinom (slika 3.20). Osim konjugata **164** u kome je estarska veza formirana između kafene kiseline i OH grupe u položaju 1 hinske kiseline (Jaiswal et al., 2011), kod svih ostalih konjugata esterifikovana je OH grupa u položaju 5 hinske kiseline ostacima (*E*)- ili (*Z*)-kafene (**165** i **166**), (*E*)- ili (*Z*)-*p*-kumarne (**167** i **168**) ili ferulinske kiseline (**169**) (Jaiswal et al., 2011; Olennikov i Tankhaeva, 2012; Wojdyło et al., 2007). Takođe, načina su i dva regioizomerna diestra hinske i kafene kiseline **170** i **171** (Olennikov i Tankhaeva, 2012), kao i mešoviti kafeoil-kumaroil estar **172** (Jaiswal et al., 2011). Pored navedenih estara sa hinskom kiselinom, u ovoj biljnoj vrsti su prisutni i analogni mono- i di-estri kafene kiseline sa vinskom kiselinom **173** i **174**, kao i ehinakozid, glikozid kafene kiseline **175** (Olennikov i Tankhaeva, 2012). U literaturi se navodi prisustvo još nekoliko polifenolnih jedinjenja (npr. kafeoil-glukoze, kvercetin-a,b,7-triglukozida<sup>§§</sup>, kvercetin-3-*O*-glukozil-galaktozida) čija struktura nije u potpunosti rasvetljena (Kolesnikov i Gins, 2001; Nan et al., 2011).



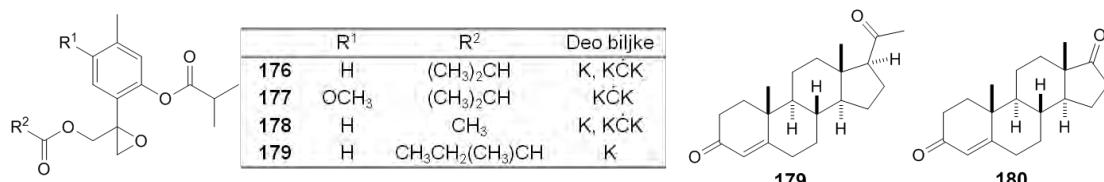
**SLIKA 3.20.** KONJUGATI HIDROKSICIMETNIH KISELINA I HINSKE, ODNOSNO VINSKE, KISELINE NAĐENI U KORENU (K), LISTU (L) ILI CVETU (C) BILJNE VRSTE *I. HELENIUM*

<sup>§§</sup> U ovom jedinjenju nije osređen položaj dva šećerna ostatka (oznake a i b).

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*3.5.3. DRUGI SEKUNDARNI METABOLITI *I. HELENIUM*

Iz korena i ili kultura čelija korena ove biljne vrste izolovana su i tri derivata timola **176-178** (Bohlmann et al., 1978; Stojakowska et al., 2006, 2005 i 2004; slika 3.21). Derivat **176** je glavni sekundarni metabolit kultura čelija korena, a druga dva su čak zastupljenija od alantolaktona (**98**) i izoalantolaktona (**109**) (Stojakowska et al., 2006). Takočé za jedinjenje **176** je utvrđeno da pokazuje i umerenu antimikrobnu aktivnost prema soju *S. aureus* FDA 209 P (MIC = 50 µg/ml) koja je uporediva sa aktivnošću alantolaktona (**98**) (Stojakowska et al., 2005). Pored navedenih, u etarskom ulju korena je identifikovan (kao malozastupljeni sastojak) i 10-acetoksi-8,9-epoksitimolil-izobutanoat (**179**) (Stojanović-Radić et al., 2012). Generalno, ovi i srodni derivati timola su, sem u biljnoj vrsti *I. helenium*, načeni i kod većeg broja drugih predstavnika roda *Inula*, poput *I. sericophylla* (Cheng et al., 2012), *I. hupehensis* (Zhao et al., 2010a), *I. ensifolia* (Stojakowska et al., 2010), *I. royleana* (Stojakowska et al., 2006), *I. macrophylla* (Su et al., 2001), *I. salicina*, *I. bifons* (Bohlmann et al., 1978), *I. britannica*, *I. conyza* i *I. spiraeifolia* (Bohlmann i Zdero, 1977). Mećutim, ova jedinjenja nemaju veliki hemotaksonomski značaj na nivou roda usled činjenice da se mogu naći i kod drugih biljnih vrsta iz familije Asteraceae, pre svega pripadnika plemena Inuleae, Helenieae i Eupatorieae (Stojakowska et al., 2010).

Određeno je i sastav vezanih masnih kiselina plodova biljne vrste *I. helenium*. Načeno je da je ovo ulje bogato esencijalnim masnim kiselinama meću kojima dominira linolna. S obzirom da su predmet pomenutog istraživanja bili plodovi više biljnih vrsta koje pripadaju različitim rodovima familije Asteraceae i da je kod svake načen izuzetno visok sadržaj linolne kiseline, pretpostavljeno je da je ovo moć da opšta karakteristika pripadnika familije Asteraceae, ali i da nema hemotaksonomski značaj na nižim taksonomskim nivoima od familije (Cisowski et al., 1996). Takočé utvrđeno je da se u listovima ove biljne vrste nalaze i male količine steroidnih hormona progesterona (**180**) i androstendiona (**181**) (Simerský et al., 2009; slika 3.21).



**SLIKA 3.21.** DERIVATI TIMOLA (K -KOREN, KČK - KULTURA ČELIJA KORENA) I STEROIDI NAĐENI KOD BILJNE VRSTE *I. HELENIUM*

# EKSPERIMENTALNI DEO

### 4.1. HEMIKALIJE

Sve hemikalije koje su korišćene u radu (p.a. čistoće): natrijum, kalijum, sumporna kiselina, hlorovodonična kiselina, anhidrovani kalcijum-hlorid i magnezijum-sulfat, natrijum-hlorid, kalijum-hidroksid, natrijum-karbonat, *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid (DCC), 4-(dimetilamino)piridin (DMAP), trimetilhlorsilan (TMSCl), trietilamin ( $\text{Et}_3\text{N}$ ), fosfomolibdenska kiselina, izobutanska, oktanska, dekanska, laurinska, miristinska, palmitinska, stearinska, arahidinska, oleinska, linolna i linoleinska kiselina, 1-oktanol, 1-dekanol, 1-dodekanol, 1-tetradekanol, geraniol, neril-izobutanoat, brom ( $\text{Br}_2$ ), jod ( $\text{I}_2$ ), crveni fosfor (P), živa(II)-oksid, metil-acetoacetat, metil-jodid, perfluorkerozin, Tween 80, kao i rastvarači: dietil-atar ( $\text{Et}_2\text{O}$ ), dihlormetan ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), heksan, metanol (MeOH), etanol (EtOH), hloroform, ugljen-tetrahlorid, etil-acetat (EtOAc), *terc*-butanol ( $^t\text{BuOH}$ ), dimetilsulfoksid (DMSO), deuterohloroform ( $\text{CDCl}_3$ ), deuterodimetilsulfoksid ( $\text{DMSO}-d_6$ ) i *tris*(6,6,7,7,8,8,8-heptafluoro-2,2-dimetil-3,5-oktandioato)eupropijum(III) ( $\text{Eu}(\text{fod})_3$ ) nabavljeni su od sledećih kompanija: Sigma-Aldrich (Sent Luis, Misuri, SAD), Acros Organics (Morris Plains, Nju Džersi, SAD), Merck (Darmštat, Nemačka), J. T. Baker (Deventer, Holandija), Supelco (Bellefonte, Pennsilvanijska, SAD), Tokyo Chemical Industry Co. (Tokio, Japan), Centrohem (Stara Pazova, Srbija), Zorka (Šabac, Srbija) i Zdravlje (Leskovac, Srbija). Rastvarači su neposredno pre korišćenja predestilovani, dok su ostale hemikalije upotrebljavane bez prethodnog prečišćavanja.

### 4.2. METODE ANALIZE

#### 4.2.1. NUKLEARNO-MAGNETNA REZONANTNA (NMR) SPEKTROSKOPIJA

1D i 2D NMR spektri su snimani na sledećim uređajima:

- ◆ Varian Unity 200 NMR (Palo Alto, Kalifornija, SAD; 200 MHz za  $^1\text{H}$ , a 50 MHz za  $^{13}\text{C}$  NMR) na Institutu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Kragujevcu;
- ◆ Bruker Avance III 400 (Fällanden, Švajcarska; 400 MHz za  $^1\text{H}$ , a 101 MHz za  $^{13}\text{C}$  NMR) na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu;
- ◆ Bruker DMX 500 (Karlsruhe, Nemačka; 500,26 MHz za  $^1\text{H}$ , a 125,8 MHz za  $^{13}\text{C}$  NMR) na Odeljenju za instrumentalnu analizu Centra za hemiju na Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu;
- ◆ Bruker Avance II+ 600 (Karlsruhe, Nemačka; 600,13 MHz za  $^1\text{H}$ , a 150,92 MHz za  $^{13}\text{C}$  NMR) na Institutu za Organsku hemiju sa centrom za fitohemiju Bugarske akademije nauka u Sofiji.

Kao rastvarači su korišćeni  $\text{CDCl}_3$  ili  $\text{DMSO}-d_6$ . Vrednosti hemijskih pomeranja su date u  $\delta$  (ppm) jedinicama, a konstante kuplovanja u Hz. Unutrašnji standard za  $^1\text{H}$  NMR bio je tetrametilsilan (TMS) ( $\delta_{\text{H}} = 0,00$ ), a za  $^{13}\text{C}$  NMR deuterohloroform  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta_{\text{C}} = 77,0$ ) ili  $\text{DMSO}-d_6$  ( $\delta_{\text{C}} = 39,5$ ). NMR spektri su snimani na 298 ili 300 K. 2D NMR spektri ( $^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY, NOESY, HSQC i HMBC) snimani su uz primenu uobičajenih pulsnih sekvenci koje su sastavni deo softvera instrumenta. Dobijeni podaci su obrađeni u program *MestReNova* (ver. 6.0.2-5475, Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Španija).

#### 4.2.2. INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA (FTIR)

FT infracrveni spektri sintetisanih i izolovanih jedinjenja snimani su u obliku kalijumbromidne pilule, na instrumentu Perkin–Elmer FTIR 31725-X (Waltham, Masačusets, SAD) na Institutu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Kragujevcu, ili tankog sloja (neat) na instrumentu Thermo Nicolet, model 6700 (Waltham, Masačusets, SAD), u Kriminalističko-tehničkom centru, MUP Niš.

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

### 4.2.3. ULTRALJUBIČASTA I VIDLJIVA SPEKTROSKOPIJA (UV-VIS)

UV-Vis spektri sintetisanih i izolovanih jedinjenja su snimani u metanolu na instrumentu Shimadzu UV-1650 PC (Tokio, Japan).

### 4.2.4. MASENA SPEKTROMETRIJA VISOKE REZOLUCIJE (HRMS)

HRMS analiza izolovanih jedinjenja je izvršena na JEOL MStation JMS-700 masenom spektrometru (JEOL Ltd., Tokio, Japan) pri jonizacionoj energiji od 70 eV, jonskoj zamci od  $300 \mu\text{A}$  i temperaturi jonskog izvora od  $230^\circ\text{C}$ . Perfluorkerozin je korišćen kao interni standard za tačno određivanje mase, a kalibracija je vršena automatski pomoću *MStation* softvera. Opseg masa je bio izabran tako da se pik koji potiče od nepoznatog jedinjenja nalazi između dva pika koji potiču od internog standarda. Analiza je vršena pri rezoluciji od 30,000 (10% tzv. „doline“) i brzini skeniranja od 60 s/dekada\*. Tačna masa je izračunata kao srednja vrednost 5 do 10 skeniranja, a svaka pojedinačna vrednost je određena kao centroida  $\text{M}^+$  jona i ostalih jona. Greška dobijenog elementarnog sastava je data u mmu jedinicama i izračunata je od strane *MStation* softvera.

### 4.2.5. GASNA HROMATOGRAFIJA-MASENA SPEKTROMETRIJA (GC-MS) I GASNA HROMATOGRAFIJA (GC)

#### 4.2.5.1. GASNA HROMATOGRAFIJA-MASENA SPEKTROMETRIJA (GC-MS)

GC-MS analiza etarskih ulja, ekstrakata, hromatografskih frakcija, izolovanih i sintetisanih jedinjenja, kao i produkata njihove derivatizacije izvršena je na aparatu HP 6890N, opremljenim sa HP-5MS, DB-5MS, DB-5 (5% fenilmetilsilosan,  $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$ , debljina filma  $0,25 \text{ mm}$ , Agilent Technologies, Santa Klara, SAD), ili DB-1 (100% dimetilpolisilosan,  $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$ , debljina filma  $0,25 \text{ mm}$ , Agilent Technologies, Santa Klara, SAD) kapilarnim kolonama, koji je bio direktno kupljan sa 5975B, masenim detektorom iste kompanije. Kao noseći gas, korišćen je helijum, sa konstantnim protokom od  $1 \text{ ml/min}$ . Temperaturni uslovi: radna temperatura injektora i detektora  $250^\circ\text{C}$ , odnosno  $320^\circ\text{C}$ ; linearni temperaturni program zagrevanja kolone u opsegu od 70 do  $315^\circ\text{C}$ , sa brzinom

\* Ova merna jedinica predstavlja broj sekundi koje su uvećaju potrebne da skenira opseg masa koje se međusobno razlikuju za faktor 10 (na engleskom *decade of mass*) npr. od  $m/z$  50 do  $m/z$  500.

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

rasta temperature od 5 °C/min, a zatim izotermalni period u trajanju od 10 minuta. Injektirano je 1 µl rastvora uzorka u etru (1 mg u 1 ml dietil-etra) (1:100, w/v), u pulsnom *split* modu (40:1), pri protoku od 1,5 ml/min u prvih 30 sekundi, a zatim 1,0 ml/min do kraja analize. Jonizacija je vršena elektronima energije 70 eV, sa akvizicijom u *m/z* opsegu 35–650 i dužinom trajanja jednog skena od 0,32 s. Procentualni sastav pojedinih sastojaka određen je na osnovu površina pikova, bez korišćenja korekcionih faktora.

Obrada TIC hromatograma (TIC = *Total Ion Current*) i masenih spektara vršena je u programu *MestReNova* (ver. 6.0.2-5475, Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Španija).

### 4.2.5.2. IDENTIFIKACIJA SASTOJAKA

Podaci su obrađeni pomoću *MSD ChemStation* softvera (ver. D.03.00.611, Agilent Technologies, Santa Klara, SAD) u kombinaciji sa *AMDIS* (*Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*, ver. 2.68) i *NIST MS Search* programskim paketom (ver. 2.0d, Nacionalni institut za standarde i tehnologiju (NIST), SAD). *AMDIS* je korišćen za dekonvoluciju masenih skenova, tj. ekstrakciju masenih spektara iz preklopjenih pikova, dok je *NIST MS Search* obezbedio algoritam za pretragu biblioteka masenih spektara. Hemijski sastav ispitivanih uzoraka određen je upoređivanjem linearnih retencionih indeksa pojedinih sastojaka, izračunatih u odnosu na C<sub>7</sub>–C<sub>40</sub> alkana (van den Dool i Kratz, 1963), sa literaturnim vrednostima (Adams, 2007), poređajem masenih spektara sa spektrima poznatih jedinjenja iz biblioteka *Wiley Registry of Mass Spectral Data 9<sup>th</sup> Edition*, *NIST/EPA/NIH MassSpectral Library II*, *MassFinder 2.3*, Adams (Adams, 2007) i MS biblioteke "OSA" (*Organic Synthesis and Analysis*) istraživačke grupe, na Departmanu za hemiju, PMF-a u Nišu, kao i koinjektiranjem standardnih supstanci (alkani, alkoholi, metil estri masnih kiselina, terpenoidi, aromatična jedinjenja, sintetisana i izolovana jedinjenja, itd.).

### 4.2.5.3. GASNA HROMATOGRAFIJA SA PLAMENO-JONIZACIONOM DETEKCIJOM (GC-FID)

GC-FID analiza izvršena je na aparatu Agilent 7890A, koji je bio opremljen sa jednim injektorom, plameno-jonizujućim detektorom i HP-5MS (5% fenilmetilsilosan, 30 m × 0,32 mm, debljina filma 0,25 mm, Agilent Technologies, Santa Klara, SAD). Radna temperatura injektora je bila 250 °C, dok je temperatura peći menjana linearno od 150 do 300 °C brzinom

## **EKSPERIMENTALNI DEO**

### **SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

---

od 15 °C/min, nakon toga je održavana 5 min na 300 °C. Kao noseći gas korišćen je azot sa konstantnim protokom od 3 ml/min. Injektiran je 1 µl odgovarajućeg rastvora uzorka u *splitless* modu. Korišćeni su sledeći parametri FID detektora: temperatura grejača, 300 °C; protok H<sub>2</sub>, 30 ml/min; protok vazduha, 400 ml/min; protok azota (tzv. *make up* gas), 23,5 ml/min; signal, 20 Hz.

### 4.3. METODE RAZDVAJANJA

#### 4.3.1. TANKOSLOJNA HROMATOGRAFIJA (TLC)

TLC je vršena na aluminijumskim pločama sa prethodno nanešenim slojem silika-gela 60 UV<sub>254</sub> (Merck, Darmštat, Nemačka). Kao eluenti su korišćene smeše heksana i dietil-etra različite polarnosti. Mrlje na TLC-u su vizualizovane pomoću UV lampe (254 i 365 nm) i izazivane 50%-tnom H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (*aq.*) ili rastvorom fosfomolibdenske kiseline (12 g) u EtOH (250 ml), nakon čega su ploče zagrevane u sušnici na 80 °C.

#### 4.3.2. TEČNA HROMATOGRAFIJA PRI SREDNJIM PRITISCIMA (MPLC)

Preparativna MPLC razdvajanja sastojaka smeša su vršena na Büchi instrumentu (tip C-601, Büchi, Flawil, Švajcarska), na prethodno napakovanoj koloni silika-gela 60 (40-63 µm, Merck, Darmštat, Nemačka), pri protoku mobilne faze od 2,5 ml/min (smeša heksan/dietil-etar) pod gradijentnim ili izokratskim uslovima.

#### 4.3.3. *DRY FLASH* HROMATOGRAFIJA

Za preparativno razdvajanje pomoću *dry flash* hromatografije korišćena je jednostavna aparatura koja se sastojala od kolone silika-gela 60 (40-63 µm, Merck, Darmštat, Nemačka; ili 20-45 µm, Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Nemačka), napakovane na sinterovanom staklenom levku srednje poroznosti i veličine, i standardne boce za vakuum filtraciju. Eluiranje je vršeno pod gradijentnim uslovima smešom heksan/dietil-etar ili heksan/etil-acetat.

#### 4.3.4. HROMATOGRAFIJA NA KOLONI

Za preparativno razdvajanje pomoću gravitacione kolonske hromatografije korišćena je kolona (dužina 70 cm, prečnik 3 cm) napakovna silika-gelom 60 (20-45µm, Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Nemačka) i smeša heksan/dietil-etar za eluiranje pod izokratskim uslovima.

## **SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

---

### **4.3.5. GEL HROMATOGRAFIJA**

Preparativno razdvajanje pomoću gel hromatografije vršeno je na koloni (dužina 50 cm, prečnik 1,5 cm) SEPHADEX-a LH-20 (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD), sa smešom MeOH:CHCl<sub>3</sub> (1:1, v/v) kao eluentom.

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

## 4.4. BILJNI MATERIJAL I PRIPREMA UZORAKA

## 4.4.1. BILJNI MATERIJAL

Podaci o biljnom materijalu korišćenom za analizu dati su u tabeli 4.1, gde su pored spiska ispitivanih biljnih vrsta navedeni godina, mesec i lokaliteti sa kojih su sakupljane, kao i vaučer brojevi pod kojima su pohranjeni u herbarijumu „OSA” (*Organic Synthesis and Analysis*) istraživačke grupe, na Departmanu za hemiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu. Pored toga u tabeli su navedeni: deo biljke koji je korišćen za analizu (sa oznakom koja se odnosi na to da li je on korišćen za destilaciju-*d* ili ekstrakciju-*e*), odvaga i prinos (w/w, obračunato prema masi biljnog materijala).

TABELA 4.1. PODACI O ISPITIVANIM UZORCIMA

TAKSON	LOKALITET	VРЕME BRANJA	VAUČER BROJ	BILJNI DELOVI	ODVAGA (g)	PRINOS (w/w, %)	OZNAKA UZORKA
<i>Lycopus europaeus</i> L. <sup>†</sup>	Crveni krst, Niš, Srbija	avgust 2009	DM0609	nadzemni delovi- <i>d</i>	250	0,01	A
		oktobar 2009	DM0709	nadzemni delovi- <i>d</i>	250	0,006	B
				nezreli plodovi- <i>e</i>	25	0,064	C
				zreli plodovi- <i>e</i>	25	0,076	D
<i>Lycopus exaltatus</i> L.f. <sup>†</sup>	Bubanj selo, Niš, Srbija	avgust 2011	DM0111	nadzemni delovi- <i>d</i>	200	0,022	E
				nadzemni delovi- <i>e</i>	80	3,3	F
	Drezden, Nemačka	avgust 2011	DM0211	nadzemni delovi- <i>d</i>	200	0,018	G
<i>Inula helenium</i> L.	‡	/	DM0112	koren- <i>d</i>	200	2,4	H

## 4.4.2. DOBIJANJE ETARSKIH ULJA

Egarska ulja su dobijena hidrodestilacijom odmerene mase fino usitnjenoj biljnog materijala u originalnom aparatu po Klevendžeru (Clevenger) u toku 2,5 h. Dobijena ulja su zatim ekstrahovana dietil-etrom iz isoljenog vodenog sloja, a etarski ekstrakt je sušen anhidrovanim MgSO<sub>4</sub>. Nakon odvajanja sredstva za sušenje filtriranjem, vršeno je koncentrovanje ekstrakta uz pomoć struje azota, na sobnoj temperaturi. Prinos etarskog ulja određen je tek nakon potpunog uklanjanja rastvarača kratkotrajnom destilacijom na rotacionom-vakuum uparivaču na sobnoj temperaturi. Na ovaj način izolovana etarska ulja čuvana su na – 18 °C do analize ili daljeg frakcionisanja.

<sup>†</sup> Korišćen je svež biljni materijal.

<sup>‡</sup> U pitanju je komercijalno dostupni uzorak korena biljne vrste *I. helenium* sa plantaže Instituta „Josif Pančić“.

**4.5. IZOLOVANJE SEKUNDARNIH METABOLITA PLODOVA BILJNE VRSTE  
*LYCOPUS EUROPAEUS* L.****4.5.1. DOBIJANJE POVRŠINSKIH VOSKOVA PLODOVA**

Epikutikularni voskovi su sprani dihlormetanom (oko 50 ml na 10 g plodova) sa površine zelenih (25 g, uzorak **C**) i zrelih (25 g, uzorak **D**) plodova pomoću ultrazvuka u trajanju od 30 min. Ispirci su zatim propušteni kroz mikrofilter (Syringe Econofilter, 25/0,45 µm RC, Agilent Technologies, Santa Klara, SAD) da bi se uklonio sav nerastvorni materijal, sušeni iznad anhidrovanog MgSO<sub>4</sub> i ukoncentrovani destilacijom na rotacionom-vakuum uparivaču. Dobijeno je 16 mg epikutikularnih voskova nezrelih plodova (uzorak **C<sub>1</sub>**) i 19 mg epikutikularnih voskova zrelih plodova (uzorak **D<sub>1</sub>**) koji su analizirani neposredno nakon izolovanja korišćenjem metoda GC i GC-MS, a snimljeni su i FTIR spektri izolovanih površinskih voskova.

Po jedna porcija ispiraka analizirana je (GC i GC-MS) bez prethodnog filtriranja kroz mikrofilter, kao i uzorak dobijen nakon uparavanja rastvarača koji je korišćen za ekstrakciju. Na ovaj način je potvrđeno da ne dolazi do kontaminacije epikutikularnih voskova tokom opisanog postupka.

**Površinski alkani (uzorak C<sub>1</sub>)** – FTIR-ATR cm<sup>-1</sup>: 2956 ( $\nu_{as}(CH_3)^{\$}$ ), 2916 ( $\nu_{as}(CH_2)^{**}$ ) 2848 ( $\nu_s(CH_2)^{\dagger\dagger}$ ), 1473 ( $\delta_{as}(CH_3)^{\ddagger\ddagger}$ ), 1461 ( $\delta_{sc}(CH_2)^{\$\$}$ ), 1377 ( $\delta_s(CH_3)^{***}$ ), 730 i 719 ( $\delta_r(CH_2)^{\dagger\dagger\dagger}$ );

**Površinski alkani (uzorak D<sub>1</sub>)** – FTIR-ATR cm<sup>-1</sup>: 2955 ( $\nu_{as}(CH_3)$ ), 2915 ( $\nu_{as}(CH_2)$ ), 2848 ( $\nu_s(CH_2)$ ), 1472 ( $\delta_{as}(CH_3)$ ), 1462 ( $\delta_{sc}(CH_2)$ ), 1377 ( $\delta_s(CH_3)$ ), 1260, 1096, 1022, 803, 729 i 719 ( $\delta_r(CH_2)$ ).

<sup>\$</sup> asimetrična valenciona vibracija CH<sub>3</sub>- grupe

<sup>\*\*</sup> asimetrična valenciona vibracija -CH<sub>2</sub>- grupe

<sup>††</sup> simetrična valenciona vibracija -CH<sub>2</sub>- grupe

<sup>‡‡</sup> asimetrična deformaciona vibracija CH<sub>3</sub> grupe

<sup>§§</sup> deformaciona „sekanje“ vibracija (*scissoring*) -CH<sub>2</sub>- grupe

<sup>\*\*\*</sup> simetrična deformaciona vibracija CH<sub>3</sub> grupe

<sup>†††</sup> deformaciona „lijuljanje“ vibracija (*rocking*) -CH<sub>2</sub>- grupe

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

### 4.5.2. DOBIJANJE DIHLORMETANSKIH EKSTRAKATA PLODOVA

Fino samleveni plodovi (posebno zreli i nezreli), sa kojih su prethodno sprani epikutikularni voskovi, su podvrgnuti ultrazvučnoj ekstrakciji pomoću dihlormetana u trajanju od 2 h. Dobijeni ekstrakti su filtrirani kroz malu napakovanu kolonu od 1 g celita (Celite®, Merck, Darmštat, Nemačka). Odmah nakon toga rastvarač je uklonjen destilacijom na rotacionom-vakuum uparivaču, na sobnoj temperaturi, a sirovi ekstrakti su čuvani na – 18 °C do frakcionisanja.

### 4.5.3. HROMATOGRAFSKO RAZDVAJANJE DIHLORMETANSKIH EKSTRAKATA PLODOVA

Sirovi ekstrakt zrelih plodova je podvrgnut *dry flash* kolonskoj hromatografiji na koloni silika-gela 60 (40-63 µm, Merck, Darmštat, Nemačka). Primenjen je gradijent od čistog heksana do čistog etil-acetata, a dobijeno je 9 frakcija. Trigliceridi (uzorak C<sub>2</sub>, na osnovu FTIR-ATR spektra) su sakupljeni u *frakciji II* (5%-tni EtOAc; 3,0 g), dok je u *frakciji VI* (heksan : EtOAc = 3 : 2, v/v) eluirala čista (na osnovu TLC i GC-MS analize), bezbojna, kristalna supstanca **I** (250 mg). Isti postupak razdvajanja je ponovljen i sa sirovim ekstraktom nezrelih plodova. Izolovano je 1,1 g triacilglicerola (uzorak **D<sub>2</sub>**) i 200 mg supstance **I**.

Supstanca **I** je podvrgnuta detaljnoj spektralnoj karakterizaciji (1D i 2D NMR, IR, MS, UV-Vis) i hemijskim transformacijama.

**Trigliceridi (uzorak C<sub>2</sub>)** – FTIR-ATR cm<sup>-1</sup>: 3010 ((v=CH)<sup>+++</sup>), 2922 (v<sub>as</sub>(CH<sub>2</sub>)), 2854 (v<sub>s</sub>(CH<sub>2</sub>)), 1742 (široka v(C=O)<sup>\$\$\$</sup>), ukazuje na prisustvo većeg broja C=O grupe), 1462 (δ<sub>sc</sub>(CH<sub>2</sub>)), 1376 (δ<sub>s</sub>(CH<sub>3</sub>)), 1159 (v(C–O)<sup>\*\*\*\*</sup>), 1098, 719 (δ<sub>r</sub>(CH<sub>2</sub>)), 591.

**Trigliceridi (uzorak D<sub>2</sub>)** – FTIR-ATR cm<sup>-1</sup>: 3011 (v=CH), 2925 (v<sub>as</sub>(CH<sub>2</sub>)), 2853 (v<sub>s</sub>(CH<sub>2</sub>)), 1742 (v(C=O)), 1461 (δ<sub>sc</sub>(CH<sub>2</sub>)), 1376 (δ<sub>s</sub>(CH<sub>3</sub>)), 1239, 1159 (v(C–O)), 1097, 721 (δ<sub>r</sub>(CH<sub>2</sub>)), 591.

**Euroabienol (I)** – RI (DB-5MS) = 2897; MS(EI, 70 eV), m/z (rel. int, %): 462 [M]<sup>+</sup> (1,4), 418 [M – CH<sub>3</sub>CHO]<sup>+</sup> (0,6), 402 [M - AcOH]<sup>+</sup> (1,7), 384 [M – AcOH – H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (7,9), 369 [M – AcOH – H<sub>2</sub>O – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (0,7), 342 [M – 2 × AcOH]<sup>+</sup> (97,9), 324 [M – 2 × AcOH –

+++ =C–H valenciona vibracija kod olefina

\$\$\$ valenciona vibracija C=O grupe

\*\*\*\* valenciona vibracija C–O veze

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

$\text{H}_2\text{O}]^+$  (90,4), 309 [ $\text{M} - 2 \times \text{AcOH} - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3]^+$  (7,2), 283 [ $\text{M} - 2 \times \text{AcOH} - \text{COOCH}_3]^+$  (96,2), 265 [ $\text{M} - 2 \times \text{AcOH} - \text{COOCH}_3 - \text{H}_2\text{O}]^+$  (92,2), 253 (24,9), 242 (33,6), 223 (68,3), 207 (46,2), 197 (15,7), 171 (9), 165 (9,8), 145 (10,5), 133 (8,6), 115 (9,6), 91 (9,3), 77 (4,5), 69 (5,6), 55 (9,8), 43 (100); UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) nm (log ε): 284 (3,50), 223 (4,00); FTIR-ATR  $\text{cm}^{-1}$  (neat): 3389 (ν(O-H)), 3080 (ν(C<sub>Ar</sub>-H)), 2959 (ν(C-H)), 1727 i 1708 (ν(C=O)), 1577 (ν(C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>)), 1366, 1234 (ν(C-O)), 1033, 946, 861, 606; FTIR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3434 (ν(O-H)), 2959 (ν(C-H)), 1732 i 1713 (ν(C=O)), 1579 (ν(C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>)), 1384, 1249 (ν(C-O)), 1037, 949, 863, 608; <sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C-NMR podaci su dati u tabeli 5.6.

### 4.5.4. DERIVATIZACIJA IZOLOVANIH SEKUNDARNIH METABOLITA

#### 4.5.4.1. TRANSESTERIFIKACIJA TRIGLICERIDA

##### 4.5.4.1.1. PREVOĐENJE U METIL ESTRE

Rastvor natrijum-metoksida (MeONa), dobijen rastvaranjem 500 mg metalnog Na u anhidrovanom MeOH (20 ml), ohlađen je do sobne temperature i u njega je postepeno, uz mešanje, dodat rastvor izolovanih triglicerida (*ca.* 500 mg) u MeOH (5 ml). Reakcionala smeša je dovedena do ključanja, ohlađena na sobnu temperaturu i reakcija je zatim zaustavljena dodatkom ledene vode. Odmah nakon toga reakcionala smeša je ekstrahovana dietil-etrom (3 × 100 ml). Kombinovani organski ekstrakti su isprani vodom, sušeni preko anhidrovanog MgSO<sub>4</sub> i ukoncentrovani na rotacionom-vakuum uparivaču. Odmereno je 20 mg dobijenog uljastog ostatka, rastvorenog u 1 ml dietil-eta i analizirano GC i GC-MS metodom. Snimljeni su i FTIR-ATR spektri proizvoda transesterifikacije.

**Metil estri (uzorak C<sub>3</sub>)** – FTIR-ATR  $\text{cm}^{-1}$ : 3010 (ν=CH), 2925 (ν<sub>as</sub>(CH<sub>2</sub>)), 2853 (ν<sub>s</sub>(CH<sub>2</sub>)), 1739 (ν(C=O)), 1436 (δ<sub>sc</sub>(CH<sub>2</sub>)), 1362 (δ<sub>s</sub>(CH<sub>3</sub>)), 1196, 1170 (ν(C-O)), 986, 723 (δ<sub>r</sub>(CH<sub>2</sub>)), 591.

**Metil estri (uzorak D<sub>3</sub>)** – FTIR-ATR  $\text{cm}^{-1}$ : 3012 (ν=CH), 2929 (ν<sub>as</sub>(CH<sub>2</sub>)), 2854 (ν<sub>s</sub>(CH<sub>2</sub>)), 1732 (ν(C=O)), 1437 (δ<sub>sc</sub>(CH<sub>2</sub>)), 1170 (ν(C-O)), 978, 725 (δ<sub>r</sub>(CH<sub>2</sub>)), 568.

##### 4.5.4.1.2. PREVOĐENJE U TERC-BUTIL ESTRE

Rastvor kalijum-*terc*-butoksida (<sup>t</sup>BuOK) je dobijen rastvaranjem 500 mg metalnog kalijuma u anhidrovanom <sup>t</sup>BuOH (20 ml) uz zagrevanje do refluksa. Porcija triglicerida (*ca.*

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

500 mg; izolovanih iz ekstrakta zrelog semena) je rastvorena u 20 ml dietil-etra, a u dobijeni rastvor je zatim veoma pažljivo, uz intenzivno mešanje, postepeno dodato 2 ml rastvora  $t$ BuOK. Nakon toga je reakcionala smeša refluktovana tokom 2 časa i obraćena na način analogan onom opisanom u postupku za metil estre. Odmereno je 20 mg dobijenog uljastog ostatka, rastvorenog u 1 ml dietil-etra i analizirano GC i GC-MS metodom. Snimljeni su i FTIR-ATR spektri proizvoda transesterifikacije.

**terc-Butil estri (uzorak D<sub>4</sub>)** - FTIR-ATR  $\text{cm}^{-1}$ : 3013 ( $\nu(\text{=CH})$ ), 2922 ( $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ ), 2851 ( $\nu_s(\text{CH}_2)$ ), 1731 ( $\nu(\text{C=O})$ ), 1632, 1584, 1456 ( $\delta_{\text{sc}}(\text{CH}_2)$ ), 1368 ( $\delta_s(\text{CH}_3)$ ), 1153 ( $\nu(\text{C-O})$ ), 985, 714 ( $\delta_r(\text{CH}_2)$ ), 511.

### 4.5.4.2. SILIOVANJE EUROABIENOLA

Euroabienol (**I**, 50 mg) je rastvoren u 10 ml suvog dietil-etra. Zatim je dodato 275  $\mu\text{l}$  trimetilhlorsilana (TMSCl), 300  $\mu\text{l}$  suvog trietilamina ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) i jedna kap dimetilsulfoksida. Reakcionala smeša je mešana na sobnoj temperaturi tokom 2 časa pod inertnom atmosferom azota. Nakon toga je dodato 10 ml ledene vode i reakcionala smeša je ekstrahovana dietil-etrom ( $3 \times 100$  ml). Kombinovani organski ekstrakti su isprani vodom i sušeni preko anhidrovanog  $\text{MgSO}_4$ . Nakon uklanjanja rastvarača destilacijom na rotacionom-vakuum uparivaču dobijen je 51 mg smeše koja se sastojala (na osnovu GC-MS analize) od neizreagovane supstance **I** (10,1%), jednog disililovanog **I<sub>1</sub>** (36,7%) i dva monosililovana derivata **I<sub>2</sub>** (47,3%) i **I<sub>3</sub>** (1,1%).

**Disililovani derivat I<sub>1</sub>** – RI (DB-5MS) = 2656; MS(EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int.%): 606 [ $\text{M}]^+$  (1,3), 546 [ $\text{M} - \text{AcOH}]^+$  (0,1), 486 [ $\text{M} - 2 \times \text{AcOH}]^+$  (100), 471 [ $\text{M} - 2 \times \text{AcOH} - \text{CH}_3]^+$  (94,5), 456 [ $\text{M} - 2 \times \text{AcOH} - 2 \times \text{CH}_3]^+$  (0,5), 427 [ $\text{M} - 2 \times \text{AcOH} - \text{COOCH}_3]^+$  (36,5), 411 (9,5), 397 (9,1), 386 (15,9), 369 (9,6), 355 (13,3), 339 (8,8), 325 (7,1), 311 (4,4), 297 (6,4), 288 (7,2), 265 (5,4), 243 (2,6), 223 (4,4), 201 (1,4), 179 (1,7), 165 (1,4), 144 (1,2), 131 (1,8), 117 (17,1), 95 (0,6), 73 [ $(\text{CH}_3)_3\text{Si}]^+$  (64), 59 (2,1), 43 (35,4).

**Monosililovani derivat I<sub>2</sub>** – RI (DB-5MS) = 2768; MS(EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int. %): 534 [ $\text{M}]^+$  (6,9), 516 [ $\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$  (0,1), 474 [ $\text{M} - \text{AcOH}]^+$  (1,1), 442 [ $\text{M} - \text{AcOH} - (\text{CH}_3)_3\text{SiH}]^+$  (1,3), 414 [ $\text{M} - 2 \times \text{AcOH}]^+$  (95,7), 399 [ $\text{M} - 2 \times \text{AcOH} - \text{CH}_3]^+$  (80,8), 381 [ $\text{M} - 2 \times \text{AcOH} - \text{CH}_3 - \text{H}_2\text{O}]^+$  (2,6), 371 (2,1), 355 [ $\text{M} - 2 \times \text{AcOH} - \text{COOCH}_3]^+$  (100), 337 [ $\text{M} - 2 \times \text{AcOH} - \text{COOCH}_3 - \text{H}_2\text{O}]^+$  (4,4), 325 (9,4), 314 (24,4), 297 (15,4), 288 (22), 273 (7,3),

**SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

259 (5,8), 247 (9), 235 (3,2), 217 (4), 201 (2,3), 179 (2,6), 165 (2,3), 144 (4,3), 129 (1,6), 117 (7,2), 91 (1,6), 73 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Si]<sup>+</sup> (57,0), 59 (2,9), 43 (33,8).

**Monosililovani derivat I<sub>3</sub>** – RI (DB-5MS) = 2800; MS(EI, 70 eV), *m/z* (rel. int.%): 534 [M]<sup>+</sup> (2), 519 [M – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (3), 474 [M – AcOH]<sup>+</sup> (2,2), 431 (1,5), 414 [M – 2 × AcOH]<sup>+</sup> (61,5), 399 [M – 2 × AcOH – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (45,4), 384 [M – 2 × AcOH – 2 × CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (18), 355 [M – 2 × AcOH – COOCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (37,3), 342 [M – 2 × AcOH – (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SiH]<sup>+</sup> (79,8), 324 (100), 314 (16,7), 299 (30,6), 283 (49,8), 265 (91,4), 253 (19,5), 242 (14,1), 223 (50,2), 211 (25,9), 193 (10,5), 179 (9,5), 165 (9,1), 141 (6,8), 129 (5,9), 117 (23,8), 91 (6,1), 73 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Si]<sup>+</sup> (85,2), 55 (10,3), 43 (91,4).

**4.5.4.3. BAZNO-KATALIZOVANO DEACETILOVANJE EUROABIENOLA**

Rastvor natrijum-metoksida (MeONa), dobijen rastvaranjem metalnog Na (3,9 mmol) u anhidrovanom MeOH (50 ml), ohlađen je do sobne temperature i u njega je, uz mešanje, dodata supstanca **I** (140 mg, 0,3 mmol). Reakcionala smeša, zaštićena od uticaja atmosfere kalcijum-hloridnom cevćicom, dovedena je do ključanja, ohlađena na sobnu temperaturu i reakcija je zatim zaustavljena dodatkom ledene vode. Odmah nakon toga reakcionala smeša je zakišljena razblaženom HCl (1 : 1, v/v), pri čemu se izdvojio beli talog koji je ekstrahovan dietil-etrom (3 × 20 ml). Kombinovani organski ekstrakti su sušeni nad anhidrovanim MgSO<sub>4</sub> i ukoncentrovani na rotacionom-vakuuum uparivaču. Dobijeno je 72 mg uljastog ostatka koji je odmah analiziran GC-MS metodom.

**Monodeacetilovani derivat I<sub>4</sub>** – RI (DB-5MS) = 2932; MS(EI, 70 eV), *m/z* (rel. int. %): 420 [M]<sup>+</sup> (1,4), 376 (0,8), 360 [M – AcOH]<sup>+</sup> (1,7), 342 [M – AcOH – H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (19,6), 324 (17,8), 310 (20,5), 282 (100), 267 (33,5), 255 (31,6), 242 (32,8), 227 (42,8), 221 (28,2), 196 (14,9), 171 (10,1), 145 (9,8), 128 (8,1), 115 (10,1), 91 (9,4), 69 (6,1), 55 (10,5), 43 (50,6).

**4.5.5. OPŠTA PROCEDURA ZA SINTEZU STANDARDA METIL I TERC-BUTIL ESTARA**

Masna kiselina (1 *eq.*), *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid (DCC, 1,1 *eq.*), alkohol (MeOH ili <sup>t</sup>BuOH, 3 *eq.*), 4-(dimetilamino)piridin (DMAP, 0,1 *eq.*) i 10 ml anhidrovanog CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> mešani su tokom 4 časa na sobnoj temperaturi zaštićeni od uticaja spoljašnje atmosfere kalcijum-hloridnom cevćicom. Zatim je dodato 10 ml pentana, a izdvojeni talog

## **EKSPERIMENTALNI DEO**

### **SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

---

dicikloheksiluree je odvojen filtracijom. Nakon uklanjanja rastvarača destilacijom na rotacionom-vakuum uparivaču dobijeni su odgovarajući standardi estara masnih kiselina.

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

### 4.6. IZOLOVANJE SEKUNDARNIH METABOLITA BILJNE VRSTE *L.*

#### *EXALTATUS L.F.*

##### 4.6.1. DOBIJANJE DIETIL-ETARSKOG EKSTRAKTA NADZEMNIH DELOVA BILJNE VRSTE *L. EXALTATUS*

Usitnjeni biljni materijal je nakon merenja potapan u odgovarajuću zapreminu rastvarača (oko 50 ml na 10 g biljnog materijala) i ostavljen u zatvorenom sudu, na mračnom mestu. Nakon sedmodnevног stajanja, filtracijom je odvojen biljni materijal, a etarski ekstrakt je zatim sušen iznad anhidrovanog MgSO<sub>4</sub>. Posle odvajanja sredstva za sušenje filtracijom, etar je uklonjen destilacijom na rotacionom-vakuum uparivaču, na sobnoj temperaturi, a suvi ostatak (ekstrakt F) je čuvan na – 18 °C do analize ili daljeg frakcionisanja.

##### 4.6.2. HROMATOGRAFSKO RAZDVAJANJE DIETIL-ETARSKOG EKSTRAKTA

Iz etarskog ekstrakta nadzemnog dela biljne vrste *L. exaltatus* (uzorak F) izolovani su intrakutikularni alkani, dve triterpenske kiseline: oleanolna i ursolna, tri derivata cimetne kiseline: *trans-p*-kumarinska, *trans*-ferulinska i *trans*-kafena kiselina, i dva flavona, apigenin i luteolin. Šema izolovanja ovih jedinjenja je prikazana na slici 4.1.

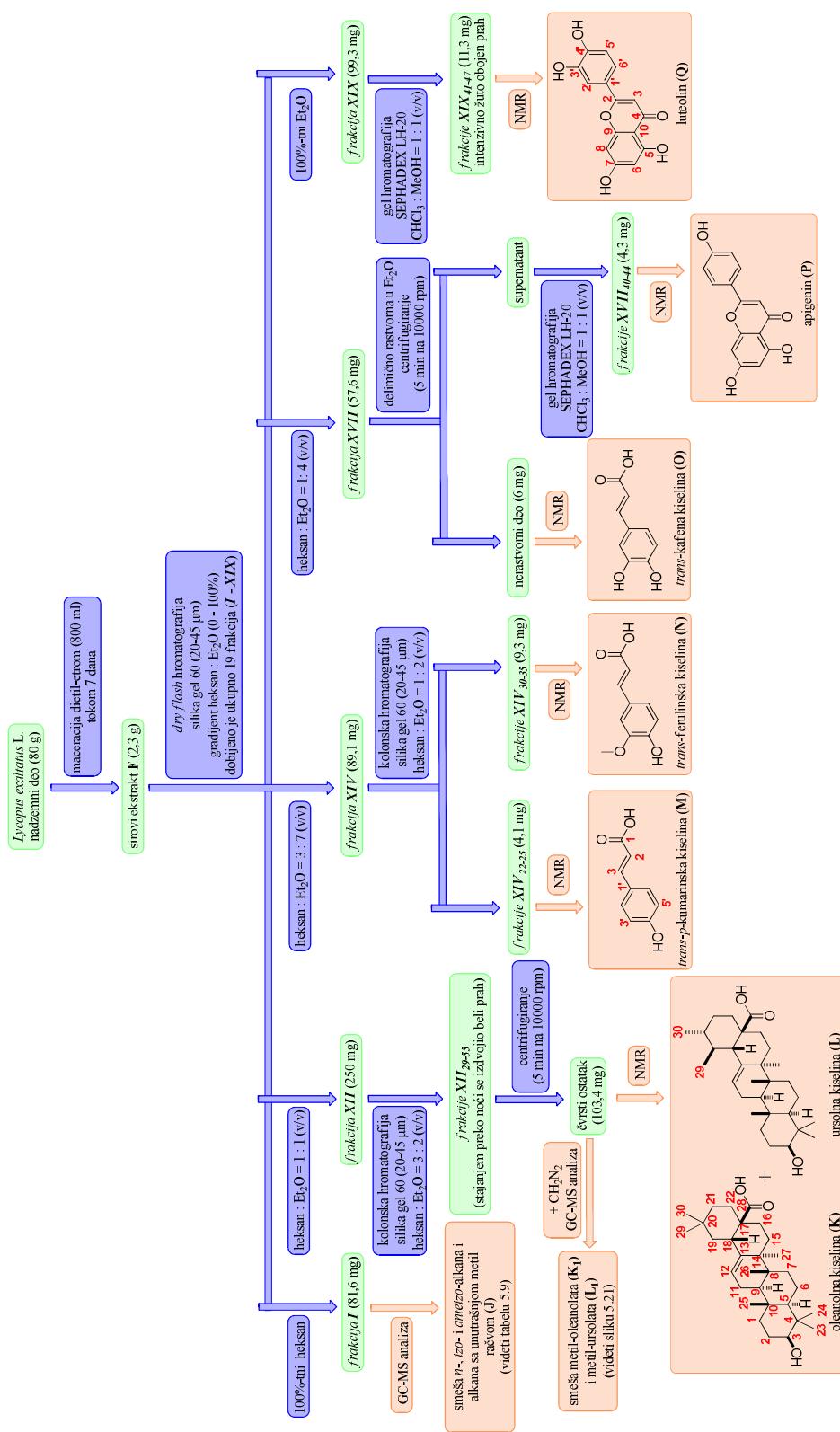
Etarski ekstrakt nadzemnog dela je prvo podvrнут *dry flash* hromatografiji na koloni silika-gela 60 (20-45 µm, Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Nemačka). Primenjen je gradijent od čistog heksana do čistog dietil-etra. Tok hromatografije je praćen pomoću TLC analize, a dobijeno je 19 frakcija.

Na osnovu GC-MS analize utvrđeno je da *frakcija I* (100%-tni heksan, uzorak J) predstavlja smešu *n*-, *izo*- i *anteizo*-alkana i alkana sa unutrašnjom metil račvom.

*Frakcija XII* (heksan : dietil-etal = 1 : 1, v/v; 250 mg), koja je bila praškasta i bledo žuto obojena, se sastojala od svega nekoliko jedinjenja, na osnovu TLC analize. Stoga je podvrnuta daljem frakcionisanju pomoću gravitacione kolonske hromatografije pod izokratskim ulsovima. Kao eluent je korišćena smeša heksana i dietil-etra u odnosu 3 : 2 (v/v), a sakupljeno je ukupno 90 frakcija zapremine 10 ml. Tokom noći se iz *frakcija XII<sub>29-55</sub>* izvojio beli talog koji je odvojen od supernatanta centrifugiranjem (5 min na 10000 rpm).

## *EKSPERIMENTALNI DEO*

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*



**SЛИКА 4.1.** ŠEMATSKI PRIKAZ IZLOVANJA SEKUNDARNIH METABOLITA IZ EKSTRAKTA NADZEMNOG DELA BILJNE VRSTE *L.*

EXALTATUS

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

Dobijeno je 103,4 mg belog praha koji je pri TLC analizi pokazivao samo jednu mrlju na pločici pri čemu su za razvijanje korišćeni eluenti različite polarnosti (smeše heksan : dietil-etal u odnosima 2 : 1, 1 : 1 i 1 : 2, v/v). Nakon snimanja 1D i 2D NMR spektara pretpostavljeno je da ovaj beli prah najverovatnije predstavlja smešu dve izomerne pentaciclične triterpenske kiseline, oleanolne (**K**) i ursolne kiseline (**L**). Ova pretpostavka je potvrđena nakon derivatizacije diazometanom (5 mg smeše je rastvoreno u 1 ml etarskog rastvora  $\text{CH}_2\text{N}_2$ ), jer su se u gasnom hromatogramu pojavila samo dva pika, za koje je poređenjem sa masenim spektrima dostupnim u literaturi (Pádua et al., 2014; Furuya et al., 1987) utvrđeno da predstavljaju odgovarajuće metil estre **K<sub>1</sub>** i **L<sub>1</sub>**.

*Frakcija XIV* (heksan : dietil-etal = 3 : 7, v/v; 89,1 mg) je, takođe, dodatno frakcionisana pomoću gravitacione hromatografije na stubu  $\text{SiO}_2$ . Kao eluent je korišćena smeša heksan : dietil-etal = 1 : 2 (v/v), a tok hromatografije je praćen TLC analizom. Na osnovu TLC-a u *frakcijama XIV<sub>22-25</sub>* je eluirala čista supstanca **M** (4,1 mg), dok je u *frakcijama XIV<sub>30-35</sub>* eluirala čista supstacna **N** (9,3 mg). Nakon snimanja 1D i 2D NMR spektara utvrđeno je da su u pitanju dva derivata cimetne kiseline: *trans-p*-kumarinska (**M**) i *trans*-ferulinska (**N**) kiselina.

*Frakcija XVII* (heksan : dietil-etal = 1 : 4, v/v; 57,6 mg) nije bila u potpunosti rastvorna u dietil-etalu, pa je nerastvorni deo (6 mg) odvojen centrifugiranjem (5 min na 10000 rpm), a na osnovu 1D i 2D NMR spektara je utvrđeno da je reč o još jednom derivatu cimetne kiseline, *trans*-kafenoj kiselini (**O**). Supernatant je dalje frakcionisan pomoću gel hromatografije na koloni SEPHADEX-a LH-20. Zapremina frakcija koje su hvatane je bila 1 ml. Na koloni se najduže zadržavala mrko obojena supstanca **P** (4 mg) koja se nalazila u *frakcijama XVII<sub>40-44</sub>*. Nakon snimanja 1D i 2D NMR spektara utvrđeno je da je ova supstanca flavon apigenin (**P**).

*Frakcija XIX* (čist dietil-etal; 99,3 mg) je, takođe, podvrgнутa daljem frakcionisanju na koloni SEPHADEX-a LH-20. Tokom ove hromatografije na koloni najduže se zadržavala svetlo žuto obojena supstanca **Q**. Ova supstanca je eluirala u *frakcijama XIX<sub>41-47</sub>* (11,3 mg) i za nju je utvrđeno (na osnovu analize 1D i 2D NMR spektara) da predstavlja još jedan flavon luteolin (**Q**).

**4.6.3. SPEKTRALNI PODACI IZOLOVANIH JEDINJENJA (I NJIHOVIH DERIVATA) IZ EKSTRAKTA NADZEMNOG DELA BILJNE VRSTE *L. EXALTATUS***

**Oleanolna (K) i ursolna (L) kiselina** –  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  178,7 (COOH<sub>(K)</sub>), 178,4 (COOH<sub>(L)</sub>), 143,9 (C-13<sub>(K)</sub>), 138,2 (C-13<sub>(L)</sub>), 124,6 (C-12<sub>(L)</sub>), 121,6 (C-12<sub>(K)</sub>), 76,9 (C-3<sub>(K)</sub> i C-3<sub>(L)</sub>), 54,8 (C-5<sub>(K)</sub> i C-5<sub>(L)</sub>), 52,4 (C-18<sub>(L)</sub>), 47,1, 47,0 (C-9<sub>(K)</sub> i C-9<sub>(L)</sub>), 46,9 (C-17<sub>(L)</sub>), 45,7 (C-19<sub>(K)</sub>), 45,5 (C-17<sub>(K)</sub>), 41,7 (C-14<sub>(L)</sub>), 41,4 (C-14<sub>(K)</sub>), 40,8 (C-18<sub>(K)</sub>), 39,4 (C-8<sub>(L)</sub>), 38,6 (C-8<sub>(K)</sub>), 38,5 (C-4<sub>(K)</sub> i C-4<sub>(L)</sub>), 38,4 (C-19<sub>(L)</sub> i C-20<sub>(L)</sub>), 38,3 (C-1<sub>(L)</sub>), 38,1 (C-1<sub>(K)</sub>), 36,6 (C-10<sub>(K)</sub> i C-10<sub>(L)</sub>), 36,4 (C-22<sub>(L)</sub>), 33,4 (C-21<sub>(K)</sub>), 32,9 (C-29<sub>(K)</sub>), 32,7 (C-7<sub>(L)</sub>), 32,4 (C-22<sub>(K)</sub>), 32,1 (C-7<sub>(K)</sub>), 30,5 (C-21<sub>(L)</sub>), 30,2 (C-20<sub>K</sub>), 28,3 (C-23<sub>(K)</sub> i C-23<sub>(L)</sub>), 27,6 (C-15<sub>(L)</sub>), 27,2 (C-15<sub>(K)</sub>), 27,0 (C-2<sub>(K)</sub> i C-2<sub>(L)</sub>), 25,6 (C-27<sub>(K)</sub>), 23,8 (C-16<sub>(L)</sub>), 23,4 (C-30<sub>(K)</sub>), 23,3 (C-27<sub>(L)</sub>), 23,0, 22,9 (C-16<sub>(K)</sub> i C-11<sub>(L)</sub>), 22,6 (C-11<sub>(K)</sub>), 21,2 (C-30<sub>(L)</sub>), 18,1 (C-6<sub>(K)</sub> i C-6<sub>(L)</sub>), 17,1 (C-29<sub>(L)</sub>), 17,0 (C-26<sub>(L)</sub>), 16,9 (C-26<sub>(K)</sub>), 16,2, 16,1 (C-24<sub>(K)</sub> i C-24<sub>(L)</sub>), 15,3 (C-25<sub>(L)</sub>), 15,2 (C-25<sub>(K)</sub>). Asignacija signala u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru je izvršena pomoću DEPT90 i DEPT135, HSQC i HMBC spektara, kao i porečenjem sa literaturnim vrednostima za hemijskih pomeranja u DMSO- $d_6$  čistih jedinjenja K i L (Abdelhalim et al., 2014).

**Metil-oleanolat (K<sub>1</sub>)** – Rt (DB-5) = 50,234 min; MS(EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int, %): 470 [M]<sup>+</sup> (2), 452 [M – H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (0,7), 429 (1,1), 411 (1,7), 377 (0,7), 355 (1,1), 341 (2,6), 331 (2,1), 315 (0,9), 295 (0,4), 262 (50,9), 207 (63,3), 203 (100), 189 (21,7), 175 (8), 161 (4,1), 147 (8,4), 133 (18,8), 119 (13,9), 105 (11,8), 95 (9,5), 81 (9,1), 69 (10,7), 55 (8,6), 43 (8,1). Spektralni podaci su u saglasnosti sa literaturnim (Furuya et al., 1987).

**Metil-ursolat (L<sub>1</sub>)** – Rt (DB-5) = 51,040 min; MS(EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int, %): 470 [M]<sup>+(1,9)</sup>, 452 [M – H<sub>2</sub>O]<sup>+(1,2)</sup>, 429 (0,8), 410 (2,8), 395 (1,3), 355 (1), 341 (1,8), 327 (1,4), 314 (1,2), 295 (0,3), 262 (100), 249 (6,9), 233 (5,8), 207 (51,6), 203 (84,2), 189 (23,9), 175 (8,7), 161 (5,7), 147 (11,5), 133 (63,2), 119 (26,1), 105 (15,2), 95 (13,7), 81 (11,9), 69 (12), 55 (12,7), 43 (10,6). Spektralni podaci su u saglasnosti sa literaturnim (Furuya et al., 1987).

**trans-p-Kumarinska kiselina (M)** – RI (DB-1) = 1793; MS(EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int, %): 164 [M]<sup>+(100)</sup>, 147 [M – OH]<sup>+(44,5)</sup>, 136 (4,9), 119 [M – COOH]<sup>+(24,6)</sup>, 107 (13), 91 (23,8), 77 (8,8), 65 (16,7), 51 (6,2), 39 (11);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,52 (*d*,  $J_{trans}$  = 15,8 Hz, 1H, H-3), 7,45 (AA'BB',  $J$  = 8,6 Hz, 2H, H-2' i H-6'), 6,79 (AA'BB',  $J$  = 8,6 Hz, 2H, H-3' i H-5'), 6,29 (*d*,  $J_{trans}$  = 15,8 Hz, 1H, H-2);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  168,0 (COOH), 159,7 (C-4'), 144,2 (C-3), 130,2 (C-2' i C-6'), 125,3 (C-1'), 115,8 (C-3' i C5'),

**SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

115,4 (C-2). Spektralni podaci su u saglasnosti sa literaturnim (Salum et al., 2010; Yi et al., 2010).

**trans-Ferulinska kiselina (N)** – RI (DB-1) = 1868; MS(EI, 70 eV), *m/z* (rel. int.%): 194 [M]<sup>+</sup> (100), 179 [M – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (21,5), 177 [M – OH]<sup>+</sup> (8,7), 161 (5,4), 149 [M – COOH]<sup>+</sup> (3,7), 145 (7), 133 (20,3), 105 (9,2), 89 (7,3), 77 (13,1), 67 (6,1), 51 (8,7), 39 (4,8); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,44 (*d*, *J*<sub>trans</sub> = 15,9 Hz, 1H, H-3), 7,09 (*d*, *J* = 2,1 Hz, 1H, H-2'), 6,83 (*dd*, *J* = 8,2, 2,1 Hz, 1H, H-6'), 6,67 (*d*, *J* = 8,2 Hz, 1H, H-5'), 6,15 (*d*, *J*<sub>trans</sub> = 15,9 Hz, 1H, H-2), 3,64 (*s*, 3H, OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 168,2 (COOH), 148,9 (C-4'), 147,6 (C-3'), 144,4 (C-3), 125,8 (C-1'), 122,6 (C-6'), 115,7(C-2), 115,5 (C-5'), 111,6 (C-2'), 55,7 (OCH<sub>3</sub>). Spektralni podaci su u saglasnosti sa literaturnim (Prachayasittikul et al., 2009; Salum et al., 2010; Yoshioka et al., 2004)

**trans-Kafena kiselina (O)** – <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,40 (*d*, *J*<sub>trans</sub> = 15,9 Hz, 1H, H-3), 7,01 (*d*, *J* = 2,1 Hz, 1H, H-2'), 6,95 (*dd*, *J* = 8,1, 2,1 Hz, 1H, H-6'), 6,75 (*d*, *J* = 8,1 Hz, 1H, H-5'), 6,16 (*d*, *J*<sub>trans</sub> = 15,9 Hz, 1H, H-2); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 168,4 (COOH), 148,3 (C-4'), 146,0 (C-3'), 144,9 (C-3), 126,1 (C-1'), 121,6 (C-6'), 116,2 (C-5'), 115,2 (C-2), 114,6 (C-2'). Spektralni podaci su u saglasnosti sa literaturnim (Teng et al., 2005).

**Apigenin (P)** – <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,91 (AA'BB', *J* = 8,9 Hz, 2H, H-2' i H-6'), 6,92 (AA'BB', *J* = 8,9 Hz, 2H, H-3' i H-5' ), 6,75 (*s*, 1H, H-3), 6,48 (*d*, *J* = 2,1 Hz, 1H, H-8), 6,19 (*d*, *J* = 2,1 Hz, 1H, H-6); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 181,8 (C=O), 163,7 (C-7), 164,1 (C-2), 167,3 (C-5), 161,2 (C-4'), 161,5 (C-9), 128,5 (C-2' i C-6'), 121,3 (C-1'), 115,7 (C-3' i C-5'), 103,7 (C-10), 102,8 (C-3), 98,9 (C-6), 94,0 (C-8). Spektralni podaci su u saglasnosti sa literaturnim (Miyazawa i Hisama, 2003; Wagner et al., 1976).

**Luteolin (Q)** – <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,42 (*dd*, *J* = 8,1, 1,9 Hz, 1H, H-6'), 7,41 (*br. s*, 1H, H-2'), 6,90 (*d*, *J* = 8,1 Hz, 1H, H-5'), 6,66 (*s*, 1H, H-3), 6,45 (*d*, *J* = 1,9 Hz, 1H, H-8), 6,20 (*d*, *J* = 1,9 Hz, 1H, H-6); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 181,6 (C=O), 164,2 (C-7), 163,9 (C-2), 161,5 (C-5), 157,3 (C-9), 149,7 (C-4'), 145,7 (C-3'), 121,5 (C-1'), 119,0 (C-6'), 116,0 (C-5'), 113,4 (C-2'), 103,7 (C-10), 102,9 (C-3), 98,8 (C-6), 93,8 (C-8). Spektralni podaci su u saglasnosti sa literaturnim (Burns et al., 2007; Miyazawa i Hisama, 2003).

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

### 4.7. IZOLOVANJE SEKUNDARNIH METABOLITA KORENA BILJNE VRSTE *INULA HELENIUM L.*

#### 4.7.1. HROMATOGRAFSKO RAZDVAJANJE ETARSKOG ULJA KORENA BILJNE VRSTE *I. HELENIUM*

Uzorak etarskog ulja **H** (500 mg) prvo je podvrgnut preparativnom MPLC razdvajaju. Primjenjen je gradijent od čistog heksana do čistog dietil-etra. Zapremina frakcija je bila 10 ml i one su mečusobno spajane na osnovu TLC i GC-MS analize. Ukupno je dobijeno 9 frakcija. U *frakciji II* je, na osnovu GC-MS analize, detektovano 10 sastojaka. Glavni sastojak je bio nepoznati seskviterpenski aldehid (**R**) zajedno sa homologom grupom od devet jedinjenja, za koje je pretpostavljeno da predstavljaju 3-metil-2-alkanone dugog ugljovodoničnog lanca (**S<sub>1-9</sub>**). Struktura 3-metil-2-alkanona dugog lanca je potvrđena koinjekcijom standarda dobijenih sintezom sa *frakcijom II*.

#### 4.7.2. SINTEZA 3-METIL-2-ALKANONA DUGOG UGLJOVODONIČNOG LANCA

##### 4.7.2.1. DOBIJANJE DUGOLANČANIH ALKIL-HALOGENIDA

Alkil-halogenidi su sintetisani pomoću dve standardne metode. Za dobivanje alkil-halogenida sa neparnim brojem C-atoma u nizu, korišćena je modifikovana Hunsdikerova (Hunsdiecker) reakcija u kojoj se na karboksilnu kiselinu deluje smešom HgO i Br<sub>2</sub> u CCl<sub>4</sub> (Lampman i Aumiller, 1988), dok su alkil-halogenidi sa parnim brojem C-atoma dobijeni u reakciji odgovarajućeg alkohola i fosfor(III)-jodida (PI<sub>3</sub>) koji je *in situ* generisan iz crvenog fosfora i kristalnog joda (Vogel, 1989). Svi sintetisani alkil-halogenidi (C<sub>7</sub>–C<sub>15</sub>) su prečišćeni *dry flash* hromatografijom i dobijeni u prinosu od 75–85%.

###### 4.7.2.1.1. OPŠTA PROCEDURA ZA DOBIJANJE ALKIL-BROMIDA SA NEPARNIM BROJEM C-ATOMA U UGLJOVODONIČNOM NIZU (LAMPMAN I AUMILLER, 1988)

U trogrlom balonu od 250 ml, zaštićenom od svetlosti, koji opremljen kapalicom, magnetnom mešalicom i efikasnim povratnim kondenzatorom, prvo je suspendovan crveni HgO (20 mmol) u CCl<sub>4</sub> (40 ml), a zatim je dodata odgovarajuća karboksilna kiselina (27 mmol). Kada je reakcionalna smeša uz mešanje zagrejana do ključanja, dodat je veoma brzo (za oko 5 min), putem kapalice, rastvor Br<sub>2</sub> (30 mmol) u CCl<sub>4</sub> (20 ml). Nakon početnog

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

indukcionog perioda došlo je do naglog izdvajanja CO<sub>2</sub>. Reakcionala smeša je zatim zagrevana, pod refluksom, oko 30 minuta, tj. do prestanka vidljivog izdvajanja CO<sub>2</sub>. Zatim je reakcionala smeša ohlađena na ledenom kupatilu, a izdvojeni talog je odvojen cećenjem i ispran malom zapreminom CCl<sub>4</sub>. Iz spojenih filtrata rastvarač je uklonjen na rotacionom-vakuuum uparivaču, a ostatak nakon destilacije, sirovi alkil-halogenid, dalje je prečišćen *dry flash* hromatografijom.

### 4.7.2.1.2. OPŠTA PROCEDURA ZA DOBIJANJE ALKIL-JODIDA SA PARNIM BROJEM C-ATOMA U UGLJOVODONIČNOM NIZU (VOGEL, 1989)

U balon od 250 ml, koji je opremljen refluks kondenzatorom, dodat je crveni fosfor (15 mmol) i odgovarajući alkohol (40 mmol). Smeša je zagrejana da blago ključa, pa je kroz kondenzator, u malim porcijama, dodat fino usitnjeni jod (20 mmol). Dodavanje joda je trajalo oko 30 min pri čemu je dozvoljeno da se nakon dodatka svake porcije stiša reakcija. Reakcionala smeša je zagrevana pod refluksom još 2 h, a zatim je ohlađena do sobne temperature i ekstrahovana dietil-etrom. Etarski ekstrakti su spojeni i redom isprani jednakim zapreminama vode, konc. HCl, pa opet vode, 10%-tnog rastvora Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i još jednom vode. Nakon ispiranja, etarski sloj je osušen nad anhidrovanim MgSO<sub>4</sub>, a rastvarač je zatim uklonjen na rotacionom-vakuuum uparivaču. Sirovi alkil-halogenid je precišćen *dry flash* hromatografijom.

### 4.7.2.2. OPŠTA PROCEDURA ZA DOBIJANJE METIL-2-ACETILALKANOATA

Metalni Na (5 mmol) je dodat u rastvor metil-acetoacetata (5 mmol) u anhidrovanim MeOH (12 ml). Reakcionala smeša je zatim ohlađena na 0 °C i u nju je, veoma polako uz intenzivno mešanje, ukapavan odgovarajući alkil-halogenid (6 mmol) u toku 20 minuta. Nakon što je dodat sav alkil-halogenid, reakcionala smeša je zagrevana pod refluksom 15-25 h. Posle toga je višak MeOH uklonjen na rotacionom-vakuuum uparivaču, a ostatku nakon destilacije je dodato 100 ml destilovane vode, pa je dobijena smeša ekstrahovana nekoliko puta pomoću dietil-etra. Etarski ekstrakti su spojeni, isprani 10%-tnom HCl (*aq.*), a zatim su osušeni nad anhidrovanim MgSO<sub>4</sub>. Etar je uparen na rotacionom-vakuuum uparivaču, a ostatak nakon destilacije, sirovi metil-2-acetylalkanoat je korišćen u daljoj sintezi bez dodatnog prečišćavanja.

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

Čistoća dobijenih metil-2-acetilalkanoata (**S<sub>1a-9a</sub>**) i njihov prinos su određeni na osnovu GC-MS analize.

**Metil-2-acetylnonanoat (S<sub>1a</sub>)** – Prinos 72%; GC-MS čistoća: 95,5%, RI(DB-5) = 1560; MS (EI, 70 eV), *m/z* (rel. int, %): 214 [M]<sup>+</sup> (0,2), 201 [M – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (0,4), 183 [M – OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (4,2), 174 (27,8), 157 (5,5), 143 (23,5), 129 [C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (30,1), 116 [C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (100), 101 (15), 87 (78,1), 74 (17,2), 55 (28), 43 [CH<sub>3</sub>CO]<sup>+</sup> (71,3).

**Metil-2-acetyldecanoat (S<sub>2a</sub>)** – Prinos 75%; GC-MS čistoća: 95,5%, RI (DB-5) = 1662; MS (EI, 70 eV), *m/z* (rel. int, %): 228 [M]<sup>+</sup> (0,2), 213 [M – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (0,4), 197 [M – OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (4), 186 (27), 171 (5), 157 (5,3), 143 (20,1), 129 [C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (28), 116 [C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (100), 101 (14,9), 87 (76,7), 74 (17), 55 (28,1), 43 [CH<sub>3</sub>CO]<sup>+</sup> (71).

**Metil-2-acetylundekanoat (S<sub>3a</sub>)** – Prinos 80%; GC-MS čistoća: 94,7%, RI (DB-5) = 1764; MS (EI, 70 eV), *m/z* (rel. int, %): 242 [M]<sup>+</sup> (0,3), 227 [M – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (0,3), 221 [M – OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (3,6), 200 (26,2), 182 (0,1), 171 (5), 157 (12,2), 143 (17,8), 129 [C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (27,5), 116 [C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (100), 101 (14,4), 87 (76,9), 74 (16,8), 55 (27,5), 43 [CH<sub>3</sub>CO]<sup>+</sup> (70,5).

**Metil-2-acetylodekanoat (S<sub>4a</sub>)** – Prinos 78%; GC-MS čistoća: 94,2%, RI (DB-5) = 1766; MS (EI, 70 eV), *m/z* (rel. int, %): 256 [M]<sup>+</sup> (0,3), 241 [M – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (0,2), 225 [M – OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (3,5), 214 (25,2), 196 (0,1), 185 (5,2), 171 (12,4), 157 (2,2), 143 (17,8), 129 [C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (27,2), 116 [C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (100), 101 (14,2), 87 (76,7), 74 (16,6), 55 (27,2), 43 [CH<sub>3</sub>CO]<sup>+</sup> (70,2).

**Metil-2-acetyltridekanoat (S<sub>5a</sub>)** – Prinos 75%; GC-MS čistoća: 94,2%, RI (DB-5) = 1868; MS (EI, 70 eV), *m/z* (rel. int, %): 270 [M]<sup>+</sup> (0,4), 255 [M – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (0,2), 239 [M – OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (3), 228 (25), 210 (0,1), 199 (5), 185 (14), 171 (2,4), 157 (2,1), 143 (17,6), 129 [C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (26,8), 116 [C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (100), 101 (14), 87 (77,6), 74 (16,5), 55 (26,8), 43 [CH<sub>3</sub>CO]<sup>+</sup> (70,9).

**Metil-2-acetiltetradekanoat (S<sub>6a</sub>)** – Prinos 73%; GC-MS čistoća: 94,5%, RI (DB-5) = 1970; MS (EI, 70 eV), *m/z* (rel. int, %): 284 [M]<sup>+</sup> (0,5), 269 [M – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (0,2), 253 [M – OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (2,3), 242 (23), 223 (0,1), 213 (3,8), 199 (12,1), 185 (3,9), 171 (2,5), 157 (4), 143 (15,5), 129 [C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (27), 116 [C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (100), 101 (12,4), 87 (74,4), 74 (15), 55 (23,7), 43 [CH<sub>3</sub>CO]<sup>+</sup> (65,7).

**Metil-2-acetylpentadekanoat (S<sub>7a</sub>)** – Prinos 70%; GC-MS čistoća: 93,2%, RI (DB-5) = 2071; MS (EI, 70 eV), *m/z* (rel. int, %): 298 [M]<sup>+</sup> (0,4), 283 [M – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (0,2), 267 [M – OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (2,3), 256 (21,9), 241 (0,1), 227 (2), 213 (10,4), 199 (4,1), 185 (2,9), 171 (2,9), 157

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

(4,1), 143 (13,5), 129 [ $C_6H_9O_3$ ]<sup>+</sup> (26,8), 116 [ $C_5H_8O_3$ ]<sup>+</sup> (100), 101 (11,4), 87 (64,3), 74 (14,9), 55 (21,7), 43 [ $CH_3CO$ ]<sup>+</sup> (59,5),

**Metil-2-acetilheksadekanoat (S<sub>8a</sub>)** – Prinos 71%; GC-MS čistoća: 93,8%, RI (DB-5) = 2172; MS (EI, 70 eV), *m/z* (rel. int, %): 312 [M]<sup>+</sup> (0,5), 297 [M – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (0,3), 281 [M – OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (1,9), 270 (22,1), 241 (2,2), 227 (9,3), 213 (3), 199 (1,5), 185 (3,7), 172 (3), 154 (2), 143 (12,8), 129 [ $C_6H_9O_3$ ]<sup>+</sup> (28,6), 116 [ $C_5H_8O_3$ ]<sup>+</sup> (100), 101 (9,9), 87 (61,2), 74 (14,7), 55 (21,8), 43 [ $CH_3CO$ ]<sup>+</sup> (60,2).

**Metil-2-acetilheptadekanoat (S<sub>9a</sub>)** – Prinos 70%; GC-MS čistoća: 93,5%, RI (DB-5) = 2272; MS (EI, 70 eV), *m/z* (rel. int, %): 326 [M]<sup>+</sup> (0,6), 311 [M – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (0,3), 295 [M – OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (1,5), 284 (21,9), 255 (2,0), 241 (8,9), 227 (1,3), 213 (0,8), 199 (4,1), 185 (4,7), 172 (2,3), 154 (1,6), 143 (12,2), 129 [ $C_6H_9O_3$ ]<sup>+</sup> (31,5), 116 [ $C_5H_8O_3$ ]<sup>+</sup> (100), 101 (9,2), 87 (59), 74 (14,3), 55 (21,8), 43 [ $CH_3CO$ ]<sup>+</sup> (61).

### 4.7.2.3. DOBIJANJE METIL-2-ACETIL-2-METILALKANOATA

Metil-2-acetil-2-metilalkanoati (S<sub>1b-9b</sub>) su dobijeni alkilovanjem metil-2-acetilalkanoata (S<sub>1a-9a</sub>; 3,75 mmol) komercijalno dostupnim metil-jodidom (4,5 mmol) po proceduri analognoj onoj opisanoj u sekciji 4.7.2.2. Sirovi metil-2-acetil-2-metilalkanoati S<sub>1b-9b</sub> su korišćeni u daljoj sintezi bez dodatnog prečišćavanja, a njihova čistoća i prinos su određeni na osnovu GC-MS analize.

**Metil-2-acetil-2-metilnonanoat (S<sub>1b</sub>)** – Prinos 90%; GC-MS čistoća: 93,4%, RI (DB-5) = 1507; MS (EI, 70 eV), *m/z* (rel. int, %): 228 [M]<sup>+</sup> (0,1), 197 [M – OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (1,8), 186 (65), 169 [M – COOCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (1,8), 157 (3,5), 143 (30,8), 130 [ $CH_3COCH(CH_3)COOCH_3$ ]<sup>+</sup> (60,4), 112 (5,3), 101 (100), 98 (13,6), 88 (7,7), 69 (13,6), 55 (13,3), 43 [ $CH_3CO$ ]<sup>+</sup> (43,8).

**Metil-2-acetil-2-metildekanoat (S<sub>2b</sub>)** – Prinos 86%; GC-MS čistoća: 94,9%, RI (DB-5) = 1608; MS (EI, 70 eV), *m/z* (rel. int, %): 242 [M]<sup>+</sup> (0,1), 211 [M – OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (1,5), 200 (64,8), 183 [M – COOCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (1,8), 171 (3,3), 157 (26,7), 143 (22,8), 130 [ $CH_3COCH(CH_3)COOCH_3$ ]<sup>+</sup> (49), 112 (5,2), 101 (100), 98 (13), 88 (7,9), 69 (13,1), 55 (13), 43 [ $CH_3CO$ ]<sup>+</sup> (43,1).

**Metil-2-acetil-2-metilundekanoat (S<sub>3b</sub>)** – Prinos 86%; GC-MS čistoća: 93,9%, RI (DB-5) = 1709; MS (EI, 70 eV), *m/z* (rel. int, %): 256 [M]<sup>+</sup> (0,1), 225 [M – OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (1,3), 213 (64,4), 197 [M – COOCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (1,6), 185 (3,1), 171 (7,6), 157 (25,3), 143 (11,3), 130

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

$[\text{CH}_3\text{COCH}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3]^+$  (48,6), 112 (5), 101 (100), 98 (12,9), 88 (8), 69 (12,8), 55 (12,7), 43  $[\text{CH}_3\text{CO}]^+$  (42,5).

**Metil-2-acetil-2-metildodekanoat (S<sub>4b</sub>)** – Prinos 85%; GC-MS čistoća: 95,9%, RI (DB-5) = 1810; MS (EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int, %): 270  $[\text{M}]^+$  (0,1), 239  $[\text{M} - \text{OCH}_3]^+$  (1,4), 228 (64,3), 211  $[\text{M} - \text{COOCH}_3]^+$  (1,5), 199 (3), 185 (7,9), 171 (15,0), 157 (15,8), 143 (10,8), 130  $[\text{CH}_3\text{COCH}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3]^+$  (48,5), 112 (5), 101 (100), 98 (13,1), 88 (7,9), 69 (12,7), 55 (12,6), 43  $[\text{CH}_3\text{CO}]^+$  (42,2).

**Metil-2-acetil-2-metiltridekanoat (S<sub>5b</sub>)** – Prinos 82%; GC-MS čistoća: 95,9%, RI (DB-5) = 1910; MS (EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int, %): 284  $[\text{M}]^+$  (0,1), 253  $[\text{M} - \text{OCH}_3]^+$  (1,3), 242 (64,7), 225  $[\text{M} - \text{COOCH}_3]^+$  (1,4), 213 (2,9), 199 (7,6), 185 (14,9), 171 (2,4), 157 (15,9), 143 (10,7), 130  $[\text{CH}_3\text{COCH}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3]^+$  (48,6), 112 (5), 101 (100), 98 (12,9), 88 (7,9), 69 (12,8), 55 (12,7), 43  $[\text{CH}_3\text{CO}]^+$  (42,5).

**Metil-2-acetil-2-metiltetradekanoat (S<sub>6b</sub>)** – Prinos 84%; GC-MS čistoća: 95,8%, RI (DB-5) = 2012; MS (EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int, %): 298  $[\text{M}]^+$  (0,1), 267  $[\text{M} - \text{OCH}_3]^+$  (1,2), 256 (67,3), 239  $[\text{M} - \text{COOCH}_3]^+$  (1,2), 213 (6,6), 199 (14,6), 185 (4,2), 171 (2), 157 (16,9), 143 (9,7), 130  $[\text{CH}_3\text{COCH}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3]^+$  (52,6), 112 (5,1), 101 (100), 98 (12,6), 88 (8,5), 69 (13,7), 55 (13,7), 43  $[\text{CH}_3\text{CO}]^+$  (45,6).

**Metil-2-acetil-2-metilpentadekanoat (S<sub>7b</sub>)** – Prinos 80%; GC-MS čistoća: 95,4%, RI (DB-5) = 2114; MS (EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int, %): 312  $[\text{M}]^+$  (0,2), 281  $[\text{M} - \text{OCH}_3]^+$  (1,1), 270 (73,8), 253  $[\text{M} - \text{COOCH}_3]^+$  (1,1), 227 (5,7), 213 (13,9), 199 (4,3), 185 (1,9), 171 (4,0), 157 (19,4), 143 (8,6), 130  $[\text{CH}_3\text{COCH}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3]^+$  (57,7), 112 (5,5), 101 (100), 98 (12,4), 88 (9), 69 (14,3), 55 (13,4), 43  $[\text{CH}_3\text{CO}]^+$  (43,6).

**Metil-2-acetil-2-metilheksadekanoat (S<sub>8b</sub>)** – Prinos 81%; GC-MS čistoća: 95,2%, RI (DB-5) = 2213; MS (EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int, %): 326  $[\text{M}]^+$  (0,1), 295  $[\text{M} - \text{OCH}_3]^+$  (1), 284 (75,6), 267  $[\text{M} - \text{COOCH}_3]^+$  (1,5), 241 (3,4), 227 (13,7), 213 (3,3), 199 (2,8), 185 (4,0), 171 (2,3), 157 (17,4), 143 (8,3), 130  $[\text{CH}_3\text{COCH}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3]^+$  (60,8), 112 (5,5), 101 (100), 98 (12), 88 (9,3), 69 (14,4), 55 (14,5), 43  $[\text{CH}_3\text{CO}]^+$  (47,6).

**Metil-2-acetil-2-metilheptadekanoat (S<sub>9b</sub>)** – Prinos 84%; GC-MS čistoća: 95,6%, RI (DB-5) = 2313; MS (EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int, %): 340  $[\text{M}]^+$  (0,1), 309  $[\text{M} - \text{OCH}_3]^+$  (0,8), 298 (79,7), 281  $[\text{M} - \text{COOCH}_3]^+$  (1,8), 265 (1,2), 255 (5,4), 241 (13,9), 227 (1,5), 213 (3,9), 199 (5,3), 185 (4,1), 171 (1,3), 157 (16,4), 143 (8,7), 130  $[\text{CH}_3\text{COCH}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3]^+$  (64,5), 112 (6,4), 101 (100), 98 (11,7), 88 (9,7), 69 (14,3), 55 (15,1), 43  $[\text{CH}_3\text{CO}]^+$  (50,7).

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

**4.7.2.4. OPŠTA PROCEDURA ZA DOBIJANJE 3-METIL-2-ALKANONA (OHNUMA ET AL., 1989)**

Smeša metil-2-acetil-2-metilalkanoata (3 mmol), vodenog rastvora KOH koncentracije 2 mol/dm<sup>3</sup> (20 ml) i EtOH (3,3 ml) je mešana na sobnoj temperaturi tokom 24 h. Nakon toga je reakcionala smeša zakišljena 10%-tnom HCl (*aq.*) i ekstrahovana 3 puta sa po 50 ml dietil-eta. Etarski ekstrakti su spojeni, sušeni nad anhidrovanim MgSO<sub>4</sub>, a zatim je rastvarač uparen na rotacionom-vakuum uparivaču. Ovako dobijeni sirovi 3-metil-2-alkanoni (**S<sub>1-9</sub>**) su prečišćeni *dry flash* kolonskom hromatografijom na silika-gelu 60 (40–63 µm, Merck, Darmštat, Nemačka). Korišćen je gradijent od čistog heksana do 2%-nog dietil-eta (v/v) u heksanu sa korakom od 1%.

**3-Metil-2-dekanon (S<sub>1</sub>)** – Prinos 95%; GC-MS čistoća: 99,4%; RI (DB-5) = 1239; MS (EI, 70 eV), *m/z* (rel. int, %): 170 [M]<sup>+</sup> (1,4), 155 [M – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (0,1), 127 [M – CH<sub>3</sub>CO]<sup>+</sup> (0,3), 113 [M – C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> (0,4), 99 (0,5), 85 (13,4), 72 [C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O]<sup>+</sup> (100), 71 [CH<sub>3</sub>COCHCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (10,0), 57 [C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> (14,2), 43 [CH<sub>3</sub>CO]<sup>+</sup> (59,7); FTIR-ATR (neat) cm<sup>-1</sup>: 2922, 2852, 1713 (C=O), 1461, 1354, 1121, 723; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2,50 (*sext*, *J* = 6,9 Hz, 1H, CH), 2,13 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>C=O), 1,30–1,20 (*m*, 12H, 6 × CH<sub>2</sub>), 1,08 (*d*, *J* = 6,9 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>), 0,88 (*t*, *J* = 7,0 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 213,0 (C=O), 47,2 (CH), 32,9 (CH<sub>2</sub>), 31,9 (CH<sub>2</sub>), 29,6 (CH<sub>2</sub>), 29,3 (CH<sub>2</sub>), 27,9 (CH<sub>3</sub>C=O), 27,2 (CH<sub>2</sub>), 22,7 (CH<sub>2</sub>), 16,1 (CHCH<sub>3</sub>), 14,1 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**3-Metil-2-undekanon (S<sub>2</sub>)** – Prinos 93%; GC-MS čistoća: 99,4%; RI (DB-5) = 1342; MS (EI, 70 eV), *m/z* (rel. int, %): 184 [M]<sup>+</sup> (0,9), 169 [M – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (0,1), 141 [M – CH<sub>3</sub>CO]<sup>+</sup> (0,2), 127 [M – C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> (0,4), 113 (0,5), 99 (0,3), 85 (13,7), 72 [C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O]<sup>+</sup> (100), 71 [CH<sub>3</sub>COCHCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (12,9), 57 [C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> (16,8), 43 [CH<sub>3</sub>CO]<sup>+</sup> (55,9); FTIR-ATR (neat) cm<sup>-1</sup>: 2921, 2852, 1713 (C=O), 1461, 1354, 1122, 723; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2,50 (*sext*, *J* = 6,9 Hz, 1H, CH), 2,13 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>C=O), 1,30–1,19 (*m*, 14H, 7 × CH<sub>2</sub>), 1,08 (*d*, *J* = 6,9 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>), 0,88 (*t*, *J* = 7,0 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 213,0 (C=O), 47,2 (CH), 32,9 (CH<sub>2</sub>), 31,9 (CH<sub>2</sub>), 29,6 (CH<sub>2</sub>), 29,5 (CH<sub>2</sub>), 29,3 (CH<sub>2</sub>), 27,9 (CH<sub>3</sub>C=O), 27,2 (CH<sub>2</sub>), 22,7 (CH<sub>2</sub>), 16,1 (CHCH<sub>3</sub>), 14,1 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**3-Metil-2-dodekanon (S<sub>3</sub>)** – Prinos 95%; GC-MS čistoća: 99,3%; RI (DB-5) = 1442; MS (EI, 70 eV), *m/z* (rel. int, %): 198 [M]<sup>+</sup> (0,9), 183 [M – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (0,1), 155 [M – CH<sub>3</sub>CO]<sup>+</sup> (0,2), 141 [M – C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> (0,4), 127 (0,5), 113 (0,2), 109 (0,8), 99 (1,1), 85 (13,0), 72 [C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O]<sup>+</sup> (100), 71 [CH<sub>3</sub>COCHCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (7,9), 57 [C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> (18,7), 43 [CH<sub>3</sub>CO]<sup>+</sup> (44,4); FTIR-ATR (neat)

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

$\text{cm}^{-1}$ : 2921, 2851, 1713 (C=O), 1460, 1354, 1121, 723;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2,50 (*sext*,  $J = 6,9$  Hz, 1H, CH), 2,13 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3\text{C=O}$ ), 1,32–1,19 (*m*, 16H, 8  $\times$   $\text{CH}_2$ ), 1,08 (*d*,  $J = 6,9$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 0,88 (*t*,  $J = 7,0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  213,0 (C=O), 47,2 (CH), 32,9 ( $\text{CH}_2$ ), 31,9 ( $\text{CH}_2$ ), 29,7 ( $\text{CH}_2$ ), 29,6 ( $\text{CH}_2$ ), 29,5 ( $\text{CH}_2$ ), 29,3 ( $\text{CH}_2$ ), 27,9 ( $\underline{\text{CH}}_3\text{C=O}$ ), 27,2 ( $\text{CH}_2$ ), 22,7 ( $\text{CH}_2$ ), 16,1 ( $\text{CHCH}_3$ ), 14,1 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).

**3-Metil-2-tridekanon (S<sub>4</sub>)** – Prinos 90%; GC-MS čistoća: 99,2%, RI (DB-5) = 1544; MS (EI, 70 eV), *m/z* (rel. int, %): 212 [M]<sup>+</sup> (0,7), 197 [M –  $\text{CH}_3$ ]<sup>+</sup> (0,1), 169 [M –  $\text{CH}_3\text{CO}$ ]<sup>+</sup> (0,1), 155 [M –  $\text{C}_4\text{H}_9$ ]<sup>+</sup> (0,2), 141 (0,2), 127 (0,6), (0,4), 109 (0,6), 95 (0,9), 85 (12,5), 72 [ $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ ]<sup>+</sup> (100), 71 [ $\text{CH}_3\text{COCHCH}_3$ ]<sup>+</sup> (8,0), 57 [ $\text{C}_4\text{H}_9$ ]<sup>+</sup> (15,3), 43 [ $\text{CH}_3\text{CO}$ ]<sup>+</sup> (40,8); FTIR-ATR (neat)  $\text{cm}^{-1}$ : 2924, 2852, 1713 (C=O), 1461, 1354, 1121, 723;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2,50 (*sext*,  $J = 6,9$  Hz, 1H, CH), 2,13 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3\text{C=O}$ ), 1,32–1,19 (*m*, 18H, 9  $\times$   $\text{CH}_2$ ), 1,08 (*d*,  $J = 6,9$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 0,88 (*t*,  $J = 7,0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  213,0 (C=O), 47,2 (CH), 32,9 ( $\text{CH}_2$ ), 31,9 ( $\text{CH}_2$ ), 29,7 (2  $\times$   $\text{CH}_2$ ), 29,6 ( $\text{CH}_2$ ), 29,5 ( $\text{CH}_2$ ), 29,3 ( $\text{CH}_2$ ), 27,9 ( $\underline{\text{CH}}_3\text{C=O}$ ), 27,2 ( $\text{CH}_2$ ), 22,7 ( $\text{CH}_2$ ), 16,1 ( $\text{CHCH}_3$ ), 14,1 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).

**3-Metil-2-tetradekanon (S<sub>5</sub>)** – Prinos 92%; GC-MS čistoća: 99,3%, RI (DB-5) = 1643; MS (EI, 70 eV), *m/z* (rel. int, %): 226 [M]<sup>+</sup> (0,8), 211 [M –  $\text{CH}_3$ ]<sup>+</sup> (0,1), 183 [M –  $\text{CH}_3\text{CO}$ ]<sup>+</sup> (0,1), 169 [M –  $\text{C}_4\text{H}_9$ ]<sup>+</sup> (0,2), 154 [M –  $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ ]<sup>+</sup> (0,1), 141 (0,3), 127 (0,7), 109 (0,4), 99 (0,9), 85 (12,3), 72 [ $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ ]<sup>+</sup> (100), 71 [ $\text{CH}_3\text{COCHCH}_3$ ]<sup>+</sup> (7,4), 57 [ $\text{C}_4\text{H}_9$ ]<sup>+</sup> (14), 43 [ $\text{CH}_3\text{CO}$ ]<sup>+</sup> (35,5); FTIR-ATR (neat)  $\text{cm}^{-1}$ : 2926, 2854, 1712 (C=O), 1461, 1354, 1119, 721;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2,50 (*sext*,  $J = 6,9$  Hz, 1H, CH), 2,13 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3\text{C=O}$ ), 1,34–1,19 (*m*, 20H, 10  $\times$   $\text{CH}_2$ ), 1,08 (*d*,  $J = 6,9$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 0,88 (*t*,  $J = 7,0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  213,0 (C=O), 47,2 (CH), 32,9 ( $\text{CH}_2$ ), 31,9 ( $\text{CH}_2$ ), 29,7 (3  $\times$   $\text{CH}_2$ ), 29,6 ( $\text{CH}_2$ ), 29,5 ( $\text{CH}_2$ ), 29,3 ( $\text{CH}_2$ ), 27,9 ( $\underline{\text{CH}}_3\text{C=O}$ ), 27,2 ( $\text{CH}_2$ ), 22,7 ( $\text{CH}_2$ ), 16,1 ( $\text{CHCH}_3$ ), 14,1 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).

**3-Metil-2-pentadekanon (S<sub>6</sub>)** – Prinos 89%; GC-MS čistoća: 99,2%, RI (DB-5) = 1746; MS (EI, 70 eV), *m/z* (rel. int, %): 240 [M]<sup>+</sup> (0,7), 225 [M –  $\text{CH}_3$ ]<sup>+</sup> (0,1), 197 [M –  $\text{CH}_3\text{CO}$ ]<sup>+</sup> (0,1), 183 [M –  $\text{C}_4\text{H}_9$ ]<sup>+</sup> (0,1), 168 [M –  $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ ]<sup>+</sup> (0,1), 155 (0,1), 141 (0,5), 127 (0,3), 113 (0,6), 109 (0,8), 91 (1), 85 (13,1), 72 [ $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ ]<sup>+</sup> (100), 71 [ $\text{CH}_3\text{COCHCH}_3$ ]<sup>+</sup> (7,5), 57 [ $\text{C}_4\text{H}_9$ ]<sup>+</sup> (13,8), 43 [ $\text{CH}_3\text{CO}$ ]<sup>+</sup> (35,3); FTIR-ATR (neat)  $\text{cm}^{-1}$ : 2921, 2853, 1714 (C=O), 1462, 1346, 1119, 715;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2,50 (*sext*,  $J = 6,9$  Hz, 1H, CH), 2,13 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3\text{C=O}$ ), 1,33–1,22 (*m*, 22H, 11  $\times$   $\text{CH}_2$ ), 1,08 (*d*,  $J = 6,9$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 0,88 (*t*,  $J$

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

= 7,0 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 212,9 (C=O), 47,2 (CH), 32,9 (CH<sub>2</sub>), 31,9 (CH<sub>2</sub>), 29,7 (4 × CH<sub>2</sub>), 29,6 (CH<sub>2</sub>), 29,5 (CH<sub>2</sub>), 29,3 (CH<sub>2</sub>), 27,9 (CH<sub>3</sub>C=O), 27,2 (CH<sub>2</sub>), 22,7 (CH<sub>2</sub>), 16,1 (CHCH<sub>3</sub>), 14,1 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**3-Metil-2-heksadekanon (S<sub>7</sub>)** – Prinos 93%; GC-MS čistoća: 99,1%, RI (DB-5) = 1849; MS (EI, 70 eV), *m/z* (rel. int, %): 254 [M]<sup>+</sup> (0,6), 239 [M – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (0,1), 211 [M – CH<sub>3</sub>CO]<sup>+</sup> (0,1), 197 [M – C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> (0,1), 182 [M – C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O]<sup>+</sup> (0,1), 169 (0,1), 155 (0,1), 141 (0,3), 127 (0,6), 109 (0,4), 97 (0,9), 85 (11,4), 72 [C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O]<sup>+</sup> (100), 71 [CH<sub>3</sub>COCHCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (6,5), 57 [C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> (12,6), 43 [CH<sub>3</sub>CO]<sup>+</sup> (32,3); FTIR-ATR (neat) cm<sup>-1</sup>: 2921, 2852, 1714 (C=O), 1461, 1347, 1119, 715; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2,50 (*sext*, *J* = 6,9 Hz, 1H, CH), 2,13 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>C=O), 1,32–1,22 (*m*, 24H, 12 × CH<sub>2</sub>), 1,08 (*d*, *J* = 6,9 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>), 0,88 (*t*, *J* = 7,0 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 212,9 (C=O), 47,2 (CH), 32,9 (CH<sub>2</sub>), 31,9 (CH<sub>2</sub>), 29,7 (5 × CH<sub>2</sub>), 29,6 (CH<sub>2</sub>), 29,5 (CH<sub>2</sub>), 29,3 (CH<sub>2</sub>), 27,9 (CH<sub>3</sub>C=O), 27,2 (CH<sub>2</sub>), 22,7 (CH<sub>2</sub>), 16,1 (CHCH<sub>3</sub>), 14,1 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**3-Metil-2-heptadekanon (S<sub>8</sub>)** – Prinos 86%; GC-MS čistoća: 99,4%, RI (DB-5) = 1950; MS (EI, 70 eV), *m/z* (rel. int, %): 268 [M]<sup>+</sup> (0,8), 255 [M – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (0,1), 225 [M – CH<sub>3</sub>CO]<sup>+</sup> (0,1), 211 [M – C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> (0,1), 196 [M – C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O]<sup>+</sup> (0,1), 169 (0,1), 155 (0,1), 141 (0,1), 127 (0,3), 113 (0,6), 109 (0,5), 97 (1,1), 85 (11,5), 72 [C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O]<sup>+</sup> (100), 71 [CH<sub>3</sub>COCHCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (6,2), 57 [C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> (11,1), 43 [CH<sub>3</sub>CO]<sup>+</sup> (28,7); FTIR-ATR (neat) cm<sup>-1</sup>: 2920, 2851, 1713 (C=O), 1460, 1352, 1123, 720; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2,52 (*sext*, *J* = 6,9 Hz, 1H, CH), 2,15 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>C=O), 1,39–1,21 (*m*, 26H, 13 × CH<sub>2</sub>), 1,10 (*d*, *J* = 6,9 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>), 0,90 (*t*, *J* = 7,0 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 213,1 (C=O), 47,2 (CH), 33,0 (CH<sub>2</sub>), 31,9 (CH<sub>2</sub>), 29,7 (6 × CH<sub>2</sub>), 29,6 (CH<sub>2</sub>), 29,5 (CH<sub>2</sub>), 29,4 (CH<sub>2</sub>), 28,0 (CH<sub>3</sub>C=O), 27,3 (CH<sub>2</sub>), 22,7 (CH<sub>2</sub>), 16,2 (CHCH<sub>3</sub>), 14,2 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**3-Metil-2-oktadekanon (S<sub>9</sub>)** – Prinos 85%; GC-MS čistoća: 99,5%, RI (DB-5) = 2051; MS (EI, 70 eV), *m/z* (rel. int, %): 282 [M]<sup>+</sup> (0,7), 267 [M – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (0,1), 239 [M – CH<sub>3</sub>CO]<sup>+</sup> (0,1), 225 [M – C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> (0,1), 210 [M – C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O]<sup>+</sup> (0,1), 183 (0,1), 169 (0,1), 155 (0,1), 141 (0,3), 127 (0,6), 109 (0,5), 97 (1,1), 85 (11,5), 72 [C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O]<sup>+</sup> (100), 71 [CH<sub>3</sub>COCHCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (6,2), 57 [C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> (11,1), 43 [CH<sub>3</sub>CO]<sup>+</sup> (28,7); FTIR-ATR (neat) cm<sup>-1</sup>: 2919, 2852, 1713 (C=O), 1461, 1352, 1124, 720; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2,52 (*sext*, *J* = 6,9 Hz, 1H, CH), 2,15 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>C=O), 1,39–1,21 (*m*, 28H, 14 × CH<sub>2</sub>), 1,10 (*d*, *J* = 6,9 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>), 0,90 (*t*, *J* = 7,0 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 213,1

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

(C=O), 47,2 (CH), 33,0 (CH<sub>2</sub>), 31,9 (CH<sub>2</sub>), 29,7 (7 × CH<sub>2</sub>), 29,6 (CH<sub>2</sub>), 29,5 (CH<sub>2</sub>), 29,4 (CH<sub>2</sub>), 28,0 (CH<sub>3</sub>C=O), 27,3 (CH<sub>2</sub>), 22,7 (CH<sub>2</sub>), 16,2 (CHCH<sub>3</sub>), 14,1 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

### 4.7.3. ODREĐIVANJE KOLIČINE 3-METIL-2-ALKANONA U KORENU BILJNE VRSTE *I. HELENIUM*

Kvantifikacija 3-metil-2-alkanona je izvršena pomoću GC-FID analize. Svi sintetisani 3-metil-2-alkanoni **S<sub>1-9</sub>** su injektovani u pet različitih koncentracija (0,009, 0,045, 0,18, 0,45 i 0,9 mg/ml) u cilju konstrukcije kalibracionih prava  $C = f(A)$ , gde je C – koncentracija 3-metil-2-alkanona, a A – površina ispod pika u gasnom hromatogramu koju odgovara datom 3-metil-2-alkanonu u datoј koncentraciji. Svaka GC-FID analiza je ponovljena 3 puta. Podaci su obraćeni pomoću *GC ChemStation* softvera (ver. B.03.01., Agilent Technologies, Santa Klara, SAD).

### 4.7.4. ANALIZA FRAKCIJE ETARSKOG ULJA KOJA JE OBOGAĆENA NEPOZNATIM SESKVITERPENSKIM ALDEHIDOM POMOĆU NMR METODE ZASNOVANE NA PRIMENI REAGENASA HEMIJSKOG POMERANJA

U cilju određivanja strukture nepoznatog seskviterpenskog aldehyda (**R**) veća količina etarskog ulja (2,1 g) je podvrgnuta *dry flash* hromatografiji na koloni silika-gela 60 (20-45 µm, Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Nemačka). U prve tri frakcije (**I-III**) je kao eluent primenjen čist heksan (100 ml), a zatim su redom korišćeni 1%-tni dietil-etal u heksanu (v/v; *frakcija IV*, 100 ml), 2%-tni dietil-etal u heksanu (*frakcije V* i **VI**, po 100 ml) i na kraju čist dietil-etal (*frakcija VII*, 100 ml). Dobijene frakcije su ukoncentrovane na rotacionom-vakuum uparivaču, na sobnoj temperaturi. GC-MS analiza je pokazala da *frakcije III* i **IV** sadrže kao glavnu sastojak seskviterpenski aldehyd **R**. Ove frakcije su spojene, a na taj način je dobijen uzorak **R<sub>III-IV</sub>** (4,8 mg) u kome je sadržaj seskviterpenskog aldehyda bio 85%. Glavna onečišćenja su bila geranil-isobutanoat (**T**; 8%) i neril-izobutanoat (**U**; 5%). Geranil-izobutanoat je sintetisan iz geraniola i izobutanske kiseline Šteglihovom (Steglich) metodom pomoću DCC-a i DMAP-a.<sup>††††</sup>

Nakon NMR eksperimenata zasnovanih na primeni reagensa hemijskog pomeranja utvrđeno je da je jedinjenje **R** elemenal. Kao reagens hemijskog pomeranja korišćen je

<sup>††††</sup> Postupak je bio analogan onom opisanom u odeljku 4.5.7.

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

Eu(fod)<sub>3</sub>. U približno 0,015 M rastvor elemenala u smeši geranil- i neril-izobutanoata dodate su ukupno četiri ekvimolarne porcije reagensa hemijskog pomeranja. Molski odnos reagensa hemijskog pomeranja i elemenala je bio u opsegu od 0 do 0,6. Nakon rastvaranja svake porcije reagensa hemijskog pomeranja snimani su NMR spektri.

Svi NMR spektri snimljeni su na 27 °C u CDCl<sub>3</sub> sa tetrametilsilanom kao internim standardom. Odgovarajuća masa uzorka (20 mg za neril- i geranil-izobutanoat i 4,8 mg za frakciju koja je sadržala elemenal) je rastvorena u 1 ml CDCl<sub>3</sub>, a 0,7 ml tog rastvora je prebačeno u 5 mm Wilmad 528-TR-7 NMR kivetu. <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C su snimljeni na Bruker Avance III 400 MHz spektrometru (<sup>1</sup>H na 400 MHz, a <sup>13</sup>C na 101 MHz), opremljenim sa <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C radnom glavom (*probe head*). <sup>1</sup>H NMR spektri su snimljeni sa 16 ponavljanja, relaksacionim vremenom od 1 s, vremenom prikupljanja signala od 4 s, 0,125 Hz digitalnom FID rezolucijom, 51 280 FID veličinom, sa spektralnom širinom od 6410 Hz i rezolucijom tačaka od 0,0003 ppm. <sup>13</sup>C NMR spektri su snimljeni uz Waltz16 <sup>1</sup>H širokopojasno dekuplovanje, 12000 ponavljanja, relaksacionim vremenom od 0,5 s, vremenom akumulacije signala od 1 s, digitalnom FID rezolucijom od 0,5 Hz, 65536 FID veličinom, spektralnom širinom od 31850 Hz i rezolucijom tačaka od 0,005 ppm. Za snimanje 2D spektara korišćene su standardne pulsne sekvence iz softvera instrumenta. <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H gDQCOSY i NOESY spektri su snimljeni sa spektralnim širinama od 5 kHz i u F2 i u F1 oblasti. Snimanje je vršeno sa 1024 × 512 tačaka sa 32 ponavljanja i vremenom relaksacije od 2,0 s. Vreme mešanja prilikom snimanja NOESY spektara je bilo 1 s. Obrada podataka vršena je na matrici sa 1024 podataka. Inverzno-detektovani 2D spektri heteronuklearne korelacije su mereni u 512 kompleksnih tačaka u F2 i 256 uzastopnih tačaka u F1, pri čemu je prikupljeno 128 (gHMQC) ili 256 (<sup>1</sup>H – <sup>13</sup>C gHMBC) ponavljanja po tački sa relaksacionim vremenom od 1,0 s. Spektralna širina za F2 dimenziju je bila 5 kHz, a za F1 27 kHz. gHMQC eksperimenti su bili optimizovani za C-H kuplovanje od 125 Hz. <sup>1</sup>H – <sup>13</sup>C gHMBC eksperimenti su bili optimizovani za kuplovanje od 10 Hz. Furijeova transformacija je bila izvršena na matrici od 512 podataka. Za sve 2D spektre korišćene su kvadratne sinusne funkcije pomerene za π/2 duž F1 i F2 ose.

**Elemenal (R) – RI (DB-5) = 1578; GC-MS čistoća: 85,1%; MS (EI, 70 eV), *m/z* (rel. int, %): 218 [M]<sup>+</sup> (2,1), 217 [M – H]<sup>+</sup> (0,6), 203 [M – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (14,9), 200 [M – H<sub>2</sub>O] (3,5), 189 [M – HCO]<sup>+</sup> (9,6), 175 (15,5), 161 (28,7), 147 (21,7), 133 (18,8), 121 (27,1), 119 (28),**

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

107 (37,7), 105 (34,6), 95 (38,6), 93 (47), 91 (52), 81 (100), 79 (64,3), 77 (34,1), 68 (35), 67 (60,6), 55 (32,7), 53 (40,9), 41 (49,7), 39 (28,2);  $^1\text{H}$ - i  $^{13}\text{C}$ - NMR podaci su dati u tabeli 5.14.

**Geranil-izobutanoat (T)** – RI (DB-5) = 1506; MS (EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int, %): 224  $[\text{M}]^+$  (0,2), 181  $[\text{M} - \text{C}_3\text{H}_7]^+$  (0,1), 154 (2,3), 136 (16,7), 121 (29), 107 (8,2), 93 (46,1), 80 (19,8), 69  $[(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CCH}_2]^+$  (100), 53 (9,4), 41 (41);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,33 (*pseudo-t sext*,  $J = 7,0, 1,3$  Hz, 1H, -O-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-), 5,08 (*pseudo-t hept*,  $J = 6,8, 1,4$  Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub><sup>cis</sup>)CH<sub>3</sub><sup>trans</sup>), 4,58 (*br. d*,  $J = 7,0$  Hz, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-), 2,54 (*hept*,  $J = 7,0$  Hz, 1H, ( $\text{CH}_3)_2\text{CHC=O}$ ), 2,15–2,07 (*m*, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub><sup>cis</sup>)CH<sub>3</sub><sup>trans</sup>), 2,07–2,01 (*m*, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-), 1,70 (*br. s*, 3H, -O-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-), 1,68 (*br. d*,  $J = 1,0$  Hz, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub><sup>cis</sup>)CH<sub>3</sub><sup>trans</sup>), 1,60 (*br. s*, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub><sup>cis</sup>)CH<sub>3</sub><sup>trans</sup>), 1,16 (*d*,  $J = 7,0$  Hz, 6H, ( $\text{CH}_3)_2\text{CHC=O}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  177,3 (( $\text{CH}_3)_2\text{CHC=O}$ ), 142,0 (O-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-), 131,9 (-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub><sup>cis</sup>)CH<sub>3</sub><sup>trans</sup>), 124,0 (-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub><sup>cis</sup>)CH<sub>3</sub><sup>trans</sup>), 118,8 (O-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-), 61,4 (O-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-), 39,7 (O-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-), 34,2 (( $\text{CH}_3)_2\text{CHC=O}$ ), 26,5 (-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub><sup>cis</sup>)CH<sub>3</sub><sup>trans</sup>), 25,8 (-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub><sup>cis</sup>)CH<sub>3</sub><sup>trans</sup>), 19,2 (( $\text{CH}_3)_2\text{CHC=O}$ ), 17,8 (-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub><sup>cis</sup>)CH<sub>3</sub><sup>trans</sup>), 16,6 (O-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-).

**Neril-izobutanoat (U)** – RI (DB-5) = 1482; MS (EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int, %): 224  $[\text{M}]^+$  (0,2), 181  $[\text{M} - \text{C}_3\text{H}_7]^+$  (0,1), 154 (2,2), 136 (13,9), 121 (34,1), 107 (8,6), 93 (68,3), 80 (26,8), 69  $[(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CCH}_2]^+$  (100), 53 (9,9), 41 (53,1);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,35 (*pseudo-t sext*,  $J = 7,2, 1,3$  Hz, 1H, -O-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-), 5,10 (*pseudo-t hept*,  $J = 6,9, 1,4$  Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub><sup>cis</sup>)CH<sub>3</sub><sup>trans</sup>), 4,56 (*br. d*,  $J = 7,2$  Hz, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-), 2,53 (*hept*,  $J = 7,0$  Hz, 1H, ( $\text{CH}_3)_2\text{CHC=O}$ ), 2,15–2,03 (*m*, 4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,76 (*pseudo-q*,  $J = 1,3$  Hz, 3H, -O-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-), 1,68 (*br. s*, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub><sup>cis</sup>)CH<sub>3</sub><sup>trans</sup>), 1,60 (*br. s*, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub><sup>cis</sup>)CH<sub>3</sub><sup>trans</sup>), 1,16 (*d*,  $J = 7,0$  Hz, 6H, ( $\text{CH}_3)_2\text{CHC=O}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  177,3 (( $\text{CH}_3)_2\text{CHC=O}$ ), 142,4 (O-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-), 132,2 (-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub><sup>cis</sup>)CH<sub>3</sub><sup>trans</sup>), 123,8 (-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub><sup>cis</sup>)CH<sub>3</sub><sup>trans</sup>), 119,6 (O-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-), 61,1 (O-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-), 34,2 (( $\text{CH}_3)_2\text{CHC=O}$ ), 32,4 (O-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-), 26,8 (-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub><sup>cis</sup>)CH<sub>3</sub><sup>trans</sup>), 25,8 (-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub><sup>cis</sup>)CH<sub>3</sub><sup>trans</sup>), 23,6 (O-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-), 19,2 (( $\text{CH}_3)_2\text{CHC=O}$ ), 17,8 (-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub><sup>cis</sup>)CH<sub>3</sub><sup>trans</sup>).

**4.8. ISPITIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI****4.8.1. KORIŠĆENI MIKROORGANIZMI**

Za određivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja, izolovanih i sintetisanih jedinjenja korišćeno je trinaest Gram-požitivnih, devet Gram-negativnih sojeva bakterija i sedam fudgalnih mikroorganizama (tabela 4.2). Plesni *Aspergillus fumigatus*, *A. restrictus*, *Acremonium chrysogenum*, i *Penicillium chrysogenum* izolovane su iz prašine dušeka, identifikovane od strane dr B. Rankovića, sa Instituta za biologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Kragujevcu, a gajene na podlozi od krompir dekstroznog agra (PDA). Klinički izolati bakterija su nabavljeni iz Instituta za javno zdravlje u Kragujevcu i Instituta za javno zdravlje u Nišu. Gram-negativna bakterija *E. coli* 95 nabavljena je iz Instituta za imunologiju i virologiju „Torlak“ iz Beograda.

**TABELA 4.2. MIKROORGANIZMI KORIŠĆENI ZA ISPITIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI**

GRAM-POZITIVNE BAKTERIJE	
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 9139, izolat iz hrane
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 19574
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404
<i>Micrococcus flavus</i>	ATCC 10240
<i>Corynebacterium pyogenes</i>	ATCC 19411
<i>Sarcina lutea</i>	ATCC 9341, izolat iz hrane
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, ATCC 25923, ATCC 27853, klinički izolat
GRAM-NEGATIVNE BAKTERIJE	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739, ATCC 25922, Torlak 95, klinički izolat
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031, klinički izolat
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 8427
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
<i>Salmonella enterica</i>	ATCC 13076
KVASCI	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 9763
PLESNI	
<i>Acremonium chrysogenum</i>	izolat iz prašine dušeka

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

NASTAVAK TABELE 4.2.	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	izolat iz prašine dušeka
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404
<i>Aspergillus restrictus</i>	izolat iz prašine dušeka
<i>Penicillium chrysogenum</i>	izolat iz prašine dušeka

4.8.2. TESTIRANJE *IN VITRO* ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti vršeno je mikrodilucionom metodom (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007). Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) vršeno je metodom serije razblaženja na mikrotitarskim pločama sa 96 bunarića. Bakterije su kultivisane na Miler Hinton (Mueller Hinton) agru (MHA; Merck, Darmštat, Nemačka), na 37 °C, a gljivice na Sabouraud dekstroznom agru (SDA; Difco Laboratories, Detroit, SAD), na 30 °C. Posle 18 časova kultivisanja, napravljena je bakterijska suspenzija u Miler Hinton bujonu, pri čemu je broj mikroorganizama standardizovan na 0,5 jedinica na Mekfarlandovojoj (McFarland) skali što je praćeno turbidimetrijskom metodom. Konačna koncentracija bakterijskog inokuluma iznosila je  $5 \times 10^5$  CFU/ml. Suspenzije gljivica su napravljene u Sabouraud dekstroznom agru (SDA). Broj živih mikroorganizama utvrđen je korišćenjem hemocitometra (za bakterije) i prebrojavanjem u *Thoma chamber* (za gljivice). Fungalni inokulum je iznosio  $1 \times 10^4$  CFU/ml.

Uzorci za testiranje su pripremljeni rastvaranjem u 10%-tnom vodenom rastvoru DMSO (etarsko ulje vrste *L. europaeus* - uzorak A), 70%-tnom EtOH (euroabienol (I)) ili u 0,05%-tnoj emulziji Tween-a 80 u vodi (3-metil-2-alkanoni S<sub>1-9</sub>). Početna koncentracija uzorka za testiranje iznosila je 10,0 mg/ml za etarsko ulje vrste *L. europaeus*, 11,5 mg/ml za euroabienol i 37,0 mg/ml za 3-metil-2-alkanone. Za svaki uzorak je, razblaživanjem u odnosu 1 : 1, napravljena serija od 10 razblaženja osnovnog rastvora. Mikrotitarske ploče (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Nemačka) su, nakon dodavanja inokuluma, u bunariće ploče, inkubirane na 37 °C u toku 24 časa (bakterije) ili na 30 °C u toku 48 časa (gljivice). Rast bakterija je vizualizovan dodavanjem 20 µl 0,5%-tnog vodenog rastvora 2,3,5-trifeniltetrazolijum-hlorida (TTC; Merck, Darmštat, Nemačka). Amoksicilin, Tetraciklin i Nistatin (Galenika, Beograd, Srbija) su korišćeni kao pozitivne, a odgovarajući rastvarači kao negativne kontrole. MIC je definisan kao najniža koncentracija ispitivanog uzorka koja

## **EKSPERIMENTALNI DEO**

### **SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

---

sprečava vidljiv rast mikroorganizma (crveno obojenje na dnu bunarića nakon dodavanja TTC-a), dok minimalna baktericidna/fungicidna koncentracija (MBC/MFC) označava najnižu koncentraciju koja ubija 99,9% ćelija. Prilikom određivanja MBC/MFC, bujon je uzet iz svih bunarića bez vidljivog rasta, inokuliran i inkubiran u toku 24 časa na 37 °C za bakterije ili u toku 48 časa na 30 °C za gljivice čiji je rast praćen. Testovi su ponavljeni četiri puta.

### 4.9. STATISTIČKA ANALIZA

Jednostrana analiza varijanse (ANOVA) korišćena je za statističku obradu dobijenih podataka i utvrđivanja značajnosti razlika između srednjih vrednosti. U svim statističkim analizama, interval poverenja bio je 95%.

#### 4.9.1. MULTIVARIJANTNA ANALIZA: METODA ANALIZE GLAVNE KOMPONENTE I AGLOMERATIVNA HIJERARHIJSKA KLASTER ANALIZA

Metoda analize glavne komponente (PCA) i aglomerativna hijerarhijska klaster analiza (AHC) dobijenih setova podataka (procentni sastav etarskih ulja) vršena je pomoću Excel plug-in programa *XLSTAT*, verzije 2014.4. Obe metode su primenjene na sledećim setovima varijabli: originalne varijable (procentualni sadržaj sastojaka koji je veći od 1%) i sume procenata klasa jedinjenja (monoterpeni (M), seskviterpeni (S), diterpeni (D), jedinjenja izvedena iz šikimatnog biosintetskog puta (SM), jedinjenja izvedena iz metabolizma masnih kiselina (MMK) i ostalo (O) – kao šesta klasa). U slučaju AHC analize primenjeni su: Pirsonova (*Pearson*) razlika (kao kriterijum grupisanja korišćeni su prosto povezivanje, prosečna veza između grupe *unweighted-pair-group average* i potpuno povezivanje) i Euklidska udaljenost (kriterijum grupisanja: prosečna veza između grupe - *unweighted pair-group average* i Vardov (*Ward*) metod). Vršena je PCA analiza Pirsonovog (n) tipa.

### 4.10. MOLEKULSKO MODELOVANJE

Optimizacija geometrije i izračunavanja termodinamičnih svojstava elemenala su izvršena pomoću MM2 (*molecular mechanics force-field*) metode inkorporirane u *ChemBio3D Ultra 12.0* softverski paket.

## REZULTATI I DISKUSIJA

### 5.1. SEKUNDARNI METABOLITI BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS* L.

#### 5.1.1. HEMIJSKI SASTAV ETARSKIH ULJA BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS*

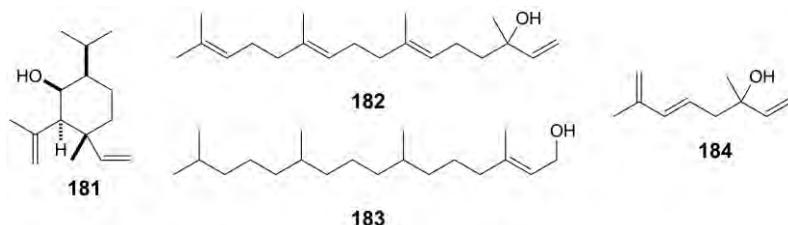
Sastav etarskih ulja nadzemnih delova biljne vrste *L. europaeus* L. (Lamiaceae) iz faze punog cveta (uzorak **A**) i faze zrelih plodova (uzorak **B**) je dat u tabeli 5.1. U uzorku **A** je identifikovano ukupno 185 sastojaka koji su činili 88,7% ovog ulja, dok je u uzorku **B** identifikovano 122 sastojka, što je predstavljalo 93,9% tog ulja. Terpeni su bili najzastupljenija klasa (81,3%-uzorak **A** i 80,4%-uzorak **B**) sa mnogo većim udelom seskviterpena (56,7%-**A** i 54,2%-**B**) u odnosu monoterpene i diterpene. Glavni sastojak u oba ulja je bio (*E*)-β-kariofilen (**82**) (13,9%-**A** i 25,7%-**B**), koga su sledili šiobunol (**181**) u ulju **A** (slika 5.1) sa 9,7% (nije detektovan u uzorku **B**) i kariofilen-oksid (**83**) u ulju **B** sa 12,5% (i svega 2,4% u uzorku **A**). Osim po ovoj neravnomernoj distribuciji glavnih seskviterpena, ova dva ulja su se međusobno razlikovala i po odnosu količina monoterpena i diterpene. Dok su u fazi punog cveta bili zastupljeniji diterpeni (15,6% naspram 1,6%), poput (*E,E*)-geranil-linaloola (**182**) i (*E*)-fitola (**183**) (slika 5.1), u fazi zrelog semena su bili zastupljeniji monoterpeni (24,6% naspram 8,8%). Uočene razlike u sastavu ova dva etarska ulja bi se mogle povezati sa različitim stepenom razvića biljke tj. fenofaze u kojoj se nalazio biljni materijal iz koga su ova ulja izolovana. Među monoterpenima su dominirali oksigenovani aciklični derivati od kojih je najzastupljeniji bio (*E*)-hotrienol (**184**) (slika 5.1), sa 4,5% u uzorku **A** i 13,7% u uzorku **B**. Ovaj monoterpen privlačnog, voćnog mirisa (Yuasa i Yasushi, 2003) je redak biljni metabolit, koji se hidrodestilacijom najčešće dobija samo u tragovima, jer se pretežno nalazi u glikozidno vezanom obliku (Praczko i Gora, 2001; Schwab et al., 1989). Do sada je (*E*)-hotrienol načen kao jedan od glavnih sastojaka etarskih ulja kod svega nekoliko ornamentalnih biljaka i drveća: *Tilia cordata* (Fitsiou et al., 2007), *Chimonanthus praecox* (Yoshitaka et al., 1990) i *Garcinia macrophylla* (Andrade et al., 2007). Prijatnom mirisu, na zelenu travu, ovih etarskih ulja sigurno su doprineli i tzv. *green leaf*<sup>†</sup> derivati čiji je sadržaj u oba uzorka bio oko 4%. Na kraju, kao malozastupljeni sastojci detektovana su

<sup>†</sup> Pod terminom *green leaf* derivati podrazumeva se skup isparljivih organskih jedinjenja koja se oslobađaju neposredno nakon mehaničkog oštećenja biljnog tkiva. Ovi sekundarni metaboliti nastaju iz metabolizma masnih kiselina dejstvom kiseonik-zavisnih oksidaza koje se nalaze u listovima skoro svih biljaka, a strukturno gledano najčešće predstavljaju aldehyde, alkohole i njihove estre sa 6 C-atoma u ugljovodoničnom nizu (Matsui et al., 2012).

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

jedinjenja izvedena iz metabolizma masnih kiselina poput: *n*-alkana, kao i nekih *izo-* i *anteizo*-izomera, zatim, dugolančanih aldehida normalnog niza i estara masnih kiselina.



SLIKA 5.1. NEKI OD GLAVNIH SASTOJAKA ETARSKIH ULJA BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS*

Postoje očigledne razlike između rezultata našeg i prethodnih istraživanja, i to ne samo u broju identifikovanih sastojaka, što je bilo i za očekivati, s obzirom da su korišćene savremenije metode analize veće osetljivosti, već i u identitetu detektovanih metabolita. U prethodna dva ispitivanja hemijskog sastava etarskog ulja biljne vrste *L. europaeus* identifikovano je svega 13 (Sharipov et al., 1969), odnosno 10 sastojaka (Lawrence, 1989). U prvom istraživanju Šaripov i saradnici (Sharipov et al., 1969) su našli da ova biljna vrsta proizvodi isključivo monoterpane kao sastojke etarskog ulja, i to sa monocikličnim *p*-mentanskim i bicikličnim skeletom, kao i neke oksigenovane aciklične monoterpane. Geraniol (67) i bornil-acetat (77) su jedini zajednički sastojci za naša i ovo prethodno analizirano ulje. Ni jedan od drugih cikličnih monoterpena (poput  $\alpha$ -pinena (74), kamfena (75),  $\gamma$ -terpinena (71)) nije načen u našim uzorcima. Rezultati druge analize sastava ulja vrste *L. europaeus* (Lawrence, 1989) su u mnogo boljoj saglasnosti sa rezultatima naše analize, jer je i tada načeno da u ulju dominiraju seskviterpeni, sa (*E*)- $\beta$ -kariofilenom (82) (24,9%) i (*E*)- $\beta$ -farnezenom (78) (17,0%) kao glavnim sastojcima. Međutim, ni u ovoj, kao ni u prvpomenutoj analizi, nije detektovan nijedan diterpen, kao ni hotrienol (184) koji je bio jedan od glavnih sastojaka u našem ulju iz faze zrelih plodova (uzorak B). Pobrojane razlike u sastavu etarskih ulja ove biljne vrste bi se mogle objasniti postojanjem različitih hemotipova ovog taksona, ili je upotreba savremenijih metoda analize omogućila dobijanje mnogo potpunijih i detaljnijih podataka o sastavu etarskog ulja ove vrste. Takoče ne bi trebalo da se zanemare i neki drugi faktori, poput vremena berbe, moguće infekcije, napada insekta i sl., koji mogu dovesti do promene u profilu isparljivih sastojaka ove biljne vrste.

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

**TABELA 5.1.** HEMIJSKI SASTAV ETARSKIH ULJA BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS*

RI <sup>i</sup>	JEDINJENJE	UZORAK A <sup>ii</sup>		KLASA	METODA IDENTIFIKACIJE
		% <sup>iv</sup>	v <sup>v</sup>		
730	3-Metil-1-butanol	tr <sup>y</sup>	- <sup>vi</sup>	H	RI, MS, CoI <sup>vii</sup>
733	2-Metil-1-butanol	tr	-	H	RI, MS, CoI
762	1-Pentanol	tr	-	GL	RI, MS, CoI
765	(Z)-2-Penten-1-ol	tr	-	GL	RI, MS
800	Oktan	tr	-	O	RI, MS, CoI
830	4-Metil-1-pentanol	tr	-	O	RI, MS
839	Furfural	tr	-	GL	RI, MS, CoI
844	(E)-3-Heksen-1-ol	tr	0,1	GL	RI, MS, CoI
850	(Z)-3-Heksen-1-ol	3,1	1,5	GL	RI, MS, CoI
858	(Z)-2-Heksen-1-ol	tr	0,6	GL	RI, MS, CoI
861	1-Heksanol	0,2	0,6	GL	RI, MS, CoI
886	2-Butilfuran	tr	-	GL	RI, MS
944	3-Etil-1-okten	-	tr	O	MS
968	Benzaldehid	tr	tr	O	RI, MS, CoI
975	1-Okten-3-on	tr	-	GL	RI, MS
977	1-Okten-3-ol (64)	0,6	0,7	GL	RI, MS
983	6-Metil-5-hepten-2-on	tr	0,1	CR	RI, MS
984	2-Oktanon	tr	-	GL	RI, MS
990	2-Pentilfuran	tr	tr	GL	RI, MS
992	6-Metil-5-hepten-2-ol	tr	tr	CR	RI, MS
997	3-Oktanol (63)	0,1	0,1	GL	RI, MS
1004	(Z)-3-Heksenil-acetat	tr	-	GL	RI, MS, CoI
1026	2-Etil-1-heksanol	tr	-	O	RI, MS, CoI
1033	(Z)-β-Ocimen	0,1	0,2	M	RI, MS
1038	2,6,6-Trimetilcikloheksanon	-	tr	CR	RI, MS
1045	(E)-β-Ocimen	tr	0,1	M	RI, MS
1046	Fenilacetraldehid	0,1	0,6	O	RI, MS, CoI
1051	2,6-Dimetil-2,6-oktadien <sup>viii</sup> (syn. <sup>ix</sup> Deoksigeraniol)	-	0,2	M	MS
1066	(E)-2-Okten-1-ol	tr	-	GL	RI, MS
1068	1-Oktanol	tr	tr	GL	RI, MS, CoI
1070	Acetofenon	tr	-	O	RI, MS, CoI
1093	4,8-Dimetil-1,3,7-nonatrien (Izomer 1 <sup>viii</sup> )	tr	-	M	RI, MS
1100	Undekan	tr	tr	O	RI, MS, CoI
1105	(E)-Hotrienol (184)	4,5	13,7	M	RI, MS
1106	Nonanal	tr	tr	GL	RI, MS

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

NASTAVAK TABELE 5.1					
1113	(E)-4,8-Dimetilnona-1,3,7-trien	0,1	0,2	M	RI, MS
1117	3-Oktil-acetat	tr	0,1	GL	RI, MS
1123	2,6-Dimetil-1,3,5,7-oktataetraen <sup>viii</sup>	tr	-	M	MS
1129	(Z)-Epoksiocimen	tr	-	M	RI, MS
1131	(3E,5E)-2,6-Dimetil-1,3,5,7-oktataetraen	tr	-	M	RI, MS
1139	(E)-Epoksiocimen	tr	-	M	RI, MS
1143	egzo-Izocitral	tr	tr	M/CR	RI, MS
1154	(2E,6Z)-2,6-Nonadienal	tr	tr	GL	RI, MS
1160	(Z)-Izocitral	0,1	0,3	M/CR	RI, MS
1163	Lavandulol	tr	-	M	RI, MS
1170	1-Nonanol	tr	-	GL	RI, MS
1175	(3E,5Z)-1,3,5-Undekatrien	tr	-	O	RI, MS
1176	Borneol	-	0,2	M	RI, MS, CoI
1179	(E)-Izocitral	0,1	0,2	M/CR	RI, MS
1180	1-Decen-3-ol	tr	-	GL	RI, MS
1184	(Z)-3-Heksenil-butanoat	tr	-	GL	RI, MS, CoI
1184	Terpinen-4-ol	tr	tr	M	RI, MS, CoI
1185	1,3,5-Undekatrien <sup>viii</sup>	tr	-	O	MS
1189	1-Feniletil-acetat	tr	-	O	RI, MS
1196	(E)-3-Heksenil-butanoat	tr	-	GL	RI, MS, CoI
1198	$\alpha$ -Terpineol	tr	0,1	M	RI, MS, CoI
1200	Dodekan	0,1	0,1	O	RI, MS, CoI
1200	Metil-salicilat	-	tr	O	RI, MS, CoI
1202	Šafral	tr	tr	CR	RI, MS
1206	Dekanal	tr	0,1	GL	RI, MS, CoI
1222	$\beta$ -Ciklocitral	0,1	0,2	CR	RI, MS
1232	2,3-Epoksigeranial	tr	-	M	MS
1234	(Z)-3-Heksenil-2-metilbutanoat	tr	-	GL	RI, MS, CoI
1239	Neral	1,5	3,5	M	RI, MS, CoI
1250	Geraniol (67)	tr	-	M	RI, MS, CoI
1258	(2,6,6-Trimetil-1-cikloheksen-1-il)-acetaldehid	tr	tr	CR	RI, MS
1263	(E)-2-Decenal	tr	0,1	GL	RI, MS
1269	Geranial	2,4	5,9	M	RI, MS, CoI
1282	Lavandulil-acetat	tr	-	M	RI, MS
1286	Bornil-acetat (77)	-	tr	M	RI, MS, CoI
1293	Dihidroedulan I	tr	-	CR	RI, MS
1300	Tridekan	0,1	0,2	O	RI, MS, CoI
1309	Undekanal	tr	tr	GL	RI, MS
1321	(2E,4E)-2,4-Dekadienal	tr	-	GL	RI, MS

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

NASTAVAK TABELE 5.1					
1350	$\alpha$ -Kubeben	tr	tr	S	RI, MS
1358	(E)-Solanon	tr	-	O	RI, MS
1366	(E)-2-Undecenal	tr	tr	GL	RI, MS
1373	$\alpha$ -Ilangen	tr	tr	S	RI, MS
1380	$\alpha$ -Kopaen	0,1	0,3	S	RI, MS
1381	(E)- $\beta$ -Damascenon	tr	tr	CR	RI, MS
1388	$\beta$ -Burbonen	0,3	1,6	S	RI, MS
1390	$\beta$ -Kubeben	-	0,3	S	RI, MS
1392	$\beta$ -Elemen (92)	0,6	-	S	RI, MS
1395	(Z)-Izoeugenol	tr	-	O	RI, MS
1396	Dihidro- $\gamma$ -jonon	-	0,1	CR	RI, MS
1400	Tetradekan	tr	-	O	RI, MS, CoI
1409	(Z)- $\beta$ -Kariofilen	tr	0,8	S	RI, MS
1411	(E)- $\beta$ -Damaskon	tr	tr	CR	RI, MS
1411	$\alpha$ -Gurjunen	1,0	-	S	RI, MS
1427	(E)- $\beta$ -Kariofilen (82)	13,9	25,7	S	RI, MS, CoI
1430	Akora-3,5-dien	tr	-	S	RI, MS
1432	$\gamma$ -Elemen	tr	-	S	RI, MS
1434	$\beta$ -Kopaen	0,1	0,3	S	RI, MS
1438	$\alpha$ -Gvajen	tr	tr	S	RI, MS
1448	Geranilaceton	0,9	5,6	CR	RI, MS
1449	cis-Murola-3,5-dien	tr	-	S	RI, MS
1451	6,10-Dimetil-5,9-undekadien-2-ol <sup>viii</sup>	0,2	1,3	CR	MS
1453	trans-Murola-3,5-dien	tr	tr	S	RI, MS
1456	alo-Aromadendren	tr	-	S	RI, MS
1461	$\alpha$ -Humulen (81)	1,3	1,7	S	RI, MS, CoI
1463	9- <i>epi</i> -(E)-Kariofilen	0,5	tr	S	RI, MS
1466	cis-Murola-4(14),5-dien	tr	-	S	RI, MS
1476	trans-Kadina-1(6),4-dien	tr	-	S	RI, MS
1478	$\gamma$ -Murolen (93)	0,5	0,2	S	RI, MS
1480	(E)- $\beta$ -Jonon	tr	0,1	CR	RI, MS, CoI
1482	ar-Kurkumen	-	tr	S	RI, MS
1485	Germakren D (79)	1,2	1,0	S	RI, MS, CoI
1489	cis- $\beta$ -Gvajen	0,1	tr	S	RI, MS
1494	$\beta$ -Selinon (95)	0,1	-	S	RI, MS
1496	trans-Murola-4(14),5-dien	0,1	tr	S	RI, MS
1499	<i>epi</i> -Kubebol	tr	0,3	S	RI, MS
1500	Biciklogermakren	0,9	-	S	RI, MS
1501	$\alpha$ -Murolen	0,5	tr	S	RI, MS

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

NASTAVAK TABELE 5.1					
1511	$\beta$ -Kurkumen	-	tr	S	RI, MS
1512	(Z)- $\gamma$ -Bisabolen	-	tr	S	RI, MS
1512	Germakren A	0,3	-	S	RI, MS
1517	$\gamma$ -Kadinen	0,6	0,3	S	RI, MS
1518	Kubebol	-	tr	S	RI, MS
1519	<i>endo</i> -1-Burbonanol	-	tr	S	RI, MS
1522	$\delta$ -Kadinen (80)	2,9	0,8	S	RI, MS
1524	<i>trans</i> -Kalamenen	tr	tr	S	RI, MS
1527	Zonaren	tr	-	S	RI, MS
1534	10- <i>epi</i> -Kubebol	0,2	tr	S	RI, MS
1536	<i>trans</i> -Kadina-1,4-dien	tr	-	S	RI, MS
1540	$\alpha$ -Kadinen	0,1	tr	S	RI, MS
1545	$\alpha$ -Kalakoren	tr	tr	S	RI, MS
1550	Hedikariol	tr	tr	S	RI, MS
1551	Elemol	0,1	0,1	S	RI, MS
1551	<i>cis</i> -Murola-5-en-4 $\beta$ -ol	tr	-	S	RI, MS
1555	Izokariofilen-oksid	-	0,2	S	RI, MS
1557	<i>cis</i> -Murola-5-en-4 $\alpha$ -ol	tr	-	S	RI, MS
1564	Germakren B	0,3	tr	S	RI, MS
1566	$\beta$ -Kalakoren	tr	-	S	RI, MS
1574	(3E,7E)-4,8,12-Trimetil-1,3,7,11-tridekatetraen	tr	tr	S	RI, MS
1576	Palustrol	0,8	-	S	RI, MS
1582	Germakren D-4-ol	3,9	0,4	S	RI, MS
1588	Kariofilen-oksid (83)	2,4	12,5	S	RI, MS, CoI
1600	Viridiflorol	tr	-	S	RI, MS
1600	Gvajol	1,4	1,0	S	RI, MS
1602	Humulen-epoksid I	tr	tr	S	RI, MS
1611	Ledol	2,6	-	S	RI, MS
1616	Humulen-epoksid II	tr	0,7	S	RI, MS
1619	1,10-di- <i>epi</i> -Kubenol	0,8	-	S	RI, MS
1625	(6E,8Z)-4,6,8-Megastigmatrien-3-on	tr	tr	CR	RI, MS
1630	Murola-4,10(14)-dien-1 $\beta$ -ol	0,1	0,3	S	RI, MS
1631	1- <i>epi</i> -Kubenol	0,2	tr	S	RI, MS
1639	Kariofila-4(12),8(13)-dien-5 $\alpha$ -ol	0,5	0,8	S	RI, MS
1642	Kariofila-4(12),8(13)-dien-5 $\beta$ -ol	0,7	2,5	S	RI, MS
1646	<i>epi</i> - $\alpha$ -Kadinol ( <i>syn.</i> $\tau$ -Kadinol)	1,2	0,4	S	RI, MS
1648	<i>epi</i> - $\alpha$ -Murolol ( <i>syn.</i> $\tau$ -Murolol)	1,8	tr	S	RI, MS
1651	$\alpha$ -Murolol ( <i>syn.</i> Torejol)	tr	tr	S	RI, MS

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

NASTAVAK TABELE 5.1					
1659	$\alpha$ -Kadinol	3,6	0,6	S	RI, MS
1669	Bulnezol	0,6	0,1	S	RI, MS
1672	14-Hidroksi-9- <i>epi</i> -( <i>E</i> )-kariofilen	tr	0,9	S	RI, MS
1689	Germakra-4(15),5,10(14)-trien-1 $\alpha$ -ol	0,7	0,4	S	RI, MS
1702	Šiobunol ( <b>181</b> )	9,7	-	S	RI, MS
1710	(2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> )-Farnezal	0,2	tr	S	RI, MS
1716	Pentadekanal	tr	0,3	O	RI, MS
1738	(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> )-Farnezal	tr	-	S	RI, MS
1745	Mint-sulfid	tr	-	S	RI, MS
1771	Benzil-benzoat	tr	-	O	RI, MS, CoI
1788	Fenantren	tr	-	O	RI, MS, CoI
1817	Heksadekanal	tr	tr	O	RI, MS, CoI
1823	Izopropil-tetradekanoat	tr	-	O	RI, MS, CoI
1841	Heksahidrofarnezilaceton	0,1	0,1	CR	RI, MS
1881	1-Heksadekanol	0,1	tr	O	RI, MS, CoI
1909	(5 <i>E</i> ,9 <i>E</i> )-Farnezilaceton	0,6	0,6	CR	RI, MS
1925	Metil-heksadekanoat	tr	tr	O	RI, MS, CoI
1960	( <i>Z,Z</i> )-Geranil-linalool	0,5	tr	D	RI, MS
1961	Heksadekanska kiselina	tr	-	O	RI, MS, CoI
1986	( <i>E,Z</i> )-Geranil-linalool	0,2	-	D	RI, MS
2015	Neidentifikovani sastojak 1 <sup>x</sup>	1,7	-	D	
2025	( <i>E,E</i> )-Geranil-linalool ( <b>182</b> )	7,6	1,1	D	RI, MS
2084	1-Oktadekanol	0,2	-	O	RI, MS, CoI
2087	Metil-( <i>Z</i> )-9-oktadecenoat ( <i>syn.</i> Metil-oleat)	-	tr	O	RI, MS, CoI
2100	Heneikosan	tr	tr	O	RI, MS, CoI
2105	Neidentifikovani sastojak 2 <sup>xi</sup>	0,9	-	D	
2110	( <i>E</i> )-Fitol ( <b>183</b> )	4,7	0,5	D	RI, MS
2200	Dokozan	-	tr	O	RI, MS, CoI
2225	Eikozanal	tr	tr	O	RI, MS
2263	2-Metildokozan	tr	-	O	RI, MS
2300	Trikozan	0,1	tr	O	RI, MS, CoI
2400	Tetrakozan	tr	tr	O	RI, MS, CoI
2430	Dokozanal	tr	-	O	RI, MS
2463	2-Metiltetrakozan	tr	-	O	RI, MS
2500	Pentakozan	0,2	tr	O	RI, MS, CoI
2572	3-Metilpentakozan	tr	-	O	RI, MS
2600	Heksakozan	tr	tr	O	RI, MS, CoI
2633	Tetrakozanal	tr	-	O	RI, MS
2662	2-Metilheksakozan	tr	-	O	RI, MS

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

**NASTAVAK TABELE 5.1**

<b>2700</b>	Heptakozan	0,2	0,1	O	RI, MS, CoI
<b>2773</b>	3-Metilheptakozan	tr	-	O	RI, MS
<b>2800</b>	Oktakozan	tr	tr	O	RI, MS, CoI
<b>2811</b>	(sve E)-Skvalen	tr	-	O	RI, MS, CoI
<b>2863</b>	2-Metiloktakozan	tr	-	O	RI, MS
<b>2900</b>	Nonakozan	0,2	0,2	O	RI, MS, CoI
<b>2973</b>	3-Metilnonakozan	tr	-	O	RI, MS
<b>3000</b>	Triakontan	tr	tr	O	RI, MS, CoI
<b>3100</b>	Hentriakontan	0,2	tr	O	RI, MS, CoI
<b>3200</b>	Dotriakontan	tr	-	O	RI, MS, CoI
<b>3300</b>	Tritriakontan	tr	-	O	RI, MS, CoI
UKUPNO IDENTIFIKOVANO		88,7 (185) <sup>ii</sup>	93,9 (122)		
TERPENI		81,3 (95)	80,4 (68)		
HEMITERPENI (H)		TR (2)	-		
MONOTERPENI (M)		8,8 (20)	24,6 (14)		
UGLJOVODONICI		0,2 (6)	0,7 (4)		
OKSIGENOVANI		8,6 (14)	23,9 (10)		
ACIKLIČNI		8,8 (18)	24,3 (10)		
SESKVITERPENI (S)		56,9 (67)	54,2 (51)		
UGLJOVODONICI		25,4 (37)	33,0 (27)		
OKSIGENOVANI		31,5 (30)	21,2 (24)		
DITERPENI (D)		15,6 (6)	1,6 (3)		
<i>GREEN LEAF</i> DERIVATI (GL)		4,0 (29)	3,9 (15)		
JEDINJENJE IZVEDENA IZ KAROTENOIDA (CR)		1,9 (14)	8,1 (15)		
OSTALO (O)		1,5 (47)	1,5 (24)		

<sup>i</sup> jedinjenja su navedena po redosledu eluiranja sa DB-5MS kolone (RI eksperimentalno određeni retencioni indeksi na pomenutoj koloni koinjekcijom homologe serije *n*-alkana C<sub>7</sub>-C<sub>40</sub>);

<sup>ii</sup> uzorak etarskog ulja dobijen hidrodestilacijom svetleg biljnog materijala iz faze punog cveta;

<sup>iii</sup> uzorak etarskog ulja dobijen hidrodestilacijom svetleg biljnog materijala iz faze zrelih plodova;

<sup>iv</sup> srednja vrednost tri analize;

<sup>v</sup> tr - trag (<0,05%);

<sup>vi</sup> -/ nije detektovano;

<sup>vii</sup> RI - upoređivanjem eksperimentalno dobijenih RI vrednosti sa literaturnim podacima; MS - upoređivanjem masenih spektara sa spektrima iz biblioteka; CoI - GC koinjektiranjem standardnih supstanci;

<sup>viii</sup> nije utvrđen tačan stereoisomer;

<sup>ix</sup> *syn.*- sinonim;

<sup>x</sup> MS(EI, 70 eV), *m/z* (rel. int. %): 270 (0,6), 245 (0,3), 218 (9,1), 203 (2,0), 189 (0,8), 175 (5,5), 161 (2,5), 147 (13,2), 134 (10,0), 121 (7,2), 107 (24,5), 93 (13,8), 81 (29,3), 71 (100), 69 (71,8), 55 (11,7), 43 (22,6), 41 (37,5);

<sup>xi</sup> MS(EI, 70 eV), *m/z* (rel. int. %): 288 (0,2), 270 (1,1), 255 (0,4), 245 (0,5), 227 (0,5), 218 (2,2), 203 (2,9), 190 (1,8), 175 (4,7), 159 (3,7), 147 (6,3), 133 (18,3), 123 (17,4), 107 (37,5), 94 (38,1), 81 (35,7), 71 (79,1), 69 (100), 55 (15,9), 43 (25,5), 41 (43,7);

<sup>xii</sup> u zagradi je dat broj identifikovanih sastojaka koji pripadaju određenoj klasi.

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

### 5.1.1.1. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST ETARSKOG ULJA BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS*

Predstavnici roda *Lycopus*, pre svega vrste *L. europaeus* i *L. lucidus*, imaju široku upotrebu kako u tradicionalnoj, tako i u zvaničnoj medicini (Yu et al., 2011). Međutim, do sada je ispitivana samo biološka aktivnost etarskog ulja vrste *L. lucidus* Turcz i pokazano je da poseduje antitumorsku, antimikrobnu, antioksidantnu i akaricidnu aktivnost (Yang i Lee, 2012; Yu et al., 2011). Imajući ovo u vidu odlučeno je da se ispita *in vitro* antimikrobnu aktivnost etarskog ulje vrste *L. europaeus*.

Etarsko ulje biljne vrste *L. europaeus* iz faze punog cveta (uzorak A) je jedino dobijeno u dovoljnoj količini za testiranje antimikrobne aktivnosti. Testiranje je vršeno mikrodilucionom metodom prema preporukama američkog Nacionalnog komiteta za kliničke laboratorijske standarde (*National Committee for Clinical Laboratory Standards-NCCLS*, 2007). Korišćeni su kontrolni laboratorijski sojevi mikroorganizama *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, Virdžinija, SAD) i Instituta za virusologiju i imunologiju „Torlak“ iz Beograda, klinički izolati i izolati iz hrane, kao i neki fungalni sojevi izolovani iz prašine dušeka, veoma česti u ljudskom okruženju i, veruje se, odgovorni za alergijske bolesti respiratornog trakta (odeljak 4.8.1). Aktivnost uzorka je ispitana na petnaest bakterijskih sojeva i šest fungalnih mikroorganizama. Rezultati testiranja su dati u tabeli 5.2, a na osnovu njih se može reći da je etarsko ulje vrste *L. europaeus* pokazalo širok dijapazon dejstva, od toga da je potpuno neaktivno prema nekim sojevima do aktivnosti umerenog intenziteta u poređenju sa pozitivnim kontrolama (Amoksicilin ili Nistatin). Ulje je ispoljilo posebnu selektivnost ka dva Gram-negativna soja, *Escherichia coli* (klinički izolat) i *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, gde je došlo do inhibicije rasta ovih mikroorganizama pri koncentraciji od 0,156 mg/ml, ali koja je ipak bila daleko viša u odnosu na standardni antibiotik Amoksicilin (MIC = 0,0025 mg/ml). Minimalna vrednost baktericidne koncentracije od 0,312 mg/ml je, takoče, načena u slučaju gore pomenutog soja *E. coli*, što je od posebne važnosti imajući u vidu da se radi o kliničkom izolatu koji je obično rezistentniji u odnosu na standardne ATCC sojeve. Pri testiranim koncentracijama ulje je bilo potpuno neaktivno prema dva soja bakterija: *Salmonella enterica* ATCC 13076 i *Micrococcus flavus* ATCC 10240. Pored antibakterijskog dejstva ulje je pokazalo aktivnost i protiv fungalnih mikroorganizama, a najosetljivija je bila plesan *Aspergillus fumigatus* (MIC = 0,625 mg/ml;

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

MFC = 5,00 mg/ml). U suštini, moglo bi se reći da je ulje vrste *L. europaeus* bilo nešto aktivnije prema sojevima bakterija, u odnosu na gljivice.

U prethodnom istraživanju je načeno da su standardni soj *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923; MIC = 6,25 mg/ml), meticilin-rezistentni *S. aureus* (MIC = 6,25 mg/ml) i klinički izolat *S. simulans* (MIC = 12,5 mg/ml) najoseljiviji prema etarskom ulju vrste *L. lucidus*. Uočena aktivnost je pripisana glavnim sastojcima ulja, terpenima α-humulenu (81), (E)-β-kariofilenu (82), β-mircenu (91) i β-pinenu (89) jer je za njih ranije utvrđeno da poseduju antimikrobna svojstva (Yu et al., 2011). Testiranja antimikrobne aktivnosti ulja *L. europaeus* i *L. lucidus* su vršena na dva ista mikroorganizma i u slučaju soja *S. aureus* (ATCC 25923) ulje *L. europaeus* je bilo neznatno aktivnije (MIC = 5 mg/ml naspram MIC = 6,25 mg/ml), dok je soj *E. coli* ATCC 25922 (MIC = 5,00 mg/ml naspram MIC = 25,0 mg/ml) bio znatno osetljiviji na ulje vrste *L. europaeus*.

**TABELA 5.2. MINIMALNE INHIBITORNE (MIC) I MINIMALNE BAKTERICIDNE/FUNGICIDNE KONCENTRACIJE (MBC/MFC) ETARSKOG ULJA VRSTE *L. EUROPAEUS***

MIKROORGANIZMI		MIC (mg/ml)	MBC/MFC (mg/ml)	AMOKSICILIN (µg/ml)	NISTATIN (µg/ml)
<b>Gram-negativne bakterije</b>					
<i>E. coli</i>	klinički izolat	0,156	0,312	2,50	NT <sup>i</sup>
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	5,00	5,00	5,00	NT
<i>E. coli</i>	ATCC 8739	5,00	>10,0	5,00	NT
<i>E. coli</i>	Torlak 95	5,00	>10,0	5,00	NT
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 10031	0,156	2,50	5,00	NT
<i>K. pneumoniae</i>	klinički izolat	5,00	10,0	5,00	NT
<i>P. vulgaris</i>	ATCC 8427	5,00	10,0	5,00	NT
<i>S. enterica</i>	ATCC 13076	/ <sup>ii</sup>	/	5,00	NT
<b>Gram-poziitivne bakterije</b>					
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	5,00	5,00	2,50	NT
<i>S. aureus</i>	klinički izolat	2,50	>10,0	2,50	NT
<i>C. perfringens</i>	ATCC 19574	1,25	1,25	5,00	NT
<i>C. sporogenes</i>	ATCC 19404	2,50	10,0	2,50	NT
<i>S. lutea</i>	ATCC 9341	5,00	>10,0	1,75	NT
<i>M. flavus</i>	ATCC 10240	/	/	5,00	NT
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633	5,00	5,00	1,75	NT

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

NASTAVAK TABELE 5.2

**Gljivice**

<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	10,0	10,0	NT	2,5
<i>S. cerevisiae</i>	ATCC 9763	2,50	5,00	NT	1,75

**Plesni**

<i>A. chrysogenum</i>	izolat iz prašine dušeka	10,0	10,0	NT	0,0390
<i>A. fumigatus</i>	izolat iz prašine dušeka	0,625	5,00	NT	0,0390
<i>A. restrictus</i>	izolat iz prašine dušeka	5,00	10,0	NT	0,0780
<i>P. chrysogenum</i>	izolat iz prašine dušeka	10,0	10,0	NT	0,0390

<sup>i</sup> nije testirano;

<sup>ii</sup> nije aktivno pri testiranim koncentracijama.

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

### 5.1.2. SEKUNDARNI METABOLITI PLODOVA BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS*

#### 5.1.2.1. HEMIJSKI SASTAV POVRŠINSKIH VOSKOVA

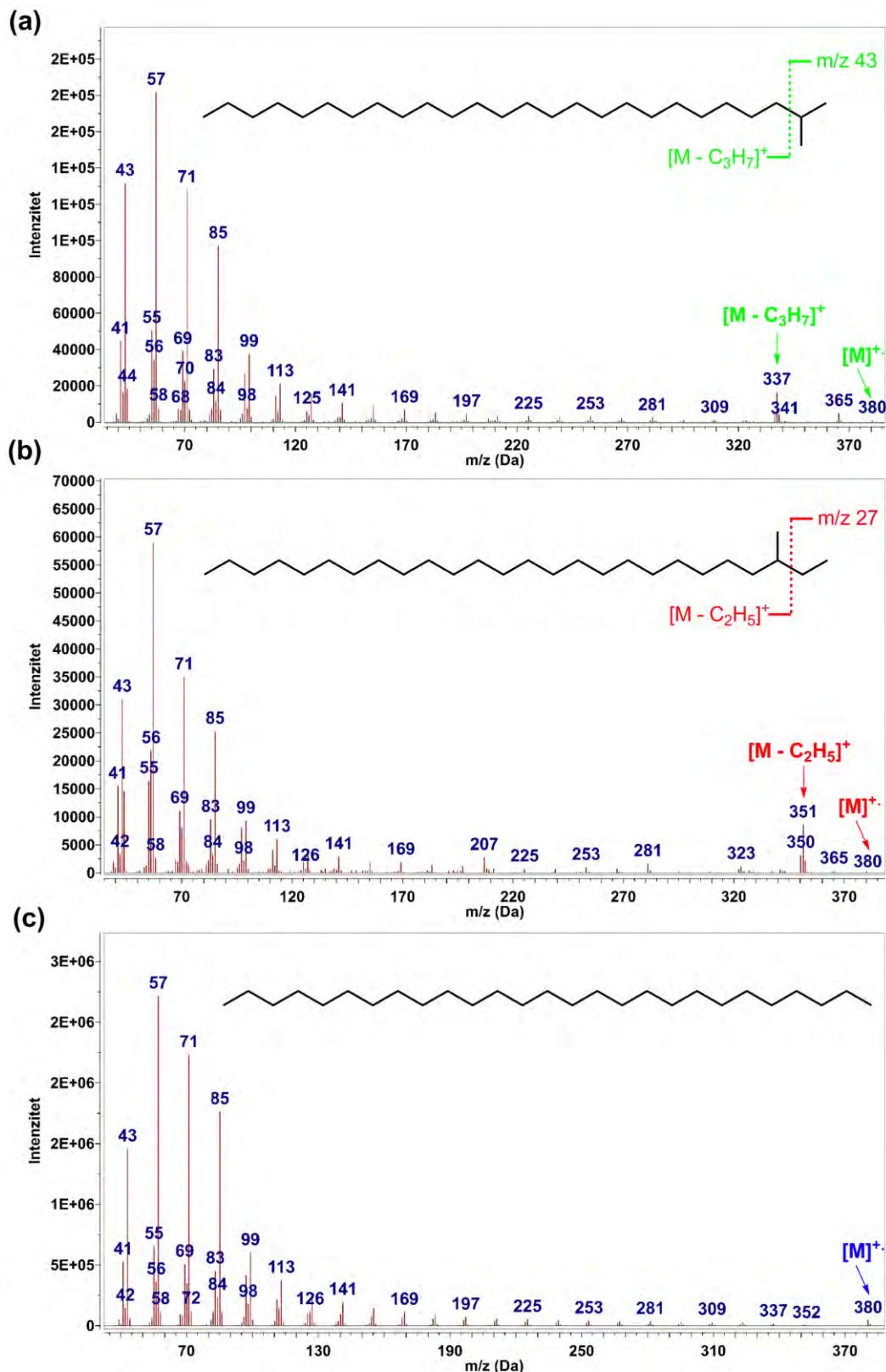
Hemijski sastav površinskih voskova plodova vrste *L. europaeus* je dat u tabeli 5.3. Analiza je omogućila identifikaciju 43 sastojaka koji su predstavljali 98,6% dihlormetanskog ispirka nezrelih plodova (uzorak **C<sub>1</sub>**), odnosno 99% zrelih plodova (uzorak **D<sub>1</sub>**). *n*-Alkani su dominirali u oba uzorka sa sadr̄ajem od 85% (uzorak **C<sub>1</sub>**) i 82,3% (uzorak **D<sub>1</sub>**), a sledili su ih *anteizo-* (7,1%-uzorak **C<sub>1</sub>** i 7,6%-uzorak **D<sub>1</sub>**) i *izo*-alkani (5,7%- **C<sub>1</sub>** i 7,1%- **D<sub>1</sub>**). Sadr̄aj račvastih alkana u plodovima vrste *L. europaeus* je bio značajno viši u odnosu na druge više biljke (Reddy et al., 2000). Jedan od izuzetaka je duvan, *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae), za koji je načeno da može da sadrži skoro iste količine *anteizo*-, *izo*- i *n*-alkana (Kavouras et al., 1998). Nedavno istraživanje je pokazalo da se ova relativno visoka zastupljenost *anteizo*- i *izo*-alkana u duvanu može iskoristiti i za utvrđivanje nivoa zagađenja duvanskim dimom kako u zatvorenim, tako i na otvorenim prostorima (Kavouras et al., 1998; Rogge et al., 1994).

Identifikacija *n*-alkana je potvrđena GC koinjekcijom standardnih supstanci (tj. komercijalno dostupne smeše serije *n*-alkana od C<sub>7</sub> do C<sub>40</sub>) sa uzorcima **C<sub>1</sub>** i **D<sub>1</sub>**. Račvasti, *izo*- i *anteizo*-, alkani su međusobno, a i u odnosu na *n*-alkane, razlikovani na osnovu karakteristične fragmentacije u masenim spektrima koja podrazumeva raskidanje veza u susedstvu tercijarnog C-atoma kojim nastaju joni različitih masa i intenziteta za ove dve homologe serije regioizomera. Kod obe ove serije izomernih račvastih alkana pretežno se raskida C<sub>2</sub>–C<sub>3</sub> veza pri čemu nastaju karakteristični, relativno intenzivni, joni [M – C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>]<sup>+</sup> i [M – C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, za *izo*- odnosno *anteizo*-izomere (slika 5.2; Stedman, 1968). Upravo pomenute razlike u fragmentaciji u masenim spektrima su korišćene zajedno sa vrednostima RI koje su dostupne u literaturi (Zaikin i Borisov, 2002; po kojima pripadnici *izo*-serije eluiraju nešto brže sa GC kolone u odnosu na *anteizo*-izomere) pri identifikaciji ovih račvastih alkana.

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

---



**SLIKA 5.2.** MASENI SPEKTRI 2-METILHEKSAKOZANA (a), 3-METILHEKSAKOZANA (b) I HEPTAKOZANA (c) SA NAZNAĆENIM KARAKTERISTIČNIM FRAGMENTNIM JONIMA. U SPEKTRU (b) JON NA  $m/z$  207 POTIĆE OD ISPARAVANJA STACIONARNE FAZE KOLONE (*COLUMN BLEED*)

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

Distribucija površinskih *n*-alkana plodova vrste *L. europaeus* je uobičajena za više biljke. Sadržaj *n*-alkana sa neparnim brojem C-atoma u nizu je bio veći u odnosu na one sa parnim, a najzastupljeniji alkan u oba uzorka je bio nonakozan. Prosečna dužina ugljovodoničnog niza (*Average Chain Length* - ACL) je iznosila 29,52 (uzorak **C<sub>1</sub>**) i 28,93 (uzorak **D<sub>1</sub>**), i bila je praćena visokim vrednostima ugljeničnog preferencijalnog (neparno/parno) indeksa (*Carbon Preference Index* - CPI) od 6,94 (uzorak **C<sub>1</sub>**) i 6,72 (uzorak **D<sub>1</sub>**). Vrednosti za CPI i ACL su izračunate na osnovu modifikovane formule koju su predložili Reddy i saradnici (2000).<sup>‡</sup> Kod *anteizo*-alkana sa većim udelom su bili homolozi sa parnim brojem C-atoma (ACL = 28,80 i 27,96), dok su kod *izo*-alkana ponovo bili zastupljeniji oni sa neparnim brojem C-atoma u nizu (ACL = 29,17 i 28,81). Ovakva raspodela alkana je uočena i ranije kod pripadnika familije Lamiaceae, npr. kod roda *Micromeria* (Reddy et al., 2000), a posledica je neznatnih razlika u biosintetskim putevima kojima ove vrste alkana nastaju. Biosinteza glavnih sastojaka voskova se odvija istim putem kojim nastaju i masne kiseline, a sastoji se od višestrukih, uzastopnih elongacija odgovarajućeg startera gradivnom jedinicom koja sadrži dva C-atoma (tzv. C<sub>2</sub> ili „acetatna“ jedinica), a koja nastaje iz malonil-koenzima A (malonil-CoA) (Shepherd i Griffiths, 2006). Svaki ovaj ciklus elongacije (tj. dodatak C<sub>2</sub> jedinice) sastoji se iz četiri koraka: (i) Klajzenove kondenzacije praćene sukcesivnom dekarboksilacijom, (ii) stereospecifične redukcije karbonilne grupe, (iii) stereospecifične dehidratacije tj. eliminacije molekula H<sub>2</sub>O i (iv) redukcije dvogube veze u koraku Majklove adicije (slika 5.3). U primarnom elongacionom sistemu, smeštenom u hloroplastima, se ovakvim elongaciono-kondenzacionim procesom, *de novo* sintetišu acil nizovi (acil-CoA) do C<sub>16</sub> i/ili C<sub>18</sub>, koji se zatim produžavaju do C<sub>30</sub> niza, ili čak i dalje, u endoplazmatičnom retikulumu pomoću sekundarnog elongacionog sistema. Na kraju, modifikacijama acil-CoA niza mogu nastati različiti proizvodi poput alkana, aldehyda, primarnih alkohola, alkil estara, sekundarnih alkohola, ketona i nekih drugih polioksigenovanih jedinjenja. Smatra se da alkani najverovatnije nastaju u dvofaznom procesu koji obuhvata redukciju acil-CoA niza i dekarbonilaciju nastalog aldehyda (Shepherd i Griffiths, 2006). Vrsta startera je osnovni faktor koji diktira distribuciju izomernih alkana. Kod *n*- i *izo*-alkana dominiraju homolozi sa neparnim brojem C-atoma jer starteri u njihovoj biosintezi C<sub>2</sub>, acetil-CoA (koji nastaje iz piruvata), i C<sub>4</sub>, izobutiril-CoA (koji nastaje iz

<sup>‡</sup> CPI =  $\frac{\sum(\text{procenat alkana sa nepranim brojem C-atoma u nizu})}{\sum(\text{procenat alkana sa parnim brojem C-atoma u nizu})}$  i ACL =  $\frac{(\sum[C_j] \times j)}{(\sum[C_j])}$ , gde je [C<sub>j</sub>] sadržaj alkana sa *j* C-atoma u nizu.

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

valina), sadrže paran broj C-atoma, dok starter sa neparnim brojem C-atoma, C<sub>5</sub>, 2-metilbutiril-CoA (koji nastaje iz izoleucina), u biosintezi *anteizoo*-alkana uslovjava veću zastupljenost homologa sa parnim brojem C-atoma (Youping et al., 2010). U prethodnom istraživanju je načelo da površinski alkani listova vrste *L. europaeus* imaju veoma sličnu raspodelu u kojoj su, takoče dominirali homolozi sa neparnim brojem C-atoma (CPI = 6,73), ali je njen maksimum bio pomeren za jednu C<sub>2</sub> jedinicu, tj. najzastupljeniji homolog je bio hentriakontan (C<sub>31</sub>) (Maffei, 1994).

**TABELA 5.3.** HEMIJSKI SASTAV POVŠINSKIH VOSKOVA PLODOVA BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS*

RI <sup>i</sup>	JEDINJENJE	UZORAK C <sub>1</sub> <sup>ii</sup>	UZORAK D <sub>1</sub> <sup>iii</sup> % <sup>iv</sup>	KLASA
<b>1200</b>	Dodekan <sup>v</sup>	tr <sup>vi</sup>	tr	N
<b>1300</b>	Tridekan <sup>v</sup>	tr	0,4	N
<b>1391</b>	1-Tetradecen	tr	tr	U
<b>1400</b>	Tetradekan <sup>v</sup>	tr	tr	N
<b>1592</b>	1-Heksadecen	tr	tr	U
<b>1600</b>	Heksadekan <sup>v</sup>	tr	tr	N
<b>1700</b>	Heptadekan <sup>v</sup>	tr	tr	N
<b>1793</b>	1-Oktadecen	tr	tr	U
<b>1800</b>	Oktadekan <sup>v</sup>	tr	tr	N
<b>1900</b>	Nonadekan <sup>v</sup>	tr	tr	N
<b>1993</b>	1-Eikozen	tr	- <sup>vii</sup>	U
<b>2000</b>	Eikozan <sup>v</sup>	tr	tr	N
<b>2100</b>	Heneikozan <sup>v</sup>	tr	tr	N
<b>2200</b>	Dokozan <sup>v</sup>	tr	-	N
<b>2293</b>	1-Trikozen	-	tr	U
<b>2300</b>	Trikozan <sup>v</sup>	0,5	1,2	N
<b>2393</b>	1-Tetrakozen	-	tr	U
<b>2400</b>	Tetrakozan <sup>v</sup>	tr	tr	N
<b>2461</b>	2-Metiltetrakozen	tr	tr	I
<b>2500</b>	Pentakozan <sup>v</sup>	1,7	3,9	N
<b>2561</b>	2-Metilpentakozen	tr	tr	I
<b>2570</b>	3-Metilpentakozen	0,5	1,0	A
<b>2600</b>	Heksakozan <sup>v</sup>	0,8	1,5	N
<b>2660</b>	2-Metilheksakozen	0,7	1,5	I

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

NASTAVAK TABELE 5.3				
<b>2670</b>	3-Metilheksakozan	tr	tr	A
<b>2700</b>	Heptakozan <sup>v</sup>	10,6	14,3	N
<b>2761</b>	2-Metilheptakozan	tr	tr	I
<b>2771</b>	3-Metilheptakozan	2,5	3,3	A
<b>2800</b>	Oktakozan <sup>v</sup>	3,9	4,2	N
<b>2808</b>	(sve E)-Skvalen <sup>v</sup>	0,8	2,1	O
<b>2861</b>	2-Metiloktakozan	2,0	2,4	I
<b>2871</b>	3-Metiloktakozan	tr	tr	A
<b>2900</b>	Nonakozan <sup>v</sup>	30,9	31,1	N
<b>2960</b>	2-Metilnonakozan	tr	tr	I
<b>2971</b>	3-Metilnonakozan	2,0	2,1	A
<b>3000</b>	Triakontan <sup>v</sup>	4,2	3,3	N
<b>3061</b>	2-Metiltriakontan	1,9	2,0	I
<b>3100</b>	Hentriakontan <sup>v</sup>	25,1	17,1	N
<b>3161</b>	2-Metilhentriakontan	tr	tr	I
<b>3171</b>	3-Metilhentriakontan	1,4	1,2	A
<b>3200</b>	Dotriakontan <sup>v</sup>	2,1	1,3	N
<b>3261</b>	2-Metildotriakontan	1,1	1,2	I
<b>3271</b>	3-Metildotriakontan	tr	-	A
<b>3300</b>	Tritriakontan <sup>v</sup>	5,2	3,9	N
<b>3371</b>	3-Metiltritriakontan	0,7	tr	A
UKUPNO IDENTIFIKOVANO		98,6 (43) <sup>viii</sup>	99,0 (43)	
ALKANI		97,8 (38)	97,0 (37)	
<i>n</i> -ALKANI (N)		85 (21)	82,3 (21)	
<i>izo</i> -ALKANI (I)		5,7 (9)	7,1 (9)	
<i>anteizo</i> -ALKANI (A)		7,1 (8)	7,6 (7)	
ALKENI (U)		TR (4)	TR (5)	
OSTALO (O)		0,8 (1)	2 (1)	

<sup>i</sup> jedinjenja su navedena po redosledu eluiranja sa DB-5MS kolone (RI eksperimentalno određeni retencioni indeksi na pomenutoj koloni koinjekcijom homologe serije *n*-alkana C<sub>7</sub>-C<sub>40</sub>);

<sup>ii</sup> uzorak površinskih voskova sa nezrelih plodova;

<sup>iii</sup> uzorak površinskih voskova sa zrelih plodova;

<sup>iv</sup> srednja vrednost tri ponavljanja;

<sup>v</sup> identifikacija sastojaka je, osim upoređivanjem eksperimentalno dobijenih RI vrednosti sa literaturnim podacima i upoređivanjem masenih spektara sa spektrima iz biblioteka, potvrđena i GC koinjektiranjem standardnih supstanci;

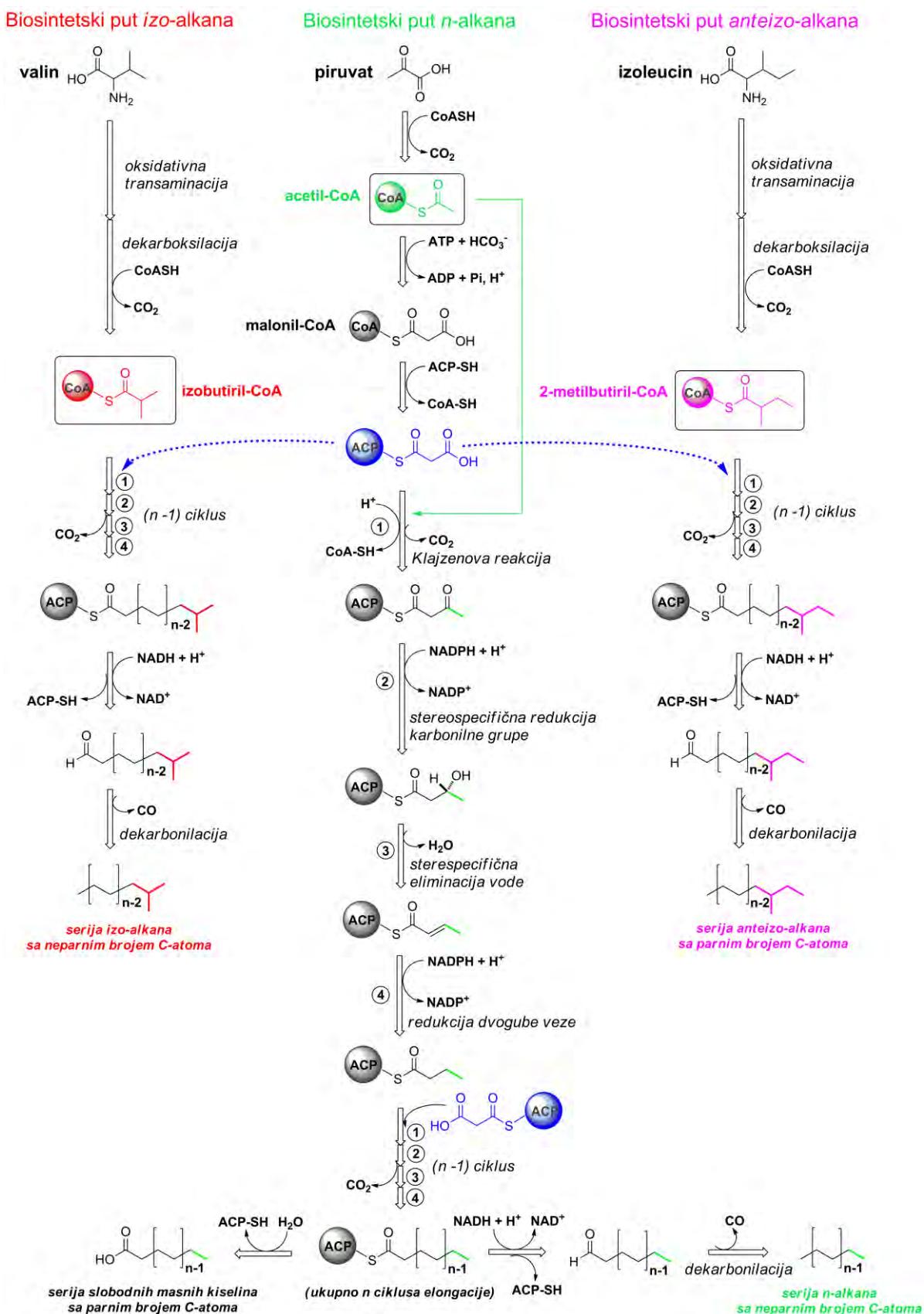
<sup>vi</sup> tr - trag (<0,05%);

<sup>vii</sup> -/ nije detektovano;

<sup>viii</sup> u zagradi je dat broj identifikovanih sastojaka koji pripadaju određenoj klasi.

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*



SLIKA 5.3. ŠEMATSKI PRIKAZ BIOSINTEZE SLOBODNIH MASNIH KISELINA I *n*-, *izo*- I *anteiso*- ALKANA KOD VIŠIH BILJAKA

### 5.1.2.2. HEMIJSKI SASTAV VEZANIH MASNIH KISELINA

Vezane masne kiseline plodova biljne vrste *L. europaeus* prevedene su u metil estre pomoću bazno-katalizovane transesterifikacije (MeONa/MeOH), a dobijeni metil estri su analizirani GC-MS metodom. U uzorku **C<sub>2</sub>** (nezreli plodovi), je ukupno identifikovano 23, a u uzorku **D<sub>2</sub>** (zreli plodovi) 30 metil estara masnih kiselina. Identifikovani metil estri predstavljali su 96,2% (uzorak **C<sub>2</sub>**), odnosno 98,9% (uzorak **D<sub>2</sub>**), svih detektovanih estara masnih kiselina, a navedeni su u tabeli 5.4 prema redosledu eluiranja sa DB-5MS kolone. U cilju poboljšanja rezolucije pojedinih delimično preklopljenih pikova u gasnom hromatogramu (npr. estara oleinske i linolne kiseline (tabela 5.4)), vezane masne kiseline plodova biljne vrste *L. europaeus* su prevedene i u *terc*-butil estre, takoče, pomoću bazno-katalizovane transesterifikacije (<sup>t</sup>BuOK/ <sup>t</sup>BuOH). Naime, u jednom prethodnom istraživanju je pokazano da se neke mono-nezasićene masne kiseline (poput oleinske, vakcenske i petroselinske kiseline) ne mogu razdvojiti gasnom hromatografijom u obliku njihovih metil estara, dok je razdvajanje njihovih *n*-butil estara bilo ostvarivo (Thies, 1995). U našem slučaju, GC-MS analiza *terc*-butil derivata se pokazala izuzetno pogodnom za međusobno razdvajanje i kvantifikaciju dve nezasićene masne kiseline, oleinske i linolne, a da je pritom zadržana rezolucija derivata svih ostalih masnih kiselina (tabela 5.5). Takoče može se zapaziti da je razlika u retencionim indeksima između *terc*-butil i odgovarajućih metil estara ( $\Delta RI = RI(RCOO^tBu) - RI(RCOOMe)$ ) konstantna i da se nalazi u opsegu između 125 i 132 jedinice, pa se može iskoristiti kao dodatni parametar u potvrdi identifikacije. Maseni spektri *terc*-butil estara skoro svih identifikovanih masnih kiselina, kao i maseni spektri nekih metil estara račvastih masnih kiselina nisu bili dostupni u literaturi do sada (tabele 5.4 i 5.5). U literaturi je jedino bio dostupan maseni spektar *terc*-butil-palmitata (*Wiley Registry of Mass Spectral Data 9<sup>th</sup> Edition*).

Među vezanim masnim kiselinama plodova biljne vrste *L. europaeus* dominirale su nezasićene masne kiseline (sa 85,8% u uzorku **C<sub>2</sub>** i 91,7 % u uzorku **D<sub>2</sub>**), dok je sadržaj zasićenih masnih kiselina bio dosta niži (sa 10,4% u uzorku **C<sub>2</sub>** i 7,2 % u uzorku **D<sub>2</sub>**). Kvalitativni i kvantitativni sastav vezanih masnih kiselina plodova *L. europaeus* se, kao i kod drugih viših biljaka, odlikuje visokim sadržajem uobičajenih masnih kiselina, poput palmitinske, linolne i linoleinske, a zajedno one su činile preko 90% ukupnih masnih kiselina. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa opštim stavom da više biljke, u najvećoj meri, sadrže C<sub>16</sub>–C<sub>18</sub>

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

masne kiseline normalnog niza sa parnim brojem C-atoma (Tsydendambaev et al., 2004). Međutim, u sastav lipida plodova *L. europaeus* ulazi i veći broj neuobičajenih masnih kiselina, poput masnih kiselina veoma dugog niza (C<sub>20</sub>–C<sub>28</sub>), masnih kiselina sa neparnim brojem C-atoma u lancu (C<sub>15</sub>–C<sub>23</sub>), kao i račvaste masne kiseline *iso-* (C<sub>16</sub> i C<sub>20</sub>–C<sub>24</sub>) i *anteiso*-niza (C<sub>15</sub> i C<sub>23</sub>), koje su detektovane u malim količinama. Ove masne kiseline nisu bile načele u prethodna dva istraživanja koja su se bavila sastavom vezanih masnih kiselina plodova biljne vrste *L. europaeus* (Kozlowski et al., 1998; Lotti i Averna, 1969).

**TABELA 5.4.** HEMIJSKI SASTAV MASNIH KISELINA PLODOVA BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS* (METIL ESTRI)

RI <sup>i</sup>	JEDINJENJE	UZORAK C <sub>3</sub> <sup>ii</sup>		KLASA	METODA IDENTIFIKACIJE
		% <sup>iv</sup>	UZORAK D <sub>3</sub> <sup>iii</sup>		
1524	Metil-dodekanoat ( <i>syn.</i> Metil-laurat)	tr <sup>vii</sup>	- <sup>vii</sup>	NM	RI, MS, Col <sup>viii</sup>
1724	Metil-tetradekanoat ( <i>syn.</i> Metil-miristat)	tr	tr	NM	RI, MS, CoI
1795	Metil-12-metiltetradekanoat	tr	-	AM	RI, MS
1824	Metil-pentadekanoat	tr	tr	NM	RI, MS
1886	Metil-14-metilpentadekanoat	tr	-	IM	RI, MS, CoI
1902	Metil-( <i>Z</i> )-9-heksadecenoat ( <i>syn.</i> Metil-palmitooleat)	tr	tr	UM	RI, MS, CoI
1924	Metil-heksadekanoat ( <i>syn.</i> Metil-palmitat)	5,6	4,2	NM	RI, MS, CoI
1995	Metil-14-metilheksadekanoat	tr	-	AM	RI, MS
1999	Metil-( <i>E</i> )-9-heptadecenoat	tr	tr	UM	RI, MS
2024	Metil-heptadekanoat	0,2	tr	NM	RI, MS
2089	Metil-( <i>Z,Z</i> )-9,12-oktadekadienoat ( <i>syn.</i> Metil-linoleat) + Metil ( <i>Z</i> )-9-oktadecenoat ( <i>syn.</i> Metil-oleat)	38,1	31,5	UM	RI, MS, CoI
2098	Metil-( <i>Z,Z,Z</i> )-9,12,15-oktadekatrienoat ( <i>syn.</i> Metil-linolenat)	47,2	58,5	UM	RI, MS, CoI
2102	Metil-( <i>E</i> )-9-oktadecenoat ( <i>syn.</i> Metil-elaidat)	-	1,4	UM	RI, MS
2125	Metil-oktadekanoat ( <i>syn.</i> Metil-stearat)	3,3	2,4	NM	RI, MS, CoI
2196	Metil-16-metiloktadekanoat	tr	tr	AM	RI, MS
2200	Metil-( <i>Z</i> )-9-nonadecenoat	tr	-	UM	RI, MS
2224	Metil-nonadekanoat	tr	tr	NM	RI, MS
2288	Metil-18-metilnonadekanoat <sup>ix</sup>	0,1	tr	IM	RI, MS
2292	Metil-( <i>Z,Z</i> )-11,14-eikozadienoat	-	tr	UM	RI, MS
2298	Metil-( <i>Z</i> )-9-eikozenoat	0,5	0,3	UM	RI, MS
2326	Metil-eikozanoat ( <i>syn.</i> Metil-arahidat)	0,8	0,4	NM	RI, MS, CoI
2398	Metil-18-metileikozanoat <sup>x</sup>	tr	tr	AM	RI, MS
2426	Metil-heneikozanoat	tr	-	NM	RI, MS

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

**NASTAVAK TABELE 5.4**

<b>2489</b>	Metil-20-metilheneikozanoat <sup>xi</sup>	tr	tr	IM	RI, MS
<b>2526</b>	Metil-dokozanoat ( <i>syn.</i> Metil-behenat)	0,3	0,2	NM	RI, MS, CoI
<b>2598</b>	Metil-20-metildokozanoat <sup>xii</sup>	tr	-	AM	RI, MS
<b>2627</b>	Metil-trikozanoat	tr	tr	NM	RI, MS
<b>2689</b>	Metil-22-metiltrikozanoat <sup>xiii</sup>	tr	tr	IM	RI, MS
<b>2728</b>	Metil-tetrakozanoat ( <i>syn.</i> Metil-lignocerat)	0,1	tr	NM	RI, MS
<b>2928</b>	Metil-heksakozanoat	tr	-	NM	RI, MS
<b>3128</b>	Metil-oktakozanoat	tr	-	NM	RI, MS
UKUPNO IDENTIFIKOVANO		96,2 (30) <sup>xiv</sup>	98,9 (23)		
METIL ESTRI ZASIĆENIH MASNIH KISELINA		10,4 (23)	7,2 (15)		
NORMALNOG NIZA (NM)		10,3 (14)	7,2 (10)		
ANTEIZO (AM)		TR (5)	TR (2)		
IZO (IM)		0,1 (4)	TR (3)		
METIL ESTRI NEZASIĆENIH MASNIH KISELINA (UM)		85,8 (7)	91,7 (8)		
<sup>i</sup> jedinjenja su navedena po redosledu eluiranja sa DB-5MS kolone (RI eksperimentalno određeni retencioni indeksi na pomenutoj koloni koinjekcijom homologe serije <i>n</i> -alkana C <sub>7</sub> -C <sub>40</sub> );					
<sup>ii</sup> metil estri dobijeni nakon bazno-katalizovane transesterifikacije (MeONa/MeOH) trigliceridne frakcije dihlormetanskog ekstrakta nezrelih plodova;					
<sup>iii</sup> metil estri dobijeni nakon bazno-katalizovane transesterifikacije (MeONa/MeOH) trigliceridne frakcije dihlormetanskog ekstrakta zrelih plodova;					
<sup>iv</sup> srednja vrednost tri ponavljanja;					
<sup>v</sup> <i>syn.</i> - sinonim;					
<sup>vi</sup> tr- trag (<0,05%);					
<sup>vii</sup> -/nije detektovano;					
<sup>xvii</sup> RI - upoređivanjem eksperimentalno dobijenih RI vrednosti sa literaturnim podacima (kako retencioni indeksi za metil estre <i>izo-</i> i <i>anteizo</i> -masnih kiselina nisu dostupni u literaturi, oni su računati pomoću jednostavne jednačine RI ( <i>izo-</i> ili <i>anteizo</i> -RCOOMe) = RI( <i>n</i> -RCOOMe) – ΔRI, gde je za <i>izo</i> -izomere ΔRI = 38, a za <i>anteizo</i> - ΔRI = 29); MS-upoređivanjem masenih spektara sa spektrima iz biblioteka; CoI- GC koinjektiranjem standardnih supstanci;					
<sup>xvi</sup> MS(EI, 70 eV), <i>m/z</i> (rel. int. %): 326 (15,2), 283 (7,9), 199 (7,3), 143 (17,9), 129 (11,1), 111 (12), 97 (18,5), 87 (74), 74 (100), 55 (44,1), 44 (46,1);					
<sup>xvii</sup> MS(EI, 70 eV), <i>m/z</i> (rel. int.%): 340 (15,8), 241 (15,3), 191 (13,6), 143 (22,1), 129 (14,3), 97 (19,8), 87 (70,8), 74 (100), 57 (62,3), 44 (69);					
<sup>xviii</sup> MS(EI, 70 eV), <i>m/z</i> (rel. int.%): 354 (16,3), 143 (18,2), 133 (17), 95 (21,8), 87 (78,9), 74 (99,8), 69,1 (29,9), 55 (54), 44 (100);					
<sup>xix</sup> MS(EI, 70 eV), <i>m/z</i> (rel. int.%): 143 (17,2), 133 (27,3), 96 (32,4), 87 (36,9), 83 (39,4), 74 (49,7), 55 (30,6), 44 (100);					
<sup>xvii</sup> MS(EI, 70 eV), <i>m/z</i> (rel. int.%): 191 (33,2), 133 (28,7), 96 (31,8), 91 (38,7), 87 (20,6), 74 (46,5), 55 (22,6), 44 (100);					
<sup>xiv</sup> u zagradi je dat broj identifikovanih sastojaka koji pripadaju određenoj klasi.					

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

Kako zasićene, tako i nezasićene masne kiseline, sa više od 20 C-atoma u nizu se smatraju retkim metabolitima, iako su načene kod nekih mikroba, insekata, biljaka i tivotinja (u njihovim organima ili proizvodima), kao i kod ljudi koji pate od patobiohemijskih poremećaja (npr. defekt kod  $\alpha$ - i  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina) (Rezanka i Sigler, 2009). Račvaste *izo*- i *anteizo*-masne kiseline, takoče imaju veoma ograničenu rasprostranjenost kod viših biljaka. Najčešća je 14-metilpalmitinska kiselina, koja je načena u lišću golosemenica (gde predstavlja jedan od hemotaksonomskih markera), u iglicama nekoliko vrsta bora i drugih četinara, kao i u ulju plodova biljne vrste *Ginkgo biloba* (Mongrand et al., 2001). Za razliku od viših biljaka, ove račvaste masne kiseline su široko rasprostranjenje kod bakterija i imaju veoma važnu ulogu u njihovoј sistematici gde se njihov sastav koristi kao korisno pomoćno sredstvo pri njihovoј identifikaciji (Kaneda, 1991). Pored toga, ustanovljeno je da glavni aspekt kriotolerantne fiziologije nekih vrsta bakterija, poput onih iz roda *Listeria*, predstavlja visok sadržaj račvastih masnih kiselina niske tačke mržnjenja u ćelijskoj membrani, koje omogućavaju normalno funkcioniranje ćelijske membrane i na niskim temperaturama (Mastronicolis et al., 2005). Takoče pretpostavlja se da je povećan sadržaj zasićenih kiselina veoma dugog niza i račvastih masnih kiselina u voskovima nekih alpskih biljnih vrsta povezan sa zaštitnom ulogom ovih voskova u njihovoј egzistenciji u uslovima tako ekstremnog ekosistema (Tsydendambaev et al., 2004).

U oba analizirana uzorka detektovane su jedino *izo*-masne kiseline sa parnim brojem C-atoma i *anteizo*-masne kiseline sa neparnim brojem C-atoma u ugljovodoničnom nizu. Kao što se i moglo očekivati, ova raspodela je suprotna onoj načenoj za *izo*- i *anteizo*-alkane, ali potpuno u skladu sa prethodno pomenutom biosintezom glavnih sastojaka voskova gde dekarboksilacijom<sup>§</sup> masnih kiselina sa parnim brojem C-atoma ( $C_nH_{2n+1}COOH$ ; gde je  $n + 1 = 2k$ ) nastaju alkani sa neparnim brojem C-atoma u nizu ( $C_nH_{2n+2}$ ; gde je  $n + 1 = 2k$ ), i obrnuto (slika 5.3). U skladu sa ovim biosintetskim putem je i odsustvo masnih kiselina koje bi trebalo da su prekursori u biosintezi najzastupljenijih alkana, kao i prisustvo samo malozastupljenih alkana koji bi trebalo da imaju najzastupljenije masne kiseline kao supstrate za dekarboksilaciju.

<sup>§</sup> Prevočenje masnih kiselina u alkane je dvofazni proces i obuhvata redukciju kiseline do aldehida koju sledi dekarbonilacija nastalog aldehida, ali se može sumarno posmatrati kao proces dekarboksilacije.

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

**TABELA 5.5.** HEMIJSKI SASTAV MASNIH KISELINA PLODOVA BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS* (*terc*-BUTIL ESTRI)

RI <sup>i</sup>	ΔR <sup>ii</sup>	JEDINJENJE	UZORAK D <sub>4</sub> <sup>iii</sup> (%) <sup>iv</sup>	KLASA
<b>1856</b>	132	<i>terc</i> -Butil-tetradekanoat <sup>v, vi</sup>	tr <sup>vii</sup>	NB
<b>1900</b>	130	<i>terc</i> -Butil-(Z)-9-heksadecenoat <sup>viii</sup>	tr	UB
<b>2054</b>	130	<i>terc</i> -Butil-heksadekanoat <sup>v</sup>	3,5	NB
<b>2125</b>	130	<i>terc</i> -Butil-14-metilheksadekanoat <sup>ix</sup>	tr	AB
<b>2154</b>	129	<i>terc</i> -Butil-heptadekanoat <sup>x</sup>	tr	NB
<b>2219</b>	130	<i>terc</i> -Butil-(Z,Z)-9,12-oktadekadienoat <sup>v, xi</sup>	28,7	UB
<b>2223</b>	130	<i>terc</i> -Butil-(Z)-9-oktadecenoat <sup>v, xii</sup>	1,7	UB
<b>2228</b>	130	<i>terc</i> -Butil-(Z,Z,Z)-9,12,15-oktadekatrienoat <sup>v, xiii</sup>	49,6	UB
<b>2232</b>	130	<i>terc</i> -Butil-(E)-9-oktadecenoat <sup>xiv</sup>	0,4	UB
<b>2254</b>	129	<i>terc</i> -Butil-oktadekanoat <sup>v, xv</sup>	2,3	NB
<b>2325</b>	129	<i>terc</i> -Butil-16-metiloktadekanoat <sup>xvi</sup>	tr	AB
<b>2353</b>	129	<i>terc</i> -Butil-nonadekanoat <sup>xvii</sup>	tr	NB
<b>2416</b>	128	<i>terc</i> -Butil-18-metilnonadekanoat <sup>xviii</sup>	tr	IB
<b>2426</b>	128	<i>terc</i> -Butil-(Z)-9-eikozenoat <sup>xix</sup>	0,2	UB
<b>2453</b>	127	<i>terc</i> -Butil-eikozanoat <sup>v, xx</sup>	0,3	NB
<b>2525</b>	127	<i>terc</i> -Butil-18-metileikozanoat <sup>xxi</sup>	tr	AB
<b>2553</b>	127	<i>terc</i> -Butil-heneikozanoat <sup>xxii</sup>	tr	NB
<b>2615</b>	126	<i>terc</i> -Butil-20-metilheneikozanoat <sup>xxiii</sup>	tr	IB
<b>2652</b>	126	<i>terc</i> -Butil-dokozanoat <sup>v, xiv</sup>	0,2	NB
<b>2725</b>	127	<i>terc</i> -Butil-20-metildokozanoat <sup>xxv</sup>	tr	AB
<b>2853</b>	125	<i>terc</i> -Butil-tetrakozanoat <sup>xxvi</sup>	tr	NB
UKUPNO IDENTIFIKOVANO			86,9 (21) <sup>xxvii</sup>	
<i>terc</i> -BUTIL ESTRI ZASIĆENIH MASNIH KISELINA			6,3 (15)	
NORMALNOG NIZA (NB)			6,3 (9)	
ANTEIZO (AB)			TR (4)	
IZO (IB)			TR (2)	
<i>terc</i> -BUTIL ESTRI NEZASIĆENIH MASNIH KISELINA (UM)			80,6 (6)	
' jedinjenja su navedena po redosledu eluiranja sa DB-5MS kolone (RI eksperimentalno određeni retencioni indeksi na pomenutoj koloni koinjekcijom homologe serije <i>n</i> -alkana C <sub>7</sub> -C <sub>40</sub> );				
<sup>ii</sup> razlika u retencionim indeksima između <i>terc</i> -butil i odgovarajućih metil estara ( $\Delta RI = RI(RCOO^tBu) - RI(RCOOMe)$ );				
<sup>iii</sup> <i>terc</i> -butil estri dobijeni nakon bazno-katalizovane transesterifikacije (^BuONa/^BuOH) trigliceridne frakcije dihlormetamskog ekstrakta zrelih plodova;				
<sup>iv</sup> srednja vrednost tri ponavljanja;				
<sup>v</sup> identifikacija sastojaka je, osim upoređivanjem eksperimentalno dobijenih RI vrednosti sa literaturnim podacima i upoređivanjem masenih spektara sa spektrima iz biblioteka, potvrđena i GC koinjektiranjem standardnih supstanci;				
<sup>vi</sup> MS(EI, 70 eV), <i>m/z</i> (rel. int. %): 229 (25,2), 211 (7,2), 191 (9,8), 96 (13,7), 57 (100), 56 (34,2), 44 (56,6), 41 (33,5);				
<sup>vii</sup> tr- trag (<0,05%);				
<sup>viii</sup> MS(EI, 70 eV), <i>m/z</i> (rel. int. %): 237 (15,9), 191 (8,8), 151 (5,2), 133 (7,3), 111 (8,6), 97 (18), 96 (18,1), 83 (18,1), 73 (9,8), 69 (23), 57 (100), 56 (19,1), 44 (45,2), 41 (46,1);				

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

### NASTAVAK TABELE 5.5

<sup>x</sup> MS(EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int. %): 271 (24,9), 269 (2,3), 253 (2,6), 191 (4,0), 177 (3,1), 129 (4,2), 109 (3,5), 96 (9,9), 83 (7,3), 69 (11,5), 57 (100), 56 (32,8), 41 (31);

<sup>x</sup> MS(EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int. %): 271 (16,6), 253 (4), 222 (4,7), 191 (2,6), 163 (3,3), 149 (8,9), 135 (10,8), 121 (16,1), 108 (33,2), 95 (65,7), 81 (65,8), 79 (100), 67 (89,5), 57 (64,5), 55 (78,8), 41 (76,6);

<sup>xi</sup> MS(EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int. %): 336 (0,1), 280 (26,3), 279 (18,1), 263 (17,8), 237 (0,5), 223 (1,2), 209 (1,6), 195 (1,5), 182 (2,2), 163 (1,9), 149 (3,6), 137 (7,6), 123 (12,4), 109 (17,4), 95 (35,5), 81 (43,9), 67 (50), 57 (100), 41 (34,2);

<sup>xii</sup> MS(EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int. %): 338 (0,1), 282 (2,9), 280 (3,6), 265 (14,4), 235 (1,1), 222 (3,3), 207 (3,2), 193 (1,4), 179 (2), 165 (2,7), 135 (4,2), 125 (4,9), 111 (10,3), 95 (19,9), 83 (22,1), 69 (28,5), 57 (100), 41 (36,6);

<sup>xiii</sup> MS(EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int. %): 334 (0,1), 278 (14,9), 277 (15,6), 261 (10,8), 235 (1,7), 222 (6), 221 (5), 209 (3), 193 (1,1), 173 (1,9), 163 (2,5), 149 (7,8), 135 (13,2), 121 (15,5), 108 (22,2), 95 (31,1), 79 (54,2), 67 (34,7), 57 (100), 41 (35,8);

<sup>xiv</sup> MS(EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int. %): 338 (0,1), 282 (2,9), 280 (3,6), 265 (14,4), 235 (1,1), 222 (3,3), 207 (3,2), 193 (1,4), 179 (2), 165 (2,7), 135 (4,2), 125 (4,9), 111 (10,3), 95 (19,9), 83 (22,1), 69 (28,5), 57 (100), 41 (36,6);

<sup>xv</sup> MS(EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int. %): 285 (33), 284 (12,1), 267 (7,5), 241 (1,6), 222 (0,4), 185 (1,7), 171 (0,7), 167 (0,3), 143 (0,6), 129 (2,8), 111 (2,3), 97 (4,4), 85 (5), 71 (7,3), 57 (100), 41 (18,7);

<sup>xvi</sup> MS(EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int. %): 299 (16,5), 281 (6,2), 277 (6,2), 241 (1,6), 191 (2,9), 185 (1,7), 171 (1,7), 163 (1,9), 149 (3,3), 133 (4,9), 121 (5,2), 108 (5,8), 95 (16,6), 79 (22,7), 67 (21), 57 (100), 41 (32,3);

<sup>xvii</sup> MS(EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int. %): 299 (18,9), 281 (15,1), 261 (6,6), 191 (11,6), 149 (11,3), 133 (13,3), 121 (19,8), 108 (25,1), 95 (58,8), 79 (78,2), 67 (78,4), 57 (100), 44 (76,3), 41 (75,9);

<sup>xviii</sup> MS(EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int. %): 313 (27,1), 277 (4,3), 191 (4,2), 177 (2,4), 163 (2), 149 (2,4), 133 (4,5), 119 (3,6), 109 (6,4), 95 (13), 79 (13,8), 67 (16,5), 57 (100), 43 (24,7);

<sup>xix</sup> MS(EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int. %): 310 (2,3), 293 (12,5), 273 (1), 249 (1,7), 235 (1,6), 221 (1,4), 193 (1,7), 179 (1,6), 165 (1,9), 151 (2,3), 135 (2,6), 125 (5,3), 111 (10,7), 97 (18,2), 83 (20,3), 69 (25,5), 57 (100), 41 (30,8);

<sup>xi</sup> MS(EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int. %): 313 (31,3), 295 (5,6), 269 (1), 241 (0,4), 227 (0,5), 213 (0,9), 185 (1,1), 171 (0,8), 157 (0,7), 129 (3,1), 111 (2,3), 97 (5,1), 85 (5,4), 71 (8,2), 57 (100), 41 (19,2);

<sup>xx</sup> MS(EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int. %): 327 (27,2), 191 (8), 177 (3,2), 167 (5,2), 133 (7,5), 111 (5,3), 96 (13,2), 83 (12,2), 67 (19,6), 57 (100), 43 (31,8);

<sup>xxi</sup> MS(EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int. %): 327 (24,7), 191 (23,2), 177 (8,6), 133 (23,8), 117 (12,7), 96 (44,2), 79 (38,3), 67 (39,7), 57 (98,6), 44 (100);

<sup>xxii</sup> MS(EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int. %): 341 (20,1), 191 (18,6), 147 (8,6), 133 (14,6), 117 (10,6), 96 (30), 79 (27,8), 67 (24,8), 57 (100), 44 (73,5);

<sup>xxiv</sup> MS(EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int. %): 341 (27,3), 323 (5,2), 203 (1,3), 191 (3,6), 177 (2), 163 (1,5), 149 (2,4), 131 (44,4), 117 (11), 101 (12), 95 (11,7), 79 (15,3), 67 (14,3), 57 (100), 41 (28,3);

<sup>xxv</sup> MS(EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int. %): 355 (20,3), 191 (32,8), 177 (14,7), 147 (12,4), 133 (31,8), 117 (31,3), 105 (16,1), 96 (49), 79 (43,9), 67 (38,9), 57 (77,9), 44 (100);

<sup>xxvi</sup> MS(EI, 70 eV),  $m/z$  (rel. int. %): 369 (16,1), 191 (27,4), 177 (9,8), 147 (11,9), 133 (30,2), 117 (15,5), 96 (50,9), 79 (37,8), 67 (47), 57 (81,8), 44 (100);

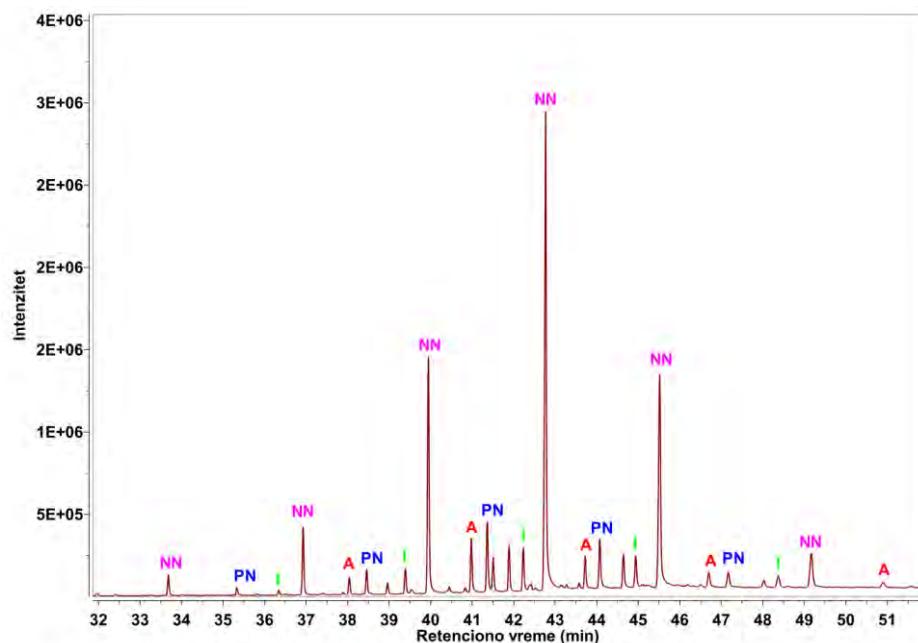
<sup>xxvii</sup> u zagradi je dat broj identifikovanih sastojaka koji pripadaju određenoj klasi.

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

### 5.1.2.3. GAUSOVA DISTRIBUCIJA POVRŠINSKIH ALKANA PLODOVA BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS*

Na slici 5.4 je predstavljen deo hromatograma površinskih ispiraka zrelih plodova biljne vrste *L. europaeus* gde se jasno može uočiti da raspodela relativnih količina *n*-alkana ( $C_{23}$ – $C_{33}$ , sa međusobnim razmakom od dva C-atomata) veoma podseća na Gausovu raspodelu. Slična raspodela je vidljiva i kod homologa koji pripadaju seriji *anteizo*-(3-metil) i *izo*-(2-metil)alkana. Gausova raspodela se inače naziva i normalnom (prirodnom) raspodelom, koja se može interpretirati na taj način da je srednja vrednost u stvari idealna vrednost kojoj sama priroda teži, a da su opažanja (tj. vrednosti merenja) sa leve ili desne strane u odnosu na nju greška, tj. devijacije od „prirodne“ idealne vrednosti. Tako, može se reći da Gausova raspodela predstavlja i „zakon prirodne greške“ (Howell, 2008). Normalna distribucija se najčešće koristi kao prva aproksimacija pri opisivanju pojave kada realne vrednosti slučajnih promenljivih pokazuju težnju da se grupišu oko jedne srednje vrednosti. Stoga, posmatrano sa statističke strane, moglo bi se reći da uočena raspodela alkana kod biljne vrste *L. europaeus* predstavlja odraz rada enzimskih sistema koji vrše produkciju alkana iz *de novo* sintetisanih prekursora, odnosno masnih kiselina.



SLIKA 5.4. DEO HROMATOGRAMA POVRŠINSKIH ISPIRAKA PLODOVA BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS* NA KOME SU OZNAČENI PIKOVI KOJI ODGOVARAJU DETEKTOVANIM *n*-ALKANIMA SA NEPARNIM (NN) I PARNIM (PN) BROJEM C-ATOMA U NIZU, KAO I *anteizo*-(A) I *izo*-ALKANIMA (I)

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

Veruje se da se biosinteza alkana odvija u dve ključne faze: (i) elongacija stearinske ili palmitinske kiseline pomoću „acetatnih” jedinica i (ii) modifikacije ovako dobijenih masnih kiselina veoma dugog niza, koje sumarno dovode do dekarboksilacije, a kojima nastaju *n*-alkani sa neparnim brojem C-atoma u ugljovodoničnom nizu. Još uvek nije u potpunosti rasvetljeno koji faktor određuje veću zastupljenost homologa sa određenom dužinom ugljovodoničnog niza kod ovih alifatičnih sastojaka voskova. Postoje određeni dokazi koji ukazuju da u reakcijama modifikacije (npr. kod onih koje katališe aldehid-reduktaza) ne postoji nikakva selektivnost prema dužini acil niza (Post-Beittenmiller, 1996). Poslednjih godina, sve je više dokaza koji idu u prilog pretpostavci da krajnju dužinu acil niza uslovjava enzim koji katalizuje prvu reakciju u ciklusu elongacije mikrozomalne masne kiseline, tj. reakciju Klajzenove kondenzacije (slika 5.3). Pretpostavlja se (na osnovu rezultata dobijenih kod kvasaca) da je odlučujući faktor dubina hidrofobnog djetepa u koji se masna kiselina veoma dugog ugljovodoničnog niza smešta tokom ciklusa elongacije, tako da u trenutku kada dužina rastućeg acil niza prekorači dubinu djetepa dalja elongacija nije moguća (slika 5.5a; Denic i Weissman, 2007). Imajući u vidu ova novija saznanja i uočenu Gausovu raspodelu površinskih alkana kod plodova *L. europaeus*, moglo bi se reći da pomenuti enzim elongaza najbolje katalizuje reakciju u kojoj, kao prekursor za dobijanje alkana, učestvuje upravo ona masna kiselina čija dužina niza odgovara dubini hidrofobnog djetepa ovog enzima, i da se svi ostali proizvodi elongacije mogu smatrati očekivanom statističkom greškom (tj. slučajnim opažanjima) koja prati zakon normalne raspodele. Stoga se parametri eksperimentalno određenih Gausovih raspodela *n*- i račvastih alkana (srednja vrednost  $\mu$  i standardna devijacija  $\zeta$ ) mogu protumačiti tako da  $\mu$  predstavlja dužinu „idealne” masne kiseline, tj. one koju je priroda nameravala da proizvede (jer je kodirana u genetičkom materijalu), a da  $\zeta$  predstavlja grešku enzimskih sistema koji vrše elongaciju. Zanimljivo je da je ova greška kod sve četiri distribucije alkana plodova biljne vrste *L. europaeus* oko dve „acetatne” jedinice (1,7-2,5; slika 5.6), što se može povezati sa još jednom karakteristikom enzimskog sistema za elongaciju. Naime, načelo je da interakcija terminalne metil grupe sa tačno određenim ostatkom lizina, koji se nalazi na lumenskoj strani heliksa, dovodi do kraja procesa elongacije (Denic i Weissman, 2007). Takoče utvrđeno je i da su enzimi, u kojima je položaj ovog ostatka lizina bio izmenjen, tj. nalazio se jedan zavoj bliže ili dalje od aktivnog mesta, bili u potpunosti funkcionalni, ali su davali proizode koji su imali za četiri C-atoma (dve „acetatne” jedinice) kraće ili duže nizove. Ova pojava je od strane autora objašnjena

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

time da je rastojanje između dva susedna zavoja kod ovih enzima ( $5,4 \text{ \AA}$ ) u izuzetno dobroj saglasnosti sa dužinom zasićenog ugljovodoničnog niza koji sadrži četiri ugljenikova atoma ( $5,3 \text{ \AA}$ ) (slika 5.5b). Fascinantno je poklapanje čvrstosti normalnih raspodela<sup>\*\*</sup> površinskih alkana plodova vrste *L. europaeus* i promena u dužini lanca do kojih dovode upravo pomenute modifikacije na enzimima. Ovo ukazuje na to da ostaci aminokiselina koji se nalaze na proksimalnom i distalnom zavodu u odnosu na ključni ostatak lizina, takođe imaju značajnu ulogu u određivanju dužine masne kiseline koja se biosintetiše. Ukoliko bi postojalo više elongaza u kojima se ovaj ključni ostatak lizina nalazi u različitim položajima, kao krajnji ishod bi se mogao očekivati set međusobno prekloppljenih Gausovih raspodela alkana koji ne bi nužno morao da ima karakteristični opšti oblik Gausove raspodele već bi, mnogo verovatnije, imao oblik deformisane Gausove raspodele. Sve ovo navodi na zaključak da je svaki organizam genetički predodređen dubinom hidrofobnog djeteta enzima unutar enzim-membrana kompleksa i da bi raspodela alkana oko „idealne” (srednje vrednosti) najverovatnije trebala da ima uvek grešku od oko dve „acetatne jedinice”.



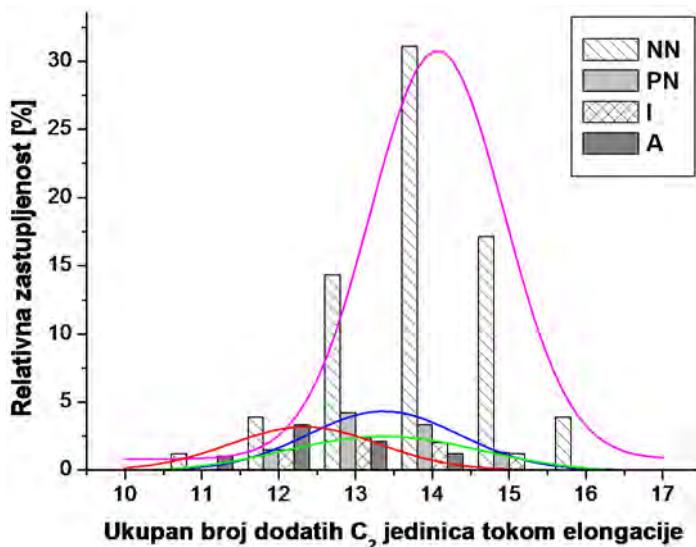
**SLIKA 5.5.** MODEL KOJIM JE ILUSTROVANO KAKO DUBINA HIDROFOBNOG DŽETA (a) I OSTATAK LIZINA NA LUMENSKOJ STRANI HELIKSA (b) ODREĐUJU DUŽINU ACIL NIZA KOJI SE BIOSINTETIŠE.<sup>††</sup> SIMBOLOM \* SU OZNAČENI POLOŽAJI LIZINA U MODIFIKOVANIM ENZIMIMA. UTVRDENO JE DA JE OSTATAK LIZINA IMAO UTICAJ NA DUŽINU ACIL NIZA SAMO U POLOŽAJIMA KOJI SU OZNAČENI CRVENOM BOJOM

<sup>\*\*</sup> Za normalnu raspodelu je karakteristično da se interval pouzdanosti od 95% nalazi na plus-minus dve standardne devijacije.

<sup>††</sup> Preuzeto iz Denic i Weissman (2007).

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*



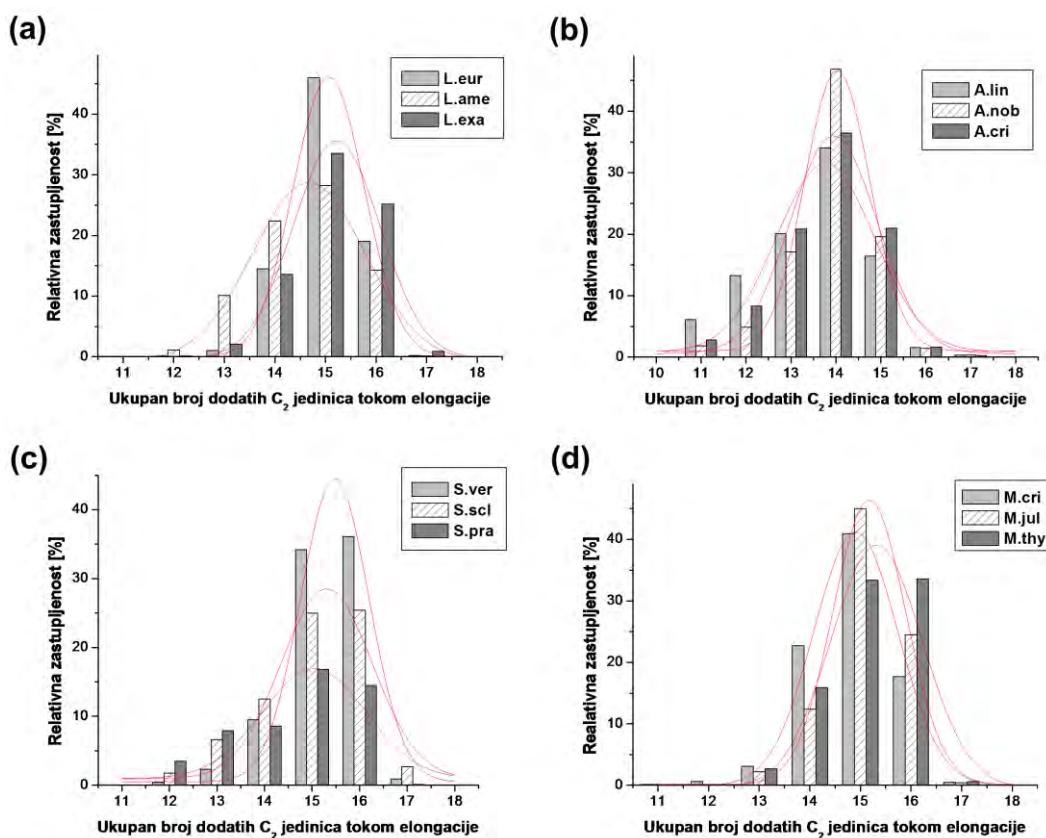
**SLIKA 5.6.** GAUSOVE RASPODELE *n*-ALKANA SA NEPARNIM (NN, KRIVA ROZE BOJE) I PARNIM (PN, KRIVA PLAVE BOJE) BROJEM C ATOMA U NIZU, KAO I *anteizo*-(A, KRIVA CRVENE BOJE) I *izo*-ALKANA (I, KRIVA PLAVE BOJE) IZ EPIKUTIKULARNIH VOSKOVA ZRELIH PLODOVA *L. EUROPAEUS* IZRAŽENE KROZ UČESTALOSTI (RELATIVNE ZASTUPLJENOSTI) DODAVANJA ODREĐENOG BROJA  $C_2$  („ACETATNIH“) JEDINICA U PROCESU ELONGACIJE

Ova hipoteza nije samo podrđana raspodelom alkana kod biljne vrste *L. europaeus*, već i raspodelama alkana kod većeg broja drugih pripadnika familije Lamiaceae, kao i onim načenim kod biljnih vrsta iz drugih biljnih familija (slika 5.7). Na slici 5.6 su prikazane sve četiri raspodele epikutikularnih alkana plodova *L. europaeus*, ali u funkciji ukupnog broja  $C_2$  jedinica dodatih tokom elongacije. Kada se raspodele alkana iskašu na ovaj način može se primetiti da i parametar  $\mu$  varira za oko 2 „acetatne“ jedinice (od  $\mu = 12,34$  kod *anteizo*-alkana do  $\mu = 14,06$  kod *n*-alkana sa neparnim brojem C-atoma). Na slici 5.7 su prikazane Gausove raspodele *n*-alkana načene kod drugih biljnih vrsta, a koje ujedno imaju različite vrednosti parametara  $\mu$  i  $\zeta$ . Površinski *n*-alkani listova biljne vrste *L. europaeus*, i još dva taksona koja pripadaju rodu *Lycopus* (*L. exaltatus* i *L. americanus*, slika 5.7a) pokazuju raspodelu u kojoj je  $\zeta$  oko 2 "acetatne jedinice" ali je ona centrirana na  $\mu = 15$  (Maffei, 1994). Alkani normalnog niza sa neparnim brojem C-atoma kod nekih članova roda *Achillea* (Asteraceae, slika 5.7b) imaju raspodele koja veoma liče na Gausove i mečusobno su veoma uniformne, pa se mogu opisati istim vrednostima parametara  $\zeta$  i  $\mu$  (oko 2 i 14  $C_2$  jedinica) (Palić et al., 1999). Mečutim, kod predstavnika druge dve roda familije Lamiaceae, *Salvia* (Maffei, 1994) i *Micromeria* (Reddy et al., 2000) (slika 5.7c i 5.7d), ovi parametri se značajno infragenetski razlikuju: npr. vrsta *M. cristata* ( $\zeta = 1,66$ ,  $\mu = 14,91$ ) odlikuje se veoma pravilnom Gausovom raspodelom alkana, dok vrste *S. sclarea* ( $\zeta = 1,92$ ,  $\mu = 15,30$ ),

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

*S. verticillata* ( $\zeta = 1,44$ ,  $\mu = 15,48$ ) i *M. thymifolia* ( $\zeta = 1,81$ ,  $\mu = 15,32$ ) imaju poprilično deformisane Gausove raspodele, koje se mogu lako prepoznati po odsustvu jasnog maksimuma, jer postoje dva dominantna, jednako zastupljena *n*-alkana. Ove deformacije u raspodeli alkana u većoj meri utiču na vrednost parametra  $\mu$  nego na parametar  $\zeta$ . Upravo pomenuto prisustvo dva (ili više) glavna *n*-alkana u voskovima neke biljne vrste se može objasniti postojanjem minimum dve različite elongaze kod date biljne vrste. Ovim se dotiče jedno od najvažnijih nedoumica u biosintezi voskova, a tiče se broja enzima koji učestvuje u biosintezi C<sub>18</sub>–C<sub>36</sub> acil grupa (Kunst i Samuels, 2009). Kod većine raspodela, može se uočiti, da što je vrednost parametra  $\mu$  bliža celom broju to vrednost R<sup>2</sup> (kvadrat koeficijenta korelacije između naćene i očekivane vrednosti) teži jedinici (>0,999), ukazujući da je najverovatnije operativan samo jedan enzim.



**SLIKA 5.7.** GAUSOVE RASPODELE *n*-ALKANA SA NEPARNIM BROJEM C-ATOMA U NIZU KOD RAZLIČITIH BILJNIH VRSTA IzRAȚENE KROZ UČESTALOSTI (RELATIVNE ZASTUPLJENOSTI) DODAVANJA ODREĐENOG BROJA C<sub>2</sub> („ACETATNIH”) JEDINICA U PROCESU ELONGACIJE: (a) *LYCOPUS EUROPAEUS* (L. EUR), *L. AMERICANUS* (L. AME) i *L. EXALTATUS* (L. EXA); (b) *ACHILLEA LINGULATA* (A. LIN), *A. NOBILIS* (A. NOB) i *A. CRITHMIFOLIA* (A. CRI); (c) *SALVIA VERTICILLATA* (S. VER), *S. SCLAREA* (S. SCL) i *S. PRATENSIS* (S. PRA); (d) *MICROMERIA CRISTATA* (M. CRI), *M. JULIANA* (M. JUL) i *M. THYMIFOLIA* (M. THY)

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

Na kraju, uobičajeni parametri za opisivanje raspodele alkana u uzorcima prirodnog porekla, ACL i CPI, bi se mogli sada izračunati, na mnogo precizniji način, preko analognih parametara odgovarajuće Gausove raspodele. Naime, srednja vrednost ( $\mu$ ) bi trebalo da odgovara prosećnoj dužini ugljovodoničnog niza ( $ACL = 2 \times \mu + 1$ ), dok bi odnos površina ispod Gausovih kriva  $n$ -alkana sa neparnim i parnim brojem C-atoma u ugljovodoničnom nizu ( $A_N/A_P$ ) trebalo da bude analogan ugljeničnom preferencijalnom indeksu (CPI). Na primer, distribucije  $n$ -alkana sa neparnim i parnim brojem C-atoma u nizu kod plodova *L. europaeus* imaju sledeće Gausove parametre (slika 5.4):  $\mu_{NN} = 14,06$ ,  $\zeta_{NN} = 1,73$  i  $R^2_{NN} = 0,995$ , odnosno,  $\mu_{PN} = 13,36$ ,  $\zeta_{PN} = 1,96$  i  $R^2_{PN} = 0,991$ , sa odnosom  $A_{NN}/A_{PN} = 6,08$ , pa bi vrednosti za ACL i CPI izračunate na osnovu njih imale vrednosti 29,12 i 6,08, a one se dobro slažu sa onim prethodno dobijenim primenom klasične formule (28,93 i 6,72) (Reddy et al., 2000).

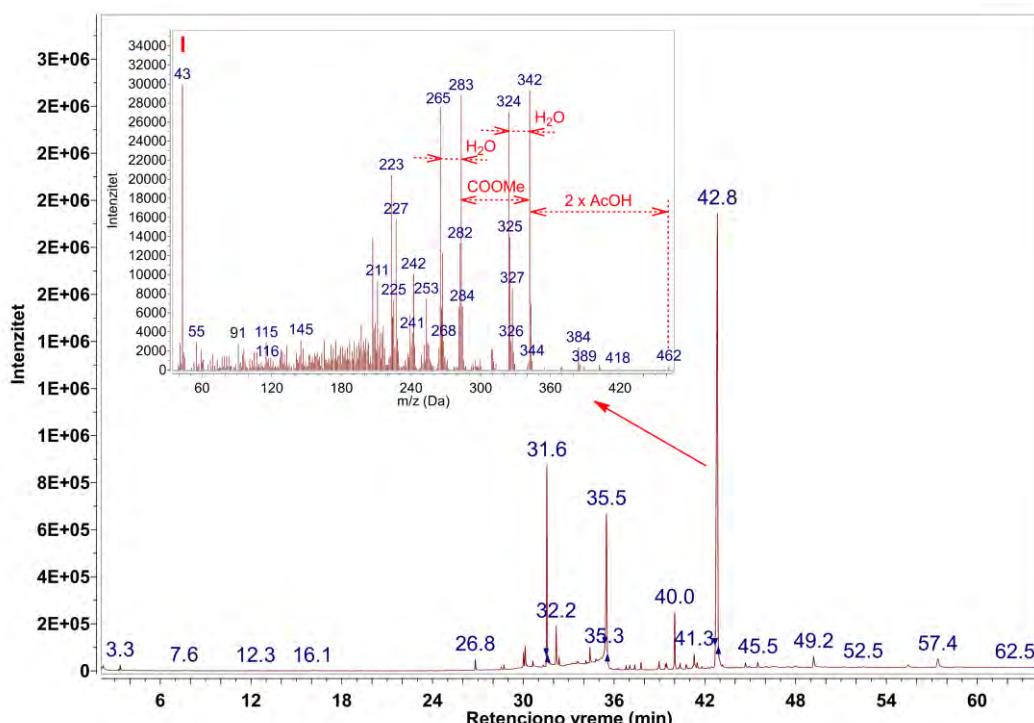
Do sada su Gausove raspodele alkana proučavane samo u konteksu uticaja statističkog parametra  $\zeta$  na strukturu i mehaničke osobine (tj. na modul skladištenja i modul gubitka energije) voskova u cilju boljeg razumevanja uslova pod kojim dolazi do poremećaja unutar njih (Petitjean et al., 2010). Dobijeni rezultati su, između ostalog, pokazali da dolazi do povećanja količine amorfne faze i broja kristalnih faza sa rastom standardne devijacije  $\zeta$ . Pored toga, utvrđeno je da količina amorfne faze, takođe raste sa povećanjem mase *izo*-alkana dodata sintetičkim voskovima, ali i da je ovaj uticaj zanemarljiv do udela *izo*-alkana od 12%, jer razgranati alkani, ukoliko su prisutni u manjoj meri, mogu da popune praznine ili međulamelarne prostore unutar kristalne rešetke. Pri većim udelima *izo*-alkana neuređenost se drastično povećava (Petitjean et al., 2008). Čini se da nastanak amorfne faze (sastavljene od linearnih i račvastih alkana) može biti izuzetno važan i kod realnih voskova, jer se na taj način ili podstiče formiranje samo jednog čvrstog rastvora ili pak sprečava pojava drugih čvrstih rastvora (Petitjean et al., 2010). Kako epikutikularni  $n$ -alkani zrelih plodova biljne vrste *L. europaeus* imaju usku raspodelu (sa vrednošću  $\zeta$  od oko 2), a sadržaj račvastih alkana je blizu 12% (tabela 5.2), oni verovatno formiraju jednu čvrstu kristalnu površinu sa malim udelom amorfnih zona (koje počinju da se javljaju pri udelu od 11,3% (Petitjean et al., 2010)).

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

### 5.1.2.4. IZOLOVANJE I ODREĐIVANJE STRUKTURE NOVOG FENOLNOG DITERPENA ABIETANSKOG SKELETA

Preliminarna GC-MS analiza ekstrakta plodova (oko 1 g) biljne vrste *L. europaeus* ukazala je na prisustvo glavnog isparljivog sastojka **I** sa molekulskim jonom na  $m/z$  362 u delu hromatograma u kome eluiraju diterpeni. Fragmentacija koja se mogla uočiti u EI-MS spektru ovog jedinjenja je sledila karakterističan obrazac konsekutivnog gubitka molekula sirćetne kiseline i vode, pri čemu nastaju drugi i treći jon po intenzitetu ( $[M - 2 \times AcOH]^+$  i  $[M - 2 \times AcOH - H_2O]^+$ ), ukazujući na ĉinjenicu da je reč o diacetilovanom molekulu. Ova pretpostavka je bila podržana i osnovnim jonom na  $m/z$  43 koji odgovara acilijum jonu  $CH_3C\equiv O^+$  (slika 5.8). Nakon ove analize, veća masa plodova (25 g) podvrgнутa je ekstrakciji, a iz dobijenog ekstrakta je hromatografijom na  $SiO_2$  izolovano jedinjenje **I** u čistom obliku (prema TLC i GC-MS analizi), a njegov prinos (u odnosu na masu suvih plodova) je bio neobično visok, oko 1%. Sa čistim jedinjenjem **I** u rukama, bilo je moguće izvršiti detaljnu hemijsku i spektalnu analizu, a i ispitati njegovu antimikrobnu aktivnost u cilju određivanja njegove moguće biološke funkcije (a koja bi morala da bude značajna s obzirom na njegov visok sadržaj u plodovima).



SLIKA 5.8. TIC HROMATOGRAM DIHLORMETANSKOG EKSTRAKTA PLODOVA BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS* SA MASENIM SPEKTROM GLAVNOG ISPARLJIVOOG SASTOJKA **I**

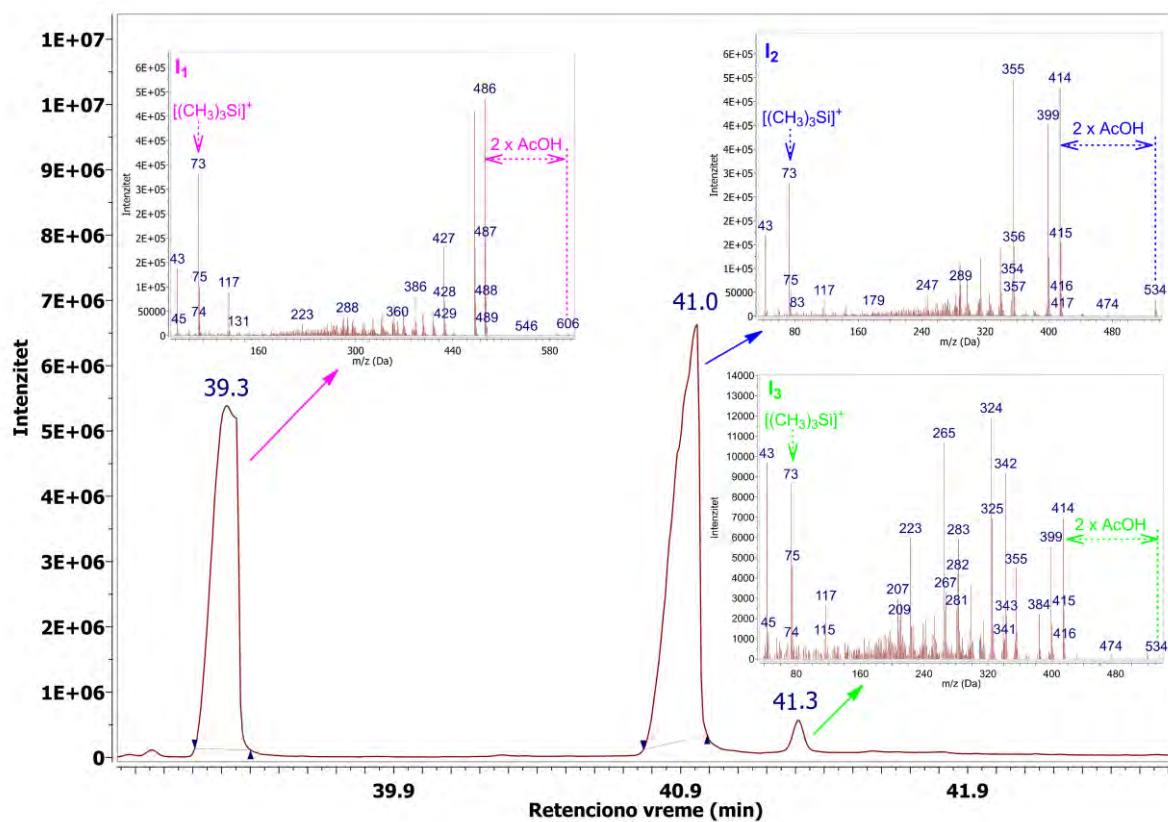
## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

Masenim spektrometrijom visoke rezolucije (HRMS) utvrđeno je da je molekulska formula jedinjenja **I** C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>O<sub>8</sub>. Uočeni gubitak molekula vode (slika 5.8) u EI-MS spektru ukazivao je na prisustvo jedne (ili više) hidroksilnih grupa u ovom molekulu, što je bilo podrđano i odgovarajućom trakom u IR spektru ( $\nu(\text{O}-\text{H}) = 3389 \text{ cm}^{-1}$ ). Pored ove, u IR spektru su se nalazile i apsorpcione trake koje su ukazivale na prisustvo i dve estarske grupe ( $\nu(\text{C}=\text{O}) = 1727$  i  $1708 \text{ cm}^{-1}$ ) i aromatičnog jezgra ( $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}-\text{H}) = 3080 \text{ cm}^{-1}$  i  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}}) = 1577 \text{ cm}^{-1}$ ). U cilju određivanja broja hidroksilnih grupa u molekulu, mala količina jedinjenja **I** je podvrgnuta reakciji sililovanja, pomoću viška TMSCl/Et<sub>3</sub>N, pri čemu je dobijena smeša jednog disililovanog (**I**<sub>1</sub>) i dva monosililovana derivata (**I**<sub>2</sub> i **I**<sub>3</sub>). Disililovani derivat **I**<sub>1</sub>, sa molekulskim jonom na  $m/z$  606 ( $[\text{M}(\mathbf{I}_1) - 2 \times \text{H} + 2 \times (\text{CH}_3)_3\text{Si}]^+$ ), poput jedinjenja **I**, je u EI-MS spektru pokazivao intenzivnu fragmentaciju praćenu gubitkom dva molekula AcOH kojom nastaje odgovarajući osnovni jon na  $m/z$  486. Različita zastupljenost monosililovanih derivata **I**<sub>2</sub> i **I**<sub>3</sub> ukazivala je na postojanje dve različite OH grupe u molekulu **I** (slika 5.9). Činjenica da je proizvod **I**<sub>4</sub> dobijen pri pokušaju totalnog deacetilovanja jedinjenja **I** (pomoću rastvora CH<sub>3</sub>ONa u CH<sub>3</sub>OH) bio rastvoran u vodi, a takođe se dodatkom kiseline, potvrdila je da je makar jedna od ove dve hidroksilne grupe fenolna. Takođe apsorpcioni maksimumi u UV-Vis spektru ( $\lambda_{\text{max}}$  223 (log ε 4,00) i 284 (log ε 3,50) nm) su ukazivali na prisustvo hidroksifenil hromofore.

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*



**SLIKA 5.9.** TIC HROMATOGRAM PROIZVODA SILILOVANJA JEDINJENJA I SA NJIHOVIM MASENIM SPEKTRIMA

Analizom  $^1\text{H}$ - i  $^{13}\text{C}$ -NMR spektara je utvrđeno prisustvo izopropil grupe vezane za aromatično jezgro, dve metil grupe vezane za kvaternarne  $sp^3$ -hibridizovane C-atome, dva protona sa aromatičnog jezgra koja su međusobno *meta* ( $J_m = 1,8$  Hz, *d*,  $\delta_{\text{H}}$  6,77 i 6,56;  $\delta_{\text{C}}$  121,8 i 114,6), jedne karboksi metil ( $\delta_{\text{H}}$  3,76, 3H, *s*;  $\delta_{\text{C}}$  178,1 i 52,3) i dve acetil grupe ( $\delta_{\text{H}}$  1,81, 3H, *s* i 2,03, 3H, *s*;  $\delta_{\text{C}}$  171,4 i 21,2, 170,4, i 21,4) (tabela 5.6). Dodatak par kapi  $\text{D}_2\text{O}$  u rastvor jedinjenja I u deuterohloroformu doveo je do nestanka dva signala, oštrog singleta na  $\delta_{\text{H}}$  6,48 i širokog singleta na  $\delta_{\text{H}}$  2,68, iz  $^1\text{H}$  NMR spektra, dajući još jednu potvrdu, pored rezultata sililovanja, pretpostavci da u molekulu postoji dve različite hidroksilne grupe. Iz  $^1\text{H}$  –  $^1\text{H}$  COSY spektra bila su evidentna dva spinska sistema: (i)  $(\text{C})_2\text{CH}-\text{CH}(\text{OR})-\text{CHOH}(\text{C})_2$  ( $\text{H-5}$ ,  $\text{H-6}$ ,  $\text{H-7}$ ;  $\delta_{\text{H}}$  3,23, 5,06, 4,47; i  $\delta_{\text{C}}$  37,3, 75,2, 70,2) i (ii)  $(\text{C})\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{C})(\text{OR})$  ( $\text{H-2}\alpha$  i  $2\beta$ ,  $\text{H-3}\alpha$  i  $3\beta$ ,  $\text{H-4}$ ;  $\delta_{\text{H}}$  1,49 i 2,15, 2,12 i 1,96, 6,32; i  $\delta_{\text{C}}$  31,3, 22,1, 74,6) (slika 5.11a). Ovi strukturni fragmenti, zajedno sa ostalim pomenutim funkcionalnim grupama, mogli su se uklopliti u strukturu prikazanu na slici 5.10 koja predstavlja potpuno novi diterpen abietanskog skeleta, a čiji su spektralni podaci (hemijiska pomeranja i konstante kuplovanja H i C atoma iz prstena B i C) bili i u veoma dobroj saglasnosti sa NMR podacima srodnog,

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

prethodno izolovanog diterpena abietanskog skeleta, leonubiastrina (**185**) (metil-6 $\beta$ -acetoksi-7 $\alpha$ ,11-dihidroksi-3-oksoabjeta-1,8,11,13-tetraen-19-oat; slika 5.10) (Malakov et al., 1998).

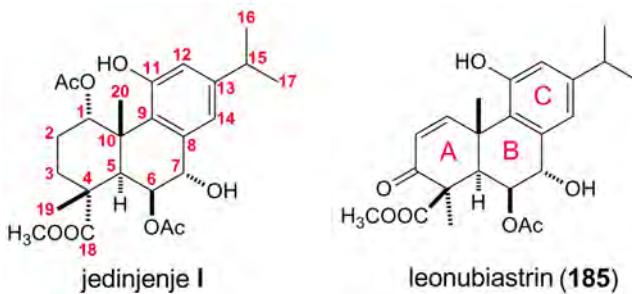
**TABELA 5.6.**  $^1\text{H}$ - i  $^{13}\text{C}$ -NMR SPEKTRALNI PODACI ZA JEDINJENJE **I**

POLOŽAJ	$\delta_{\text{C}}$ [ppm] <sup>i</sup>	$\delta_{\text{H}}$ [ppm] <sup>ii</sup>
<b>1</b>	74,6	$\beta$ : 6,32 (br. s, 1H)
<b>2</b>	22,1	$\alpha$ : 1,96 (m, 1H)
		$\beta$ : 2,12 (m, 1H)
<b>3</b>	31,3	$\alpha$ : 2,15 (m, 1H)
		$\beta$ : 1,49 (m, 1H)
<b>4</b>	47,6	-
<b>5</b>	37,3	$\alpha$ : 3,23 (s, 1H)
<b>6</b>	75,2	$\alpha$ : 5,06 (br. s, 1H)
<b>7</b>	70,2	$\beta$ : 4,47 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H)
<b>8</b>	136,2	-
<b>9</b>	127,5	-
<b>10</b>	42,5	-
<b>11</b>	153,3	-
<b>12</b>	114,6	6,56 (d, $J_m = 1,8$ Hz, 1H)
<b>13</b>	148,3	-
<b>14</b>	121,8	6,77 (d, $J_m = 1,8$ Hz, 1H)
<b>15</b>	33,1	2,79 (hept, $J = 7$ Hz, 1H)
<b>16</b>	23,5	1,21 (d, $J = 7$ Hz, 3H)
<b>17</b>	23,8	1,20 (d, $J = 7$ Hz, 3H)
<b>19</b>	178,1	-
<b>19<math>\beta</math>-CH<sub>3</sub></b>	18,2	1,46 (s, 3H)
<b>20<math>\beta</math>-CH<sub>3</sub></b>	21,7	1,74 (s, 3H)
<b>1<math>\alpha</math>-OAc</b>	171,4	-
	21,2	1,81 (s, 3H)
<b>6<math>\beta</math>-OAc</b>	170,4	-
	21,4	2,03 (s, 3H)
<b>18<math>\alpha</math>-COOCH<sub>3</sub></b>	52,3	3,76 (s, 3H)
<b>11-OH</b>	-	6,48 (s, 1H)
<b>7<math>\alpha</math>-OH</b>	-	2,57 (br. s, 1H)

<sup>i</sup> spektar je snimljen u CDCl<sub>3</sub> (125 MHz);

<sup>ii</sup> spektar je snimljen u CDCl<sub>3</sub> (500 MHz).

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

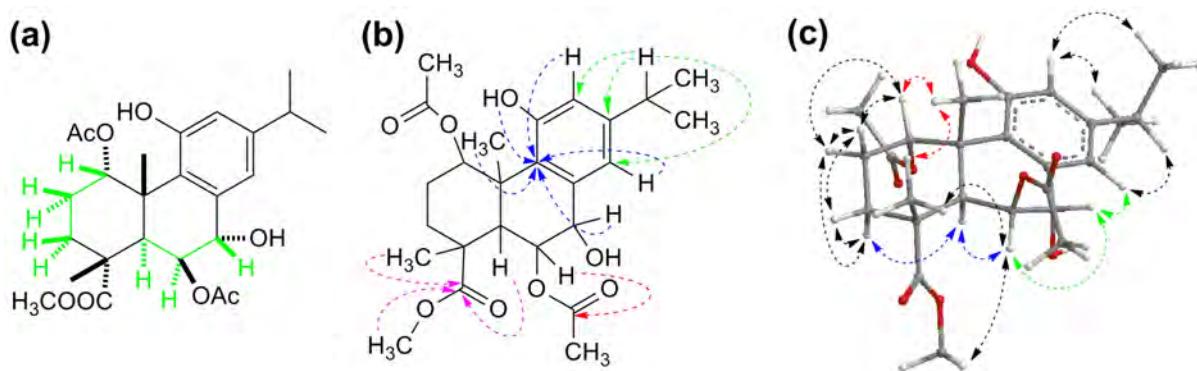


**SLIKA 5.10.** STRUKTURA JEDINJENJA I I LEONUBIASTRINA (185) SA NUMERACIJOM C-ATOMA I PRSTENOVA U ABIETANSKOM SKELETU

Od posebnog značaja pri određivanju strukture jedinjenja I je bio proton H-1, za koji je pretpostavljeno da u susedstvu ima acetoksi grupu, a koji se nalazio na neobično velikom hemijskom pomeranju od  $\delta_H$  6,32. Naime, u do sada izolovanim izopimaranskim diterpenima iz ove biljne vrste (51-54 i 58, slika 3.8) signal analognog protona (H-1 $\beta$ ) iz prstena A nalazio se na znatno nižem hemijskom pomeranju (oko 5 ppm) (Gibbons et al., 2003; Hussein i Rodriguez, 2000), pa je pomeranje našeg H-1 protona bilo komparabilno samo sa abiet-8,11,13-trienskim skeletom koji poseduje fenolnu grupu u položaju C-11, kod koga može doći do izrazitog smanjenja zaštite protona H-1 (*deshielding effect*) usled njegove koplanarnosti sa aromatičnim jegrom i blizine slobodnih elektronskih parova kiseonika fenolne grupe (Mendes et al., 1989). Pretpostavljena struktura je dodatno verifikovana na osnovu analize HMBC spektra, a najznačajnije u potvrdi parcijalnih struktura prstena B i C bile su interakcije: (i) protona H-5 sa karbonilnim ugljenikom jedne od acetil grupa, jer su omogućile smeštanje druge acetil grupe u položaj 6; zatim (ii) metinskog H-15 protona sa ugljenicima aromatičnog jezgra; kao i (iii) protona H-7 $\beta$ , CH<sub>3</sub>-20, protona aromatičnog jezgra i fenolnog protona sa ugljenikom C-9, dok su za potkrepljenje strukture prstena A krucijalne bile interakcije protona iz CH<sub>3</sub>O grupe, kao i H-5 i CH<sub>3</sub>-19 protona, sa karbonilnim C-atomom na  $\delta_C$  178,1 (C-18), jer su ukazivale na to da karboksimetil grupa mora na C-4 (slika 5.11b). Na kraju je relativna stereohemija ovog diterpena određena na osnovu analize NOESY spektra u kome je aksialni proton H-5 $\alpha$  pokazivao korelacione signale sa protonima H-6 $\alpha$  i H-3 $\alpha$ , dok je pseudoekvatorijalni proton H-7 $\beta$  proton interagovao sa aromatičnim protonom H-14 i, takoče, pseudoekvatorijalnim, protonom H-6 $\alpha$ . Relativna konfiguracija hiralnih centara na prstenu A određena je na osnovu nOe interakcija protona metil grupe CH<sub>3</sub>-19 sa protonom H-1 i sa protonima druge metil grupe u položaju 20 (slika 5.11c). Male vrednosti konstanti kuplovanja između protona H-5 $\beta$  i H-6 $\beta$ , kao i između protona H-6 $\beta$  i H-

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

$7\alpha$ , u saglasnosti su sa torzionim uglovima ( $73,5^\circ$  i  $78,2^\circ$ ,  $J = 0,5$  i  $0,1$  Hz izračunatih na osnovu Karplusove jednačine), vidljivih na trodimenzionalnom modelu prikazanom na slici 5.11c optimizovanim da odgovara globalnom energetskom minimumu pomoću MM2 (*molecular mechanics force-field*) metode (inkorporirane u *ChemBio3D Ultra 12.0* softverski paket).



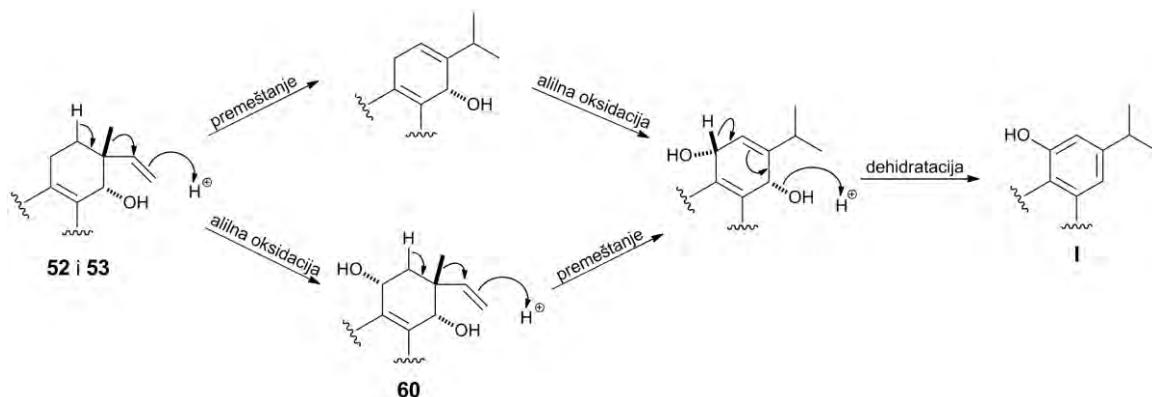
**SLIKA 5.11.** SPINSKI SISTEMI VIDLJIVI U  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY SPEKTRU JEDINJENJA **I** (a), KAO I NAJBITNIJE KORELACIJE UOČENE U NJEGOVIM HMBC (b) I NOESY (c) SPEKTRIMA

Jedinjenje **I** je prvi diterpen abietanskog skeleta koji je ikada načen u rodu *Lycopus*, pa mu mi predlažemo trivijalno ime euroabienol. Prethodno pomenuti diterpen leonubiastrin (**185**), izolovan iz biljne vrste *Leonurus marrubiastrum* (familija Lamiaceae, podfamilija Lamioideae) (Malakov et al., 1998), koji je strukturno najsličniji euroabienolu, epimeran je (hiralni centar C-4) sa euroabienolom (slika 5.10). Ovo je veoma interesantno sa biogenetičke tačke gledišta jer ukazuje na to da postoji različit set enzima (ili samo jedan enzim) kod ovih dveju biljnih vrsta, što predstavlja još jedan dokaz za svrstavanje ovih vrsta u dve različite podfamilije (Lamioideae i Nepetoideae). Zajedničko za ova dva metabolita je i da poseduju neuobičajenu monohidroksilaciju u prstenu C, umesto znatno uobičajenije 11,12-dioksigenacije za abietanske diterpene. Međutim, neophodno je naglasiti i sličnosti euroabienola, pre svega u oksigenacionom obrascu na prstenu A, a donekle i na prstenu B, sa isopimaranskim diterpenima (**49-60**, slika 3.8) prethodno izolovanim iz nadzemnog dela biljne vrste *L. europaeus*. Na slici 5.12 je prikazan biosintetski put kojim bi euroabienol mogao da nastane iz nekih od diterpena isopimaranskog skeleta iz biljne vrste *L. europaeus* (Gibbons et al., 2003; Hussein i Rodriguez, 2000), što ukazuje na blisku povezanost ovih sekundarnih metabolita, prethodno izolovanih iz nadzemnih delova, i ovog najzastupljenijeg

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

u plodovima. GC-MS analizom dihlormetanskog ekstrakta nadzemnog dela ove biljne vrste načeno je da se euroabienol nalazi i u ovim biljnim organima, pa je ovaj diterpen ili propušten iz nekog razloga u prethodnim studijama, ili populacija ove biljne vrste iz Niša predstavlja potpuno novi hemotip. Ne bi trebalo zanemariti i neke druge faktore koji bi mogli da dovedu do promene profila sekundarnih metabolita biljne vrste *L. europaeus*, poput vremena branja, postojanja neke biljne infekcije, napad insekata itd.



SLIKA 5.12. MOGUĆA BIOSINTETSKA VEZA EUROABIENOLA I PRETHODNO IZOLOVANIH DITERPENA IZOPIMARANSKOG SKELETA 52, 53 I 60 IZ *L. EUROPAEUS*

### 5.1.2.5. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EUROABIENOLA

Fenolni diterpeni su široko rasprostranjeni prirodni proizvodi u biljnom carstvu koji mogu da poseduju širok spektar bioloških aktivnosti, poput antioksidantne (Haraguchi et al., 1995; Kabouche et al., 2007; Kolak et al., 2009; Richheimer et al., 1996) antimikrobne (Aladesanmi i Odediran, 2000; Kužma et al., 2007; Sato et al., 2008; Smith et al., 2007; Yang et al., 2001), citotoksične (Khan et al., 2009; Różalski et al., 2006; Topcu et al., 2008), antikancer (Huang et al., 2005) i anti-HIV aktivnosti (Sun et al., 2003). Imajući ovo u vidu, ispitana je *in vitro* antimikrobna aktivnost euroabienola, a sve u cilju određivanja njegove potencijalne biološke funkcije. Euroabienol (**I**) je testiran na petnaest sojeva bakterija i šest sojeva fudgalnih mikroorganizama pomoću mikrodilucione metode. Rezultati testiranja su prikazani u tabeli 5.7. i na osnovu njih se može reći da ovaj fenolni diterpen abietanskog skeleta pokazuje osrednju antimikrobnu aktivnost u poređenju sa standarnim antibiotikom i antimikotikom (Tetraciklinom i Nistatinom), i to bez ikakvog selektivnog dejstva na određeni soj mikroorganizma. Kod bakterija, euroabienol je pokazao inhibitorno dejstvo u intervalu koncentracija od 0,022 do 0,716 mg/ml, dok su kod gljivica MIC vrednosti bile nešto više,

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

između 0,089 i 1,433 mg/ml. Najveća inhibicija rasta je zabeležena u slučaju Gram-pozitivnog soja *Staphylococcus aureus* (kako izolata, tako i standardnog soja ATCC 6538), dok je baktericidno dejstvo bilo najizraženije (MBC = 0,179 mg/ml) kod još jednog Gram-pozitivnog soja, izolata iz hrane vrste *Sarcina lutea*. Najrezistentniji soj je bio izolat *Escherichia coli* za koji su utvrđene najveće MIC i MBC vrednosti (0,716 mg/ml i 5,735 mg/ml). Dejstvo euroabienola je bilo nešto izraženije prema Gram-pozitivnim u odnosu na Gram-negativne sojeve, a ova povećana rezistentnost Gram-negativnih bakterija može biti posledica prisustva određenih lipopolisaharida u njihovom ćelijskom zidu (Smith-Palmer et al., 1998). Euroabienol, takođe, je pokazao i širok spektar dejstva na testirane fungalne sojeve, od toga da najveća testirana koncentracija (5,735 mg/ml) uopšte nije imala uticaja na rast plesni *Acremonium chrysogenum* do fungicidnog dejstva koje je uporedivo sa standardnim antimikotikom koji je korišćen kao pozitivna kontrola. Najosetljiviji sojevi su bili gljivica *Saccharomyces cerevisiae* (MIC = MFC = 0,089 mg/ml), što je donekle i neočekivano imajući u vidu da je ovaj soj ujedno i najrezistentniji prema Nistantinu, i plesan *Aspergillus fumigatus* (MIC = 0,089 mg/ml; MFC = 0,358 mg/ml).

**TABELA 5.7.** MINIMALNE INHIBITORNE (MIC) I MINIMALNE BAKTERICIDNE/FUNGICIDNE KONCENTRACIJE (MBC/MFC) EUROABIENOLA (I)

MIKROORGANIZMI		MIC (mg/ml)	MBC/MFC (mg/ml)	TETRACIKLIN (µg/ml)	NISTATIN (µg/ml)
<b>Gram-negativne bakterije</b>					
<i>E. coli</i>	klinički izolat	0,358	0,716	0,195	NT <sup>i</sup>
<i>E. coli</i>	izolat iz hrane	0,716	5,735	1,562	NT
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	0,179	2,867	1,562	NT
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 10031	0,179	1,433	0,390	NT
<i>K. pneumoniae</i>	klinički izolat	0,045	0,716	0,390	NT
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 9027	0,358	2,867	1,562	NT
<i>P. vulgaris</i>	ATCC 8427	0,179	5,735	0,390	NT
<i>S. enterica</i>	ATCC 13076	0,179	1,433	0,195	NT
<b>Gram-pozitivne bakterije</b>					
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633	0,179	2,867	0,195	NT
<i>B. cereus</i>	izolat iz hrane	0,089	0,716	0,195	NT
<i>C. pyogenes</i>	ATCC 19411	0,179	1,433	1,562	NT
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	0,179	5,735	0,098	NT

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

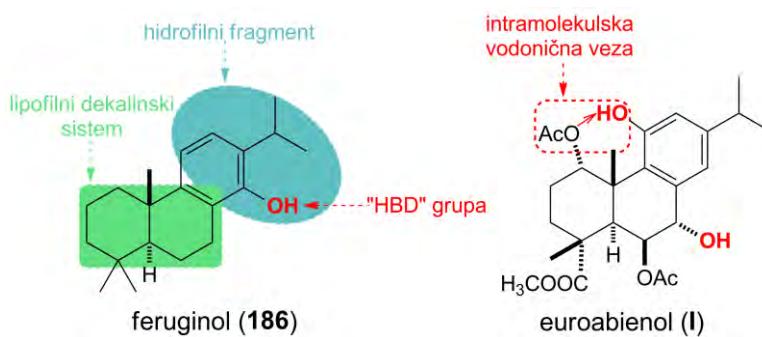
NASTAVAK TABELE 5.7					
<i>S. aureus</i>	ATCC 6538	0,022	2,867	0,098	NT
<i>S. aureus</i>	izolat iz hrane	0,022	0,716	0,098	NT
<i>S. lutea</i>	izolat iz hrane	0,045	0,179	0,390	NT
<b>Gljivice</b>					
<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	0,358	1,433	NT	6,250
<i>S. cerevisiae</i>	ATCC 9763	0,089	0,089	NT	12,50
<b>Plesni</b>					
<i>A. chrysogenum</i>	izolat iz prašine dušeka	>5,735	>5,735	NT	0,195
<i>A. fumigatus</i>	izolat iz prašine dušeka	0,089	0,358	NT	0,195
<i>A. restrictus</i>	izolat iz prašine dušeka	1,433	2,867	NT	0,781
<i>P. chrysogenum</i>	izolat iz prašine dušeka	1,433	2,867	NT	0,390
<sup>i</sup> nije testirano					

U nekoliko prethodnih studija koje su se bavile antimikrobnim dejstvom abietanskih diterpena (strukturno veoma sličnih euroabienolu, ali kod kojih su izopropil i OH grupa na aromatičnom jezgru međusobno *ortho*) načelo je da se njihove MIC vrednosti prema različitim sojevim *S. aureus* kreću u intervalu od 0,008 do 0,150 mg/ml u zavisnosti od strukture ostatka molekula (Kužma et al., 2007; Sato et al., 2008; Yang et al., 2001). Nedavno je ispitana i odnos strukture i aktivnosti većeg broja antimikrobnih diterpena i tom prilikom je utvrđeno da su najaktivniji oni koji u svojoj strukturi sadrže supstituisani dekalinski sistem, sposoban da se umetne u lipofilni region, i hidrofilni fragment sa jednom nukleofilnom, tzv. „HBD” (*Hydrogen Bond Donor*), grupom (poput OH grupe), koja može da nagradi vodoničnu vezu sa odgovarajućim, tzv. „HBA” (*Hydrogen Bond Acceptor*), grupama u ćelijskoj membrani (Urzáa et al., 2008; slika 5.13). Pomenute strukturne osobine imaju i euroabienol što pruža još jednu potvrdu ovim rezultatima. Takoče autori ovog istraživanja su našli da prisustvo dve OH grupe u hidrofilnom fragmentu, ili dodatne „HBD” grupe na dekalinskom sistemu, smanjuje aktivnost, i smatra se da je to posledica otežane inkorporacije molekula u membranu usled smanjenje lipofilnosti (do čega može da dolazi i u slučaju euroabienola), dok acetilovanje jedne od njih u mnogome olakšava ovaj proces (Urzáa et al., 2008). Na ovaj način bi se mogla eventualno povećati i aktivnost euroabienola. Na primer, MIC vrednost feruginola (186), abietanskog diterpena srodnog euroabienolu, koji poseduje samo jednu, fenolnu OH grupu u *ortho* položaju u odnosu na izopropil grupu na prstenu C, protiv soja *S. aureus* je svega 8 µg/ml (Evans et al., 1999). Razlika u aktivnosti ova dva

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

abietanska diterpena može da leži u činjenici da kod euroabienola, usled blizine dve hidrofilne grupe ( $C(1)$ -OAc i  $C(11)$ -OH), može doći do intramolekulskih interakcija između njih, koje su kompetitivne sa pomenutim građenjem intermolekulskih vodoničnih veza sa odgovarajućim „HBA” grupama u ćelijskoj membrani, a koje je jedan od esencijalnih faktora koji utiču na aktivnost (slika 5.13). Međutim, neophodna su dalja istraživanja u vezi specifičnog načina delovanja euroabienola da bi se potkrepila ova zapažanja.



SLIKA 5.13. UPOREĐENJE STRUKTURA FERUGINOLA (186) I EUROABIENOLA (I) SA ISTAKNUTIM STRUKTURNIM FRAGMENTIMA ODGOVORNIM ZA ANTIMIKROBNU AKTIVNOST

Široki spektar antimikrobne aktivnosti i visok sadržaj euroabienola (I) u plodovim (oko 1 %, w/w) čine ga odličnim kandidatom za svrstavanje u fitoncide (*phytoncide*), sekundarne metabolite koji predstavljaju prvu liniju odbrane biljaka u slučaju napada patogena. Drugi ovakvi sekundarni metaboliti su, na primer, azofiloni kod nekih sojeva gljiva (Quang et al., 2005) ili *green leaf* derivati kod biljaka (Nakamura i Hatanaka, 2002; Radulović et al., 2007).

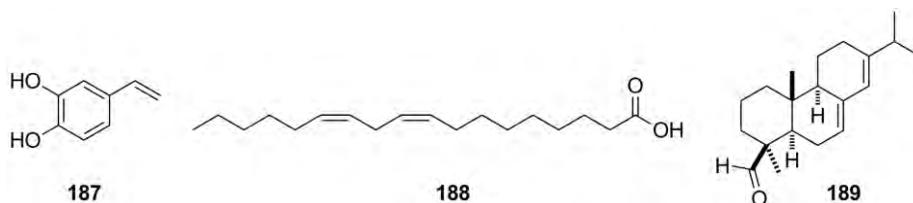
# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

### 5.2. SEKUNDARNI METABOLITI BILJNE VRSTE *L. EXALTATUS* L.F.

#### 5.2.1. HEMIJSKI SASTAV ETARSKIH ULJA BILJNE VRSTE *L. EXALTATUS*

Detaljnom GC-MS i GC analizom etarskih ulja izolovanih iz nadzemnih delova biljne vrste *L. exaltatus*, ubrane na dva različita lokaliteta, u Nemaćkoj (uzorak **E**) i Srbiji (uzorak **G**), identifikovano je 178, odnosno 150 sastojaka, što je, u oba slučaja, predstavljalo preko 95% površina ispod pikova u hromatogramima (tabela 5.8). Hemijski sastav ova dva ulja je bio jako sličan i njime su dominirali terpeni (oko 45%), a sledila su ih jedinjenja izvedena iz metabolizma masnih kiselina, kao i jedinjenja nastala šikimatnim biosintetskim putem (sa po *ca.* 25%). Među terpenima, procentualni sadržaj monoterpena (oko 10%) je bio dosta niži u odnosu na seskviterpene i diterpene (oko 17-18%), iako su, kao klasa jedinjenja, bili najbrojniji u ovim etarskim uljima. Šikimatni metabolit sa C<sub>6</sub>C<sub>2</sub> skeletom - 3,4-dihidroksistiren (**187**) (15,0% - **E** i 11,8% - **G**), (Z,Z)-9,12-oktadekadienska kiselina (**188**) (6,4% - **E** i 8,2% - **G**), diterpen abietanskog skeleta - 4-*epi*-abietal (**189**) (8,2% - **E** i 5,0% - **G**) i monociklični monoterpen - β-felandren (**88**) (6,2% - **E** i 5,0% - **G**) bili su glavni sastojci u oba ulja (slika 5.14).



SLIKA 5.14. NEKI OD GLAVNIH SASTOJAKA ETARSKIH ULJA BILJNE VRSTE *L. EXALTATUS*

Uočljive su značajne razlike u hemijskom sastavu ispitivanih etarskih ulja i sastava prethodno publikovanog za istu biljnu vrstu, gde je identifikovano samo 18 sastojaka koji su činili svega 59,8% ukupnog ulja (tabela 3.3). Izuzev 3-oktanola (**63**), svi ostali identifikovani sastojci u ovom ulju pripadali su monoterpenskoj i seskviterpenskoj frakciji, a najzastupljeniji među njima bili su aciklični monoterpen β-mircen (**91**) (14,5%), zatim biciklični monoterpeni pinanskog skeleta, α-pinjen (**74**) (16,6%) i β-pinjen (**89**) (12,5%), i seskviterpeni eudezmanskog skeleta, α-selinjen (**94**) (15,5%) i selinadien<sup>‡‡</sup> (**97**) (16,4%) (Lawrence, 1989).

<sup>‡‡</sup> Nije određen tačan položaj dvogubih veza u ovom jedinjenju.

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

Skoro svi sastojci koji su identifikovani tokom ove prethodne analizi etarskog ulja biljne vrste *L. exaltatus* (sa izuzetkom  $\gamma$ -murolena (93)) načeni su i našim uzorcima **G** i **E**, međutim većina njih je detektovana samo u tragovima, a sadržaj upravo pomenutih glavnih sastojaka nije prelazio 3,5%. Takoče od glavnih sastojaka ulja **G** i **E**, u ovom prethodnom istraživanju, načen je samo  $\beta$ -felandren (88), ali mu je sadržaj bio znatno niži, svega 0,6%. Navedene razlike u sastavu etarskih ulja ove biljne vrste možda se mogu objasniti uticajem ekološko-geografskih faktora. Naime, *L. exaltatus* je vrsta koja je prevashodno rasprostranjena u istočnoj i centralnoj Evropi, kao i nekim oblastima u Aziji, poput Sibira, himalajskih predela u Indiji i nekih regionalnih u Turskoj (Henderson, 1962), a etarsko ulje, čiji je sastav prethodno publikovan, dobijeno je iz biljnih jedinki koje su uzgajane iz semena (dobijenih iz botaničke baštine u Varšavi) pod eksperimentalnim uslovima u botaničkoj bašti u južnom delu države Ontario (Kanada), dok su uzorci ulja **G** i **E** dobijeni iz samoniklih populacija ove biljne vrste koje su rasle u Nemačkoj i Srbiji.

**TABELA 5.8.** HEMIJSKI SASTAV ETARSKIH ULJA BILJNE VRSTE *L. EXALTATUS*

RI <sup>i</sup>	JEDINJENJE	UZORAK E <sup>ii</sup> % <sup>iv</sup>	UZORAK G <sup>iii</sup> % <sup>vi</sup>	KLASA	METODA IDENTIFIKACIJE
736	Butil-formijat	tr <sup>v</sup>	- <sup>vi</sup>	O	RI, MS, CoI <sup>vii</sup>
737	3-Metil-1-butanol	tr	tr	O	RI, MS, CoI
741	2-Metil-1-butanol	tr	tr	O	RI, MS, CoI
771	(Z)-2-Penten-1-ol	tr	-	MMK/GL	RI, MS
778	3-Metil-2-buten-1-ol	tr	tr	O	RI, MS, CoI
785	2,3-Butandiol	tr	-	O	RI, MS
826	3-Metilbutanska kiselina	tr	-	O	RI, MS, CoI
834	2-Metilbutanska kiselina	tr	-	O	RI, MS, CoI
836	4-Metil-1-pentanol	tr	-	MMK	RI, MS
851	(E)-3-Heksen-1-ol	tr	0,4	MMK/GL	RI, MS, CoI
857	(Z)-3-Heksen-1-ol	0,5	0,1	MMK/GL	RI, MS, CoI
866	(Z)-2-Heksen-1-ol	0,1	tr	MMK/GL	RI, MS, CoI
869	1-Heksanol	tr	tr	MMK/GL	RI, MS, CoI
914	3-(Metiltio)propanal	tr	-	O	RI, MS
933	$\alpha$ -Tujen	tr	0,1	M	RI, MS, CoI
943	$\alpha$ -Pinen (74)	1,0	0,4	M	RI, MS, CoI
961	Kamfen (75)	tr	tr	M	RI, MS, CoI
968	Heksanska kiselina	tr	tr	MMK/GL	RI, MS, CoI
971	Benzaldehid	tr	tr	SM	RI, MS, CoI

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

NASTAVAK TABELE 5.8					
978	Fenol	tr	-	SM	RI, MS, Col
982	Sabinen (90)	0,3	0,2	M	RI, MS
984	1-Okten-3-ol (64)	0,5	0,4	MMK/GL	RI, MS
991	$\beta$ -Pinen (89)	0,8	1,0	M	RI, MS, Col
996	$\beta$ -Mircen (91)	1,1	2,0	M	RI, MS
1002	3-Oktanol (63)	tr	tr	MMK/GL	RI, MS
1010	(E)-2-Heksenska kiselina	tr	tr	MMK/GL	RI, MS, Col
1013	p-Menta-1(7),8-dien	tr	-	M	RI, MS
1016	$\alpha$ -Felandren	tr	tr	M	RI, MS
1024	$\alpha$ -Terpinen	tr	tr	M	RI, MS
1031	p-Cimen (73)	tr	tr	M	RI, MS, Col
1035	Limonen (70)	tr	tr	M	RI, MS, Col
1038	Benzil alkohol	tr	tr	SM	RI, MS, Col
1038	$\beta$ -Felandren (88)	6,2	5,0	M	RI, MS
1040	1,8-Sineol	tr	tr	M	RI, MS, Col
1048	(E)- $\beta$ -Ocimen	tr	-	M	RI, MS
1048	Fenilacetaldehid	0,3	0,8	SM	RI, MS, Col
1062	$\gamma$ -Terpinen (71)	tr	tr	M	RI, MS
1063	1-Fenil-1-etanol	tr	tr	SM	RI, MS, Col
1074	cis-Sabinen-hidrat	tr	-	M	RI, MS
1089	$\alpha$ -Terpinolen (72)	tr	tr	M	RI, MS
1100	Linalool (65)	tr	tr	M	RI, MS, Col
1105	trans-Sabinen-hidrat	tr	-	M	RI, MS
1114	2-Feniletanol	tr	tr	SM	RI, MS, Col
1127	cis-p-Menta-2-en-1-ol	tr	tr	M	RI, MS
1129	$\alpha$ -Kamfolenal	tr	-	M	RI, MS
1144	trans-p-Menta-2-en-1-ol	tr	tr	M	RI, MS
1145	trans-Pinokarveol	tr	tr	M	RI, MS
1148	cis-Verbenol	tr	-	M	RI, MS
1154	<i>o</i> -Metilacetofenon	tr	tr	SM	RI, MS
1159	Benzoeva kiselina	0,3	0,1	SM	RI, MS, Col
1162	Lavandulol	tr	tr	M	RI, MS
1165	Pinocarvon	tr	tr	M	RI, MS
1170	Etil-benzoat	tr	tr	SM	RI, MS, Col
1175	Borneol	tr	tr	M	RI, MS, Col
1180	Hidroksimaltol	tr	-	O	RI, MS
1183	Terpinen-4-ol	tr	tr	M	RI, MS
1189	Kripton	tr	-	M	RI, MS
1193	Metil-salicilat <sup>viii</sup>	tr	tr	SM	RI, MS, Col

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

**NASTAVAK TABELE 5.8**

1197	$\alpha$ -Terpineol	0,5	1,1	M	RI, MS
1198	Mirtenol	tr	tr	M	RI, MS
1210	<i>trans</i> -Piperitol	tr	tr	M	RI, MS
1220	<i>trans</i> -Karveol	tr	tr	M	RI, MS
1223	<i>p</i> -Kumenol	tr	tr	M	RI, MS
1229	<i>egzo</i> -2-Hidroksi-1,8-sineol	tr	tr	M	RI, MS
1241	Pulegon	tr	-	M	RI, MS
1245	Kumin aldehid	tr	tr	M	RI, MS
1257	<i>p</i> -Anizaldehid	tr	tr	SM	RI, MS, CoI
1264	<i>trans</i> -Šizool	tr	-	M	RI, MS
1278	<i>trans</i> -Askaridol glikol	tr	tr	M	RI, MS
1283	Felandral	tr	tr	M	RI, MS
1285	<i>p</i> -Anizil alkohol	0,2	0,5	M	RI, MS
1288	Bornil-acetat (77)	tr	tr	M	RI, MS
1291	$\alpha$ -Terpinen-7-al	tr	tr	M	RI, MS
1292	Salicilna kiselina <sup>viii</sup>	tr	tr	SM	RI, MS, CoI
1294	<i>p</i> -Cimen-7-ol	tr	tr	M	RI, MS
1300	Tridekan	tr	-	MMK	RI, MS, CoI
1305	Teaspiran A	tr	-	O	RI, MS
1312	<i>p</i> -Vinilvajakol <sup>viii</sup>	tr	tr	SM	RI, MS
1326	4-Hidroksikripton	tr	-	M	RI, MS
1341	3-Okso- <i>p</i> -menta-1-en-7-al	tr	tr	M	RI, MS
1346	3-Hidroksi-4-fenil-2-butanon	tr	tr	O	RI, MS
1351	$\alpha$ -Kubeben	tr	tr	S	RI, MS
1353	Eugenol <sup>viii</sup>	1,2	2,0	SM	RI, MS, CoI
1358	4-Hidroksibenzaldehid <sup>viii</sup>	tr	tr	SM	RI, MS, CoI
1361	(Z)-8-Hidrosilinalool	tr	tr	M	RI, MS
1373	$\alpha$ -Ilangen	tr	-	S	RI, MS
1379	$\alpha$ -Kopaen	tr	tr	S	RI, MS
1388	$\beta$ -Burbonen	tr	tr	S	RI, MS
1392	$\beta$ -Elemen (92)	0,7	0,9	S	RI, MS
1393	(E)-Jasmon	tr	-	O	RI, MS
1394	Vanilin <sup>viii</sup>	tr	tr	SM	RI, MS, CoI
1397	7,8-Dihidro- $\alpha$ -jonon	tr	-	O	RI, MS
1420	Etil- <i>p</i> -anizat <sup>viii</sup>	tr	tr	SM	RI, MS
1425	(E)- $\beta$ -Kariofilen (82)	2,4	3,2	S	RI, MS, CoI
1438	3,4-Dihidroksistiren (syn. <sup>ix</sup> 4-vinilatehol) <sup>viii</sup> (187)	15,0	11,8	SM	MS
1453	(Z)- $\beta$ -Farnezen (78)	1,0	0,6	S	RI, MS

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

**NASTAVAK TABELE 5.8**

<b>1460</b>	$\alpha$ -Humulen (81)	0,3	0,5	S	RI, MS
<b>1475</b>	Eudezma-2,4,11-trien	tr	tr	S	RI, MS
<b>1478</b>	$\delta$ -Selenen	tr	tr	S	RI, MS
<b>1486</b>	Germakren D (79)	1,6	1,0	S	RI, MS
<b>1488</b>	Selina-4,11-dien (96)	tr	tr	S	RI, MS
<b>1493</b>	$\beta$ -Selenen (95)	2,3	1,5	S	RI, MS
<b>1501</b>	$\alpha$ -Selenen (94)	3,2	3,5	S	RI, MS
<b>1505</b>	$\alpha$ -Bulnezen	0,9	0,2	S	RI, MS
<b>1511</b>	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina <sup>viii</sup> (1)	tr	tr	SM	RI, MS
<b>1512</b>	Germakren A	0,4	tr	S	RI, MS
<b>1513</b>	Kuparen	tr	-	S	RI, MS
<b>1517</b>	$\gamma$ -Kadinen	tr	tr	S	RI, MS
<b>1522</b>	Valencen	1,0	2,1	S	RI, MS
<b>1524</b>	7- <i>epi</i> - $\alpha$ -Selenen	0,3	0,5	S	RI, MS
<b>1526</b>	Metil-gentizat <sup>viii</sup>	tr	tr	SM	RI, MS
<b>1540</b>	Homovanilil alkohol <sup>viii</sup>	0,3	0,4	SM	RI, MS
<b>1558</b>	Vanilinska kiselina <sup>viii</sup> (4)	0,9	1,1	SM	RI, MS
<b>1581</b>	Germakren D-4-ol	tr	tr	S	RI, MS
<b>1582</b>	Protokatehualdehid <sup>viii</sup> (6)	0,4	0,3	SM	RI, MS, CoI
<b>1587</b>	Kariofilen-oksid (83)	1,3	2,0	S	RI, MS, CoI
<b>1596</b>	2-(3,4-Dihidroksifenil)acetaldehid <sup>viii</sup>	tr	tr	SM	MS
<b>1614</b>	Humulen-epoksid II	tr	tr	S	RI, MS
<b>1618</b>	Torilenol	0,1	tr	S	RI, MS
<b>1627</b>	Murola-4,10(14)-dien-1 $\beta$ -ol	tr	tr	S	RI, MS
<b>1639</b>	3-Okso- $\alpha$ -jonol	0,3	-	O	RI, MS
<b>1649</b>	Siringaldehid <sup>viii</sup>	tr	tr	SM	RI, MS
<b>1661</b>	Pogostol	0,9	0,8	S	RI, MS
<b>1690</b>	Murola-4,10(14)-dien-8 $\beta$ -ol	tr	tr	S	RI, MS
<b>1694</b>	Eudezma-4(15),7-dien-1 $\beta$ -ol	tr	tr	S	RI, MS
<b>1699</b>	(Indol-3-il)acetaldehid	tr	tr	O	RI, MS
<b>1718</b>	(Z)- $\alpha$ -Atlanton	tr	tr	S	RI, MS
<b>1733</b>	(E)-Koniferil alkohol <sup>viii</sup>	0,4	0,9	SM	RI, MS
<b>1737</b>	Oplopanon	tr	tr	S	RI, MS
<b>1766</b>	Etil-homoprotokatehuat <sup>viii</sup>	tr	tr	SM	MS
<b>1768</b>	Benzil-benzoat	tr	tr	SM	RI, MS, CoI
<b>1793</b>	<i>trans-p</i> -Kumarinska kiselina <sup>viii</sup> (8)	1,2	0,5	SM	RI, MS, CoI
<b>1822</b>	Protokatehukarboksilna kiselina <sup>viii</sup> (3)	tr	tr	SM	MS
<b>1824</b>	<i>trans</i> -Etil- <i>p</i> -kumarat <sup>viii</sup>	tr	tr	SM	RI, MS, CoI
<b>1836</b>	Neofitadien Izomer I <sup>x</sup>	0,3	0,2	D	RI, MS

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

**NASTAVAK TABELE 5.8**

<b>1841</b>	Heksahidrofarnezilaceton	tr	tr	O	RI, MS
<b>1862</b>	Neofitadien Izomer II <sup>x</sup>	tr	tr	D	RI, MS
<b>1868</b>	<i>trans</i> -Ferulinska kiselina <sup>viii</sup> ( <b>11</b> )	2,6	1,4	SM	RI, MS
<b>1879</b>	Neofitadien Izomer IIIf <sup>x</sup>	tr	tr	D	RI, MS
<b>1904</b>	Rimuen	tr	-	D	RI, MS
<b>1909</b>	(5E,9E)-Farnezilaceton	tr	tr	O	RI, MS
<b>1913</b>	<i>trans</i> -Etil-ferulat <sup>viii</sup>	0,3	0,5	SM	RI, MS
<b>1925</b>	<i>trans</i> -Sinapinska kiselina <sup>viii</sup> ( <b>13</b> )	0,4	0,5	SM	MS
<b>1961</b>	Heksadekanska kiselina	2,4	0,6	MMK	RI, MS, CoI
<b>1992</b>	Etil-heksadekanoat	tr	0,1	MMK	RI, MS, CoI
<b>2024</b>	Abieta-8,12-dien	tr	tr	D	RI, MS
<b>2057</b>	Abietatrien	0,4	0,6	D	RI, MS
<b>2059</b>	Heptadekanska kiselina	tr	-	MMK	RI, MS
<b>2060</b>	<i>trans</i> -Etil-kafeat <sup>viii</sup> ( <b>10</b> )	1,6	2,5	SM	RI, MS
<b>2089</b>	Abieta-7,13-dien	1,0	1,7	D	RI, MS
<b>2096</b>	Metil-(Z,Z)-9,12-oktadekadienoat	tr	0,2	MMK	RI, MS, CoI
<b>2108</b>	(E)-Fitol	2,3	2	D	RI, MS
<b>2140</b>	(Z,Z)-9,12-Oktadekanska kiselina	6,4	8,2	MMK	RI, MS, CoI
<b>2140</b>	(Z)-9-Oktadecenska kiselina	tr	tr	D	RI, MS, CoI
<b>2151</b>	Abieta-8(14),13(15)-dien	0,3	1,2	D	RI, MS
<b>2158</b>	Etil-(Z,Z)-9,12-oktadekadienoat	0,3	0,9	MMK	RI, MS, CoI
<b>2162</b>	Oktadekanska kiselina	tr	tr	MMK	RI, MS, CoI
<b>2164</b>	Etil-(Z,Z,Z)-9,12,15-oktadekatrienoat	tr	tr	MMK	RI, MS, CoI
<b>2227</b>	Sandarakopimarinoat	0,3	0,2	D	RI, MS
<b>2267</b>	4- <i>epi</i> -Abietal ( <b>189</b> )	8,2	5,0	D	RI, MS
<b>2279</b>	Abietal	tr	0,3	D	RI, MS
<b>2282</b>	(13E)-Labda-7,13-dien-15-ol	2,4	4,1	D	RI, MS
<b>2292</b>	6-Tridecil-5,6-dihidro-2 <i>H</i> -piran-2-on ( <i>syn. Massoia</i> oktadekalakton) ( <b>190</b> )	0,2	0,3	MMK	RI, MS
<b>2313</b>	4- <i>epi</i> -Abietol	2,2	1,5	D	RI, MS
<b>2399</b>	Abietol	0,9	0,6	D	RI, MS
<b>2492</b>	1-Dokozanol	tr	tr	MMK	RI, MS
<b>2500</b>	Pentakozan	tr	tr	MMK	RI, MS, CoI
<b>2506</b>	6-Pentadecil-5,6-dihidro-2 <i>H</i> -piran-2-on ( <i>syn. Massoia</i> eikozalakton) ( <b>191</b> )	2,8	2,6	MMK	RI, MS
<b>2574</b>	3-Metilpentakozan	tr	tr	MMK	RI, MS
<b>2600</b>	Heksakozan	tr	tr	MMK	RI, MS, CoI
<b>2700</b>	Heptakozan	2,0	2,2	MMK	RI, MS, CoI

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

**NASTAVAK TABELE 5.8**

<b>2719</b>	6-Heptadecil-5,6-dihidro-2 <i>H</i> -piran-2-on ( <i>syn.</i> <i>Massoia</i> dokozalakton) ( <b>192</b> )	1,5	1,2	MMK	RI, MS
<b>2773</b>	3-Metilheptakozan	0,9	0,8	MMK	RI, MS
<b>2800</b>	Oktakozan	1,8	3,5	MMK	RI, MS, CoI
<b>2810</b>	(sve <i>E</i> )-Skvalen	0,5	0,6	O	RI, MS, CoI
<b>2862</b>	2-Metiloktakozan	tr	tr	MMK	RI, MS
<b>2900</b>	Nonakozan	4,9	6,0	MMK	RI, MS, CoI
<b>2973</b>	3-Metilnonakozan	0,3	0,4	MMK	RI, MS
UKUPNO IDENTIFIKOVANO		95,1 (178) <sup>x</sup>	95,8 (150)		
TERPENI		44,8 (93)	44,6 (80)		
MONOTERPENI (M)		10,1 (47)	10,2 (37)		
SESKVITERPENI (S)		16,4 (30)	16,8 (28)		
DITERPENI (D)		18,3 (16)	17,4 (15)		
JEDINJENJA IZVEDENA IZ METABOLIZMA MASNIH KISELINA (MMK)		24,6 (31)	27,5 (28)		
<i>GREEN LEAF</i> DERIVATI (GL)		1,1 (8)	0,9 (7)		
JEDINJENJA IZVEDENA IZ ŠIKIMATNOG PUTA (SM)		24,9 (35)	22,8 (34)		
OSTALO (O)		0,8 (19)	0,6 (8)		

<sup>i</sup> jedinjenja su navedena po redosledu eluiranja sa DB-1 kolone (RI eksperimentalno određeni retencioni indeksi na pomenutoj koloni koinjekcijom homologe serije *n*-alkana C<sub>7</sub>-C<sub>40</sub>);

<sup>ii</sup> uzorak etarskog ulja dobijen hidrodestilacijom biljnog materijala sa lokaliteta u blizini Drezdena;

<sup>iii</sup> uzorak etarskog ulja dobijen hidrodestilacijom biljnog materijala sa lokaliteta u blizini Niša;

<sup>iv</sup> srednja vrednost tri ponavljanja;

<sup>v</sup> tr - trag (<0,05%);

<sup>vi</sup> -/ nije detektovano;

<sup>vii</sup> RI - upoređivanjem eksperimentalno dobijenih RI vrednosti sa literaturnim podacima; MS - upoređivanjem masenih spektara sa spektrima iz biblioteka; CoI - GC koinjektiranjem standardnih supstanci;

<sup>viii</sup> (poli)fenolna jedinjenja

<sup>ix</sup> *syn.* - sinonim;

<sup>x</sup> nije utvrđen tačan stereoizomer;

<sup>x1</sup> u zagradi je dat broj identifikovanih sastojaka koji pripadaju određenoj klasi.

Iako se glavni sastojak naših etarskih ulja, 3,4-dihidroksistiren (**187**), može veoma retko detektovati kao biljni sekundarni metabolit, ovo jedinjenje je našlo široku primenu u industriji gde se koristi kao aditiv u proizvodnji parfema, hrane i pića, a nalazi se na FEMA GRAS<sup>§§</sup> listi aditiva čija se upotreba ne smatra štetnom po čoveka, a predstavlja i polazno jedinjenje za dobijanje nekih biološki aktivnih molekula, smola, kao i lepkova, premaza i elektromaterijala (Bernini et al., 2007). Pored toga, sam 3,4-dihidroksistiren (**187**) ispoljava

<sup>§§</sup> FEMA GRAS - *Flavor and Extract Manufacturer's Association; Generally Regarded as Safe*

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

neka interesantna biološka svojstva; na primer deluje kao inhibitor pteridin-zavisne monooksigenaze (Koizumi et al., 1984), zatim, pokazuje jaku antioksidantnu aktivnost (Terpinc et al., 2011), a i inhibira rast nekih vrsta patogenih Gram-negativnih bakterija iz hrane (Licandro-Seraut et al., 2013). Ovo jedinjenje se u nešto većoj količini može naći u pršenju kafi jer nastaje tokom procesa njene termičke obrade kao degradacioni proizvod hlorogenske (14) i/ili kafene kiseline (9) (Hertz-Schünemann et al., 2013), a kako je hlorogenska kiselina (14) jedno od glavnih polifenolnih jedinjenja u listu duvana, 3,4-dihidroksistiren (187) je načen i u duvanskom dimu (Kaur et al., 2009). Takoče pokazano je da je glavni proizvod katabolizma hlorogenske (14) i kafene kiseline (9) kod nekih bakterija koje pripadaju rodu *Lactobacillus* upravo 3,4-dihidroksistiren (Bel-Rhlid et al., 2013; Sánchez-Maldonado et al., 2011).

Još 3 jedinjenja koja pripadaju seriji 6-alkil-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona, tzv. *massoia* oktadeka- (190), eikoza- (191), i dokozalakton (192), zavrečuju pomena. Naime, homolog sa najkraćim bočnim alkil nizom (190), 6-tridecil-5,6-dihidro-2H-piran-2-on, je do sada samo jednom prilikom okarakterisan kao biološki aktivni biljni sekundarni metabolit (Al-Mekhlafi et al., 2013), kada je izolovan iz metanolnog ekstrakta kore stabla biljne vrste *Horsfieldia superba* (Hk. f. & Th.) Warb (Myristicaceae)<sup>\*\*\*</sup>, a zatim je utvrđeno i da pokazuje osrednju citotoksičnu aktivnost protiv ćelija raka prostate, debelog creva i dojke čoveka, dok preostala dva laktona, 191 i 192, predstavljaju potpuno nove prirodne proizvode. Ovaj tip jedinjenja, koja sadrži α,β-nezasićeni δ-laktonski prsten sa alkil lancem (čija dužina može varirati od 5 do 17 C-atoma) u položaju 6, veoma retko ulaze u sastav etarskih ulja i najčešće su zastupljena u malom procentu<sup>†††</sup> (Rali et al., 2007). Međutim, α,β-nezasićeni δ-laktonski prsten je strukturni fragment koji je prisutan u većem broju biološki aktivnih prirodnih proizvoda, poput *massoia* laktona (193)<sup>†††</sup>, goniotalamina<sup>§§§</sup>, argentilaktona<sup>\*\*\*\*</sup> i pasifloricina

\*\*\* *Horsfieldia superba* (Hk. f. & Th.) Warb. je mala drvenasta biljna vrsta koja je ugrožena i endemična na teritoriji Indonezije, Malezije i Singapura (Jossang et al., 1991).

††† Jedan od retkih izuzetaka je etarsko ulje dobijeno iz listova biljne vrste *Cryptocarya cunninghamii* Meissner (Lauraceae) čiji je glavni sastojak 6-nonil-5,6-dihidro-2H-piran-2-on (Brophy et al., 1998).

††† (–)-*Massoia* lakton ((–)-*massoialactone*) je prvi put izolovan iz kore biljne vrste *Cryptocarya massoia*. Ovo jedinjenje izaziva iritaciju kože, dovodi do sistolnog zastoja srčanog mišića kod tabe, a pokazuje i jako antimikrobitno dejstvo prema sojevima *S. aureus*, *B. subtilis* i *E. coli* (Barros et al., 2014).

§§§ Goniotalamin (*goniothalamin*) je načen kod više vrsta koja pripadaju rodu *Goniothalamus*. Osim što pokazuje jako dobro citotoksično i antiproliferativno dejstvo prema više linija ćelija raka, ovo jedinjenje ispoljava i insekticidna, larvicidna, fungicidna, baktericidna i tripanocidna svojstva (Barros et al., 2014).

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

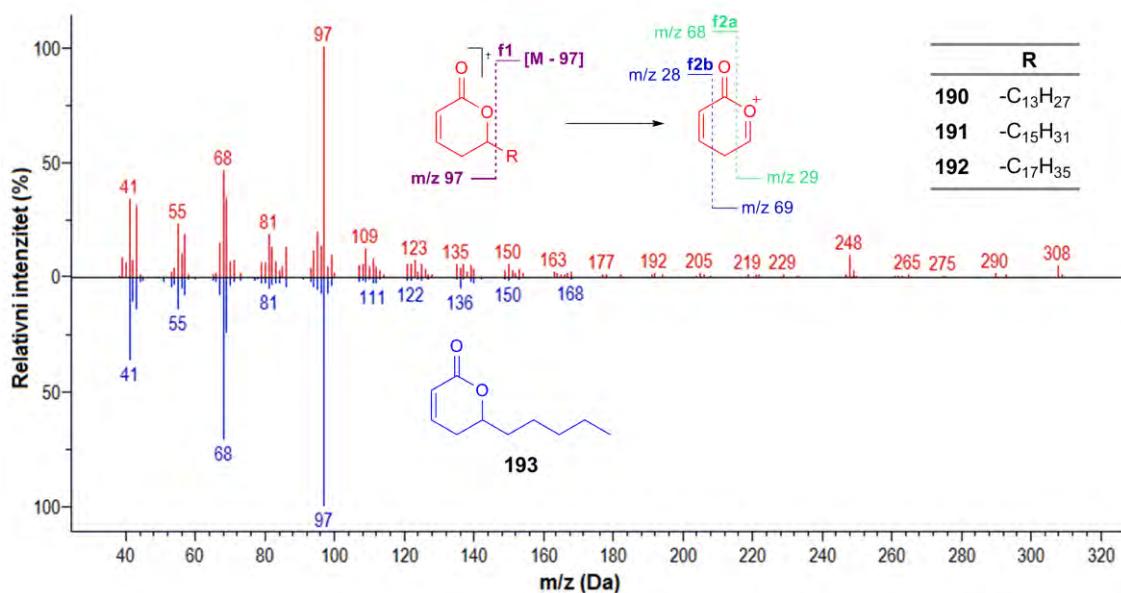
A-C<sup>††††</sup>, a smatra se da bi upravo on mogao da ima značajnu ulogu, kao Majklov akceptor, u mehanizmu delovanja ovih jedinjenja. U istraživanjima koja su se bavila biološkom aktivnošću analoga gore pomenutih prirodnih proizvoda, prevashodno *Massoia* laktona i pasifloricina A, načeno je da je sintetski 6-pentadecil-5,6-dihidro-2H-piran-2-on (**191**) izuzetno aktivan prema parazitskim protozoama *Leishmania panamensis* i *Plasmodium falciparum* i da je, osim laktonskog prstena, za aktivnost izuzetno bitno i postojanje dugog alifatičnog lanca, čije prisustvo ujedno dovodi i do smanjenja citotoksičnosti (Cardona et al., 2006; Castaño et al., 2009).

Struktura ovih laktona je ustanovljena porečenjem njihovih masenih spektara sa masenim spektrima *massoia* dekalaktona (**193**) i *massoia* dodekalaktona koji su dostupni u komercijalnim bibliotekama masenih spektara (Adams 2007; Hochmut et al., 2003). Naime, 6-alkil supstituisani 5,6-dihidro-2H-piran-2-oni imaju veoma karakteristične masene spektre u kojima se osnovni jon nalazi na *m/z* 97 i nastaje  $\alpha$ -fragmentacijom tj. raskidanjem egzociklične C-C veze u molekulskom radikal katjonu (fragmentacija f1, slika 5.15). Osnovni jon zatim podleže retro-Dils-Alderovoј fragmentaciji dajući druga dva karakteristična jona na *m/z* 68 (fragmentacija f2a) i 69 (fragmentacija f2b; Radulović i Blagojević, 2012). Maseni spektri laktona **190-192** detektovanih u etarskom ulju vrste *L. exaltatus* pokazuju molekulske jone na *m/z* 280, 308 i 336, što po masi odgovara 5,6-dihidro-2H-piran-2-onima koji u položaju 6 imaju vezane tridecil, pentadecil i heptadecil alkil nizove. Prethodno je utvrđeno da kod *massoia* laktona produženje alkil niza za jednu -CH<sub>2</sub>- grupu dovodi do porasta retencionog indeksa za *ca.* 107 jedinica (Radulović i Blagojević, 2012), a analogan trend je vidljiv i kod vrednosti retencionih indeksa naših laktona (RI = 2292, 2506 i 2719). Takoče, eventualno prisustvo račve u alkil nizu se moglo isključiti usled nepostojanja jona u masenom spektru koji bi trebalo da nastanu raskidanjem veze u neposrednom susedstvu date račve (Stedman 1968).

\*\*\*\* Argentilakton (*argentinolactone*) je prvi put izolovan iz rizoma biljne vrste *Aristolochia argentina* Gris., a ujedno je i glavni sastojak etarskog ulja *Annona haematantha* Miq., vrste lijane koja je endemična za Francusku Gvineju. Ovo jedinjenje pokazuje kako *in vitro*, tako i *in vivo*, tripanocidno dejstvo protiv različitih *Leishmania* spp., parazita koji dovode do smrtonosne infekcije poznate pod nazivom lišmanijaza, ili Kala-azar (Waechter et al., 1997).

††† Pasifloricini A-C (*passifloricines* A-C) su poliketidni  $\alpha$ -pironi izolovani iz smole koja oblaže listove biljne vrste *Passiflora foetida* L. var. *hispida* koja nastanjuje tropske predele Južne Amerike. Za pasifloricin A je utvrđeno da pokazuje antiprotozoalnu aktivnost (Murga et al., 2004).

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*



**SLIKA 5.15.** POREĐENJE MASENIH SPEKTARA *MASOIA* LAKTONA (**193**) (SPEKTAR PLAVE BOJE) I *MASOIA* EIKOZALAKTONA (**191**) (SPEKTAR CRVENE BOJE) SA NAZNAĆENIM KARAKTERISTIČNIM FRAGMENTACIJAMA ZA 6-ALKIL SUPSTITUISANE 5,6-DIHIDRO-2*H*-PIRAN-2-ONE

### 5.2.2. SEKUNDARNI METABOLITI IZOLOVANI IZ NADZEMNIH DELOVA BILJNE VRSTE *L. exaltatus*

#### 5.2.2.1. HEMIJSKI SASTAV ALKANSKE FRAKCIJE

U tabeli 5.9 je dat sastav intrakutikularnih alkana (uzorak J) nadzemnog dela biljne vrste *L. exaltatus*. Detaljna GC-MS analiza je omogućila identifikaciju 60 sastojaka koji su predstavljali 98,6% ove najnepolarnije (100%-tni heksan) hromatografske frakcije. *n*-Alkani (C<sub>11</sub>-C<sub>36</sub>) su bili najzastupljeniji (83,20%), a sledili su ih *anteizo*- (C<sub>24</sub>-C<sub>35</sub>) i *izo*-alkani (C<sub>25</sub>-C<sub>35</sub>), pri čemu je sadržaj *anteizo*-izomera bio značajno viši u odnosu na *izo*-izomere (11,59% naspram 3,71%). Ovim homologim serijama su dominirali hentrikontan (24,12%), 3-metilhentrikontan (3,07%) i 2-metiltriakontan (0,95%). Kao što se i moglo očekivati, imajući u vidu biosintetske puteve kojim pomenuti alkani nastaju (sekcija 5.1.2.1, slika 5.3), kod *n*- i *izo*-alkana, veći udeo su imali homolozi sa neparnim brojem C-atoma, dok su kod *anteizo*-alkana bili zastupljeniji oni sa parnim brojem C-atoma u nizu. Raspodele homologa

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

ovih klase alkana se mogu opisati sledećim ACL i CPI vrednostima<sup>††††</sup>: 30,77 i 5,41 za *n*-, 31,24 i 4,35 za *izo*- i 31,48 i 8,26 za *anteizo*-izomere.

**TABELA 5.9.** HEMIJSKI SASTAV *FRAKCIJE I* (100%-TNI HEKSAN) ETARSKOG EKSTRAKTA NADZEMNOG DELA BILJNE VRSTE *L. EXALTATUS*

RI <sup>i</sup>	JEDINJENJE	UZORAK F <sup>ii</sup> %	KLASA
<b>1100</b>	Undekan <sup>iv</sup>	tr <sup>v</sup>	N
<b>1200</b>	Dodekan <sup>iv</sup>	0,02	N
<b>1300</b>	Tridekan <sup>iv</sup>	0,13	N
<b>1400</b>	Tetradekan <sup>iv</sup>	0,01	N
<b>1500</b>	Pentadekan <sup>iv</sup>	0,03	N
<b>1600</b>	Heksadekan <sup>iv</sup>	tr	N
<b>1700</b>	Heptadekan <sup>iv</sup>	0,01	N
<b>1800</b>	Oktadekan <sup>iv</sup>	tr	N
<b>1900</b>	Nonadekan <sup>iv</sup>	tr	N
<b>2000</b>	Eikozan <sup>iv</sup>	tr	N
<b>2100</b>	Heneikozan <sup>iv</sup>	0,01	N
<b>2200</b>	Dokozan <sup>iv</sup>	tr	N
<b>2300</b>	Trikozan <sup>iv</sup>	0,05	N
<b>2336</b>	11-Metiltrikozan	tr	UR
<b>2374</b>	3-Metiltrikozan	tr	A
<b>2400</b>	Tetrakozan <sup>iv</sup>	0,02	N
<b>2463</b>	2-Metiltetrakozan	0,03	I
<b>2474</b>	3-Metiltetrakozan	tr	A
<b>2500</b>	Pentakozan <sup>iv</sup>	0,87	N
<b>2534</b>	11-Metilpentakozan	0,03	UR
	13-Metilpentakozan		UR
<b>2563</b>	2-Metilpentakozan	0,01	I
<b>2574</b>	3-Metilpentakozan	0,45	A
<b>2600</b>	Heksakozan <sup>iv</sup>	0,26	N
<b>2663</b>	2-Metilheksakozan	0,28	I
<b>2674</b>	3-Metilheksakozan	0,12	A
<b>2700</b>	Heptakozan <sup>iv</sup>	4,61	N
<b>2732</b>	11-Metilheptakozan	0,05	UR
	13-Metilheptakozan		UR

<sup>††††</sup> Vrednosti za ACL i CPI su izračunate na osnovu modifikovane formule koju su predložili Redi i saradnici (Reddy et al., 2000).

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

NASTAVAK TABELE 5.9			
2763	2-Metilheptakozan	0,03	I
2774	3-Metilheptakozan	2,10	A
2800	Oktakozan <sup>iv</sup>	1,77	N
2863	2-Metiloktakozan	0,61	I
2874	3-Metiloktakozan	0,17	A
2900	Nonakozan <sup>iv</sup>	19,09	N
2930	11-Metilnonakozan		UR
	13-Metilnonakozan	0,15	UR
	15-Metilnonakozan		UR
2963	2-Metilnonakozan	0,12	I
2974	3-Metilnonakozan	1,76	A
3000	Triakontan <sup>iv</sup>	4,04	N
3062	2-Metiltriakontan	0,95	I
3073	3-Metiltriakontan	0,30	A
3100	Hentriakontan <sup>iv</sup>	24,12	N
3128	11-Metilhentriakontan		UR
	13-Metilhentriakontan	0,23	UR
	15-Metilhentriakontan		UR
3162	2-Metilhentriakontan	0,24	I
3173	3-Metilhentriakontan	3,07	A
3200	Dotriakontan <sup>iv</sup>	4,73	N
3262	2-Metildotriakontan	0,91	I
3273	3-Metildotriakontan	0,51	A
3300	Tritriakontan <sup>iv</sup>	19,15	N
3362	2-Metiltritriakontan	0,25	I
3373	3-Metiltritriakontan	2,90	A
3400	Tetratriakontan	1,91	N
3461	2-Metiltetratriakontan	0,28	I
3472	3-Metiltetratriakontan	0,23	A
3500	Pentatriakontan	1,61	N
3600	Heksatriakontan	0,75	N
UKUPNO IDENTIFIKOVANO		98,97 (60) <sup>v</sup>	
<i>n</i> -ALKANI (N)		83,20 (26)	
SA PARNIM BROJEM C-ATOMA U NIZU		13,52 (13)	
SA NEPARNIM BROJEM C-ATOMA U NIZU		69,68 (13)	
<i>izo</i> -ALKANI (I)		3,71 (11)	
SA PARNIM BROJEM C-ATOMA U NIZU		0,65 (5)	
SA NEPARNIM BROJEM C-ATOMA U NIZU		3,06 (6)	
<i>anteizo</i> -ALKANI (A)		11,59 (12)	

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

NASTAVAK TABELE 5.9

SA PARNIM BROJEM C-ATOMA U NIZU	10,26 (6)
SA NEPARNIM BROJEM C-ATOMA U NIZU	1,33 (6)
SA UNUTRAŠNjom METIL RAČVOM (UR)	0,46 (11)

<sup>i</sup> jedinjenja su navedena po redosledu eluiranja sa DB-5 kolone (RI eksperimentalno određeni retencioni indeksi na pomenutoj koloni koinjekcijom homologe serije *n*-alkana C<sub>7</sub>-C<sub>40</sub>);

<sup>ii</sup> alkanska frakcija (100%-tni heksan) dietil-etarskog ekstrakta nadzemnih delova;

<sup>iii</sup> srednja vrednost pet ponavljanja;

<sup>iv</sup> identifikacija sastojaka je osim upoređivanjem eksperimentalno dobijenih RI vrednosti sa literaturnim podacima i upoređivanjem masenih spektara sa spektrima iz biblioteka potvrđena i GC koinjektiranjem standardnih supstanci;

<sup>v</sup> tr - trag (<0,05%);

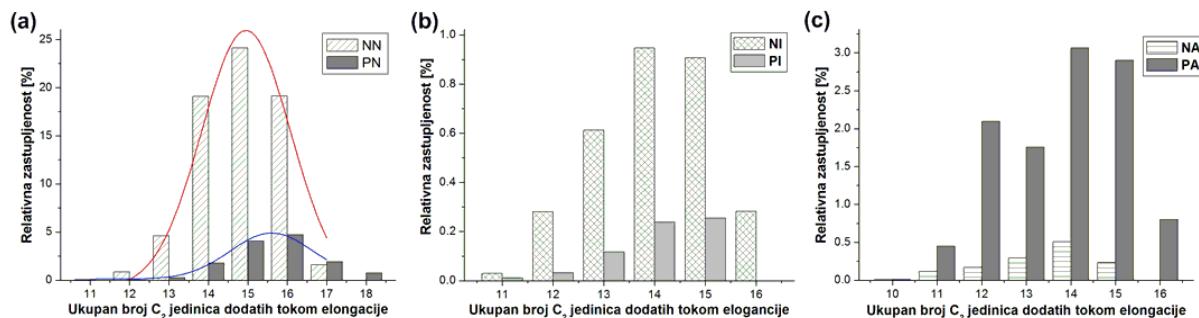
<sup>vi</sup> u zagradi je dat broj identifikovanih sastojaka koji pripadaju određenoj klasi.

U prethodnom istraživanju u kome je određen sastav površinskih alkana listova vrste *L. exaltatus* (tabela 3.3; Maffei, 1994) identifikovana je homologa serija *n*-alkana od C<sub>25</sub>-C<sub>35</sub> u kojoj su bili zastupljeniji homolozi sa neparnim brojem C-atomu (ACL = 31,22 i CPI = 5,45), dok je nađeno svega četiri *izo*- (C<sub>29</sub>, C<sub>30</sub>, C<sub>32</sub> i C<sub>33</sub>) i dva *anteizo*-izomera (C<sub>31</sub> i C<sub>34</sub>). Zanimljivo je da je procentualni udeo *izo*-alkana u površinskim voskovima listova bio veći u odnosu *anteizo*-alkane, i da 3-metilhentriakontan, najzastupljeniji *anteizo*-alkan u *frakciji I* (uzorak **J**), uopšte nije detektovan. Osim ovih razlika u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu *izo*- i *anteizo*-alkana, neophodno je istaći da je kod trenutno analiziranih intrakutikularnih alkana identifikovana znatno brojnija serija *n*-alkana od C<sub>11</sub> do C<sub>36</sub>. Raspodele *n*-alkana, kako površinskih tako i intrakutikularnih, međusobno su veoma slične, kako u pogledu najzastupljenijeg *n*-alkana, hentriakontana, tako i u pogledu ACL i CPI vrednosti kojima se mogu opisati. Kao što je već rečeno *n*-alkani sa neparnim brojem C atoma koji su detektovani u površinskim voskovima listova vrste *L. exaltatus* imaju Gausovu raspodelu koja je centrirana na  $\mu = 15$  i u kojoj je  $\zeta$  oko 2 acetatne jedinice (slika 5.7a). Slična raspodela ( $\mu = 14,95$  i  $\zeta = 2,26$ )<sup>\$\$\$\$</sup> je vidljiva i kod *n*-alkana sa nepranim brojem C-atomu u nizu identifikovanih u *frakciji I* (100%-tni heksan) etarskog ekstrakta nadzemnog dela ove biljne vrste. Distribucija *n*-alkana sa parnim brojem C-atomu u nizu bi se mogla klasifikovati kao deformisana Gausova raspodela koju karakteriše vrednost parametara  $\mu$  i  $\zeta$  od 15,6 i 2,12 (slika 5.16a), dok su raspodele *izo*- i *anteizo*-alkana previše složenog oblika da bi se mogle opisati Gausovom krivom (slika 5.16b i 5.16c).

\$\$\$\$ Gausova raspodela je razmatrana samo kod trikozana i viših alkana jer se za njih sa sigurnošću može tvrditi da nastaju pomoću sekundarnog elongacionog sistema.

# REZULTATI I DISKUSIJA

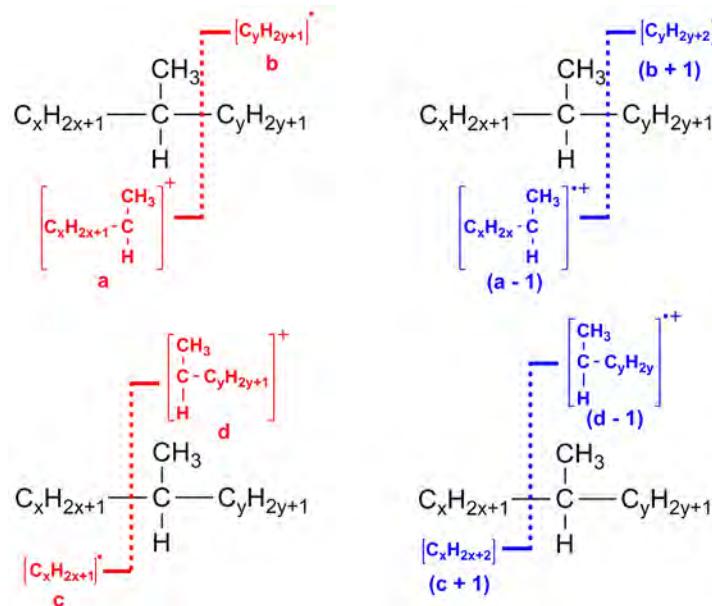
## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*



**SLIKA 5.16.** RASPODELE *n*-ALKANA SA NEPARNIM (NN, GAUSOVA KRIVA CRVENE BOJE) I PARNIM (PN, GAUSOVA KRIVA PLAVE BOJE) BROJEM C-ATOMA U NIZU (a), KAO I *izo*- (NI, ODNOSNO PI; b) I *anteizo*-ALKANA (NA, ODNOSNO PA; c) IZ FRAKCIJE I (100%-TNI HEKSAN) ETARSKOG EKSTRAKTA NADZEMNOG DELA BILJNE VRSTE *L. EXALTATUS* IZRAĐENE KROZ UČESTALOSTI (RELATIVNE ZASTUPLJENOSTI) DODAVANJA ODREĐENOG BROJA C<sub>2</sub> (ACETATNIH) JEDINICA U PROCESU ELONGACIJE

Pored homologih serija *n*-, *izo*- i *anteizo*-alkana u hromatogramu je detektovana još jedna serija jedinjenja koja su u masenom spektru pokazivala fragmentaciju karakterističnu za alkane, kao i regularnost pri zadrtavanju na GC koloni jer su im se vrednosti retencionih indeksa međusobno razlikovale za *ca.* 200 jedinica. Maseni spektri ovih jedinjenja bili su specifični po prisustvu pojedinih jona parne mase (npr. na *m/z* 168, 196, 224 itd.) i odsustvu molekulskog jona. Takoče maseni spektri ovih jedinjenja su se odlikovali i relativno intenzivnim [M – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> jonom, koji se obično ne javlja u masenim spektima *n*-, *izo*- i *anteizo*-alkana. Sve upravo navedene karakteristike u masenom spektru svojstvene su za dugolančane alkane koji poseduju unutrašnju metil račvu (Nelson et al., 1972). Kod ovakvog tipa alkana dolazi do raskidanja veza sa obe strane metil račve pri čemu nastaju sekundarni joni (strukture **a** i **d**, slika 5.17) tačno određene mase (tj. *m/z* vrednosti) na osnovu kojih se može odrediti položaj metil grupe u nizu. Tokom ove fragmentacije dolazi i do prenošenja H<sup>•</sup> radikala sa sekundarnog katjona na primarni radikal, pri čemu nastaju katjon-radikali parne mase (strukture (**a – 1**) i (**d – 1**)), koji obično daju jone većeg intenziteta u masenom spektru u odnosu na sekundarne katjone neparne mase (strukture **a** i **d**) iz kojih nastaju (Nelson et al., 1972).

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*



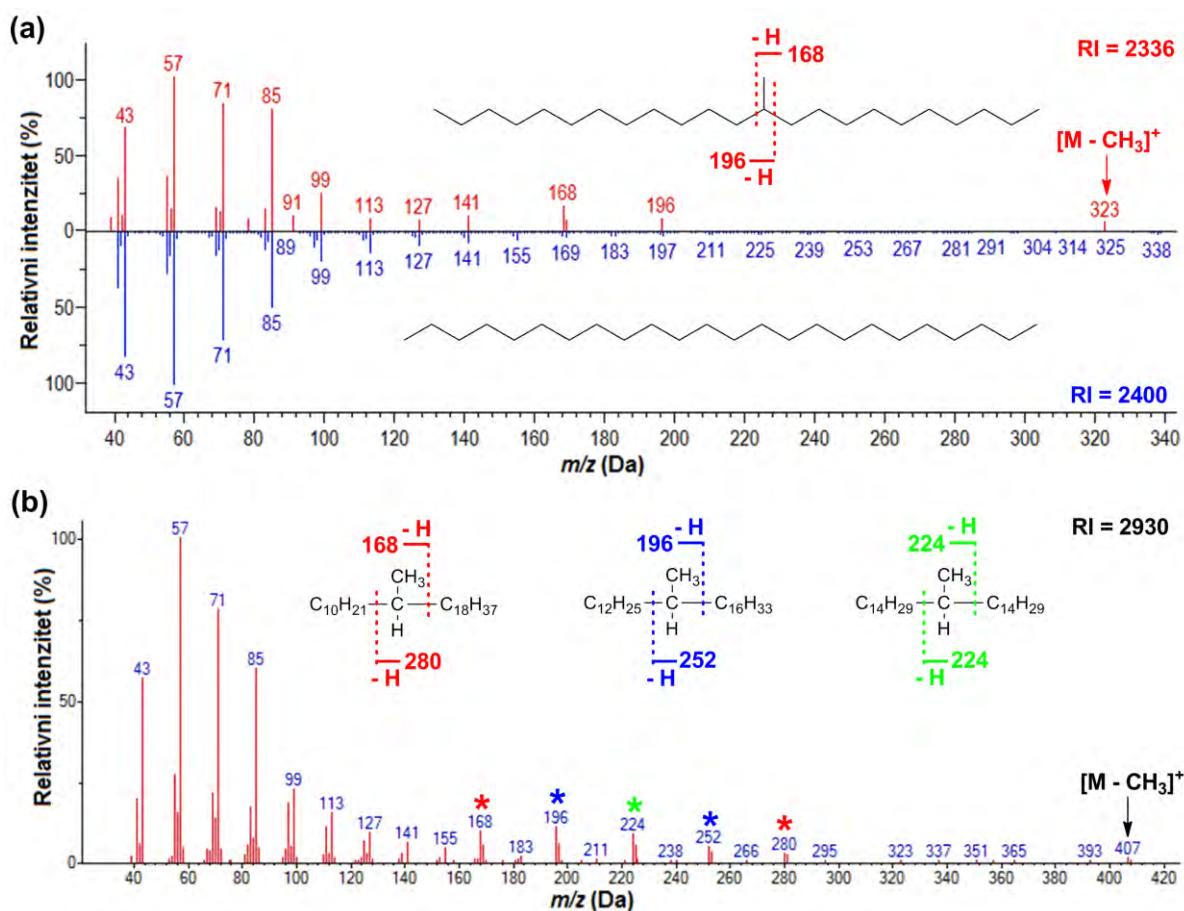
**SLIKA 5.17.** FRAGMENTACIJE KARAKTERISTIČNE ZA DUGOLANČANE ALKANE SA UNUTRAŠNjom METIL RAČVOM. CRVENOM BOJOM SU OZNAČENE STRUKTURE KATJONA I RADIKALA KOJI NASTAJU HOMOLITIČKIM RASKIDANJEM C–C VEZE, DOK SU PLAVOM BOJOM OBELEŽENE STRUKTURE KATJON-RADIKALA I ALKANA KOJI NASTAJU NAKON PRENOŠA H<sup>+</sup> RADIKALA

U masenom spektru jedinjenja koje je eluiralo na RI(DB-5) = 2336 bila su prisutna samo dva jona parne mase na  $m/z$  168 i 196. Imajući u vidu fragmentacione puteve karakteristične za dugolančane alkane sa unutrašnjom metil račvom prepostavljeno je da je reč o 11-metiltrikozanu (slika 5.18a). Ova prepostavka je bila dodatno podržana odličnim slaganjem retencionog indeksa ovog jedinjenja sa indeksom 11-metiltrikozana dostupnim u literaturi (RI(DB-5MS) = 2335; Steinmetz et al., 2003). Jon na  $m/z$  168 je bio prisutan u masenim spektrima svih ostalih jedinjenja iz ove serije, a bio je praćen drugim jonom parne mase čija je  $m/z$  vrednost rasla za 28 amu (ekvivalentno sa dve - $\text{CH}_2-$  grupe) sa porastom vrednosti retencionog indeksa za ca. 200 jedinica, što je ukazivalo na postojanje serije 11-metilalkana ( $\text{C}_{24}-\text{C}_{32}$ ) sa parnim brojem C-atoma u nizu. Međutim, u svim ovim masenim spektrima su se javljali i još neki dodatni joni parne mase, koji nisu mogli da potiču od 11-metilalkana, a čije bi se prisustvo moglo objasniti koeluiranjem nekih drugih dugolančanih alkana koji imaju unutrašnju metil račvu sa 11-metilalkanima. U masenom skenu jedinjenja koja su eluirala na RI(DB-5) = 2534, pored jona na  $m/z$  168 i 224 koji nastaju fragmentacijom 11-metilpentakozanu, javio se i jon na  $m/z$  196 koji je karakterističan za metil grupu u položaju 13 (Nelson et al., 1972). Poput jona na  $m/z$  168, i jon na  $m/z$  196 je bio prisutan i u svim ostalim masenim spektrima ove serije, a koji odgovaraju jedinjenjima sa višim RI

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

vrednostima, a bio je, takođe praćen jonom parne mase čija je  $m/z$  je vrednost konstantno rasla za 28 amu i ukazivala, zajedno sa RI vrednošću, na produženje niza za dve -CH<sub>2</sub>- grupe. Na osnovu ovih činjenica je zaključeno da zajedno sa 11-metilalkanima koeluiraju i serija odgovarajućih 13-metilalkana (C<sub>26</sub>–C<sub>32</sub>) sa parnim brojem C-atomata u nizu. Pojava jona na  $m/z$  224 u masenim spektrima jedinjanja sa RI = 2930 i RI = 3128 mogla se objasniti prisustvom i dva 15-metil izomera, 15-metilnonakozana i 15-metilpentekontana, u *frakciji I* (slika 5.18b).



**SЛИКА 5.18.** (a) ПОРЕДЕНJE МАСЕНИХ СПЕКТРА 11-METILTRIKOZANA (СПЕКТАР ЦРВЕНЕ БОЈЕ) И ТЕТРАКОЗАНА (СПЕКТАР ПЛАВЕ БОЈЕ) СА НАЗНАЧЕНИМ ФРАГМЕНТАЦИЈАМА КОЈИМА НАСТАЈУ КАРАКТЕРИСТИЧНИ ЈОНИ У СПЕКТРУ 11-METILTRIKOZANA. (b) МАСЕНИ СКЕН НА RI = 2930 НА КОМЕ СУ ОЗНАЧЕНИ СПЕЦИФИЧНИ ЈОНИ НА ОСНОВУ КОЈИХ СУ ИДЕНТИФИКОВАНИ 11-METILNONAKOZAN (ЦРВЕНА БОЈА), 13-METILNONAKOZAN (ПЛАВА БОЈА) И 15-METILNONAKOZAN (ZELENA БОЈА)

Alkani sa 11-, 13- i 15-metil račvom pokazuju veoma slična retencionna svojstva i najčešće koeluiraju sa GC kolone, pa se njihovo prisustvo potvrđuje na osnovu gore

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

pomenutih karakterističnih jona parne mase u masenom spektru (Nelson et al., 1972). Ove tri klase alkana sa unutrašnjom metil raćvom su široko rasprostranjene kod insekata gde ulaze u sastav kutikularnih lipida koji imaju važnu ulogu u zaštiti insekata od gubitka vode, abrazije ili napada mikroorganizama, a mogu delovati i kao signalni molekuli insekata za seksualno privlačenje i označavanje teritorije, kao feromoni kojima se regulišu odnosi unutar „kaste”, zatim, kao feromoni koji pomažu u međusobnom pronalačenju i raspoznavanju, ili kao agregacioni, alarmni i termoregulatorni feromoni, kairomoni itd. (Howard i Blomquist, 2005). Za razliku od insekata, veoma su retki primeri dostupni u literaturi koji navode pripadnike ovih klasa račvastih alkana kao biljne metabolite. Do sada je 11-metiltrikozan jedino identifikovan kao sastojak površinskog voska vrste *Euphorbia tirucalli* L. (Ahmad et al., 1996) i etil-acetatog ekstrakta vrste *Stachys scardica* Griseb (Lazarević et al., 2010), dok je C<sub>26</sub>–C<sub>34</sub> serija 11-, 13- i 15-metilalkana detektovana u voskovima koji oblaču klas nekih genetski modifikovanih vrsta ječma (von Wettstein-Knowles, 2007). Imajući u vidu pobrojane fiziološke funkcije koje ovi alkani sa unutrašnjom metil raćvom mogu imati kod insekata, moguće je da imaju i neku specifičnu ulogu i kod ovih biljnih vrsta, npr. kao atraktanti ili repelenti za neke vrste insekata.

### 5.2.2.2. (POLI)FENOLNA JEDINJENJA I TRITERPENSKE KISELINE

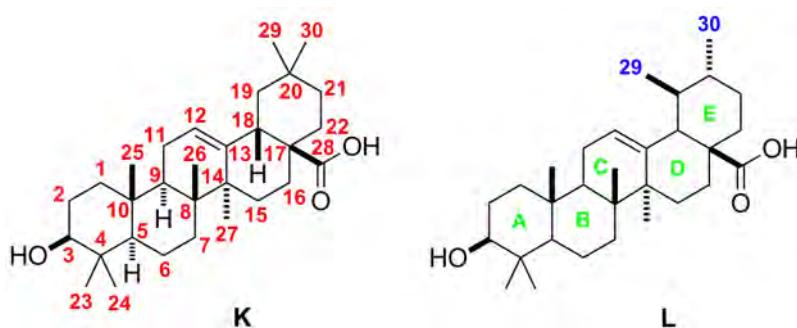
Predstavnici roda *Lycopus* se, između ostalog, smatraju bogatim izvorom polifenolnih jedinjenja, pre svega (poli)fenolnih kiselina i flavonoida, a njihova upotreba u tradicionalnoj i zvaničnoj medicini se veoma često povezuje sa visokim sadržajem ovih sekundarnih metabolita (Bucar et al., 1995; Fecka i Cisowski, 1999; Kartnig i Bucar, 1995; Ślusarczyk et al., 2009). U nedavnom istraživanju je iz populacije biljne vrste *L. exaltatus* iz regiona Lipetsk u Rusiji izolovano devet (poli)fenolnih jedinjenja: protokatehualdehid (6), kafena kiselina (9), apeginin (19) i luteolin (23), kao i glukuronidi ova dva flavona (22 i 26-28). Kako su sva ova polifenolna jedinjenja bila ranije izolovana i iz vrste *L. europaeus*, autori su ukazali na mogućnost korišćenja i ovog predstavnika roda *Lycopus* u lečenju blažih oblika hipertireoze (Savina et al., 2013). Naše frakcionisanje etarskog ekstrakta nadzemnog dela biljne vrste *L. exaltatus* je rezultovalo u izolovanju i spektralnoj karakterizaci (1D i 2D NMR) tri derivata cimetne kiseline (8, 9 i 11) i dva flavona (19 i 23) čime je profil polifenolnih jedinjenja ove biljne vrste obogaćen sa još dva sastojka, *trans-p*-kumarinskom (8) i *trans*-ferulinskom (11) kiselinom. Neophodno je istaći da je i značajan broj (preko 20)

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

(poli)fenolnih jedinjenja, koja nisu načena u prethodnim fitohemijskim ispitivanjima (tabela 5.8; npr. eugenol, 3,4-dihidroksistiren (187), *trans*-sinapinska (13) i vanilinska kiselina (4), itd.) identifikovan i u etarskom ulju izolovanom iz iste populacije ove biljne vrste.

Nakon frakcionisanja, koje je obuhvatalo gradijentnu *dry flash* hromatografiju, izokratsku kolonsku hromatografiju na SiO<sub>2</sub> i particiju na osnovu rastvorljivosti (slika 4.1), dobijen je i beli talog koji je TLC analizom pokazivao samo jednu mrlju na TLC pločici i onda kada su za razvijanje korišćeni eluenti različite polarnosti. Složenost NMR spektara, prevashodno bliski signali u <sup>13</sup>C NMR spektru, navodila je na zaključak da ovaj uzorak ipak, iako to prvo bitno nije pokazala TLC analiza, predstavlja smešu strukturno veoma sličnih jedinjenja. Uprkos složenosti NMR spektara moglo su se uočiti grupe veoma karakterističnih signala koje su ukazivale na to da se ovaj uzorak sastoji od dve regioizomerne triterpenske kiseline. Set signala u <sup>13</sup>C NMR spektru na δ 178,7 (COOH), 143,9 (C-12), 121,6 (C-13) i 76,9 (C-3) praćen tripletom na 5,12 ppm (*J* = 3,2 Hz, H-12), multipletom na 2,99 ppm (H-3) i dubletom dubleta na 2,74 ppm (*J* = 13,5, 3,6 Hz, H-18) u <sup>1</sup>H NMR spektru nagovestio je prisustvo oleanolne kiseline (K), dok su signali na δ 178,4 (COOH), 138,2 (C-12), 124,6 (C-13) i 76,9 (C-3) u <sup>13</sup>C NMR spektru zajedno sa tripletom na 5,15 ppm (*J* = 3,2 Hz, H-12), multipletom na 2,99 ppm (H-3) i dubletom na 2,11 ppm (*J* = 11,3 Hz, H-18) u protonskom ukazivali da ovaj uzorak sadrži i ursolnu kiselinu (L) (Abdelhalim et al., 2014; De Sousa Menezes i Kaplan, 2006; slike 5.19 i 5.20).

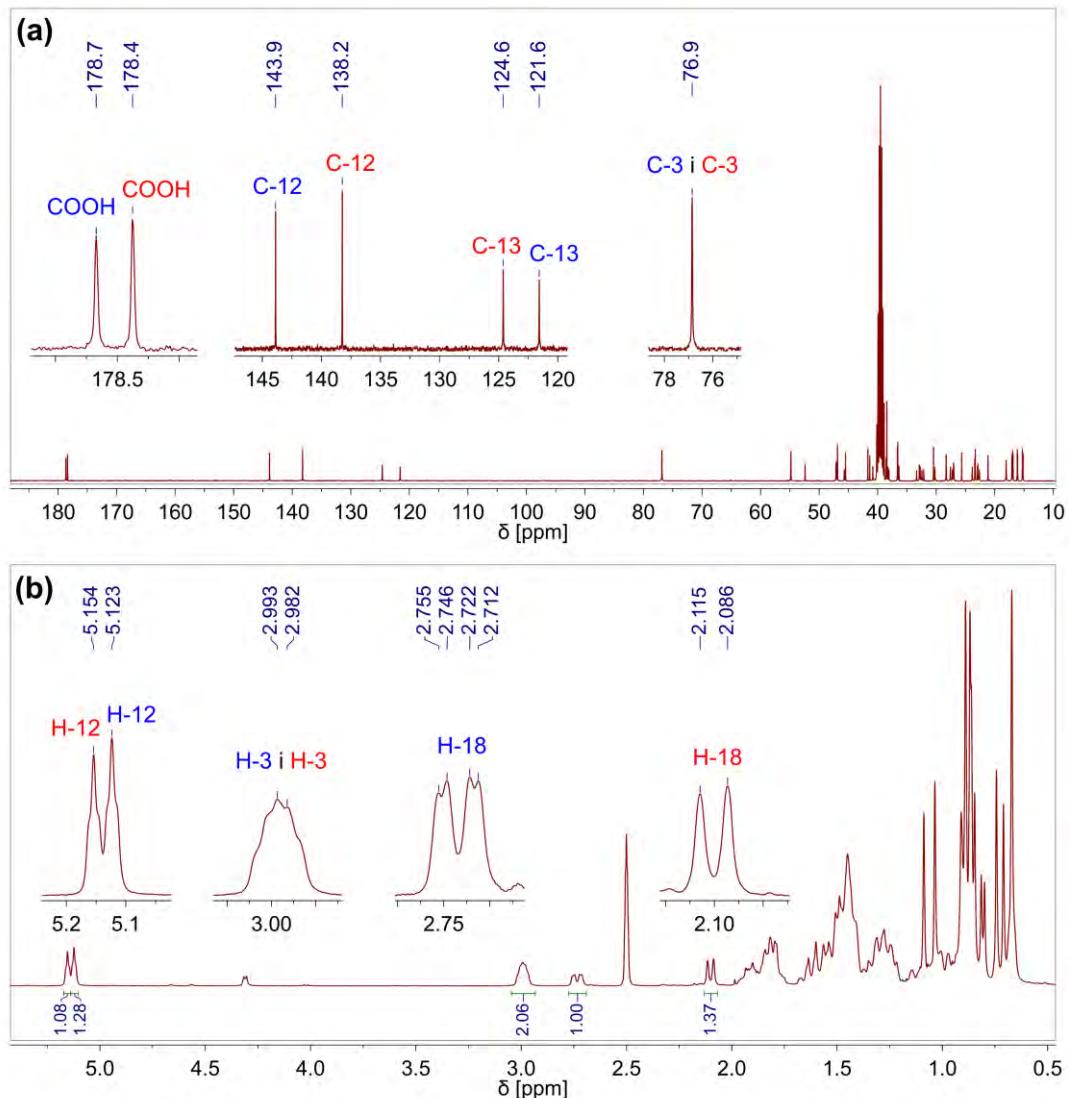


SLIKA 5.19. STRUKTURE OLEANOLNE (K) I URSOLNE (L) KISELINE SA NUMERACIJOM C-ATOMA I PRSTENA U

\*\*\*\*\*  
SKELETU

\*\*\*\*\* U ursolnoj kiselini (K) H-atomi u položajima 5, 9 i 17 imaju istu relativnu konfiguraciju kao i u oleanolnoj kiselini (L), ali su zbog preglednosti izostavljeni.

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*



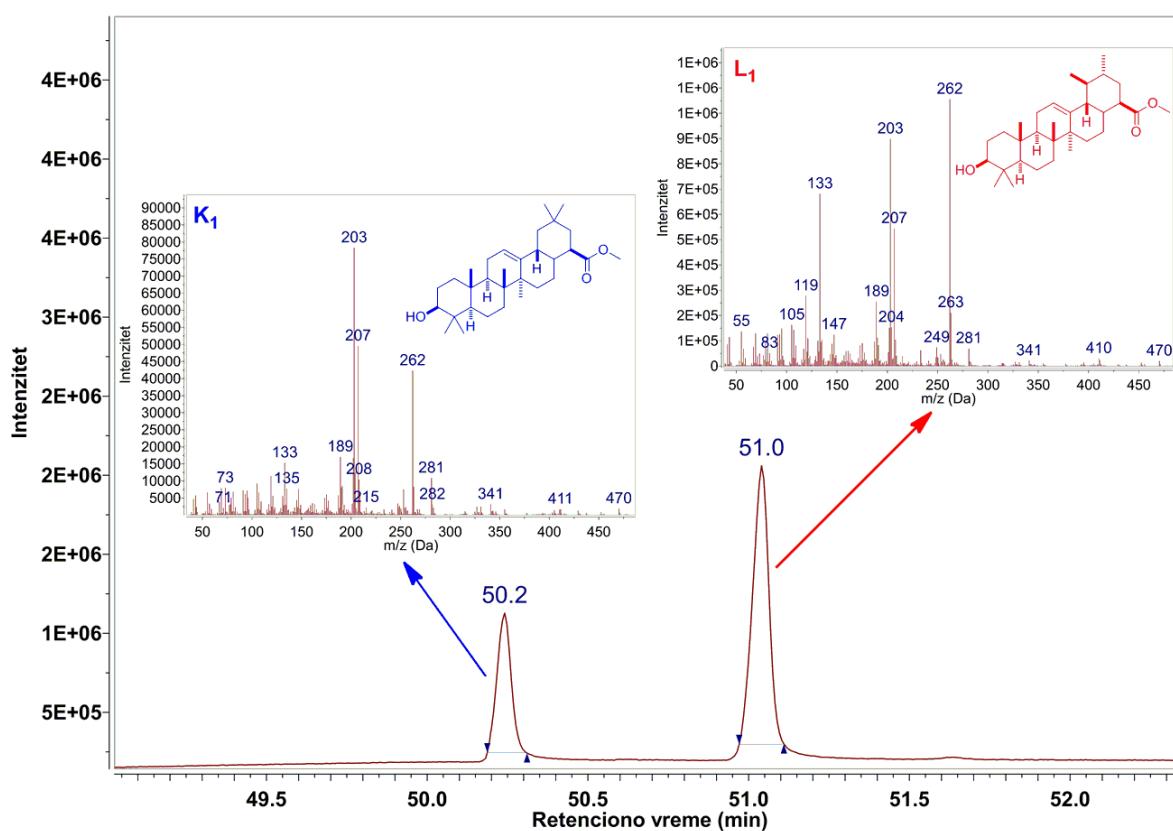
**SLIKA 5.20.**  $^{13}\text{C}$  NMR (a) i  $^1\text{H}$  NMR (b) SPEKTRI SMEŠE OLEANOLNE (**K**) I URSOLNE (**L**) KISELINE. PLAVOM BOJOM SU OBELEŽENI SIGNALI KOJI POTIĆU OD OLEANOLNE KISELINE, DOK SU CRVENOM BOJOM OBELEŽENI SIGNALI KOJI POTIĆU OD URSOLNE KISELINE

Ova preliminarna identifikacija dodatno je potvrđena nakon GC-MS analize uzorka tretiranog diazometanom jer su se u gasnom hromatogramu pojavila samo dva pika za koje je poređenjem sa masenim spektrima dostupnim u literaturi (Furuya et al., 1987; Pádua et al., 2014) utvrđeno da predstavljaju metil estre pomenutih kiselina (**K**<sub>1</sub> i **L**<sub>1</sub>; slika 5.21). Kako su ove dve pentaciclične triterpenske kiseline (**K** i **L**) strukturno veoma slične (tj. razlikuju se samo u položaju jedne metil grupe u skeletu) maseni spektri njihovih metil estara **K**<sub>1</sub> i **L**<sub>1</sub> su međusobno, takođe veoma slični i obično se razlikuju samo po relativnom intenzitetu pojedinih jona (Budzikiewicz et al., 1963). Primarna fragmentacija kod ovakvih  $\Delta^{12}$

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

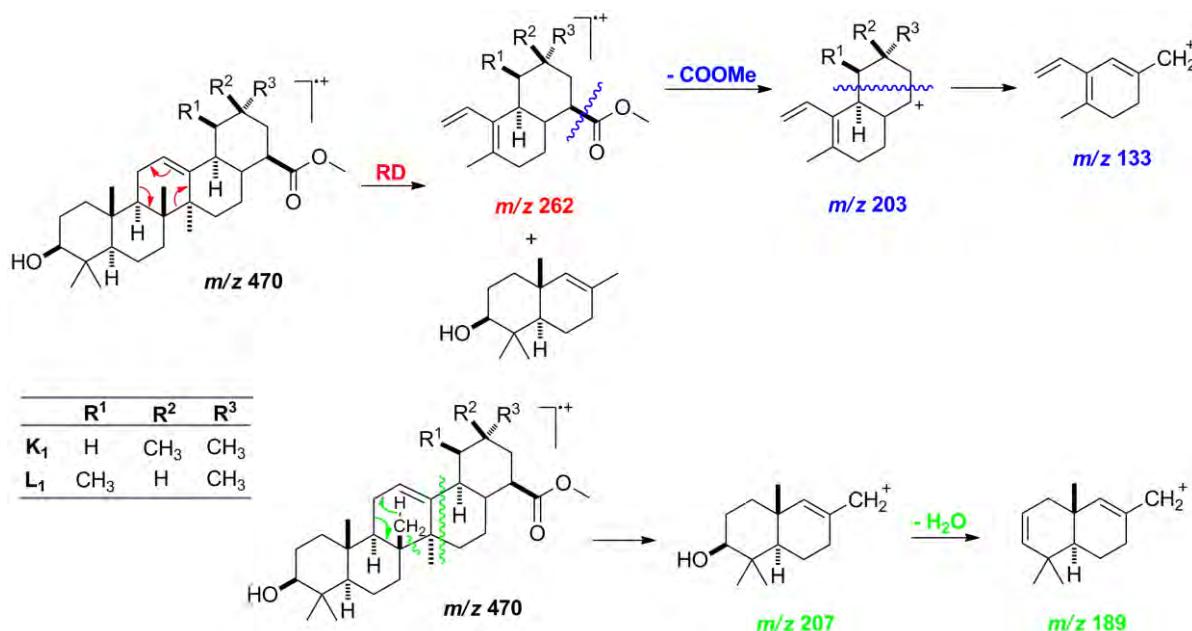
ursanskih i oleanskih triterpena podrazumeva retro-Dils-Alderovu reakciju kojom nastaje jon na  $m/z$  262, koji je kod metil-oleanoata (**K<sub>1</sub>**) ujedno i osnovni jon, dok je kod metil-ursolata (**L<sub>1</sub>**) najintenzivniji jon na  $m/z$  203 koji nastaje daljom fragmentacijom jona na  $m/z$  262 usled gubitka COOMe grupe. U masenom spektru metil-ursolata (**L<sub>1</sub>**) intenzivniji je i jon na  $m/z$ , 133 za koji se smatra da nastaje specifičnim cepanjem prstena E i za koji je pretpostavljeno da ima strukturu prikazanu na slici 5.22. u kojoj je pozitivno nanelektrisanje rezonanciono delokalizovano (Assimopoulou i Papageorgiou, 2005; Budzikiewicz et al., 1963). Takođe poznato je da metil estar **K<sub>1</sub>** eluira nešto brže sa nepolarne GC kolone (poput DB-5) u odnosu na regioizomerni metil estar **L<sub>1</sub>** (De Sousa Menezes i Kaplan, 2006). Odnos triterpenskih kiselina je bio, na osnovu odnosa integrala H-18 atoma u  $^1\text{H}$  NMR spektru, 42,2% oleanolne (**K**) i 57,8% ursolne kiseline (**L**).



SLIKA 5.21. TIC HRAMATOGRAM DOBIJEN NAKON DERIVATIZACIJE OLEANOLNE (**K**) I URSOLNE (**L**) KISELINE DIAZOMETANOM SA MASENIM SPEKTRIMA ODGOVARAJUĆIH METIL ESTARA (**K<sub>1</sub>** I **L<sub>1</sub>**)

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*



SLIKA 5.22. KARAKTERISTIČNE FRAGMENTACIJE METIL ESTARA OLEANOLNE (**K<sub>1</sub>**) I URSOLNE (**L<sub>1</sub>**) KISELINE. CRVENOM BOJOM JE OZNAĆEN DOMINANTNI FRAGMENTACIONI PUT KOD JEDINJENJA **K<sub>1</sub>**, A PLAVOM BOJOM KOD JEDINJENJA **L<sub>1</sub>** (ASSIMOPOULOU I PAPAGEORGIOU, 2005; BUDZIKIEWICZ ET AL., 1963)

Zanimljivo je da su ove dve pentaciclične triterpenske kiseline (**K** i **L**) načene samo kod još jednog predstavnika roda *Lycopus*, *L. lucidus* Turcz. (Lee et al., 2006; Li et al., 2014; Yang et al., 2014), koji ima široku etnofarmakološku primenu u zemljama istočne Azije gde se između ostalog koristi kao tonik, sedativ i protivupalni agens, zatim, pri zaceljivanju rana, protiv bolova i menstrualnih tegoba, kao i kod kardiovaskularnih bolesti i poremećaja u radu tiroidne tležde, itd. (Lee et al., 2006; Murata et al., 2010; Yang et al., 2014;). Pored oleanolne i ursolne kiseline, iz nadzemnog dela biljne vrste *L. lucidus* Turcz., izolovano je još desetak triterpenskih kiselina ursanskog, oleanskog i lupanskog skeleta različitog stepena oksigenacije, u slobodnom i ili glikozidno vezanom obliku (Lee et al., 2006; Li et al., 2014; Yang et al., 2014), ali je njihov ukupni sadržaj znatno niži u odnosu na sadržaj oleanolne i ursolne kiseline u nadzemnom delu biljne vrste *L. exaltatus* (ca. 0,1%). Iako je dugo smatrano da oleanolna i ursolna kiselina nemaju neku značajnu biološku aktivnost, u poslednjih dvadesetak godina su rezultati brojnih *in vivo* i *in vitro* farmakoloških studija pokazali da ovi biljni metaboliti mogu imati niz blagotvornih dejstava (poput antimikrobnog, antifungalnog, antioksidatnog, insekticidnog, anti-HIV, antitumorskog, antiinflamatornog, imunomodulatornog, hepatoprotektivnog, gastroprotektivnog itd.) koja su praćena niskom toksičnošću (Liu, 1995; Ovesná et al., 2004). Oleanolna i ursolna kiselina, takoče, ulaze u

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

sastav i nekih farmaceutskih preparata, dostupnih na tržistu istočno azijskih zemalja, koje se koriste pri lećenju upalnih procesa, fibroze jetre i kao hemoterapija kod nekih vrsta tumora (Ikeda et al., 2008; Liu, 2005).

### 5.2.3. MULTIVARIJANTNA ANALIZA SASTAVA ETARSKIH ULJA BILJNIH VRSTA RODA *LYCOPUS*

Prema trenutno prihvaćenoj sistematici, rod *Lycopus* je svrstan u podfamiliju Nepetoideae, pleme Mentheae (Harley et al., 2004). Međutim, položaj ovog roda unutar plemena Mentheae još uvek nije preciziran jer su rezultati molekularnih filogenetskih istraživanja međusobno veoma kontradiktorni. Naime, u zavisnosti od toga koja je vrsta i region DNK korišćen pri poređenju, predstavnici roda *Lycopus* su se u filogenetskom stablu nalazili ili u neposrednoj blizini grane koju su činili predstavnici podplemena Menthinae (Wagstaff et al., 1995) ili su bili pozicionirani unutar sestrinske grupe podplemena Nepetinae (Moon et al., 2010). Rezultati najnovijih istraživanja izdvajaju ovaj rod kao zasebno podpleme Lycopinae (Drew i Sytsma, 2012). Pored toga, nisu jasno definisani ni infragenerički odnosi. Brike (Briquet, 1896) je na osnovu prisustva ili odsustva stolona na nižim delovima stabla ovaj rod podelio na dve sekcije *Stoloniferi* i *Astolonosi*, pri čemu je sekciju *Astolonosi* činila samo jedna vrsta *Lycopus americanus* Muhl. ex W.P.C. Barton. U istraživanju novijeg datuma Mun i Hong (Moon i Hong, 2006) su predložili podelu ovog roda na četiri sekcije na osnovu morfoloških i anatomske karakteristika oraščića (tabela 5.10), koje su inače veoma jedinstvene i izdvajaju ovaj rod od svih ostalih u plemenu Mentheae. Međutim, utvrđeno je i da većina vegetativnih karakteristika biljnih vrsta roda *Lycopus* pokazuje visok stepen varijabilnosti što u mnogome otežava karakterizaciju ovih taksona (Moon i Hong, 2003).

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

**TABELA 5.10.** PODELA VRSTA RODA *LYCOPUS* NA PODGRUPE NA OSNOVU MORFOLOGIJE I ANATOMIJE ORAŠČIĆA (MOON I HONG, 2006)

GRUPA	TAKSONI	GEOGRAFSKO POREKLO
I	<i>Lycopus angustifolius</i> Elliott	SAD
	<i>Lycopus parviflorus</i> (Benth.) Maxim.†††††	Japan
	<i>Lycopus virginicus</i> L.	Kanada, SAD
II	<i>Lycopus europaeus</i> L.	Estonija, Švedska
	<i>Lycopus lucidus</i> Turcz. ex Benth.	Južna Koreja, Kina, Japan
III	<i>Lycopus cokeri</i> H.E. Ahles ex Sorrie	SAD
	<i>Lycopus uniflorus</i> Michx.	Kanada, Japan, Južna Koreja
IV	<i>Lycopus americanus</i> Muhl. ex W.P.C. Barton	SAD
	<i>Lycopus amplexens</i> Raf.	SAD
	<i>Lycopus australis</i> R.Br.	Australija
	<i>Lycopus exaltatus</i> L.f.	Mađarska
	<i>Lycopus laurentianus</i> Roll.-Germ.	Kanada
	<i>Lycopus maackianus</i> (Maxim. ex Herder) Makino	Južna Koreja, Japan
	<i>Lycopus cavaleriei</i> H.Lév.	Japan
	<i>Lycopus rubellus</i> Moench	SAD

Na osnovu naših rezultata i prethodnih fitohemijskih ispitivanja vrsta roda *Lycopus*, kojim su bile obuhvaćene vrste *L. exaltatus*, *L. europaeus* i *L. lucidus*, moglo bi se reći da je odlika roda u celini produkcija (poli)fenolnih jedinjenja, ali i da postoje određeni karakteristični tipovi sekundarnih metabolita za pojedine vrste. Biljna vrsta *L. europaeus* bi se mogla opisati kao takson koji prevashodno biosintetiše diterpene izopimaranskog skeleta, dok bi se vrste *L. exaltatus* i *L. lucidus* mogle svrstati zajedno u grupu koja proizvodi triterpenske kiseline oleanskog i ursanskog skeleta.††††† Međutim, ovo grupisanje nije u saglasnosti sa infrageneričkom klasifikacijom zasnovanoj na morfološkim i anatomskim karakteristikama oraščića (Moon i Hong, 2006) po kojoj su vrste *L. europaeus* i *L. lucidus* svrstane zajedno (tabela 5.10). Takođe, potencijalno je u budućnosti izvršiti fitohemijska

††††† Ovaj naziv predstavlja sinonim za biljnu vrstu *Lycopus uniflorus* Michx. prema bazi „The Plant List“ koja obuhvata sve poznate i prihvaćene biljne vrste (<http://www.theplantlist.org>).

††††† U dosadašnjim fitohemijskim ispitivanjima biljne vrste *L. europaeus* nije izolovana ni jedna triterpenska kiselina, dok je iz vrste *L. lucidus* izolovan samo jedan diterpen pimaranskog skeleta (Yang et al., 2014) i jedan glikozidno vezani diterpen abietanskog skeleta (Li et al., 2014).

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

ispitivanja i ostalih vrsta ovog roda kako bi se potvrdila mogućnost korišćenja izopimaranskih diterpena i triterpenskih kiselina oleanskog i ursanskog skeleta kao hemotaksonomske markera na nivou sekcija u okviru ovog roda.

Pored pomenute tri vrste ovog roda, koje su detaljno fitohemijskih okarakterisane, u literaturi su dostupni podaci o hemijskom sastavu etarskih ulja još nekoliko predstavnika ovog roda (tabela 5.11). Imajući u vidu: (i) da su uočene samo suptilne razlike u sastavu neisparljivih sekundarnih metabolita kod pojedinih predstavnika ovog roda; (ii) da su u literaturi dostupni brojni primeri koji potvrđuju da hemijski sastav etarskog ulja može biti koristan parametar pri infrageneričkoj klasifikaciji; kao i (iii) da još uvek nije jasno definisana podela na niže taksonomske kategorije unutar roda *Lycopus*, statističko poređenje razlika u sastavu etarskih ulja predstavnika ovog roda u cilju sticanja dodatnih uvida u infrageneričke odnose činilo se veoma svršishodnim. Uporedna statistička analiza sastava etarskih ulja vrsta roda *Lycopus* je uračena pomoću analize glavne komponente (PCA) i aglomerativne hijerarhijske klaster analize (AHC). Obe metode primenjene su na sledećim setovima varijabli: originalne varijable (*variable*; procentualni sadržaj sastojaka koji je veći od 1%) i sume procenata klase jedinjenja (monoterpeni (M), seskviterpeni (S), diterpeni (D), jedinjenja izvedena iz šikimatnog puta (SM), jedinjenja izvedena iz metabolizma masnih kiselina (MMK) i ostalo (O) – kao šesta klasa), koje su date kao prilozi 47 i 48 u odeljku Prilozi.

**TABELA 5.11.** VRSTE RODA *LYCOPUS* ČIJI SU HEMIJSKI SASTAVI ETARSKIH ULJA KORIŠĆENI ZA UPOREDNU STATISTIČKU ANALIZU

TAKSONI	GEOGRAFSKO POREKLO	OZNAKA	REFERENCA
<i>Lycopus americanus</i> Muhl. ex W.P.C. Barton	SAD	Lycame-B	Lawrence, 1989
<i>Lycopus europaeus</i> L.	Srbija	Lyceur-1A	naši rezultati
	Srbija	Lyceur-2A	naši rezultati
	SAD	Lyceur-B	Lawrence, 1989
<i>Lycopus exaltatus</i> L.f.	Srbija	Lycexa-1A	naši rezultati
	Nemačka	Lycexa-2A	naši rezultati
	SAD	Lycexa-B	Lawrence, 1989
<i>Lycopus lucidus</i> Turcz. ex Benth.	Južna Koreja	Lycluc-1	Yang i Lee, 2012
<i>Lycopus lucidus</i> Turcz. var. <i>hirtus</i> Regel	Kina	Lycluc-2	Yu et al., 2011
<i>Lycopus uniflorus</i> Michx.	SAD	Lycuni-B	Lawrence, 1989
<i>Lycopus virginicus</i> L.	SAD	Lycvir-B	Lawrence, 1989

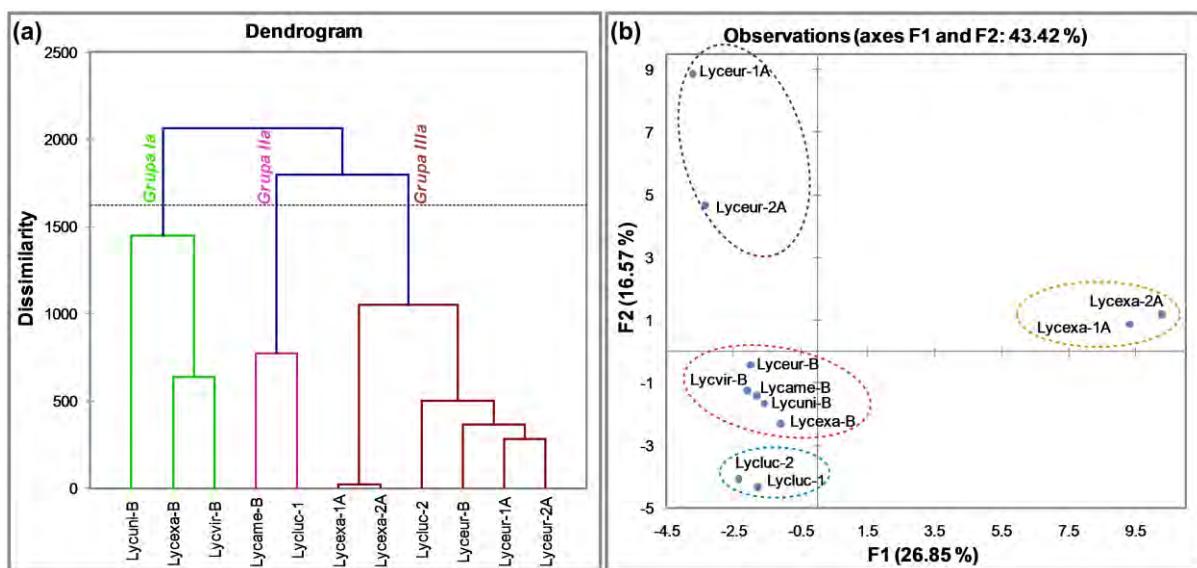
## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

Rezultati uporedne statističke analize hemijskog sastava etarskih ulja biljnih vrsta roda *Lycopus* u kojoj su kao varijable korišćeni procentualni sadržaji sastojaka (> 1%; AHC-a i PCA-a) prikazani su na slici 5.23. Dendogram (slika 5.23a), dobijen kao rezultat klaster analize, ukazuje na postojanje tri različite grupe. Najbrojnija je bila grupa IIIa, čija su se ulja odlikovala relativno visokim sadržajem (*E*-β-kariofilena (82) i kariofilen-oksida (83). U okviru ove grupe moglo se uočiti i dodatno grupisanje čiji je osnovni parametar prisustvo ili odsustvo 3,4-dihidroksistirena (187). Prvu podgrupu činila su dva etarska ulja biljne vrste *L. exaltatus* analizirana u ovom radu, u kojima je jedinjenje (187) bilo identifikovano kao glavni sastojak, dok drugu podgrupu su činila sva tri ulja vrste *L. europaeus* i jedno od ulja vrste *L. lucidus* (Lycluc-2). Ovo pozicioniranje uzorka Lycluc-2 blisko uljima vrste *L. europaeus* je u skladu sa već pomenutim infrageneričkim odnosima ovog roda na osnovu morfoloških karakteristika oraščića, po kojоj ove dve vrste čine nezavisnu sekciju (tabela 5.10). Međutim, drugi uzorak vrste *L. lucidus* (Lycluc-1) je, zajedno sa uljem vrste *L. americanus*, izdvojen u zasebnu grupu IIa usled znatno većeg udela 1-okten-3-ola (64) u ulju nego što je to slučaj kod ostalih testiranih vrsta ovog roda. Ovo razdvajanje uzorka ulja vrste *L. lucidus* bi se moglo objasniti činjenicom da su dobijena iz dva različita varijeteta ove biljne vrste (tabela 5.11). Etarsko ulje *L. exaltatus* (Lycexa-B) čiji je sastav prethodno publikovan od strane Lorenza (Lawrence, 1989), a za koje smo već istakli da mu se sastav veoma razlikuje od etarskih ulja iste biljne vrste koja su analizirana u ovom radu (Lycexa-1 i Lycexa-2), formira grupu Ia zajedno sa uljima vrsta *L. uniflorus* i *L. virginicus*. Za ova tri ulja iz grupe Ia karakterističan je visok sadržaj monoterpena, posebno α- i β-pinena (74 i 89). Kao što je već naglašeno (sekcija 5.2.1) uočena razlika u sastavu etarskih ulja vrste *L. exaltatus* mogla bi biti posledica ekološko-geografskih faktora, a zanimljivo je i to da se uzorak Lycexa-B, dobijen iz populacije ove vrste koja je uザgajana van svog prirodnog staništa, u Severnoj Americi, grupisao zajedno sa uljima dve *Lycopus* vrste čije je prirodno stanište upravo Severna Amerika.

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*



**SLIKA 5.23.** REZULTATI AHC (a, DENDROGRAM) I PCA (b, BI PLOT) ANALIZA HEMIJSKOG SASTAVA ETARSKIH ULJA BILJNIH VRSTA RODA *LYCOPUS* KADA SU KAO VARIJABLE KORIŠĆENI SASTOJCI ČIJI JE PROCENTUALNI SADRŽAJI BIO VEĆI OD 1%

Rezultati PCA-a analize su značajno drugačiji u odnosu na rezultate AHC-a analize.\$\$\$\$ Na grafikonu (*biplot*, glavne komponente F1 i F2) prikazanom na slici 5.23b uočava se grupisanje uzoraka ulja vrste *L. europaeus*, koji su analizirani u ovom radu, u gornjem levom (obeleženi ljubičastom bojom), odnosno ulja vrste *L. exaltatus*, u gornjem desnom (obeleženi narandžastom bojom) kvadrantu, kao i blisko pozicioniranje oba uzorka vrste *L. lucidus* u donjem levom kvadrantu (obeleženi plavom bojom). Pored ova dva ulja vrste *L. lucidus* u donjem levom kvadrantu su smeštена i sva ostala anaizirana ulja ovog roda, a među njima i po jedan uzorak ulja vrsta *L. europaeus* i *L. exaltatus*. Ovakav ishod PCA-a analize, posebno grupisanje uzoraka, obeleženih crvenom bojom na slici 5.23b, može se protumačiti dvojako: (i) da je pomenuti uticaj ekološko-geografskih faktora na sastav etarskih ulja veoma izražen, pa su ulja dobijena iz populacija biljnih vrsta sa evropskog kontinenta okarakterisana pozitivnom vrednošću druge glave komponente F2, dok negativnu vrednost komponente F2 imaju ona dobijena iz populacija sa severno-američkog kontinenta i iz istočne Azije; ili (ii) da je kod grupe ulja koja su obeležena crvenom bojom presudan uticaj eksperimentatora.\*\*\*\*\* Imajući u vidu da je druga glavna komponenta F2 pokazivala najveći

\$\$\$\$ Usled velikog broja varijabli spram broja uzoraka glavne komponente F1 i F2 objašnjavaju oko 43% varijabilnosti svih uzoraka. Najpouzdanija klasifikacija se dobija kada zbir vrednosti komponenti F1 i F2 veći od 60%.

\*\*\*\*\* I ranije je primećeno da je često sastav etarskog ulja koje ispitivala jedna grupa istraživača najsličniji sastavu drugih etarskih ulja koja je ispitivala ta grupa.

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

stepen korelacije (0,919) sa sadr̄ajem (*Z*)-3-heksen-1-ola u uljima, prisustvo ovog jedinjenja kod uzoraka Lyceur-1A, Lyceur-2A, Lycexa-1A i Lycexa-2A, odnosno njegovo odsustvo kod svih ostalih ulja je osnova ovog razdvajanja. U prilog prepostavci *i* ide i ĉinjenica da su se i ulja populacija vrsta *L. exaltatus* i *L. europaeus*, koje su predstavnici roda *Lycopus* u flori Evrope, a koje su donete na severno-američki kontinent, grupisala zajedno sa uljima drugih vrsta ovog roda nativnih za ovaj kontinent. Naime, kao što je već napomenuto, poznato je da su biljne vrste roda *Lycopus* veoma varijabilne u pogledu pojedinih vegetativnih karakteristika što je dovelo do teškoća u njihovoj karakterizaciji i do klasifikacije kao zasebnih vrsta većeg broja nižih formi, poput varijeteta, koje su se prividno razlikovale od već prihvaćenih vrsta i naseljavale veoma uska geografska područja (Hederson, 1962). Pored toga sekundarni metabolizam biljaka se može značajno promeniti usled abiotičkog stresa (npr. promene temperature, dužine osvetljenosti, nadmorske visine, sastava zemljišta itd.), a posebno su tome podložni isparljivi metaboliti za koje se smatra da su jedni od glavnih vidova komunikacije između biljaka (Petinatti Pavarini et al., 2012). Stoga se, osim na varijabilnost vegetativnih karakteristika pripadnika roda *Lycopus*, sličan uticaj ekološko-geografskih faktora jednako može očekivati i na biosintezu sekundarnih metabolita, a što se može ispoljiti kroz hemijski sastav etarskih ulja. Međutim, ne može se zanemariti ni ĉinjenica da je sastav ulja vrsta *Lycopus*, koja su obeležena crvenom bojom na slici 5.23b, određen od strane istog naučnog tima (Lawrence, 1989), pre više od 25 godina, i da su kod nekih ulja, poput Lyceur-B i Lycame-B, identifikovani sastojci činili svega 60-70% ovih ulja, a da su kod nekih ulja, poput Lycexa-B, samo delimično rasvetljene strukture za neke od glavnih sastojaka (npr. za jedinjenje 97 u tabeli 3.4 određeno je samo da pripada određenoj grupi seskviterpena, kao i stepen nezasićenja).

Na slici 5.24 prikazani su rezultati uporedne statističke analize sastava etarskih ulja vrsta roda *Lycopus* u kojoj su kao varijable korišćene sume procenata posebnih klasa jedinjenja (AHC-*b* i PCA-*b*). Ukoliko je pri analizi sastava ovih etarskih ulja neki od sastojaka i pogrešno identifikovan i dalje postoji velika verovatnoća da je klasa kojoj ovo jedinjenje pripada tačno određena (na osnovu fragmentacije u masenom spektru i vrednosti  $R_t$  ili RI), pa bi se moglo reći da je ovaj tip statističke analize manje podložan eksperimentalnim greškama. Rezultati AHC-*b* analize, poput onih dobijenih nakon AHC-*a* analize, ukazuju na postojanje tri različite grupe, ali je međusobno pozicioniranje uzoraka etarskih ulja sada drugačije. Grupu IIa čine samo dva uzoka, Lycvir-B i Lycuni-B, koje odlikuje znatno veći

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

udeo monoterpena u ulju u odnosu na ostale testirane uzorke, a ove dve vrste su, takođe smeštene u istu sekciju na osnovu morfoloških karakteristika oraščića (*grupa I*, tabela 5.10). Sva tri uzorka ulja biljne vrste *L. europaeus* i po jedan od uzoraka ulja *L. lucidus* (Lycluc-2) i *L. exaltatus* (Lycexa-B) činila su *grupu IIIb* za koju je bilo karakteristično da je procentualni sadržaj seskviterpena u uljima veći od 50%. U preostalim uljima, Lycexa-1A, Lycexa-2A, Lycluc-1 i Lycame-B, dominirala su jedinjenja izvedena iz metabolizma masnih kiselina i iz šikimatnog biosintetskog puta, a ona su formirala *grupu IIb*. Vrste *L. exaltatus* i *L. americanus*, takođe su svrstane u istu sekciju na osnovu morfoloških karakteristika oraščića i pomenuto blisko pozicioniranje njihovih etarskih ulja na dendogramu prikazanom na slici 5.24a dodatno podržava ovu infrageneričku klasifikaciju (grupa IV, tabela 5.10). Zanimljivo je da se jedan od uzoraka ulja vrste *L. lucidus* (Lycluc-2) locirao blisko uzorcima ulja vrste *L. europaeus* sa kojom vrsta *L. lucidus* ima veoma slične morfološke karakteristike oraščića (grupa II, tabela 5.10), dok se drugi uzorak ove vrste (Lycluc-1) grupisao zajedno sa uljima vrste *L. exaltatus* sa kojom joj je zajednička produkcija triterpenskih kiselina oleanskog i ursanskog skeleta. Kao što je već ranije pomenuto ova dva ulja su poreklom iz različitih varijeteta biljne vrste *L. lucidus*.

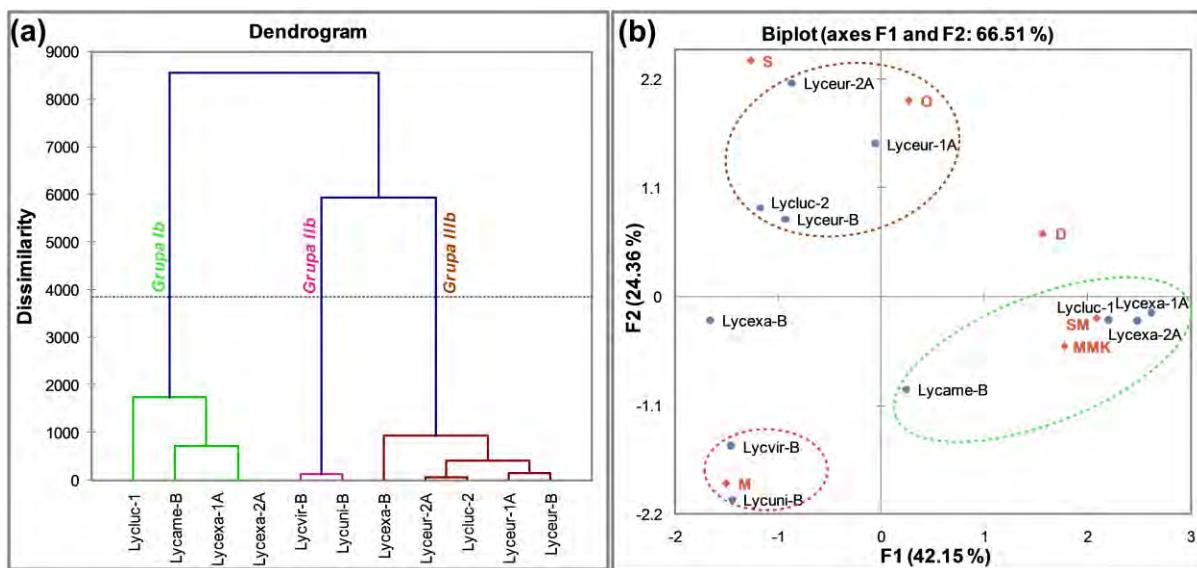
Rezultati PCA-*b* analize su veoma slični rezultatima AHC-*b* analize. Na grafikonu prikazanom na slici 5.24b može se jasno videti da je *grupa Ib* zauzimala desni donji kvadrant dok je *grupa IIIb*, bez uzorka Lycexa-B, zauzimala levi donji kvadrant. Pomenuti uzorak Lycexa-B je bio odvojen od *grupe IIIb* i nalazio se u levom donjem kvadrantu zajedno sa uljima Lycuni-B i Lycvir-B (*grupa IIb*), a njegovo ne svrstavanje u *grupu Ib*, zajedno sa ostalim uzorcima ulja ove biljne vrste, najverovatnije je posledica ekološko-geografskih faktora. Međutim, sva ulja vrste *L. exaltatus* i dalje pokazuju određenu sličnost koja se ogleda u negativnoj vrednosti druge glavne komponente. Za razliku od rezultata PCA analize kada su kao varijable korišćeni procentualni sadržaji pojedinačnih sastojaka, pri ovoj PCA analizi ne dolazi do grupisanja etarskih ulja čiji je sastav analizirao isti naučni tim, odnosno može se reći da se eventualni uticaj greške eksperimentatora može izbeći, ili smanjiti, ukoliko se kao varijable koriste sume procenata klase jedinjenja. Takođe, pri ovoj PCA analizi znatno je manje vidljiv i uticaj ekološko-geografskih parametara na grupisanje uzorka.

Grupisanje etarskih ulja vrsta roda *Lycopus* dobijeno kao rezultat ACH i PCA analiza u kojima su kao varijable korišćene korišćene sume procenata klase jedinjenja u velikoj meri je u skladu sa predloženom podelom ovog roda na sekcije koja je izvršena na osnovu

## **REZULTATI I DISKUSIJA**

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

morfoloških karakteristika oraščića (tabela 5.10; Moon i Hong, 2006). Takođe iako se vrsta *L. lucidus* sa morfološkog aspekta smatra srodnom vrsti *L. europaeus*, ova biljna vrsta je hemotaksonomski gledano (na osnovu isparljivih i neisparljivih sekundarnih metabolita koje produkuje) bliska i sa vrstom *L. exaltatus*.



**SLIKA 5.24.** REZULTATI AHC (a, DENDOGRAM) I PCA (b, BIPILOT) ANALIZA HEMIJSKOG SASTAVA ETARSKIH ULJA BILJNIH VRSTA RODA *LYCOPUS* KADA SU KAO VARIJABLE KORIŠĆENE SUME PROCENATA KLASA JEDINJENJA (MONOTERPENI (M), SESKVITERPENI (S), DITERPENI (D), JEDINJENJA IZVEDENA IZ ŠKIMATNOG PUTA (SM), JEDINJENJA IZVEDENA IZ METABOLIZMA MASNIH KISELINA (MMK) I OSTALO (O) – KAO ŠESTA KLASA)

### 5.3. SEKUNDARNI METABOLITI BILJNE VRSTE *I. HELENIUM L.*

#### 5.3.1. IDENTIFIKACIJA I POTVRDA STRUKTURE 3-METIL-2-ALKANONA SINTEZOM

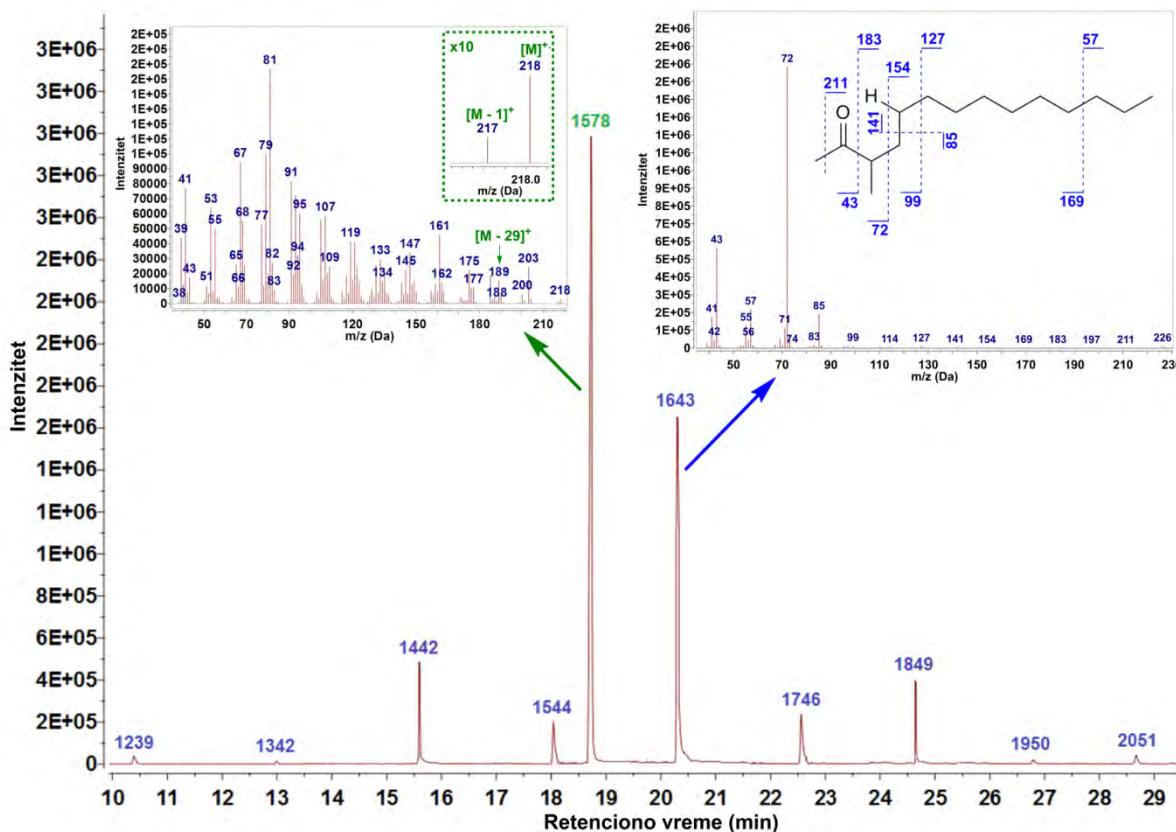
U poslednjih nekoliko godina u okviru „OSA” istraživačke grupe, na Departmanu za hemiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, sprovedena su ekstenzivna istraživanja čiji su predmet bili isparljivi sekundarni metaboliti biljne vrste *Inula helenium* L. i njihova biološka aktivnost. Do sada je utvrđeno da je etarsko ulje korena ove vrste izrazito aktivno prema bakteriji *Staphylococcus aureus* i da ono svoje baktericidno dejstvo ispoljava putem oštećenja ćelijske membrane. Pored toga, hromatografsko razdvajanje ulja (i ispitivanje aktivnosti dobijenih frakcija) otkrilo je da su seskviterpenski laktoni (98, 109 i 111, slika 3.12) glavni nosioci aktivnosti. Takođe omogućilo je detekciju (i identifikaciju) dodatnih malozastupljenih sastojaka koji nisu bili detektovani pri GC i GC-MS analizi nefrakcionisanog etarskog ulja (Stojanović-Radić et al., 2012). Činjenica da je frakcija najbogatija diplofilinom (111) ujedno i u najvećoj meri inibirala rast ovog mikroorganizma ( $MIC = 0,2 \mu\text{g/ml}$ ) ukazivala je na to da je ovaj seskviterpenski lakton aktivniji u odnosu na preostala dva, a konformacionom analizom je pokazano da je uočena razlika u aktivnosti najverovatnije posledica sterne zaklonjenosti  $\alpha,\beta$ -nezasićenog karbonilnog sistem aksijalnom metil grupom u položaju 14 kod alantolaktona (98) i izoalantolaktona (109) (slika 3.15) (Blagojević i Radulović, 2012). Takođe kako su i prozvodi dobijeni nakon hemijskih modifikacija ovih seskviterpenskih laktona i dalje posedovali antistafilokokalno dejstvo, zaključeno je da za ispoljavanje istog nije isključivo neophodan pomenuti  $\alpha,\beta$ -nezasićeni karbonilni sistem (Stojanović-Radić et al., 2012).

Međutim, hemijski sastav još jedne frakcije sa izuzetno niskom MIC vrednošću ( $0,8 \mu\text{g/ml}$ ) je ostao nepoznat. Glavni sastojak ove malozastupljene frakcije (3,5%) je bio seskviterpenski aldehid (R), za koji je pretpostavljeno da najverovatnije poseduje germakranski skelet na osnovu uočene fragmentacije u masenom spektru, zajednom sa još devet jedinjenja (S<sub>1-9</sub>) koja su pokazivala pravilnost pri eluiranju sa GC kolone i analogiju u masenim spektrima (slika 5.25). Naime, fragmentacija u masenim spektrima ovih jedinjenja, prevashodno osnovni jon na  $m/z$  72, koji najverovatnije nastaje Meklafertijevim (McLafferty) premeštanjem, i intenzivan jon na  $m/z$  43, koji odgovara acetil fragmentu, nagoveštavao je da

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

je moć da reč o 3-metil-2-alkanonima (Francke, 2010). Razlika od 14 amu (jedna CH<sub>2</sub> grupa) između molekulske jone dva uzastopna jedinjenja iz ove grupe u gasnom hromatogramu, razdvojenih sa *ca.* 100 RI jedinica, ukazivala je na postojanje C<sub>11</sub>–C<sub>19</sub> homologe serije ovih jedinjenja. Načlost, u literaturi nisu bile dostupne vrednosti retencionih indeksa za ova jedinjenja. Postojanje dodatna metil račve u molekulu je isključeno na osnovu vrednosti razlike retencionih indeksa za izomere: 2-tridekanon i 6,10-dimetil-2-undekanon. Naime, retencioni indeks za 6,10-dimetil-2-undekanon je za 90 jedinica niži u odnosu na njegov neračvasti izomer 2-tridekanon, a posledica je postojanja dve metil račve (Setzer et al., 2005; Wang et al., 2006). Kako je vrednost retencionog indeksa jedinjenja za koje smo prepostavili da je 3-metil-2-dodekanon bila niža u odnosu na onu za izomer normalnog niza, 2-tridekanon, za svega pedesetak jedinica, mogla se odbaciti mogućnost postojanja dodatne metil račve kod jedinjenja S<sub>1–9</sub> detektovanih u frakciji etarskog ulja korena *I. helenium*.



**SLIKA 5.25.** TIC HROMATOGRAM FRAKCIJE ETARSKOG ULJA KORENA *I. HELENIUM* (5% DIETIL-ETAR U HEKSANU) NA KOME SE VIDE PIKOVI KOJI ODOGOVARAJU SESKVITERPENSKOM ALDEHIDU **R** (RI = 1578) I 3-METIL-2 ALKANONIMA **S<sub>1–9</sub>**. PRIKAZANI SU I MASENI SPEKTRI ALDEHIDA **R** I 3-METIL-2-TETRADEKANONA (**S<sub>5</sub>**)

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

Detaljnim pregledom literature utvrđeno je da se 3-metil-2-alkanoni dugog lanca veoma retko javljaju kao sastojci uzoraka prirodnog porekla, i da do sada nikada nisu identifikovani kao biljni metaboliti. 3-Metil-2-dekanon je nađen u izlučevini kojom mušjak Bengalskog tigra, *Panthera tigris*, vrši obeležavanje svoje teritorije (Burger et al., 2008), dok su ovo jedinjenje i njegov homolog (3-metil-2-undekanon) detektovani u normalnom urinu vuka, *Canis lupus* (Raymer et al., 1986). Tri homologa nešto dužeg ugljovodoničnog lanca, 3-metil-2-tridecanon, 3-metil-2-tetradekanon i 3-metil-2-pentadekanon, ulaze u sastav sekreta koji luče Duforove tleze kod vrste saharskih pustinjskih mrava, *Cataglyphis bicolor* (Gökçen et al., 2002). Motivisani ovim zanimljivim prirodnim poreklom 3-metil-2-alkanona i njihovom krajnje ograničenom i specifičnom rasprostranjenosću u prirodi, odlučili smo da potvrdimo pretpostavljeni identitet jedinjenja **S<sub>1-9</sub>**, koja bi ujedno predstavljala potpuno nove metabolite nađene u biljnoj vrsti *I. helenium*, porečnjem njihovih hromatografskih i spektralnih osobina sa osobinama odgovarajućih sintetskih 3-metil-2-alkanona. Izolovanje ovih metabolita bilo je praktično nemoguće zbog njihovog malog sadržaja i međusobne sličnosti, kao i složenosti matriksa frakcije u kojoj se nalaze,<sup>†††††</sup> dok bi nam njihova sinteza omogućila da ispitamo i u kojoj meri ova jedinjenja doprinose jakom antistafilokokalnom dejstvu pomenute frakcije.

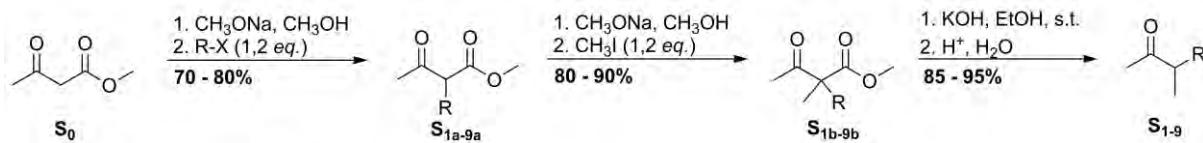
Kao polazno jedinjenje u sintezi 3-metil-2-alkanona **S<sub>1-9</sub>** korišćen je komercijalno dostupni metil-acetoacetat (**S<sub>0</sub>**). Prvi korak u sintezi je bilo bazno-katalizovano alkilovanje β-ketoestra **S<sub>0</sub>** odgovarajućim alkil-halogenidom, a dobijeni proizvodi **S<sub>1a-9a</sub>** su zatim metilovani na potpuno analogan način. Hidrolizom i dekarboksilacijom proizvoda metilovanja **S<sub>1b-9b</sub>** dobijeni su ciljni 3-metil-2-alkanoni **S<sub>1-9</sub>** (slika 5.26). Ukupni prinos 3-metil-2-alkanona **S<sub>1-9</sub>** bio je 50-65%. Svi sintetisani 3-metil-2-alkanoni su detaljno spektralno okarakterisani (<sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C-NMR, IR, MS). Fragmentacija sintetisanih 3-metil-2-alkanona u EI-MS spektru slagala se sa fragmentacijom jedinjenja iz frakcije etarskog ulja korena biljne vrste *I. helenium*, za koje se pretpostavljalо da predstavljaju C<sub>11</sub>-C<sub>19</sub> deo homologe serije 3-metil-2-alkanona. Radi potpune potvrde da se radi o istim jedinjenjima izvršeno je koinjektiranje svih sintetisanih 3-metil-2-alkanona sa pomenutom frakcijom etarskog ulja, a porast intenziteta odgovarajućih pikova u gasnom hromatogramu nesumnjivo je potvrdio da je reč o C<sub>11</sub>-C<sub>19</sub> seriji 3-metil-2-alkanona **S<sub>1-9</sub>**, čime je njihovo prisustvo u biljnom carstvu

<sup>†††††</sup> Bilo nam je dostupno svega 70 mg ove frakcije koju je činilo više od 10 sastojaka.

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

dokazano po prvi put. Pored toga, neophodno je istaći da četiri homologa ( $C_{13}$ ,  $C_{17}$ – $C_{19}$ ) predstavljaju i nove prirodne proizvode.



$R = C_nH_{2n+1}$ , od  $n = 7$  do  $n = 15$

$X = I$  ili  $Br$

**SLIKA 5.26.** SINTEZA 3-METIL-2-ALKANONA ( $S_{1-9}$ )

### 5.3.2. ODREĐIVANJE SADRŽAJA 3-METIL-2-ALKANONA U KORENU BILJNE VRSTE *I. HELENIUM*

U cilju određivanja sadržaja ovih jedinjenja u biljnom materijalu konstruisane su GC-FID kalibracione prave za sve sintetisane 3-metil-2-alkanone  $S_{1-9}$ . Na primer, kalibraciona prava dobijena za 3-metil-2-oktadekanon,  $C = 1,3285 \times 10^{-4}A + 5,0526 \times 10^{-3}$ , imala je izuzetno dobar koeficijent korelacije  $R^2 = 0,99989$  ( $C$  je koncentracija u mg/ml, a  $A$  je površina ispod pika). Za sve ostale 3-metil-2-alkanone dobijene su uporedive kalibracione prave sa sličnim odgovorom detektora. Sadržaj 3-metil-2-alkanona, određen na osnovu ovih kalibracionih prava, bio je u osugu od 0,08 do 24,2 mg na 100 g suvog korena biljne vrste *I. helenium* (tabela 5.12).

**TABELA 5.12.** GC-FID KALIBRACIONI OPSEG, JEDNAČINA KALIBRACIONE PRAVE, KOEFICIJENT KORELACIJE I REZULTATI KVANTITATIVNE ANALIZE ZA SVAKI POJEDINAČNI 3-METIL-2-ALKANON

OZNAKA	NAZIV JEDINJENJA	KALIBRACIONI OPSEG [mg/ml]	JEDNAČINA KALIBRACIONE KRIVE	$R^{2i}$	SADRŽAJ <sup>ii</sup>
$S_1$	3-Metil-2-dekanon		$C = 1,3807 \times 10^{-4}A + 5,0699 \times 10^{-3}$	0,9997	0,32
$S_2$	3-Metil-2-undekanon		$C = 1,3690 \times 10^{-4}A + 5,0678 \times 10^{-3}$	0,9997	0,21
$S_3$	3-Metil-2-dodekanon		$C = 1,3579 \times 10^{-4}A + 5,0626 \times 10^{-3}$	0,9998	5,1
$S_4$	3-Metil-2-tridekanon		$C = 1,3542 \times 10^{-4}A + 5,0606 \times 10^{-3}$	0,9999	2,1
$S_5$	3-Metil-2-tetradekanon	0,009–0,9	$C = 1,3436 \times 10^{-4}A + 5,0595 \times 10^{-3}$	0,9999	24,2
$S_6$	3-Metil-2-pentadekanon		$C = 1,3379 \times 10^{-4}A + 5,0566 \times 10^{-3}$	0,9997	2,5
$S_7$	3-Metil-2-heksadekanon		$C = 1,3336 \times 10^{-4}A + 5,0544 \times 10^{-3}$	0,9998	4,5
$S_8$	3-Metil-2-heptadekanon		$C = 1,3379 \times 10^{-4}A + 5,0531 \times 10^{-3}$	0,9999	0,08
$S_9$	3-Metil-2-oktadekanon		$C = 1,3285 \times 10^{-4}A + 5,0526 \times 10^{-3}$	0,9999	0,54

<sup>i</sup> koeficijent korelacije;

<sup>ii</sup> miligramma na 100 g suvog korena.

### 5.3.3. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST 3-METIL-2-ALKANONA

Za jedan od ciljeva ovog istraživanja postavljeno je i utvrđivanje moguće biološke funkcije ovih retkih sekundarnih metabolita. Stoga je određen doprinos 3-metil-2-alkanona ( $S_{1-9}$ ) ukupnoj antimikrobnoj aktivnosti frakcije etarskog ulja korena *I. helenium*, u kojoj su detektovani, pomoću mikrodilucione metode. Testiranje je vršeno na šest patogenih sojeva bakterija i dva soja gljivica (tabela 5.13), pri čemu je izbor ovih mikroorganizama izvršen na osnovu sledeća dva kriterijuma: (i) da je prethodno utvrđeno da etarsko ulje *I. helenium* pokazuje aktivnost prema datom, ili srodnom, soju patogenih (prema ljudima) bakterija ili gljivica (Deriu et al., 2008; Stojanović-Radić et al., 2012) i/ili (ii) da ovi mikroorganizmi mogu nastanjavati i zemljište čime bi predstavljali moguće direktnе patogene ove biljne vrste (npr. *Aspergillus niger*, Staib et al., 1978). Dobijeni rezultati su bili pomalo iznenajući jer je utvrđeno da 3-metil-2-alkanoni nisu bili aktivni prema bakteriji *S. aureus* pri ispitivanim koncentracijama ( $MIC \leq 37,0$  mg/ml), odnosno da su pokazali izrazitu selektivnost prema samo jednom kvascu - *Candida albicans* ( $MIC = 3,7$  mg/ml, tabela 5.13). Imajući u vidu rezultate ovog mikrobiološkog testiranja moglo bi se reći da aktivnost pomenute frakcije etarskog ulja korena *I. helenium* prema bakteriji *S. aureus* potiče od još uvek neidentifikovanog seskviterpenskog aldehida (Stojanović-Radić et al., 2012), a da uočena selektivnost 3-metil-2-alkanona ka soju *C. albicans* (gljivici koja se može naći i u zemljištu (Hube, 2004; Marples, 1966)) ukazuje na to da ova jedinjenja mogu učestvovati u odbrani ove biljke od napada ovog konkretnog patogena. Data pretpostavka o zaštitnoj ulozi je podržana i rezultatima nekih ranijih istraživanja koji su dobijeni za strukturno veoma srodnja jedinjenja. Na primer, nađeno je da su 2-alkanoni srednje dužine lanca ( $C_7-C_{15}$ ) veoma efikasni u zaštiti biljaka od herbivora, npr. moljaca (*Manduca sexta* L. i *Heliothis zea* Boddie; Fridman et al., 2005). Pored toga, nedavno je utvrđeno da je etarsko ulje biljne vrste *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae) aktivno protiv nekih vrsta nematoda, poput *Meloidogyne incognita* i *Meloidogyne javanica*, koji napadaju koren biljaka, a individualno najaktivniji sastojak ovog ulja je bio 2-undekanon (Ntalli et al., 2011). Takođe, utvrđeno je da 2-alkanoni normalnog niza ( $C_{10}-C_{12}$ ) prisutni u isparljivoj smoli koja se izlučuje na stablu biljne vrste *Commiphora rostrata* (Burseraceae) pokazuju značajnu antifungalnu aktivnost protiv većeg broja vrsta rodova *Aspergillus* i *Penicillium* pri koncentraciji od 5000 ppm i stoga je pretpostavljeno da ova jedinjenja mogu imati značajnu ulogu u odbrani ove biljne vrste od patogenih mikroorganizma (McDowell et al., 1988).

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

**TABELA 5.13.** ANTIMIKROBNA AKTIVNOST 3-METIL-2-ALKANONA (**S<sub>1-9</sub>**)

GLJIVICA		JEDINJENJE <sup>i</sup>									NISTATIN (mg/ml) <sup>ii</sup>
		S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>9</sub>	
<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	3,70	3,70	3,70	3,70	3,70	3,70	3,70	3,70	3,70	0,78

<sup>i</sup> nijedan od 3-metil-2-alkanona (**S<sub>1-9</sub>**) nije bio aktivan, pri testiranim koncentracijama, prema sojevima *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 9139, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Proteus vulgaris* ATCC 8427, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 i *Aspergillus niger* ATCC 16404;

<sup>ii</sup> MIC – minimalna inhibitorna koncentracija.

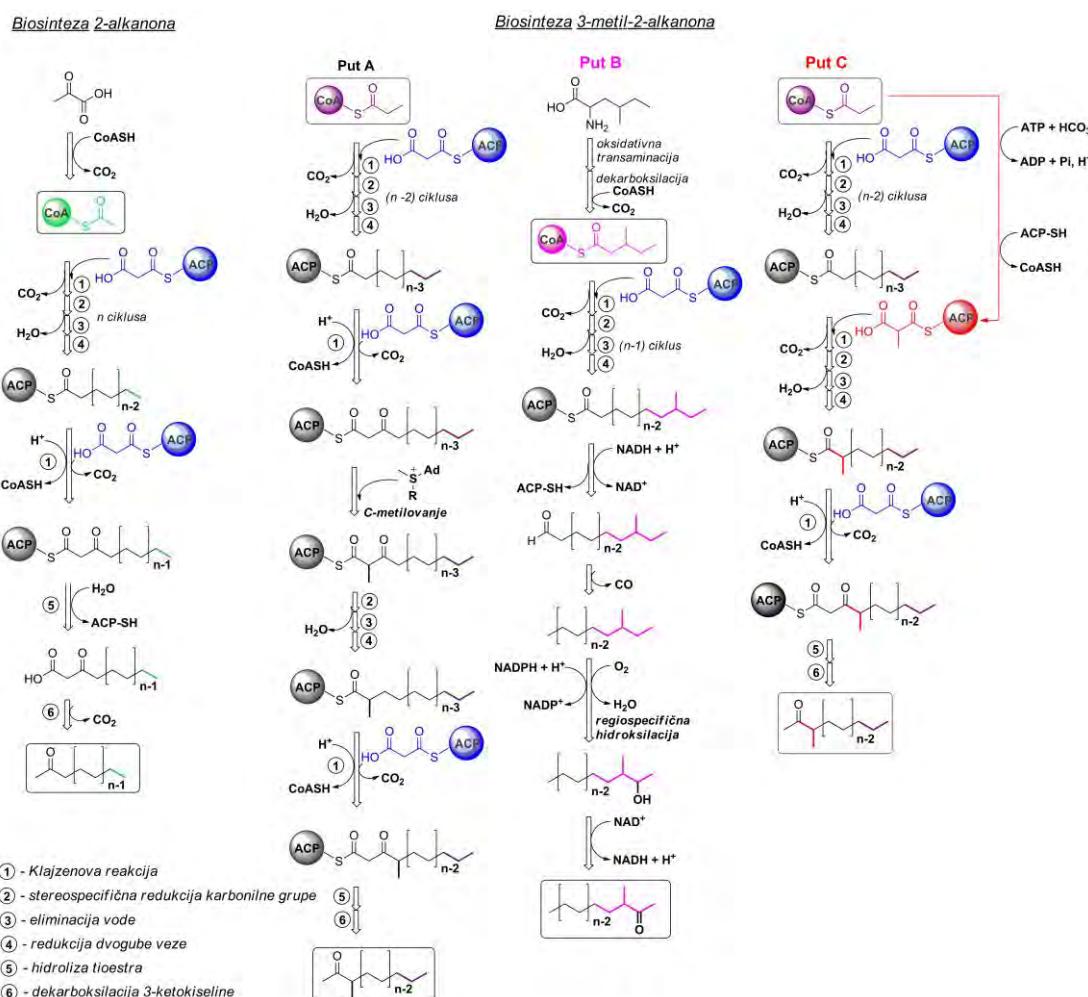
### 5.3.4. GAUSOVA RASPODELA 3-METIL-2-ALKANONA I RAZMATRANJE BIOSINTEZE OVIH JEDINJENJA

Na slici 5.25 se može uočiti da je i kod 3-metil-2-alkanona (**S<sub>1-9</sub>**), načenih u frakciji etarskog ulja korena biljne vrste *I. helenium*, sadržaj homologa sa neparnim brojem C-atoma u ugljovodoničnom nizu veći u odnosu na one sa parnim. Ova raspodela 3-metil-2-alkanona (**S<sub>1-9</sub>**) se može opisati vrednostima ACL = 14,94 i CPI = 9,96, pri čemu je dobijena vrednost ugljeničnog preferencijalnog indeksa izuzetno visoka. Slična distribucija, u kojoj dominiraju homolozi sa neparnim brojem C-atoma, je karakteristična i za 2-alkanone normalnog niza koji su prethodno detektovani kao metaboliti biljaka i nekih drugih organizama. Na osnovu ovakve distribucije je prvo pretpostavljeno, a kasnije i dokazano, da se biosinteza 2-alkanona odvija acetatnim biosintetskim putem (Fridman et al., 2005). Načeno je da u poslednjem ciklusu elongacije umesto redukcije karbonilne grupe u 3-ketoacil-ACP intermedijeru dolazi do hidrolize tioestarske veze i dekarboksilacije nastale 3-ketokiseline pri čemu nastaju 2-alkanoni (slika 5.27; Auldrige et al., 2012). Imajući u vidu da su 2-alkanoni i 3-metil-2-alkanoni konstitucioni izomeri i da pokazuju veoma sličnu raspodelu sadržaja neparnih i parnih homologa, može se pretpostaviti da i biosinteza 3-metil-2-alkanona protiće na analogan način kao kod 2-alkanona. Mečutum, uvočenje metil račve kod 3-metil-2-alkanona zahteva neke dodatne korake u biosintezi. Do sada je, kod prirodnih proizvoda koji prevashodno nastaju acetatnim biosintetskim putem, načeno da dodatna metil račva može biti uvedena na rastući poliketidni niz na tri različita načina: (i) metilovanjem β-ketoestra pomoću odgovarajućeg prirodnog elektrofila poput *S*-adenozilmitionina (Dewick, 2002); (ii) pomoću startera koji već poseduje metil račvu u odgovarajućem položaju (Youping et al., 2010); ili (ii) dodatkom metilmalonil-CoA umesto malonil-CoA u tačno određenom ciklusu elongacije

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

(Chase et al., 1992). Stoga se mogu zamisliti barem tri različita biosintetska puta (A-C) koji vode do 3-metil-2-alkanona, a oni su prikazani na slici 5.27. Biostintetski putevi A i C polaze od istog startnog molekula propionil-CoA. U biosintetskom putu C metil račva se uvodi u pretposlednjem ciklusu elongacije pomoću metilmalonil-CoA, dok u biosintetskom putu A postoji samo jedan dodatni korak C-metilovanja koji prethodi krajnjoj Klajzenovoj reakciji, hidrolizi tioestra i dekarboksilaciji. Biosintetski put B se najviše razlikuje, u odnosu na dva prethodno opisana, jer metil grupa u položaju 3 potiče od odgovarajućeg startera C<sub>6</sub>-3-metilpentanoil-CoA (koji bi mogao da nastane iz homoizoleucina) dok se keto grupa u položaju 2 uvodi naknadno regiospecifičnom hidroksilacijom *anteizo*-alkana sa neparnim brojem C-atoma u nizu i oksidacijom nastalog alkohola (Chase et al., 1992).



**SLIKA 5.27.** PREDLOŽENIM BIOSINTSKI PUTEVI KOJIM MOGU DA NASTANU 2-ALKANONI (AULDIDGE ET AL., 2012; FRIDMAN ET AL., 2005) I 3-METIL-2-ALKANONI SA NEPARNIM BROJEM C-ATOMA U NIZU \*\*\*\*\*

\*\*\*\*\* Koraci u biosintezi, označeni brojevima od 1 do 4, su detaljnije prikazani na slici 5.3.

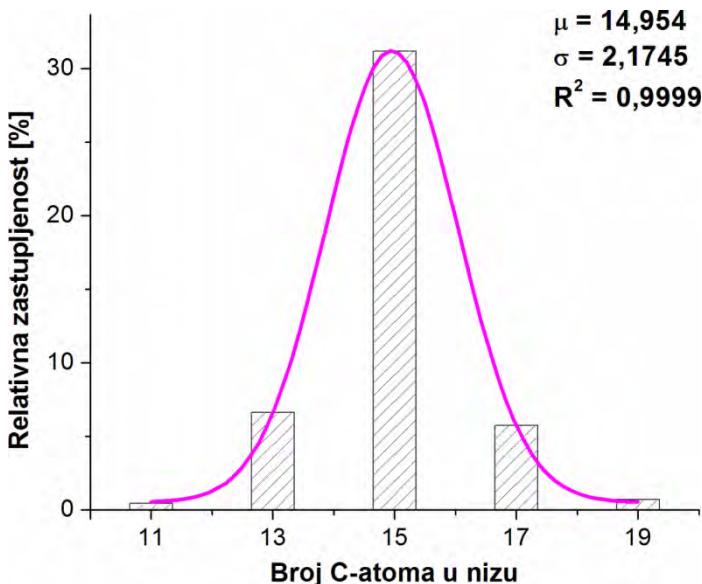
## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

Još jedna ĉinjenica koja ide u prilog prepostavci da se biosinteza 3-metil-2-alkanona (**S<sub>1-9</sub>**) odvija acetatnim putem je Gausova raspodela njihovih relativnih sadržaja koja je prikazana na slici 5.28. Sličnu raspodelu smo prethodno uočili i kod epikutikularnih (*n*-, *iso*- i *anteizo*-) alkana plodova biljne vrste *L. europaeus* kada smo prepostavili da ove normalne raspodele reflektuju rad enzimskog sistema elongaze i da parametar  $\mu$  odgovara dužini "idealne" masne kiseline koju bi ovaj enzimski sistem trebalo da biosintetiše, dok parametar  $\zeta$  predstavlja njegovu grešku pri biosintezi. Pored toga, utvrdili smo da se vrednosti parametara  $\mu$  i  $\zeta$  odlično slažu sa ACL i CPI vrednostima koje se najčešće koriste za opisivanje raspodele alkana prisutnih u voskovima. Za 3-metil-2-alkanone sa neparnim brojem C-atoma u nizu karakterični su sledeći parametri Gausove raspodele:  $\mu = 14,95$ ,  $\zeta = 2,17$ ,  $R^2 = 0,9999$ , pri čemu je važno primetiti da su vrednosti načene za parametar  $\mu$  i prosečnu dužinu ugljovodoničnog lanca,  $ACL = 14,94$ , skoro identične. Zanimljivo je da kod raspodele 3-metil-2-alkanona standardna devijacija  $\zeta$  ima vrednost od *ca.* 2 C-atoma, odnosno 1 acetatnu jedinicu, dok je njena vrednost za sve četiri distribucije površinskih alkana plodova biljne vrste *L. europaeus* ( $C_{21}-C_{34}$ ) bila *ca.* 2 acetatne jedinice (1,7-2,5). Uočena razlika u vrednostima standardne devijacije  $\zeta$  se može dovesti u vezu sa vrstom elongacionog sistema koja učestvuje u biosintezi ove dve klase jedinjenja. Naime, poznato je da u biosintezi glavnih sastojaka voskova učestvuju dva tipa elongacionih enzimskih sistema, pri čemu prvi elongacioni sistem vrši *de novo* sintezu acil nizova do  $C_{16}$  i/ili  $C_{18}$ , dok ih drugi elongacioni sistem producira do 30 ili više ugljenikovih atoma u nizu (Youping et al., 2010). Takođe smatra se da je distribucija alkana prisutnih u voskovima genetički predodređena dubinom hidrofobnog djetepa unutar membranskog enzimskog kompleksa drugog elongacionog sistema (kao i brojem ovih elongacionih enzima), i da bi odstupanje ove raspodele od idealne (srednje) vrednosti trebalo da bude dve acetatne jedinice (Denic i Weissman, 2007). Imajući u vidu dužine ugljovodoničnih lanaca kod homologe serije 3-metil-2-alkanona ( $C_{11}-C_{19}$ ), tj. broj acetatnih jedinica koje su tokom biosinteze inkorporirane u najduži homolog ove serije, može se reći da njihova raspodela predstavlja odraz rada prvog elongacionog sistema koji je genetski kodiran tako da je manje sklon grešci ( $\zeta \approx 1$  acetatna jedinica) u odnosu na drugi elongacioni sistem ( $\zeta \approx 2$  acetatne jedinice).

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

---



**SLIKA 5.28.** GAUSOVA RASPODELA 3-METIL-2-ALKANONA SA NEPARNIM BROJEM C-ATOMA U NIZU DETEKTOVANIH U FRAKCIJI ETARSKOG ULJA KORENA BILJNE VRSTE *I. HELENIUM*

### 5.3.5. RASVETLJAVANJE STRUKTURE NEPOZNATOG SESKVITERPENSKOG ALDEHIDA IZ ULJA *I. HELENIUM*

U cilju identifikacije glavnog, i najverovatnije aktivnog, sastojka pomenute frakcije etarskog ulja korena biljne vrste *I. helenium*, koja je pokazala izrazito antistafilokokalno dejstvo, veća količina ulja (oko 2 g) je podvrgnuta frakcionaciji pomoću *dry flash* hromatografije. Nepolarni eluent je sprao sa kolone frakciju **R<sub>III-IV</sub>** (dobijenu spajanjem 2 frakcije, a čija je masa bila *ca.* 5 mg) obogaćenu seskviterpenskim aldehidom **R**, za koju je nakon GC-MS analize utvrđeno da sadrži 85% ovog jedinjenja i da su dva glavna onečišćenja bila geranil-izobutanoat (**T**; 8%) i neril-izobutanoat (**U**; 5%). Maseni spektar jedinjenja **R** je veoma ličio na maseni spektar biciklogermakrenala. Jon najveće mase (molekulski jon) na *m/z* 218 je odgovarao oksigenovanom seskviterpenu molekulske formule C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O, a dva jona, [M - 1]<sup>+</sup> i [M - 29]<sup>+</sup>, karakteristični su za aldehyde (slika 5.25).

U pokušaju rasvetljavanja strukture jedinjenja **R** uračeni su i opsežni NMR eksperimenti. Dobijeni 1D- i 2D-NMR spektri su bili prilično složeni, a njihova interpretacija je bila otežana usled postojanja velikog broja međusobno preklapljenih signala, kao i nekih dodatnih signala koji su poticali od gore pobrojanih kontaminanata. Kao što se i moglo očekivati, u <sup>1</sup>H NMR spektru uzorka **R<sub>III-IV</sub>** javio se široki singlet karakterističan za proton aldehidne grupe na δ<sub>H</sub> 9,53 (kome je dodeljena jedinična vrednost integrala). U protonskom

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

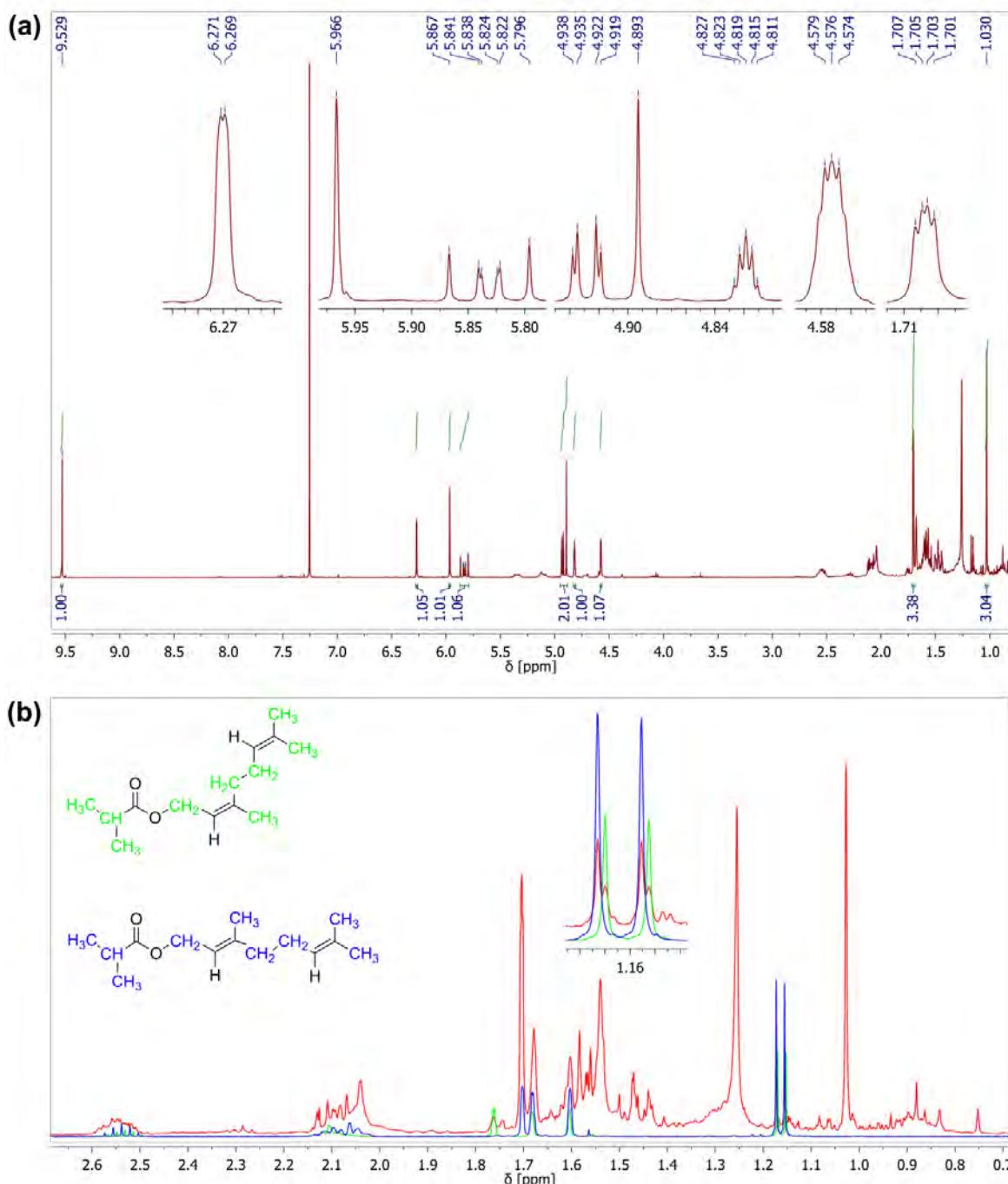
spektru mogli su se uočiti i signali 7 olefinskih protona, za koje se moglo pretpostaviti da pripadaju aldehidu **R** na osnovu vrednosti njihovih integrala, i to na:  $\delta_H$  6,27 (1H, br. d,  $J = 0,7$  Hz), 5,97 (1H, br. s), 5,83 (1H, m), 4,82 (1H, pseudo-quint) i 4,58 (1H, m), kao i multiplet višeg reda od dva protona u opsegu hemijskih pomeranja od 4,88 do 4,95 ppm (slika 5.29a). Za dva multipleta malog intenziteta na  $\delta_H$  5,38-5,29 i 5,15-5,05 je utvrđeno, porečanjem sa  $^1H$  NMR spektrima standarda geranil- i neril-izobutanoata (**T** i **U**), da potiču od olefinskih protona ova dva glavna kontaminanta (slika 5.29b). Pomalo je bilo iznenadujuće da u literaturi nisu bili dostupni potpuno asignirani  $^1H$ - i  $^{13}C$ -NMR spektri ova dva izobutanoata. U oblasti ispod 3 ppm signali su bili međusobno preklapljeni što je onemogućilo analizu ovog dela protonskog spektra. Jedino se za singlet na  $\delta_H$  1,03 (3H) moglo pretpostaviti da potiče od  $CH_3$  grupe, a oblik signala je ukazivao na to da ova metil grupa nema vicinalne protone u okruženju, odnosno da je vezana za kvaternerni ugljenikov atom.

Pored signala ugljenika aldehidne grupe na  $\delta_C$  194,5, u oblasti između 100 i 150 ppm, u  $^{13}C$  NMR spektru uzorka **R<sub>III-IV</sub>**, moglo se uočiti još osam olefinskih  $^{13}C$  rezonanci. Od pomenutih signala ugljenika dvogube veze, četiri su bila znatno intenzivnija od ostalih. Spektar DEPT135 je pokazao da tri signala, na  $\delta_C$  132,9, 112,2 i 110,1, potiču od ugljenika metilenske grupe (=CH<sub>2</sub>), a da preostali signal na  $\delta_C$  150,0 predstavlja metinski olefinski ugljenik (=CH–), što je bilo u saglasnosti sa prethodno predočenim brojem olefinskih protona u aldehidu **R**. Shodno tome, jedinjenje **R** bi trebalo da u svojoj strukturi ima (najmanje) tri dvogube veze i da su dva njegova olefinska ugljenika neprotonovana. Ova pretpostavka je potvrđena na osnovu odgovarajućih korelacija u gHMQC spektru: (i) signal metinskog ugljenika na  $\delta_C$  150,0 je korelisao sa protonom na  $\delta_H$  5,83 (ii) metilenski olefinski ugljenik na  $\delta_C$  132,9 je pokazivao korelacije sa protonima na  $\delta_H$  6,27 i 5,97; (iii) metilenski olefinski ugljenik na  $\delta_C$  112,2 sa protonima na  $\delta_H$  4,82 i 4,58; (iv) a metilenski olefinski ugljenik na  $\delta_C$  110,1 se sprezao sa protonima u oblasti između 4,88 i 4,95 ppm. Geminalno kuplovanje pomenutih parova metilenskih olefinskih protona je, takođe, bilo vidljivo na osnovu korelacionih signala u  $^1H$  –  $^1H$  gDQCOSY spektru. Iz DEPT135 spektra je potvrđeno i prisustvo dve metil grupe na  $\delta_C$  24,9 i 16,6, a na osnovu gHMQC spektra, ovi ugljenici su vezani za vodonike na 1,70 i 1,03 ppm. Za singlet na 1,03 ppm smo već pretpostavili da odgovara  $CH_3$  grupi koja je vezana za kvaternerni ugljenikov atom, dok je detaljnija analiza dela protonskog spektra oko 1,70 ppm otkrila prisustvo još jedne  $CH_3$  grupe koja se usled

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

daljinskog kuplovanja javila kao dublet dubleta ( $J = 1,6, 0,8$  Hz). Vrednosti hemijska pomeranja za ovu metil grupu,  $\delta_H$  1,70 i  $\delta_C$  24,9, ukazuju da se ona najverovatnije nalazi na nekoj od dvogubih veza (paramagnetični pomeraj).

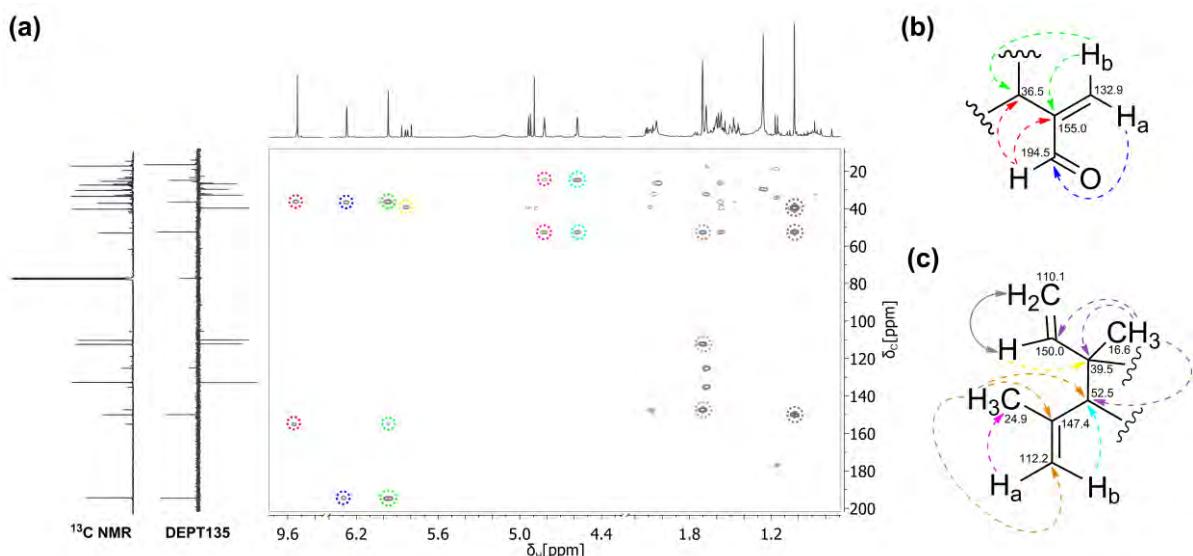


**SLIKA 5.29.** (a)  $^1\text{H}$  NMR SPEKTAR UZORKA **R<sub>III-IV</sub>** SA INTEGRALIJENIM SIGNALIMA KOJI SU PRIPISANI SESKVITERPENSKOM ALDEHIDU **R**. (b) MEĐUSOBNO POREĐENJE  $^1\text{H}$  NMR SPEKTRA (PREKLOPLJENI SPEKTRI U OBLASTI HEMIJSKIH POMERANJA  $< 3$  ppm) UZORKA **R<sub>III-IV</sub>** (OZNAČENOGR CRVENOM BOJOM) SA  $^1\text{H}$  NMR SPEKTRIMA DVA GLAVNA KONTAMINANTA GERANIL-IZOBUTANOATA (**T**, OZNAČEN PLAVOM BOJOM) I NERIL-IZOBUTANOATA (**U**, OZNAČEN ZELENOM BOJOM)

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

Na osnovu interakcija uočenih u  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  gHMBC spektru uzorka **R<sub>III-IV</sub>** bilo je moguće sastaviti dva strukturalna fragmenta jedinjenja **R** koja su prikazana na slici 5.30. Postojanje korelacionih signala između: (i) dva metilenska olefinska protona na  $\delta_{\text{H}}$  6,27 i 5,97 sa aldehidnim ( $\delta_{\text{C}}$  194,5), neprotonovanim olefinskim ( $\delta_{\text{C}}$  155,0) i alifatičnim metinskim ugljenikom ( $\delta_{\text{C}}$  36,5), kao i između (ii) protona aldehidne grupe i upravo pomenutog olefinskog i metinskog ugljenika, omogućilo je formiranje fragmenta koji je odgovarao  $\alpha$ -supstituisanom akroleinu (slika 5.30b). Geminálni (metilenski) protoni na  $\delta_{\text{H}}$  6,27 i 5,97 su imali značajno različita hemijska pomeranja usled magnetnog anizotropnog efekta aldehidne grupe. Proton Ha koji se nalazio na većem hemijskom pomeranju mogao se sa sigurnošću asignirati kao *cis* u odnosu na aldehidnu grupu. Takođe, kod ovog protona Ha moglo se uočiti daljinsko sprezanje od 0,7 Hz, dok je širina ovog dubleta ukazivala na postojanje i nekih dodatnih (daljinskih) kuplovanja.



**SLIKA 5.30.** (a) UVEĆANJE  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  gHMBC SPEKTRA UZORKA **R<sub>III-IV</sub>** SA OBELEŽENIM (ODGOVARAJUĆOM BOJOM) KORELACIONIM SIGNALIMA TAKO DA SE BOJA PODUDARA SA KORELACIJAMA NA STRUKTURAMA (b) I (c); (b) I (c) STRUKTURNI FRAGMENTI SA OZNAČENIM ODGOVARAJUĆIM  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  gHMBC KORELACIJAMA (ISPREKIDANE STRELICE). STRELICA SIVE BOJE PREDSTAVLJA  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  gDQCOSY INTERAKCIJU.

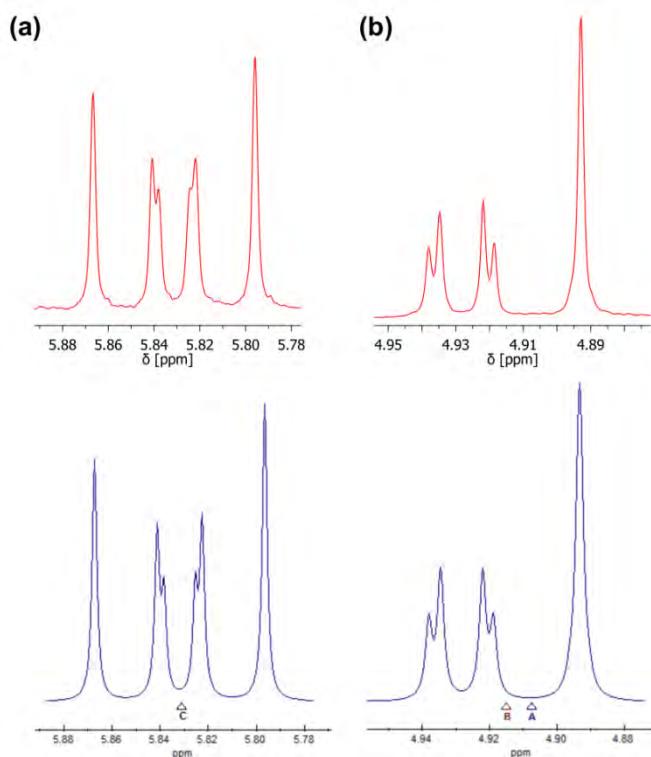
Drugi strukturalni fragment je sastavljen na osnovu podaka iz  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  gHMBC i  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  gDQCOSY spektara vezanih za dva metilenska olefinska protona na  $\delta_{\text{H}}$  4,82 i 4,58, i dve metil grupe na  $\delta_{\text{H}}$  1,70 i 1,03. Uočena  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  daljinska sprezanja protona na  $\delta_{\text{H}}$  4,82, 4,58 i 1,70 ukazivala su na postojanje izopropenilnog spinskog sistema vezanog za metinsku grupu na  $\delta_{\text{C}}$  52,5 (slika 5.30a i c). Protoni druge CH<sub>3</sub> grupe ( $\delta_{\text{C}}$  16,6 i  $\delta_{\text{H}}$  1,03) su očekivano

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

korelisali sa kvaternernim ugljenikom na  $\delta_C$  39,5, dok su za dalje proširenje ovog strukturnog fragmenta najznačajnije bile njihove interakcije sa ugljenikom =CH– grupe ( $\delta_C$  150,0 i  $\delta_H$  5,83) i metinskim ugljenikom na  $\delta_C$  52,5. Iako se proton iz pomenute =CH– grupe u  $^1H - ^{13}C$  gHMBC spektru mogao dovesti u vezu jedino sa kvaternernim ugljenikom na  $\delta_C$  39,5, on je u  $^1H - ^1H$  gDQCOSY spektru pokazivao korelace signale sa oba preostala metilenska olefinska protona u oblasti između 4,88 i 4,95 ppm, koji su omogućili upotpunjavanje ovog strukturnog fragmenta (slika 5.30c).

Stoga, izgledalo je da u našem seskviterpenskom aldehidu postoji i vinilna grupa, koja je predstavljala tipični ABX spinski sistem. Hemiska pomeranja i konstante kuplovanja multipleta na 5,83 i 4,88-4,95 ppm, koji su činili pomenuti spinski sistem, su određeni pomoću WinDNMR softvera (Reich, 1995). Variranjem vrednosti hemijskih pomeranja i konstanti kuplovanja dobijen je simulirani odgovarajući deo spektra (slika 5.31) tako da on najbolje odgovara eksperimentalnom. Na ovaj način je potvrđeno prisustvo 2,4-dimetilheksa-1,5-dien-3,4-diil fragmenta, koji se veoma često sreće kod seskviterpena elemanskog i srodnih skeleta.



**SLIKA 5.31.** POREĐENJE IZGLEDA SIGNALA PROTONA VINILNE GRUPE, NA  $\delta_H$  5,83 (a) I 4,88-4,95 (b), U EKSPERIMENTALNOM (SIGNALI CRVENE BOJE) I U SIMULIRANOM SPEKTRU (SIGNALI PLAVE BOJE) POMOĆU WINDNMR SOFTVERA

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

Na osnovu molekulske formule aldehida **R** ( $C_{15}H_{22}O$ ), očekivalo bi se da u ovom molekulu postoji ukupno 5 nezasićenja. Kako smo već utvrdili prisustvo aldehidne grupe i tri dvogube veze, veoma je verovatno da preostalo nezasićenje potiče od prisustva nekog prstena u njegovojoj strukturi. Do sada je detaljna NMR analiza uzorka **R<sub>III-IV</sub>** omogućila predlog dela strukture (dva strukturna fragmenta) molekula **R** i asignaciju 12 ugljenikovih i 14 vodonikovih atoma, dok su signali 2 protona iz CH grupe ( $\delta_C$  52,5 i  $\delta_H$   $\approx$  2,10,  $\delta_C$  36,5 i  $\delta_H$   $\approx$  2,55) samo locirani na osnovu 2D spektara. Ostala su nepoznata hemijska pomeranja za 3 ugljenikova i 6 vodonikovih atoma. Jedini signali u DEPT135 spektru koji su ostali nedodeljeni su signali  $CH_2$  grupe na  $\delta_C$  39,7, 32,8, 29,7 i 26,8, pa se može zaključiti da ugljenici i protoni koji nedostaju u strukturi **R** predstavljaju tri  $CH_2$  grupe. Međutim, kako su se signali ovih protona nalazili u oblasti jakog magnetnog polja pouzdano utvrđivanje njihovog hemijskog pomeranja je bilo praktično nemoguće, kako usled međusobnog preklapanja njihovih signala, tako i usled preklapanja sa signalima koji potiču od nečistoća (slika 5.29b).

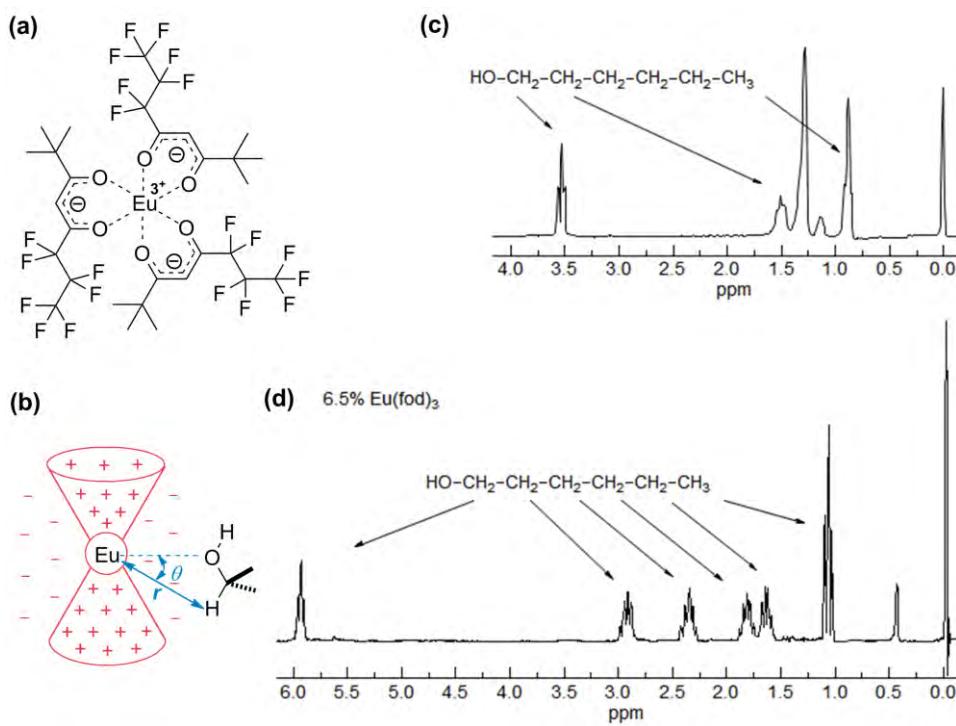
Tako, da bi se u potpunosti odredila struktura jedinjenja **R**, bilo je neophodno razdvajanje preklopljenih signala u oblasti ispod 3 ppm, odnosno uproščavanje  $^1H$  NMR spektra. Ovakav problem se ponekad može rešiti povećanjem radne frekvencije tj. korišćenjem spektrometra koji radi na jačem magnetnom polju, ali su ovi najsavremeniji NMR aparati visoke rezolucije ( $> 600$  MHz), usled visoke cene retki. Druga metodologija, kojom se pod izvesnim uslovima može postići razdvajanje preklopljenih i bliskih multipleta, zasniva se na primeni tzv. reagenasa hemijskog pomeranja (*shifts reagents*). Oni predstavljaju kompleksne retkih zemalja (lantanida) sa 1,3-diketonima i to najčešće europijuma (slika 5.32a; Milosavljević, 2004). Pomenuta metoda je prvi put primenjena davne 1969. godine (Hinckley, 1969), a često je korišćena tokom naredne dve decenije.

Primena lantanidnih (paramagnetičnih) reagenasa hemijskog pomeranja (LSR) je zasnovana na njihovojo sposobnosti da se selektivno koordiniraju za elektron-donorsku funkcionalnu grupu (tj. Luisovu bazu) u supstratu što dovodi do lokalne promene magnetnog polja koje osećaju protoni (i ugljenici) u blizini koordinacionog mesta, a samim tim i do pomeranja njihovih signala u NMR spektru (Turov et al., 2005). Na ovaj način se može postići razdvajanje preklopljenih signala, tj. uklanjanje degenerisanosti hemijskih pomeranja pojedinih slučajno izohronih protona, čime se mogu dobiti dodatne informacije, o strukturi supstrata, iz multipletnosti, konstanti kuplovanja i vrednosti integrala ovih signala (slika

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

5.32c i d). Sam lantanidni jon ima izražena paramagnetsna svojstva i njegov uticaj na magnetnu okolinu jezgara u supstratu prevashodno se prenosi putem dva mehanizma: (i) kontaktnim dejstvom koje se prenosi delokalizacijom spina nesparenog elektrona lantanida kroz hemijske veze supstrata i koje osećaju samo jezgra bliska mestu kompleksiranja, i (ii) pseudokontaktnim dejstvom koje se ne prenosi putem hemijskih veza, već kroz prostor, i koje potiče od sekundarnog magnetnog polja, koje je obično anizotropno, a stvara ga paramagnetsni katjon. Zbog njihovog jakog elektropozitivnog karaktera i zaklonjenosti nesparenih valentnih elektrona u *f*-orbitalama, lantanidi najčešće formiraju komplekse putem elektrostatickih interakcija. Stoga se i smatra da lantanidi dovode do promene hemijskih pomeranja prevashodno pseudokontaktnim mehanizmom i da veličina promene hemijskog pomeranja indukovanih lantanidom ( $\Delta\delta_H$  i  $\Delta\delta_C$ ) isključivo zavisi od rastojanja lantanid - posmatrano jezgro ( $r$ ; pri čemu efekat lantanida naglo opada sa kubom ovog rastojanja), kao i od njihovog stereohemijskog odnosa definisanog uglom ( $\theta$ ) između magnetne ose lantanida i linije rastojanja  $r$  (slika 5.32b; Mayo, 1973; Milosavljević, 2004).



**SLIKA 5.32.** (a) STRUKTURA *TRIS*(6,6,7,7,8,8,8-HEPTAFLUORO-2,2-DIMETIL-3,5-OKTANDIOATO)EUROPIJUMA(III) ( $\text{Eu}(\text{FOD})_3$ ) (b) GEOMETRIJSKI PARAMETRI ( $r$  i  $\theta$ ) OD KOJI ZAVISI PROMENA HEMIJSKOG POMERANJA PRIKAZANOG PROTONA ( $\Delta\delta_H$ ) U KOMPLEKSU EU-SUPSTRAT (ALKOHOL). PROSTOR SMANJENE ZAŠTITE (POZITIVNO  $\Delta\delta_H$ ) OZNAČEN JE SA „-“, A PROSTOR POVEĆANE ZAŠTITE (NEGATIVNO  $\Delta\delta_H$ ) SA „+“.  $^1\text{H}$  NMR SPEKTRI (220 MHz) 1-HEKSANOLA U  $\text{CDCl}_3$ : (c) BEZ REAGENSA HEMIJSKOG POMERANJA I (d) U PRISUSTVU  $\text{Eu}(\text{FOD})_3$  (LIGAND : SUPSTRAT = 0,065)

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

U praksi se ova metoda uprošćavanja NMR spektara sastoji od suksesivnog dodavanja tačno određene mase LSR i snimanja (i međusobnog upoređivanja) NMR spektara nakon dodatka svake porcije LSR. Hemijska pomeranja pojedinih vodonikovih i ugljenikovih atoma se menjaju, u većoj ili manjoj meri, nakon dodatka svake porcije LSR, što može u određenom trenutku dovesti do razdvajanja pojedinih preklopljenih signala čime bi se eventualno olakšala njihova asignacija. Ova metoda je do sada uspešno primenjena pri strukturnoj i konformacionoj analizi mnogih sintetskih i prirodnih organskih jedinjenja, kao i pri određivanju enantiomernog viška. Za njenu primenu u određivanju optičke čistoće bio neophodan supstrat u čistom stanju sa razjašnjrenom, ili najvećim delom razjašnjrenom, strukturom na osnovu uobičajenih NMR merenja (Chakrabartty et al., 1982; Gansow et al., 1971; Hinckley et al., 1971; Kuhn i Rembold, 1977; Schenato et al., 2003; Seger et al., 2000; Turov et al., 2005; Wineburg i Swern, 1972). Nedavno su primenom hiralnih lantanidnih reagenasa hemijskog pomeranja uspešno izvršena i određivanja sadržaja enantiomera pojedinih oksigenovanih bicikličnih monoterpena (bornil-acetata, fenhona i kamfora) u etarskim uljima, bez njihovog prethodnog izolovanja (Baldovini et al., 2003; Ristorcelli et al., 1998). Slična metodologija je primenjena i pri određivanju enantiomernog viška atropina i hiosciamina u sirovom ekstraktu semena biljne vrste *Datura stramonium* (Lanfranchi et al., 2010).

U upravo pomenutim kvantitativnim NMR studijama (Baldovini et al., 2003; Lanfranchi et al., 2009; Ristorcelli et al., 1998), za određivanje sadržaja određenog jedinjenja u smeši prirodnog porekla, bio je neophodan standard tog jedinjenja za konstrukciju kalibracione prave. Sama metodologija je bila zasnovana na postojanju seta signala koji nisu bili preklopljeni sa drugim signalima (koji su poticali bilo od datih analita ili drugih molekula iz matriksa). Ovo je i bio glavni razlog zbog čega su se istraživači odlučili da prate promene hemijskih pomeranja signala u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru indukovanih lantanidom, i to uprkos gubitku osetljivosti i javljanja problema vezanih za integraljenje signala, jer je sam po sebi dekuplovani  $^{13}\text{C}$  NMR spektar znatno manje kompleksan u odnosu na  $^1\text{H}$  NMR spektar. Do sada, metodologija zasnovana na primeni LSR nije korišćena za razdvajanje preklopljenih signala (kako u  $^1\text{H}$  NMR, tako i u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru) koji potiču od različitih (neenantiomernih) molekula, tj. za određivanje strukture pojedinačnih nepoznatih sastojaka neke smeše, odnosno, pri kvalitativnoj analizi. Razdvajanje slučajno preklopljenih signala koji potiču od dva ili više sastojaka neke smeše bi mogao biti krajnji ishod postepenog

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

dodavanja LSR neposredno u datu smešu budući da se može očekivati: (i) različito pomeranje ovih signala usled razlika u strukturi jedinjenja od kojih potiču (tj. usled različitih prostornih odnos LSR i koordinacionih mesta (funkcionalnih grupa) u nagrađenim kompleksima, kao i identiteta samih funkcionalnih grupa); (ii) međusobna kompeticija prilikom kompleksiranja (usled različite stabilnost kompleksa koje grade pojedinačni sastojci smeše sa LSR); i (iii) pomeranje ravnoteže reakcije kompleksiranja sa LSR usled različitog sadržaja pojedinih sastojaka smeše (Cockerill et al., 1973; Mayo, 1973).

Takoče do sada su u svega nekoliko istraživanja korišćeni 2D NMR eksperimenti ( $^1\text{H}$  –  $^1\text{H}$  COSY, NOESY, HSQC i HMBC) u kombinaciji sa LSR pri pokušaju potpune asignacije  $^1\text{H}$ - i  $^{13}\text{C}$ -NMR spektara prirodnih proizvoda (König i Wright, 1995; Orjala et al., 1993; Wright et al., 1992); ovo je neočekivano jer se može dobiti mnogo više korisnih informacija iz ovakvih 2D spektara u kojima su signali međusobno razdvojeni. Pored toga, prisustvo LSR koji poseduje paramagnetna svojstva trebalo bi da poveća osetljivost  $^{13}\text{C}$  NMR merenja, a samim tim i da značajno skrati vreme koje je potrebno za snimanje valjanih  $^{13}\text{C}$  NMR spektara, čak i za uzorke dostupne u jako maloj količini (poput uzorka **R<sub>III-IV</sub>**; Flockhart i Thorburn Burns, 1987). Međutim, upotreba LSR ima i svoju negativnu stranu jer može da dovede do smanjenja (ali ne i potpunog gubitka) nuklearnog Overhauser-ovog efekta, zbog čega, pri visokim koncentracijama LSR, može doći i do širenja signala. Shodno tome, da bi se ovo izbeglo preporučuje se titracija sa LSR (Cockerill et al., 1973).

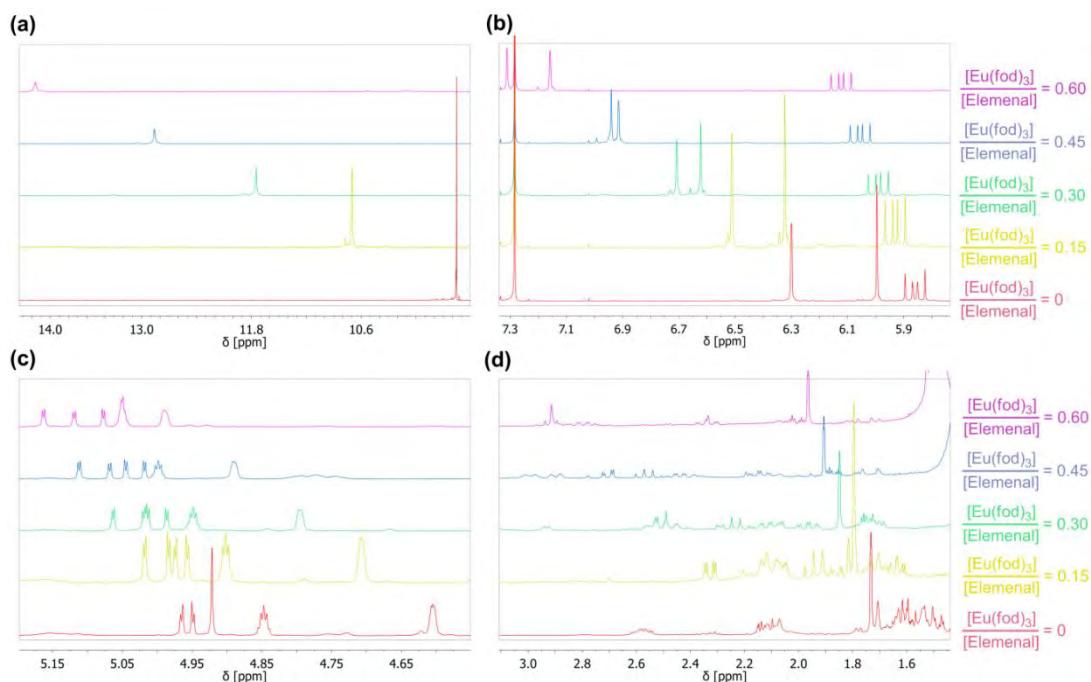
Iako je opisana detaljna analiza NMR spektara smeše **R<sub>III-IV</sub>** pružila veoma dragocene podatke ona nije rezultovala konkretnim predlogom strukture seskviterpena **R**. Shodno tome, odlučili smo da pokušamo da pojednostavimo izgled protonskog spektra uzorka **R<sub>III-IV</sub>** u oblasti jakog magnetnog polja dodatkom LSR. Iako pomenuti uzorak predstavlja smešu više jedinjenja pretpostavili smo da će uticaj LSR biti najočigledniji na signale koji potiču od našeg jedinjenja **R**, koje je najzastupljenije u uzorku, a i sadrži aldehidnu grupu, koja se smatra dobrom Luisovom bazom, a veoma je pogodna za koordinaciju sa LSR. Nadali smo se da će nam građenje adukta sa LSR omogućiti da makar asigniramo signal protona iz CH grupe ( $\delta_{\text{C}}$  36,5 i  $\delta_{\text{H}} \approx 2,55$ ) za koju smo već utvrdili da je povezana sa akroleinskim delom (koordinacionim mestom LSR), i za koji se stoga mogao očekivati vidljivi pomak ka oblasti slabijeg polja. Eu(fod)<sub>3</sub> je izabran kao LSR jer kombinuje sposobnost maksimalne indukcije hemijskog pomeranja sa minimalnim širenjem pomerenih signala. Takoče, Eu(fod)<sub>3</sub> je dobro rastvoran u CDCl<sub>3</sub>, a njegova jezgra ne daju signale u uobičajenoj oblasti precesionih frekvenci za većinu organskih jedinjenja (Kuhnz i Rembold, 1977). Sa dodatkom Eu(fod)<sub>3</sub>

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

protonski spektar uzorka **R<sub>III-IV</sub>** se značajno uprostio jer je došlo do paramagnetcog pomeranja većeg broja signala. I dok su promene položaja signala protona iz prvog utvrđenog strukturnog fragmenta (slika 5.30b), koji se nalaze u neposednoj blizini koordinacionog mesta, bile očekivane, uticaj europijuma(III) na protone vinilne, izopropenil i CH grupe ( $\delta_C$  52,5 i  $\delta_H \approx 2,10$ ), koji pripadaju drugom strukturnom fragmentu, bio je prilično iznenađujuć (slika 5.33).

Najizrazitije promene u odnosu na referentni spektar (bez dodatka LSR) bile su: međusobno razlaganje signala protona sa =CH<sub>2</sub> kraja vinilne grupe i izdvajanje signala protona obe CH grupe iz veoma složenog dela spektra na  $\delta_H < 3$  ppm. Pri približnom molarnom odnosu [LSR] : [aldehid] = 0,45 mogla su se jasno uočiti dva zasebna dubleta dubleta na  $\delta_H$  5,06 ( $J = 17,5, 1,3$  Hz) i  $\delta_H$  5,00 ( $J = 10,8, 1,3$  Hz), koja su zajedno sa dubletom dubleta na  $\delta_H$  6,03 ( $J = 17,5, 10,8$  Hz) činila ABX spinski sistem vinilne grupe (slika 5.33; tabela 5.14). Poznato je da su kod alkena, *trans* protoni jače spregnuti (veća konstanta kuplovanja) u odnosu na *cis*, dok je vrednost konstante kuplovanja za *geminalne* vodonike još niža u odnosu na prethodna dva (Milosavljević, 2004). Shodno tome moglo se tvrditi da je proton (označen sa Ha) čiji je signal na nešto većem  $\delta_H$  zauzimao *trans* položaj u odnosu na =CH proton.



**SLIKA 5.33.** POMACI SIGNALA TOKOM POSTEPENOG DODAVANJA Eu(fod)<sub>3</sub>: PROTONA ALDEHIDNE GRUPE (a), OLEFINSKIH PROTONA KOJI SU SE NALAZILI NA (b)  $\delta_H > 5,8$  ppm I (c)  $\delta_H < 5$  ppm U REFERENTNOM SPEKTRU, I ALIFATIČNIH PROTONA (d) KOJI SU REZONIRALI U OPSEGU OD 1,45 DO 2,60 ppm U REFERENTNOM SPEKTRU

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

**TABELA 5.14.**  $^1\text{H}$ - i  $^{13}\text{C}$ -NMR PODACI ZA ELEMENAL (**R**) I KOMPLEKS  $\text{Eu}(\text{fod})_3$  – ELEMENAL PRI MOLARNOM ODNOSU OD 0,45 I EKSPERIMENTALNO ODREĐENE VREDNOSTI  $\Delta\text{Eu}$  ZA PROTONE

POLOŽAJ	$\delta_{\text{H}}$ [ppm]	ELEMENAL		$[\text{Eu}(\text{fod})_3]/[\text{Elemenal}] = 0,45$	$\Delta\text{Eu}$
		$\delta_{\text{C}}$ [ppm]	$\delta_{\text{H}}$ [ppm]		
<b>1</b>	5,83 ( <i>m</i> , 1H)	150,0	6,03 ( <i>dd</i> , $J = 17,5, 10,8$ Hz, 1H)	150,2	0,41
<b>2</b>	4,92 <sup>a</sup>	110,1	<b>a:</b> 5,00 ( <i>dd</i> , $J = 10,8, 1,3$ Hz, 1H)	110,2	0,23
	4,93 <sup>a</sup>		<b>b:</b> 5,06 ( <i>dd</i> , $J = 17,5, 1,3$ Hz, 1H)		0,27
<b>3</b>	<b>a:</b> 4,82 ( <i>pseudo-quint</i> , $J = 1,6$ , Hz, 1H) <b>b:</b> 4,58 ( <i>pseudo-dq</i> , $J = 1,6, 0,8$ Hz, 1H)	112,2	<b>a:</b> 4,97 ( <i>m</i> , 1H) <b>b:</b> 4,86 ( <i>m</i> , 1H)	112,5	0,32 0,61
<b>4</b>	- <sup>b</sup>	147,4	-	147,8	-
<b>5</b>	2,14 <sup>a</sup>	52,5	2,68 ( <i>br. dd</i> , $J = 12,8, 3,0$ Hz, 1H)	53,1	1,23
<b>6</b>	$\approx 1,59$ (2H) <sup>c</sup>	32,8 <sup>d</sup>	<b>e:</b> 2,87 ( <i>pseudo-dt</i> , $J = 12,9, 3, 2$ Hz, 1H) <b>a:</b> 2,53 ( <i>pseudo-q</i> , $J = 12,5$ Hz, 1H)	33,9	2,84 2,09
<b>7</b>	2,58 <sup>a</sup>	36,5	4,74 ( <i>br. tt</i> , $J \approx 12, 3$ Hz, 1H)	38,6	4,95
<b>8</b>	<b>e:</b> $\approx 1,62$ <sup>c</sup>  <b>a:</b> $\approx 1,46$ <sup>c</sup>	26,8	<b>e:</b> 2,95 ( <i>br. pseudo-d quint</i> , $J = 13,5, 3$ Hz, 1H)  <b>a:</b> 2,41 ( <i>pseudo-qd</i> , $J = 13,5, 3,4$ Hz, 1H)	28,0	2,96 2,11
<b>9</b>	<b>e:</b> $\approx 1,47$ <sup>c</sup>  <b>a:</b> $\approx 1,56$ <sup>c</sup>	39,7	<b>e:</b> 1,84 ( <i>pseudo-dt</i> , $J = 13,4, 3,4$ Hz, 1H) <b>a:</b> 2,12 ( <i>pseudo-td</i> , $J = 13,4, 3,6$ Hz, 1H)	40,3	0,82 1,24
<b>10</b>	-	39,5	-	40,0	-
<b>11</b>	-	155,0	-	/ <sup>e</sup>	-
<b>12</b>	9,53 ( <i>br. s</i> , 1H)	194,5	12,83 ( <i>s</i> , 1H)	207,2	7,55
<b>13</b>	<b>a:</b> 6,27 ( <i>br. d</i> , $J = 0,7$ Hz, 1H) <b>b:</b> 5,97 ( <i>br. s</i> , 1H)	132,9	<b>a:</b> 6,89 ( <i>br. d</i> , $J = 0,7$ Hz, 1H) <b>b:</b> 6,91 ( <i>s</i> , 1H)	135,3	1,39 2,13
<b>14</b>	1,03 ( <i>br. s</i> , 3H)	16,6	1,38 ( <i>br. s</i> , 3H)	17,0	0,74
<b>15</b>	1,70 ( <i>dd</i> , $J = 1,6, 0,8$ Hz, 3H)	24,9	1,88 ( <i>dd</i> , $J = 1,6, 0,8$ Hz, 3H)	25,0	0,36

<sup>a</sup> hemijska pomeranja su određena ekstrapolacijom prave  $f(\delta_{\text{H}}) = f([\text{Eu}(\text{fod})_3]/[\text{Elemenal}])$  na  $[\text{Eu}(\text{fod})_3]/[\text{Elemenal}] = 0$ ;

<sup>b</sup> u datoj poziciji nema vodonika;

<sup>c</sup> hemijska pomeranja su određena na osnovu odgovarajućih korelacionih signalova u gHMQC spektru;

<sup>d</sup> hemijska pomeranja su određena na osnovu odgovarajuće vrednosti hemijskog pomeranja indukovanih lantanidom;

<sup>e</sup> određivanje hemijskog pomeranja je bilo otežano zbog širenja signalova.

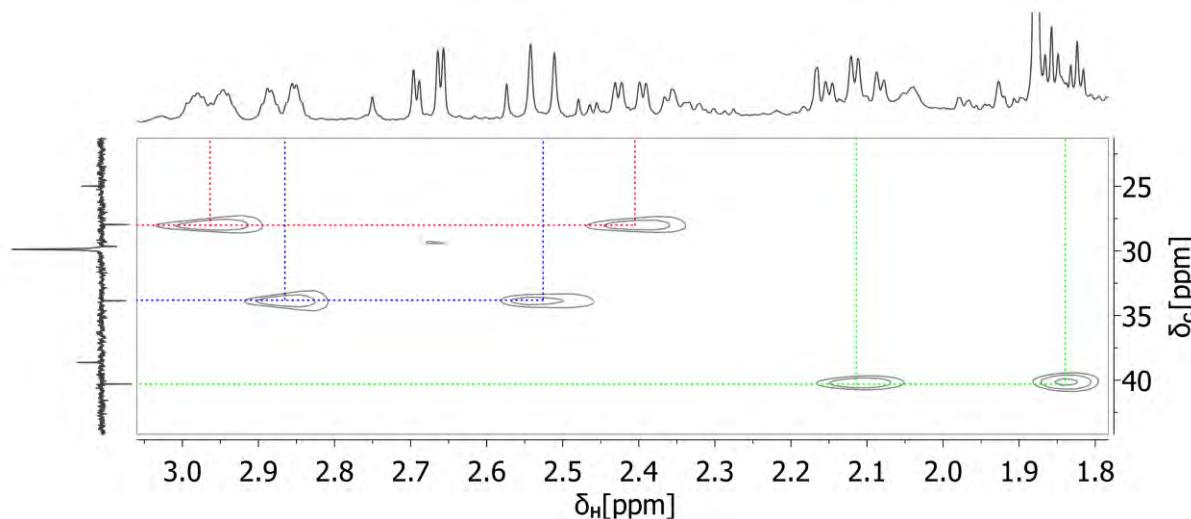
Lociranje protona CH grupe je bilo olakšano činjenicom da je uticaj lantanidnih reagenasa hemijskog pomeranja isti kako za jezgra ugljenika tako i za jezgra vodonika koja se nalaze na približno istom rastojanju (tj. direktno su međusobno vezana) u odnosu na paramagnetični katjon (tj. ista je apsolutna vrednost  $\Delta\delta_{\text{C}}$  i  $\Delta\delta_{\text{H}}$  izražena u ppm). Prema tome mogli smo veoma lako da odredimo položaj protona obe CH grupe iz gHMQC spektara, snimljenih nakon dodatka  $\text{Eu}(\text{fod})_3$ , jer je promena izgleda  $^{13}\text{C}$  NMR spektara bila manje izražena u odnosu na protonski zbog znatno šireg spektralnog opsega (0 – 250 ppm). Pri molarnom odnosu 0,45, proton iz CH grupe bliže koordinacionom centru dao je signal na  $\delta_{\text{H}}$

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

4,74, u obliku širokog tripleta tripleta ( $J \approx 12, 3$  Hz), dok se signal protona iz dalje CH grupe javio na  $\delta_H$  2,68 kao široki dubleta dubleta ( $J = 12,8, 3,0$  Hz; tabela 5.14).

Pored toga u pomenutom gHMQC spektru su sada bila vidljiva i tri para dijastereotopnih protona: (i) protoni na  $\delta_H$  2,95 i 2,41 su korelisali sa ugljenikom na  $\delta_C$  28,0, (ii) protoni na  $\delta_H$  2,87 i 2,53 sa ugljenikom na  $\delta_C$  33,9, a (iii) protoni na  $\delta_H$  2,12 i 1,84 sa ugljenikom na  $\delta_C$  40,3 (slika 5.34; tabela 5.14). Ovo razdvajanje signala pomenutih parova dijastereotopnih protona je bilo krucijalno za kompletiranje strukture našeg seskviterpenskog aldehida **R**, tj. elema-1,3,11(13)-trien-12-ala, jer je sada u  $^1H - ^1H$  gDQCOSY spektru bilo evidentno prisustvo sledećeg spinskog sistema  $(C)_2CH-CH_2-CH(C)-CH_2-CH_2-C(C)_3$  (slika 5.35a). Upravo uspostaljena konektivnost je bila podržana i odgovarajućim interakcijama u  $^1H - ^{13}C$  gHMBC spektru. Ovaj spinski sistem je povezao strukturne fragmente 1 i 2 u cikloheksanski prsten, ujedno kompletirajući elemanski skelet u aldehidu **R**. Multipletnost signala ovih  $CH_2$  grupa bila je u potpunosti u saglasnosti sa postojanjem 1,3,4,4-tetrasupstituisanog cikloheksanskog prstena, pri čemu su konstante geminalnog ( $J_{\text{gem}}$ ) i *trans*-diaksijalnog sprezanja ( $J_{\text{aa}}$ ), kao i konstante aksijalno-ekvatorijalnog ( $J_{\text{ae}}$ ) i ekvatorijalno-ekvatorijalnog ( $J_{\text{ee}}$ ) sprezanja, kod pomenutih dijastereotopnih protona imale međusobno veoma slične vrednosti ( $J_{\text{gem}} \approx J_{\text{aa}}$  i  $J_{\text{ae}} \approx J_{\text{ee}}$ ), što je rezultiralo veoma kompleksnim *pseudo* oblicima njihovih signala (tabela 5.14).

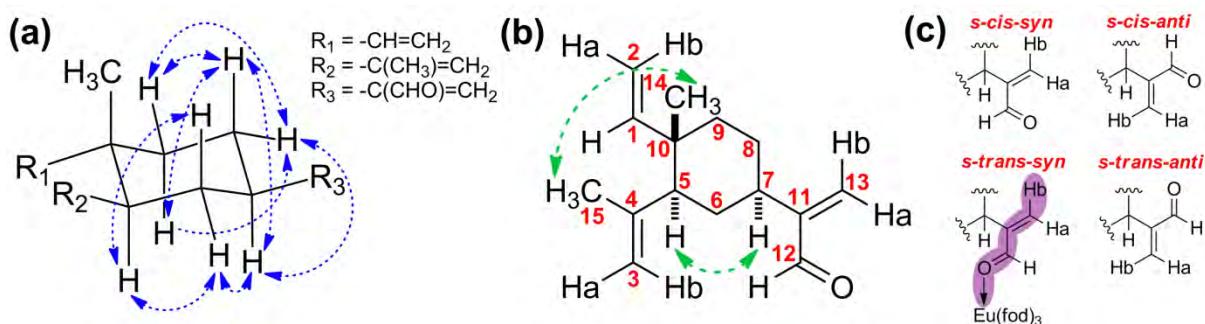


SLIKA 5.34. DEO GHMQC SPEKTRA, KOJI JE SNIMLJEN PRI MOLARNOM ODNOSU  $\text{Eu}(\text{FOD})_3 : \text{ELEMENAL} = 0,45$ , NA KOME SE JASNO MOGLO UOČITI RAZDVAJANJE PAROVA DIJASTEREOTOPNIH PROTONA

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

Iako smo detaljnom pretragom literature utvrdili da je ovaj seskviterpenski aldehid elemanskog skeleta već izolovan iz prirodnih uzoraka, njegovo nađenje u prirodi se ipak može okarakterisati kao veoma retko. Naime, ovaj seskviterpenski aldehid, elemenal (ili  $\beta$ -elemenal), prethodno je izolovan u čistom stanju (pre nekih 50 godina) iz etarskih ulja biljnih vrsta *Thujopsis dolabrata* Stieb. et Zucc. (Itô et al., 1965) i *Saussurea lappa* Clarke (Maurer i Grieder, 1977). Struktura elemenala je prvo bila pretpostavljena na osnovu ograničenih spektralnih podataka (UV-Vis, IR i  $^1\text{H}$  NMR (90 MHz); koji su bili dostupni u to vreme), a zatim i potvrđena, zajedno sa apsolutnom stereochemijom, na osnovu poređenja sa autentičnim semisintetskim standardom dobijenim iz ( $-$ )- $\beta$ -elemena. Korelacioni signali između protona CH grupa, kao i protona  $\text{CH}_3$  grupa, u NOESY spektru uzorka **R<sub>III-IV</sub>**, snimljenom nakon dodatka  $\text{Eu}(\text{fod})_3$ , potvrdili su da i naš antistafilokokalni elemenal, 1,3,11(13)-trien-12-al (**R**) ima istu relativnu konfiguraciju kao prethodno izolovani elemenal (slika 5.35b). Prisustvo  $\text{Eu}(\text{fod})_3$  (pri molarnom odnosu 0,45) nije dovelo do nestanka nOe, najverovatnije zato što je osnovni modus rada LSR bio putem pseudokontaktnog dejstva tj. dipolarne interakcije (čiji se efekat prenosi kroz prostor), a potiče od sekundarnog magnetnog polja, koje je anizotropno, a generiše ga paramagnetski katjon (Mayo, 1973). Takođe dodatak  $\text{Eu}(\text{fod})_3$  je smanjio i vreme neophodno za snimanje  $^{13}\text{C}$ - i 2D-NMR spektara smeše **R<sub>III-IV</sub>** koja je bila dostupna u količini od svega par milograma, a da pri tom nije doveo do značajnijeg širenja signala.



**SLIKA 5.35.** (a) KORELACIONI SIGNALI U  $^1\text{H}$  –  $^1\text{H}$  GDQCOSY SPEKTRU KOJI SU BILI NAJZNAČAJNIJI ZA UZVRĐIVANJE STRUKTURE SESKVITERPENSKEGA ALDEHIDA **R**. (b) STRUKTURA ELEMENALA (**R**) SA NUMERACIJOM C-ATOMATA NA KOJOJ SU OZNAČENE I KORELACIJE U NOESY SPEKTRU (STRELICE ZELENE BOJE) KOJIMA JE POTVRĐENA RELATIVNA STEREOHEMIJA OVOG JEDINENJA. (c) ČETIRI MOGUĆE KONFORMACIJE METAKRILINOG FRAGMENTA. POVOLJNA ORIJENTACIJA (CIK-CAK)  $\zeta$ -VEZA U S-TRANS-SYN KONFORMACIJI, PREKO KOJIH BI MOGLO U NAJVEĆOJ MERI DA SE OČEKUJE PRENOŠENJE SPINA NESPARENOG ELEKTRONA, OSENĆENA JE LJUBIČASTOM BOJOM

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

Elemenal je takođe identifikovan, ali samo na osnovu analize masenog spektra (MS spektar elemenala prvi put objavljen od strane Dekrakera i saradnika (de Kraker et al., 2001)) kao malozastupljeni sastojak etarskih ulja dobijenih iz nadzemnih delova biljnih vrsta *Origanum onites* L. (Biondi et al., 1993), *Teucrium pestalozzae* Bois (Baser et al., 1997) i *Perovskia scrophulariifolia* Bunge (Nuriddinov et al., 1997), kao i iz mladih izdanaka *Abies cilicica* subsp. *cilicica* (Ant. et Kotschy) Carr. (Baćci et al., 1999). Takođe elemenal je identifikovan, na osnovu porečenja sa masenim spektrom dostupnim u literaturi (GC-MS analiza, bez izolovanja), i kao sastojak etarskog ulja dobijenog iz nadzemnog dela biljne vrste *Mentha pulegium* L. (Boukhebt et al., 2011) i rizoma vrsta *Zingiber neesanum* (Graham) Ramamoorthy (Sabulal et al., 2007) i *Zingiber zerumbet* (L.) Smith (Baby et al., 2009). Međutim, rezultati nedavnog istraživanja, u kome je uporedo analiziran sastav etarskog ulja i ekstrakta svetog korena biljne vrste *Saussurea lappa*, ukazuju na to da su (-)-elemenal, kao i (-)-β-elemen i (-)-elema-1,3,11(13)-trien-12-ol najverovatnije artefakti koji nastaju tokom zagrevanja (npr. tokom sušenja korena, izolovanja etarskog ulja ili GC analize) iz odgovarajućih derivata germakranskog skeleta usled Koupovog premeštanja (de Kraker et al., 2001). Zanimljivo je da se β-elemen smatra i novim prirodnim lekom protiv kancera i da su patentirane neke formulacije za farmakološku primenu čiji je on glavni aktivni sastojak, a koje su trenutno u procesu prijave za kliničke studije u Sjedinjenim Američkim Državama (Barrero et al., 2011). Takođe nedavno istraživanje je pokazalo da je β-elemenal čak efektivniji od β-elemenata u sprečavanju rasta i proliferacije nemikrocelularnih ćelija raka pluća i stoga bi mogao da ima veliki potencijal kao alternativa β-elementu u hemoterapiji raka pluća i nekih drugih vrsta tumora (Li et al., 2013).

Iako se i samom vizuelnom analizom NMR spektara snimljenih nakon dodatka svake porcije LSR može doći do značajnih informacija, ponekad je pogodnije pri interpretaciji dobijenih rezultata izraziti iste u grafičkoj formi, kao zavisnost hemijskog pomeranja indukovanih lantanidom od molarnog odnosa [LSR]/[supstrat], za koju je načeno da je najčešće linearna u opsegu molarnih odnosa od 0,2 do 0,6 (Cockerill et al., 1973). Nagib ove prave naziva se gradijent pomeranja ( $\Delta\text{Eu}$ ; *gradient shift*) i obično ima veću vrednost za protone bliže koordinacionom mestu. U slučaju elemenala, najizrazitiji pomak u spektru je uočen za signale protona aldehidne (H-12) i C(7)-H grupe ( $\delta_{\text{C}} 36,6$  i  $\delta_{\text{H}} \approx 2,58$ ) koji su imali vrednost  $\Delta\text{Eu}$  od 7,55, odnosno 4,95, a sledili su ih protoni iz  $=\text{CH}_2$  grupe koja je deo

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

dvogube veze konjugovane sa aldehidnom grupom za koje je načena vrednost  $\Delta\text{Eu}$  od 1,39, za proton H-13a, i 2,13, za proton H-13b (slika 5.36; tabela 5.14).

Kod geminalnih protona H-13a i H-13b mogao se uočiti i takozvani *signal crossover* fenomen, jer je prava protona H-13b „prešla preko” prave protona H-13a, odnosno signal protona H-13b koji se nalazio na manjem hemijskom pomeranju u referentnom spektru, više (brte) se pomerao ka oblasti nižeg magnetnog polja sa dodatkom LSR u odnosu na proton H-13a, da bi se na kraju pri određenom molarnom odnosu našao i na većem hemijskom pomeranju u odnosu na proton H-13a. Ovaj fenomen se obično objašnjava većom blizinom datih protona koordinacionom centru za koji se vezuje paramagnetni katjon (Wineburg i Swern, 1972), i stoga bi trebalo da mu je proton H-13b bliži u odnosu proton H-13a. Međutim, već smo utvrdili, na osnovu većeg  $\delta_H$  u referentnom spektru, da se proton H-13a nalazi *cis* u odnosu na aldehidnu grupu i samim tim bi trebalo da bude bliže koordinacionom mestu paramagnetnog katjona, pa bi se očekivalo da je pod jačim uticajem njegovog sekundarnog magnetnog polja i da ima veće pomeranje indukovano lantanidom. Štaviše, rezultati prethodnih istraživanja na metakroleinu su saglasni sa tim da bi proton koji se nalazi *cis* u odnosu na aldehidnu grupu trebalo da ima nešto veće pomeranje indukovano lantanidom (Finocchiaro et al., 1974; Montaudo et al., 1973). Međutim, kako postoje dve moguće konformacije, *s-cis* i *s-trans*, oko C-11-C-12 veze, ukoliko bi metakrilni fragment zauzimao *s-trans* konformaciju, tada bi se Eu(fod)<sub>3</sub> koji je vezan za kiseonikov atom nalazio dalje u odnosu na proton H-13a i samim tim bi ovaj proton bio pod manjim uticajem sekundarnog magnetnog polja. Upravo pomenuta orijentacija aldehidne grupe je u saglanosti sa korelacijom između CHO i H-13a protona koja je bila vidljiva u NOESY spektru snimjenom nakon dodatka LSR.

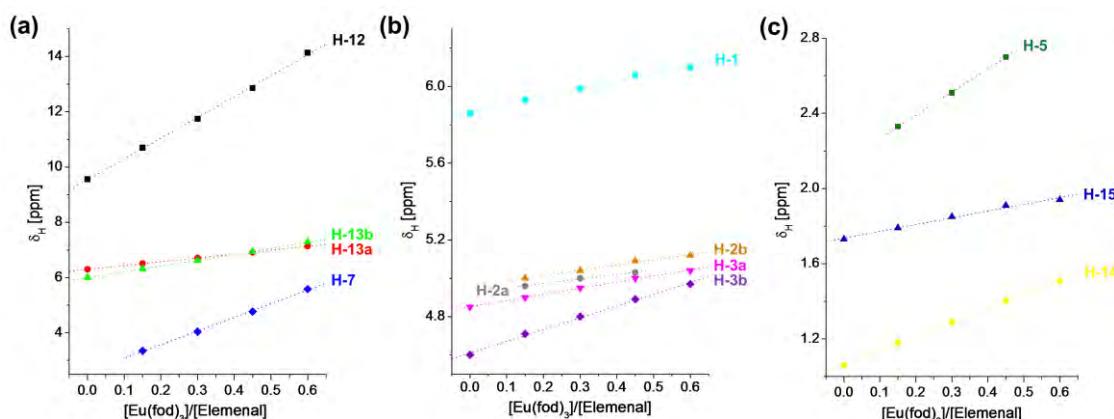
Relativni prostorni odnos grupa oko C-11-C-7 veze je bila druga konformaciona nedoumica koja se mogla razrešiti iz NMR spektara snimljenih nakon dodatka LSR. Kako uticaj sekundarnog magnetnog polja veoma oštro opada sa rastojanjem, znatno viša vrednost  $\Delta\text{Eu}$  (4,95) za proton H-7 u odnosu na metilenske protone H-13a i H-13b (1,39 i 2,13; slika 3.36a, tabela 5.14) je ukazivala na to da bi elemenal-Eu(fod)<sub>3</sub> kompleks trebalo da zauzima takvu konformaciju (*s-trans* oko C-11-C-12 veze sa *syn* međusobnom orijentacijom H-7 i CHO protona oko C-11-C-7) u kojoj je proton H-7 u neposrednoj blizini paramagnetnog katjona (slika 5.35c). U prilog upravo pomenutoj konformaciji kompleksa elemenal-Eu(fod)<sub>3</sub> ide i činjenica da je metilenski proton H-3b bio pod znatno jačim uticajem lantanida u odnosu

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

na njegov geminalni proton H-3a (slika 5.36b, tabela 5.14), na osnovu skoro dvostruko veće vrednosti  $\Delta\text{Eu}$ , a što je jedino moguće upravo u *s-trans-syn* konformaciji u kojoj je  $\text{Eu}(\text{fod})_3$  orijentisan ka izopropenilnoj grupi. Međutim, neophodno je istaći da upravo izvedeni zaključci važe samo za kompleks sa europijumom(III) a ne i za sam (slobodni) aldehid jer se uočeni anizotropni efekat CHO grupe na proton H-13a jedino može se javiti u *s-cis* konformaciji.

Smatra se da se kod lantanidnih reagenasa hemijskog pomeranja ipak može, u malom procentu (*ca.* 1%), ispoljiti i kontaktno dejstvo (tj. efekat kroz hemijske veze), i to prevashodno kod protona vezanih za ugljenike koji su najbliži elektrodonorskoj grupi (Mayo, 1973). Prema tome, može da bi se ova neobična pojava (proton H-13b koji se nalazi u *trans* položaju u odnosu na aldehidnu grupu u  $\alpha,\beta$ -nezasićenom karbonilnom sistemu ima veću vrednost  $\Delta\text{Eu}$  u odnosu na *cis* H-13a proton) mogla objasniti nešto većim udelom kontaktnog dejstva lantanida na proton H-13b u našem LSR adaktu. Takođe pretpostavlja se da se kontaktno dejstvo obično javlja u većoj meri kod aromatičnih sistema gde prisustvo konjugacije dovodi do delokalizacije elektrona, a samim tim i do povećanja udela kontaktnog dejstva u promeni hemijskih pomeranja i kod ostalih protona u molekulu (Mayo, 1973). Na sličan način bi se spin nesparenog elektrona lantanida mogao delokalizovati i kroz pogodno orijentisani sistem  $\zeta$ -elektrona u  $\alpha,\beta$ -nezasićenom karbonilnom sistemu, poput onog koji postoji u našem konkretnom slučaju u *s-trans* konformaciji, pri čemu bi ovaj uticaj trebalo da bude veći na proton u *trans* položaju u odnosu na aldehidnu grupu, zbog boljeg preklapanja orbitala (slika 5.35c).



**SLIKA 5.36.** PRAVE ZAVISNOSTI HEMIJSKIH POMERANJA PROTONA OD ODNOSA  $[\text{EU}(\text{FOD})_3]/[\text{ELEMENAL}]$ : (a) ZA PROTONE NAJBLIJE KOORDINACIONOM MESTU, (b) ZA OSTALE OLEFINSKE PROTONE I (c) ZA PROTONE ČIJI SE SIGNALI NALAZE U OBLASTI JAKOG POLJA

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

Grafičko predstavljanje spektralnih podataka dobijenih nakon sukcesivnog dodavanja LSR ima još nekoliko pogodnosti. Na primer,  $\delta_H$  vrednosti međusobno preklapljenih signala u referentnom spektru (bez dodatka LSR) mogu se odrediti kao odsečak prave  $f(\delta_H) = f([LSR]/[supstrat])$  na  $y$  osi (tj. ekstrapolacijom prave do vrednosti  $[LSR]/[supstrat] = 0$ ) (Wineburg i Swern, 1972). Na ovaj način su određene vrednosti  $\delta_H$  za protone H-2a, H-2b, H-5 i H-7 (slika 5.36; tabela 5.14), koje su i preciznije u odnosu na vrednosti hemijskih pomeranja koje su se mogle očitati iz protonskog ili 2D spektara, jer postoji određena nesigurnost pri njihovom direktnom određivanju iz NMR spektara kako usled uzajamnog preklapanja tih signala, tako i usled njihovog preklapanja sa signalima koji potiču iz nečistoća (slika 5.29).

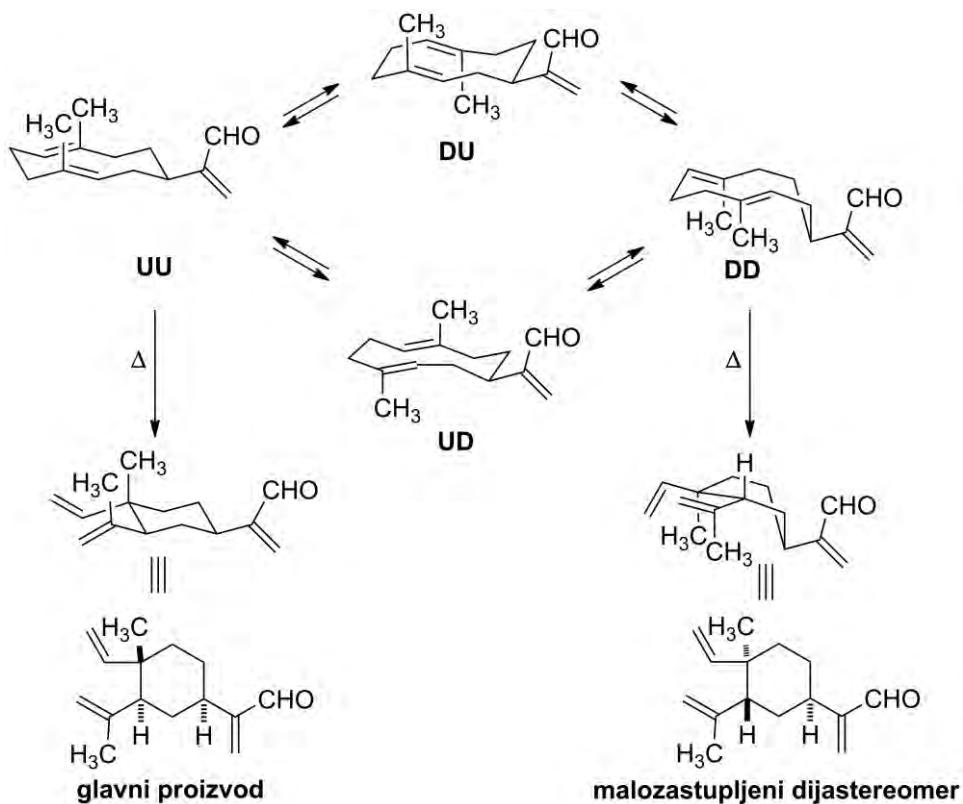
Kao što smo već naglasili elementi najverovatnije nastaju Koupovim premeštanjem odgovarajućih germakrana. Načelo je da, u rastvoru, gemakrani mogu da zauzmu bilo koju od četiri konformacije iz kojih može doći do Koupovog premeštanja, koje su označene sa UU, UD, DU i DD, ukoliko se pretpostavi da je izopropenilna grupa, ili srodnii supstituent, dovoljno voluminozna da zauzme pseudoekvatorijalni položaj na ciklodekadienskom prstenu (slika 5.37; Faraldo et al., 2007). Koupovo premeštanje je stereospecifična reakcija tokom koje molekul u prelaznom stanju prevashodno teži da zauzme stoličastu konformaciju, a ovi geometrijski zahtevi su ispunjeni samo u UU i DD konformacijama odgovarajućih germakrana (de Kraker et al., 2001). Eksperimentalni podaci i molekulsko modelovanje su saglasni da je UU (*Up-Up*) oblik, u kome obe metil grupe i pseudo-ekvatorijalni supstituent zauzimaju istu stranu cikloheksadienskog prstena (koji se nalazi u konformaciji stolica-stolica), najstabilniji i najzastupljeniji u konformacionoj ravnoteži (Faraldo et al., 2007).

Shodno tome, Koupovo premeštanje bi trebalo da se pretežno odvija iz ove (najstabilnije) konformacije, i smatra se da  $\beta$ -elementi koji se javlja u prirodi, kao i njegovi derivati, zauzima konformaciju stolice u kojoj je relativni stereohemijski odnos grupa na cikloheksanskom prstenu diktiran stereohemijom startnog germakrana i geometrijskim zahtevima cikličnog prelaznog stanja (slika 5.37; de Kraker et al., 2001; Takeneda, 1974). Glavni faktor destabilizacije u pomenutoj konformaciji  $\beta$ -elementa i njegovih derivata, npr. elemenala (koja je označena ca **Konf-1**), je *syn*-pentanska interakcija između angularne metil grupe i metil grupe iz izopropenil supstituenta (slika 5.38a). Rezultati eksperimenta molekulskog modelovanja (pomoću MM2 metode) ukazuju na to da bi destabilizujući uticaj pomenute *syn*-pentanske interakcije u elemenaluu bio za oko *ca.* 2 kcal/mol manji ukoliko bi

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

ka angularnoj metil grupi bio okrenut  $=\text{CH}_2$  kraj izopropenil supstituenta (konformer **Konf-2**; slika 5.38b). Međutim, postojanje nOe korelacionih signala između pomenutih metil grupa, kao i vinilno-alilnog sprezanja protona H-5 sa protonom H-3b (čiji signal ima oblik pseudo-dubleta kvinteta (slika 5.35b; tabela 5.14)), a ne i sa njegovim geminalnim protonom H-3a (čiji signal ima oblik pseudo-kvinteta), jasno su potvrdili da orijentacija izopropenil grupe odgovara onoj u konformeru **Konf-1**, tj. postoji tzv. „U” odnos između protona H-5 i H-3b. Naime, u stabilnijem konformeru **Konf-2** može se jedino očekivati takozvano „W” kuplovanje između alilnog protona H-5 i vinilnog protona H-3a ( $^4J_{\sigma} > 0$  Hz), dok se ovo sprezanje ne bi trebalo javiti u konformeru **Konf-1** ( $^4J_{\sigma,\pi} \approx 0$  Hz) zato što je dihedralni ugao između pomenutih alilnih i vinilnih C-H veza veoma blizak  $180^\circ$  (175,7°; Garbish, 1964; slika 5.38a i b).



**SLIKA 5.37.** MOGUĆE KONFORMACIJE GERMAKRADIENALA UKOLIKO JE RELATIVNO VOLUMINOZNI SUPSTITUENT NA UGLJENIKU C-7 DESETOČLANOG PRSTENA PSEUDOEKVATORIJALAN. KONFORMERI SU OBELEŽENI SA UU, UD, DU I DD NA OSNOVU ORIJENTACIJE C(14)H<sub>3</sub> I C(15)H<sub>3</sub> GRUPA. OZNAKA U (OD *Up*) SE ODNOSI NA ORIJENTACIJU NAGORE, DOK SE OZNAKA D (OD *Down*) ODNOSI NA ORIJENTACIJU NADOLE. KOUPOVO PREMEŠTANJE BI MOGLO DA SE ODVIJA IZ UU I DD KONFORMACIJA, ALI KAKO UU OBLIK PREOVLADUJE U KONFORMACIONOJ RAVNOTEȚI ONA BI TREBALO DA DA I NAJZASTUPLJENIJI STEREOIZOMER ELEMENALA, DOK BI IZ UU OBЛИKA MOGAO NASTATI MANJE ZASTUPLJENI STEREOIZOMER ELEMENAL.

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

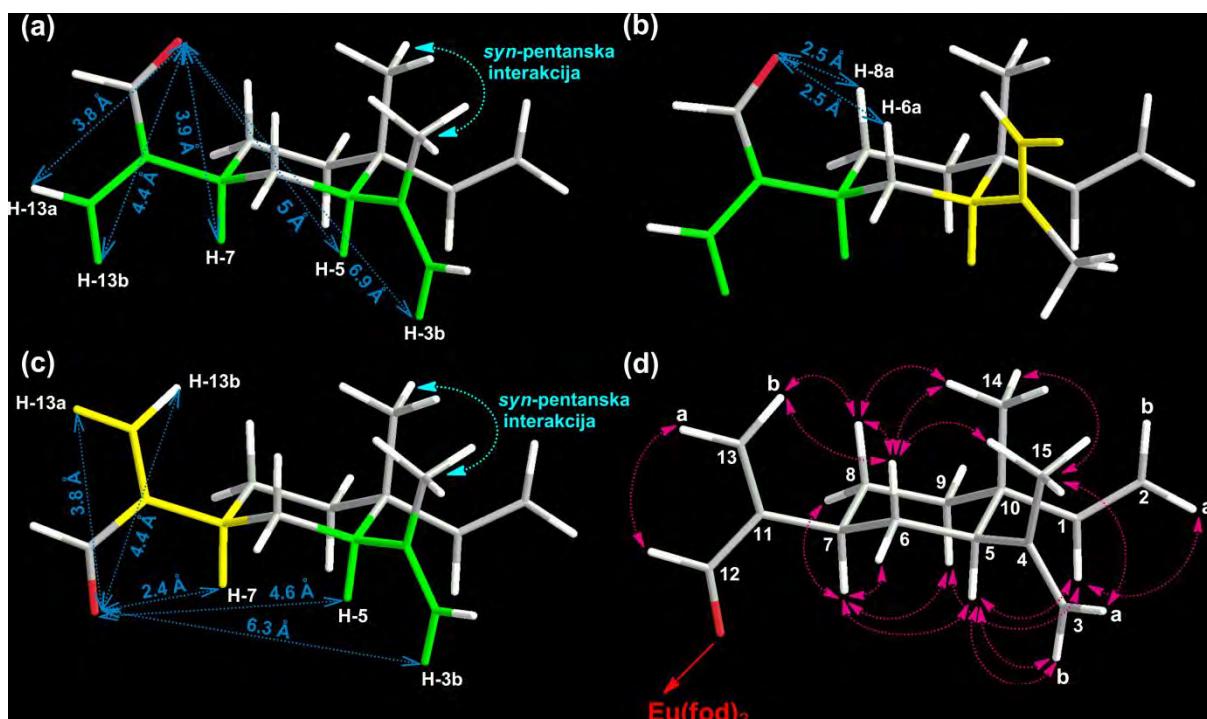
Zanimljivo je da, u oba do sada pomenuta konformerata **Konf-1** i **Konf-2**, molekulska modelovanje MM-2 metodom (koja minimizuje stenu energiju) daje, kao energetski najstabilniju, *s-trans* konformaciju metakrilnog fragmenta sa *anti* orijentacijom CHO grupe u odnosu na proton H-7 na cikloheksanskom prstenu. Međutim, mala konstanta vinilno-alilnog sprezanja ( $J = 0,7$  Hz) između protona H-13a (koji se nalazi u *cis* položaju u odnosu na aldehidnu grupu) i protona H-7, koja je bila vidljiva i u referentnom i u protonskom spektru snimljenom nakon dodatka Eu(fod)<sub>3</sub>, ukazivala je na *syn* orijentaciju CHO grupe i protona H-7 (konformer **Konf-3**; slika 5.38c) i u slobodnom aldehidu i u njegovom kompleksu sa europijumom(III). U konformeru **Konf-3** dihedralni ugao  $\theta$  između pomenutih vinilnih i alilnih C-H veza ima vrednost blisku nuli ( $\theta = 0,9^\circ$ ), pa se može očekivati karakteristično „W” kuplovanje. Kako je u konformerima **Konf-1** i **Konf-2** vrednost ovog dihedralnog ugla oko  $180^\circ$  ( $179,4^\circ$ ), kod njih ovo daljinsko kuplovanje ne bi trebalo da se opazi (vrednost konstante  $^4J_{\zeta,\pi}$  trebalo bi da bude bliska nuli). Nasuprot tome, kod konformerata **Konf-1** i **Konf-2** trebalo da se javi „U” kuplovanje između protona H-13b (*trans* u odnosu na aldehidnu grupu) i protona H-7 (slika 5.38a i b) koje nije detektovano. Pored toga, pri *anti* orijentaciji aldehidne grupe, kao u konformerima **Konf-1** i **Konf-2**, rastojanja protona H-13a i H-7 od aldehidnog kiseonika su skoro jednaka ( $3,8$  Å, odnosno  $3,9$  Å), pa bi i uticaj sekundarnog magnetnog polja na ove protone, takođe trebalo da bude približno isti. Međutim, to je kontradiktorno eksperimentalno određenim vrednostima  $\Delta E_u$  za ove protone. Kao što smo već prethodno naglasili veći obim hemijskog pomeranja indukovanih lantanidom koji je način za proton H-7 može se jedino objasniti time da elemenat-Eu(fod)<sub>3</sub> kompleks zauzima *s-trans-syn* konformaciju (**Konf-3**) u kojoj se ovaj proton nalazi u neposrednoj blizini paramagnetenog katjona, i zaista, na osnovu rezultata optimizacije energije MM2 metodom, u datoj konformaciji proton H-7 bi trebalo da se nalazi znatno bliže koordinacionom mestu u odnosu na proton H-13a ( $2,4$  Å naspram  $3,8$  Å; slika 5.38).

MM2 optimizacija, takođe predviđa da bi sterna energija konformerata **Konf-3** trebala da bude veća za svega  $0,5$ - $0,6$  kcal/mol u odnosu na konformer **Konf-1**. U prilog dominaciji oblika **Konf-1** u konformacionoj ravnoteži, u našem konkretnom slučaju, ne idu ni izuzetno niske vrednosti hemijskih pomeranja indukovanih lantanidom načene za aksijalne protone H-6 i H-8. Ova pomeranja bi trebalo da imaju znatno više vrednosti imajući u vidu da je rastojanje datih protona od vezivnog mesta oko  $2,5$  Å u konformeru **Konf-1** (slika 5.38a). Slična razmatranja se mogu primeniti i na neke druge protone (npr. H-3a i H-3b, kao i H-1, H-2a i

# REZULTATI I DISKUSIJA

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

H-2b; slika 5.38; tabela 5.14). Prema tome svi do sada ovde predstavljeni eksperimentalni podaci (vinilo-alilna kuplovanja, nOe korelacioni signali i vrednosti  $\Delta\text{Eu}$ ) idu u prilog tvrdnji da je **Konf-3** najzastupljenija konformacija elemenal-Eu(fod)<sub>3</sub> kompleksa.



**SLIKA 5.38.** MOGUĆE KONFORMACIJE ELEMENALA KOJE SE U TEKSTU NAVODE KAO KONFORMERI **KONF-1** (a), **KONF-2** (b) I **KONF-3** (c), A NA KOJIMA SU OZNAČENA RASTOJANJA POJEDINIH PROTONA OD ALDEHIDNE GRUPE, KAO I KORELACIONI SIGNALI VIDLJIVI U NOESY SPEKTRU KOJI SU ILUSTROVANI NA KONFORMACIJI **KONF-3** KOJU ELEMENAL NAJVEROVATNIJE ZAUZIMA U ELEMENAL-EU(FOD)<sub>3</sub> KOMPLEKSU (d). MOGUĆA VINILNO-ALILNA „W“ KUPLOVANJA SU OZNAČENA ŢUTOM BOJOM, DOK SU „U“ KUPLOVANJA OZNAČENA ZELENOM BOJOM

U cilju dodatne potvrde zaključaka u vezi stereohemije kompleksa elemenal-Eu(fod)<sub>3</sub>, izvršena je i konformaciona analiza pomoću tzv. *lanthanide probe method* (Hofer, 1976; Inagaki i Miyazawa, 1980). Interni pravougli koordinatni sistem je postavljen tako da se kiseonik karbonilne grupe nalazio u koordinatnom početku, a pravac C=O veze je definisao negativnu *z*-osu. U datom sistemu, pozicija europijuma se može opisati pomoću dužine Eu–O veze ( $r_o$ ), ugla između Eu–O–C(12) veza ( $\alpha_o$ ) i dihedralnog ugla Eu–O–C(12)–C(13) ( $\beta_o$ ) (Inagaki i Miyazawa, 1980). Pri određivanju optimalnog položaja jona europijuma, koordinate supstrata, kao i njegova geometrija (poput one u konformaciji **Konf-3**), su držane konstantnim, dok su koordinate europijuma(III) sistematski menjane (tako da se dobije najbolje slaganje sa eksperimentalnim podacima) pomoću *ChemBio 3D Ultra 12.0*

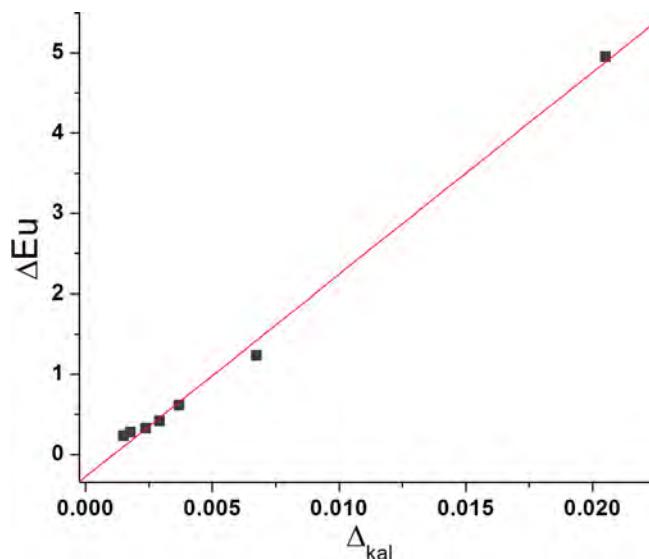
## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

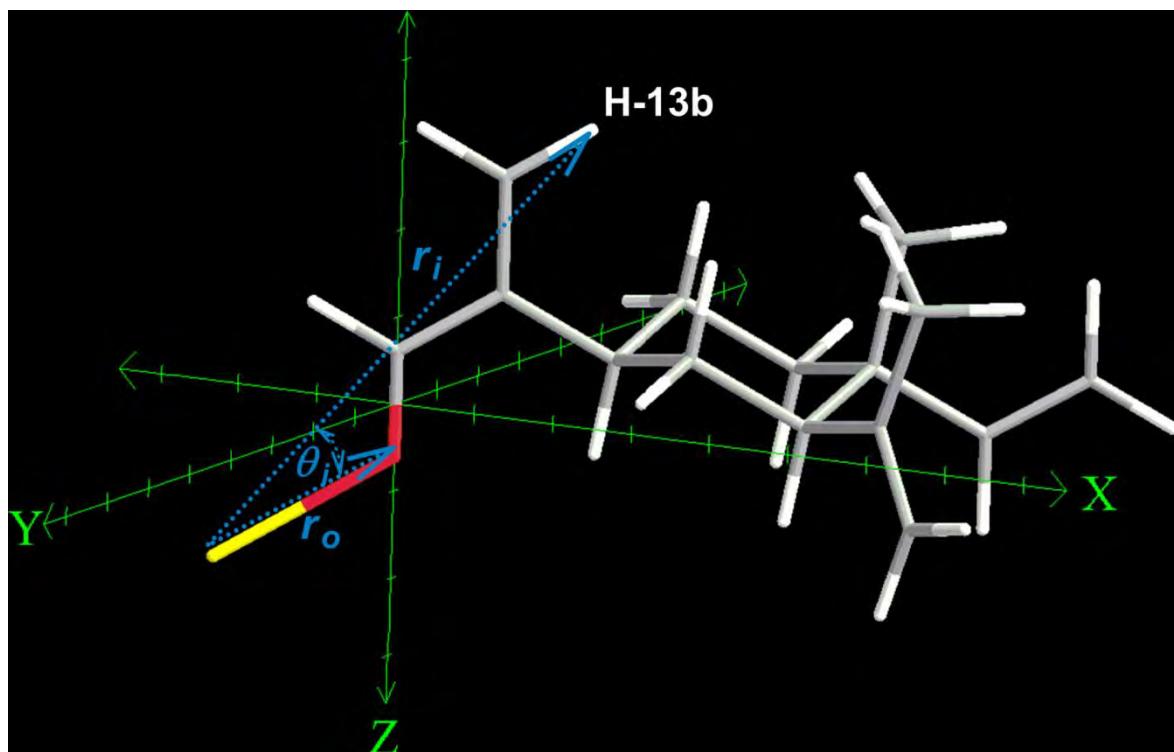
softverskog paketa. Vrednost dihedralnog ugla je bila podešena na  $180^\circ$  da bi se osigurala koplanarnost europijuma(III) i metakrilnog fragmenta (koja je neophodna za dobar prenos elektronske gustine), ugao između veza  $\alpha_o$  je variran između  $110^\circ$  i  $130^\circ$  (da bi se obezbedilo minimalno odstupanje od adekvatno cik-cak orijentisanog  $\zeta$ -sistema), dok je dužina veze  $r_o$  bila u opsegu između  $2,30$  i  $2,56$  Å. Za svaki od položaja lantanidnog jona izračunat je član  $(3\cos^2\theta_i - 1)/r_i^3$  u Mekonel-Robertsonovoj (McConnell-Robertson) jednačini za svaki od protona ( $i$ ) u supstratu (pri čemu je  $r_i$  rastojanje između lantanidnog jona i datog protona, dok  $\theta_i$  predstavlja ugao između vektora koji odgovara rastojanju  $r_i$  i vektora  $r_o$ , a poslednji predstavlja Ln-koordinacioni centar vezu). Zatim je ispitano slaganje (linearna zavisnost) izračunatih vrednosti ( $\Delta_{\text{kal}}$ ) za sve testirane položaje europijuma(III) sa eksperimentalno određenim vrednostima ( $\Delta E_u$ ; Hofer, 1976). Najveća vrednost koeficijenta korelacije ( $R^2 = 0,9980$ ; slika 5.39) je dobijena kada se europijum(III) nalazio na  $r_o = 2,328$  Å,  $\alpha_o = 120^\circ$  i  $\beta_o = 180^\circ$  (slika 5.40). Kako se Mekonel-Robertsonova jednačina može primeniti samo na jezgra kod kojih je udeo kontaktnog dejstva zanemarljiv (Hofer, 1976), vrednosti za protone H-12, H-13a i H-13b su bile izostavljene iz ovog fitovanja (npr. ovaj pseudokontaktni model je predviđao veću vrednost hemijskog pomeranja indukovanih lantanidom za proton H-13a u odnosu na proton H-13b, dok je eksperimentalno dobijen obrnut odnos). Načine vrednosti hemijskih pomeranja indukovanih lantanidom ( $\Delta E_u$ ) za protone H-12, H-13a i H-13b se mogu smatrati kao kombinacija (tj. kao zbir, u prvoj aproksimaciji) dipolarnog ili pseudokontaktnog ( $\Delta E_{u,\text{dip}}$ ) i kontaktnog ( $\Delta E_{u,\text{kontakt}}$ ) člana. Stoga se, za ove protone, može izvršiti procena u dela kontaktnog i dipolarnog dejstva, korišćenjem njihovih  $\Delta_{\text{kal}}$  vrednosti i jednačine prave  $\Delta E_{u,\text{dip}} = -0,28 + 251,82 \times \Delta_{\text{kal}}$  koja je utvrđena za najverovatniju konformaciju (slika 5.40). Na primer, na ovaj način smo utvrdili da se za proton H-13b značajni deo hemijskog pomeranja indukovanih lantanidom ( $\Delta E_u = 2,13$ ) može pripisati postojanju kontaktne interakcije ( $\Delta E_{u,\text{kontakt}} \approx 0,62$ ).

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*



**SLIKA 5.39.** SLAGANJE IZRAČUNATIH ( $\Delta_{\text{kal}}$ ) I EKSPERIMENTALNO NAĐENIH ( $\Delta_{\text{Eu}}$ ) VREDNOSTI ZA HEMIJSKA POMERANJA INDUKOVANA LANTANIDOM ZA KOMPLEKS ELEMENAL-EU(FOD)<sub>3</sub> (VREDNOSTI DOBIJENE ZA PROTONE H-12, H-13A I H-13B SU IZOSTAVLJENE ZBOG ZNAČAJNOG UDELA KONTAKTNOG DEJSTVA) ZA POLOȚAJ EUROPIJUMA(III) NA  $r_o = 2,328 \text{ \AA}$ ,  $\alpha_o = 120^\circ$  I  $\beta_o = 180^\circ$



**SLIKA 5.40.** NAJVEROVATNJA KONFORMACIJA KOMPLEKSA Eu(FOD)<sub>3</sub>-ELEMENAL (PRIKAZANA U PRAVOUGLOM KOORDINATNOM SISTEMU) DOBIJENA PRIMENOM TZV. *LANTHANIDE PROBE METHOD* ( $r_o = 2,328 \text{ \AA}$ ,  $\alpha_o = 120^\circ$  I  $\beta_o = 180^\circ$ ). PARAMETRI KOJI SU NEOPHODNI ZA IZRAČUNAVANJE  $\Delta_{\text{kal}}$  NA OSNOVU MEKONEL-ROBERTSONOVE JEDNAĆINE SU ILUSTROVANI ZA PROTON H-13b;  $r_i$  JE RASTOJANJE OVOG PROTONA OD EU, DOK JE  $\theta_i$  UGAO IZMEĐU VEKTORA KOJI ODGOVARA  $r_i$  I VEKTORA  $r_o$  KOJI PREDSTAVLJA EU-O VEZU

## REZULTATI I DISKUSIJA

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

Nestabilnost germakrana, odnosno njihova podložnost Koupovom premeštanju pri zagrevanju (npr. tokom destilacije vodenom parom ili tokom sušenja biljnog materijala) pri čemu nastaju elemansi, predstavlja osnovnu sumnju o prirodnom poreklu seskviterpena elemanskog skeleta (de Kraker et al., 2001). Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da se elemenal, izolovan iz etarskog ulja korena biljne vrste *I. helenium*, ne nalazi u svojoj najstabilnijoj konformaciji (**Konf-2**), koju je dala optimizacija sterne energije pomoću MM2 metode, već zauzima konformaciju (**Konf-3**) u kojoj orijentacija angularne metil grupe i metil grupe iz izopropenil supstituenta strogo odražava njihov međusobni prostorni odnos na desetočlanom prstenu u najstabilnijoj UU konformaciji odgovarajućeg germakradiena iz koje najverovatnije dolazi do Koupovog premeštanja. Zanimljivo je da u NMR spektrima nije detektovan ni jedan signal koji bi potvrdio postojanje elemenala (makar i u malom procentu) u najstabilnijoj konformaciji **Konf-2**, a to je najverovatnije posledica visoke energetske barijere za rotaciju oko C-4–C-5 veze. Pored toga, prethodno je načeno da tokom zagrevanja čistog germakradienala osim elemenala, uvek nastaje u maloj količini još jedan proizvod za koji je utvrđeno da predstavlja dijastereoizomer elemenala, a ova pojava je objašnjena time da se Koupovo premeštanje može odvijati i iz manje stabilne DD konformacije (de Kraker et al., 2001). Nakon detaljnije analize TIC hromatograma uzorka **R<sub>III-IV</sub>** utvrđeno je da se ovaj dijastereoomer elemenala nalazio i u datom uzorku i da je eluirao na RI = 1546. Sve ove činjenice idu u prilog tome da je elemenal veoma povezan sa odgovarajućim germakradienalom pri čemu ne treba isključiti ni mogućnost interkonverzije na povišenoj temperaturi, ni postojanje biosintetske veze.

# IZVOD

---

**SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

---

U ovoj doktorskoj disertaciji je ispitivan hemijski sastav etarskih ulja i ekstrakata biljnih vrsta *Lycopus europaeus* L., *L. exaltatus* L.f., i *Inula helenium* L. Etarska ulja dobijena hidrodestilacijom po Klevendžeru su analizirana pomoću GC i GC-MS metoda. Hromatografskim razdvajanjem sastojaka etarskih ulja i ekstrakata izolovana su čista jedinjenja i njihova struktura je određena na osnovu detaljne spektralne (1D- i 2D-NMR, GC-MS, HRMS, FTIR, UV-Vis) i hemijske analize (koja je podrazumevala različite vrste derivatizacija, poput sililovanja, esterifikacije, transesterifikacije, itd.). Identitet pojedinih jedinjenja, koje nije bilo moguće izolovati u čistom stanju, potvrđen je njihovom sintezom i GC koinjekcijom dobijenih standarda, ili primenom lantanidnih reagenasa hemijskog pomeranja u analizi NMR spektara složenih smeša. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja i izolovanih ili sintetisanih čistih jedinjenja je testirana mikrodilucionom metodom.

Dobijeni su sledeći rezultati:

◆ Hemijskom karakterizacijom etarskih ulja dobijenih hidrodestilacijom nadzemnog dela biljne vrste *L. europaeus* iz faze punog cveta i faze zrelih plodova, kao i lipida izolovanih iz zrelih i nezrelih plodova ove vrste, utvrđeno je prisustvo nekih jedinjenja koja se relativno retko mogu sresti kao biljni sekundarni metaboliti. U pomenutu grupu jedinjenja spadaju (*E*)-hotrienol, među isparljivim sastojcima, zatim, veći broj neuobičajenih masnih kiselina (dugolančane, račvaste ili sa neparnim brojem C-atoma) koje su ulazile u sastav triacilglicerola, kao i *izo-* i *anteizo*-alkani u epikutikularnim voskovima. Kod površinskih (*n*-, *izo*- i *anteizo*-) alkana plodova biljne vrste *L. europaeus* primećeno je i da distribucija njihovih relativnih sadržaja prati oblik Gausove raspodele. Ove normalne raspodele, koje su uočene kod epikutikularnih alkana, mogle bi da reflektuju rad sekundarnog enzimskog sistema elongaze pri čemu bi parametar  $\mu$  trebalo da odgovara dužini „idealne“ masne keline koju bi ovaj enzimski sistem trebalo da biosintetiše, dok bi parametar  $\sigma$  predstavljaо njegovu grešku pri biosintezi. Pored toga, utvrdili smo da se vrednosti parametra  $\mu$  i  $\sigma$  odlično slažu sa ACL i CPI vrednostima koje se najčešće koriste za opisivanje raspodele alkana prisutnih u voskovima. Testiranjem antimikrobne aktivnosti je utvrđeno da ulje vrste *L. europaeus* selektivno deluje na dva Gram-negativna soja: *Escherichia coli* (izolat) i *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031).

◆ Novi diacetilovani, polioksigenovani diterpen abietanskog skeleta je, takođe, izolovan iz plodova biljne vrste *L. europaeus*. Struktura ovog diterpena, koji je nazvan euroabienol, određena je na osnovu detaljne spektralne i hemijske analize. Prisustvo fenolnog prstena C,

---

**SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

---

sa veoma retkim šablonom oksigenacije, kao i njegov relativno visok sadržaj u plodovima (oko 1%, w/w), naveli su nas da pokušamo da odredimo njegovu moguću biološku ulogu. Stoga je ispitana *in vitro* antimikrobna aktivnost euroabienola protiv petnaest sojeva bakterija i šest sojeva gljivica. Euroabienol je pokazao veoma širok spektar antimikrobnog dejstva, pa bi se mogao smatrati sekundarnim metabolitom koji učestvuje u prvoj odbrambenoj reakciji biljke na napad patogena. Hemotaksonomski gledano važno je istaći da je euroabienol prvi diterpen abietanskog skeleta nađen u rodu *Lycopus*.

◆ Detaljna analiza etarskih ulja dobijenih iz nadzemnih delova vrste *L. exaltatus* sa dva različita staništa (populacije iz Srbije i Nemačke) omogućila je identifikaciju više od 170 isparljivih jedinjenja. Hemski sastav ispitanih ulja je bio međusobno sličan i njime su dominirali: 3,4-dihidroksistiren, (*Z,Z*)-9,12-oktadekadienska kiselina, 4-*epi*-abietal i β-felandren, ali se značajno razlikovao, kako u kvalitativnom, tako i kvantitativnom pogledu, u odnosu na sastav etarskog ulja prethodno publikovanog za ovu biljnu vrstu koja je uzgajana u Kanadi. Uočene razlike u sastavu isparljivih sastojaka mogle bi se pripisati uticaju ekološko-geoloških faktora, imajući u vidu da se radi o populacijama ovog taksona sa dva različita kontinenta. Takođe, neki od identifikovanih sastojaka etarskih ulja vrste *L. exaltatus*, poput *massoia*-eikozalaktona i dokozalaktona, predstavljaju nove prirodne proizvode.

◆ Iz etarskog ekstrakta nadzemnog dela biljne vrste *L. exaltatus* izolovani su i detaljno spektralno okarakterisani brojni sastojci voskova (*n*-, *izo*- i *anteizo*-alkani, i alkani sa unutrašnjom metil račvom), zatim, dve triterpenske kiseline (oleanolna i ursolna), tri derivata cimetne kiseline (*trans-p*-kumarinska, *trans*-ferulinska i *trans*-kafena kiselina) i dva flavona (apiginin i luteolin). Prethodna fitohemijska ispitivanja vrsta roda *Lycopus* pokazala su da su (poli)fenolna jedinjenja uobičajeni sekundarni metaboliti za ovaj rod, dok su triterpenske kiseline do sada nađene samo u vrsti *L. lucidus*.

◆ Poznato je da su neki vegetativni karakteri biljnih vrsta roda *Lycopus* veoma varijabilni, što umnogome otežava kako karakterizaciju ovih taksona, tako i uspostavljanje jasnih infrageneričkih odnosa. Pored pomenute dve vrste roda *Lycopus*, koje su ispitivane u ovom radu, u literaturi su bili dostupni podaci o hemiskom sastavu etarskih ulja još četiri predstavnika ovog roda, pa smo odlučili da izvršimo statističko poređenje razlika sastava etarskih ulja predstavnika ovog roda ne bi li utvrdili da li razlike u sastavu ovih isparljivih jedinjenja mogu dati neke dodatne informacije vezane za veoma složene taksonomske odnose unutar ovog roda. Rezultati multivarijantne statističke analize, u kojoj su kao varijable

---

**SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

---

korišćeni procentualni sadržaji sastojaka, ukazivali su na to da bi i sastav etarskih ulja taksona ovog roda, poput morfoloških karakteristika, mogao biti pod značajnim uticajem abiotских faktora. Međutim, grupisanje ulja vrsta roda *Lycopus*, koje je dobijeno kao rezultat statističke analize u kojoj su kao varijable korišćene sume procenata klasa jedinjenja, bilo je u skladu sa prethodno predloženom podelom ovog roda na sekcije, a koja je izvršena na osnovu morfoloških i anatomskeh karakteristika oraščića. Takođe, iako se biljna vrsta *L. lucidus* na osnovu morfoloških karakteristika smatra srodnom vrsti *L. europaeus*, rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da je hemotaksonomski gledano, prema sastavu kako isparljivih tako i neisparljivih sekundarnih metabolita, veoma bliska i vrsti *L. exaltatus*.

◆ U nedavnom istraživanju smo pokazali da je etarsko ulje korena biljne vrste *I. helenium* izrazito aktivno prema bakteriji *Staphylococcus aureus*. Frakcionisanjem ulja je utvrđeno da su seskviterpenski laktoni eudezmanskog skeleta glavni nosioci uočene aktivnosti. Međutim, hemijski sastav jedne od malozastupljenih frakcija, sa izuzetno niskom MIC vrednošću ( $0,8 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), ostao je nepoznat. Glavni sastojak ove frakcije je bio neki seskviterpenski aldehid zajedno sa još devet jedinjenja koja su pokazivala pravilnost u eluiranju sa GC kolone i analognu fragmentaciju u masenim spektrima. Na osnovu pomenutih GC i MS podataka pretpostavljen je da je reč o homologoj seriji 3-metil-2-alkanona ( $\text{C}_{11}-\text{C}_{19}$ ). Kako je izolovanje ovih metabolita bilo praktično nemoguće, sintetisana je mala kombinatorna biblioteka ovih 3-metil-2-alkanona u tri sintetska koraka sa prinosom od 50-65%. Koinjekcija dobijenih standarda sa frakcijom ulja biljne vrste *I. helenium* nesumnjivo je potvrdila prvobitnu pretpostavku. Konstruisane su GC-FID kalibracione prave za sve sintetisane 3-metil-2-alkanone i određen je njihov sadržaj u biljnom materijalu, a koji je bio opseg od 0,08 do 24,2 mg na 100 g suvog korena. Ispitivanjem *in vitro* antimikrobne aktivnosti je utvrđeno da 3-metil-2-alkanoni nisu aktivni prema bakteriji *S. aureus* pri testiranim koncentracijama i da pokazuju selektivno dejstvo samo prema jednoj plesni-*Candida albicans*. Rezultati ovog mikrobiološkog testiranja navode na zaključak da aktivnost frakcije etarskog ulja korena vrste *I. helenium* prema bakteriji *S. aureus* potiče od još uvek neidentifikovanog seskviterpenskog aldehyda. Primena metodologije malih kombinatornih biblioteka omogućila nam je ne samo da po prvi put identifikujemo nove 3-metil-2-alkanone dugog ugljovodoničnog lanca, već i određivanje njihovog sadržaja i bioloških osobina grupe strukturno veoma sličnih jedinjenja.

---

**SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

---

◆ Primećena je i Gausova raspodela relativnih količina identifikovanih 3-metil-2-alkanona u kojoj su bili zastupljeniji homolozi sa neparnim brojem C-atoma u nizu. Ovakva raspodela ukazivala je na to da se i njihova biosinteza prevashodno odvija acetatnim biosintetskim putem. Predložili smo tri moguća biosintetska puta nastanka 3-metil-2-alkanona, a Gausov parametar  $\sigma$  bi se, kod ove konkretnе klase jedinjenja, mogao posmatrati kao greška primarnog enzimskog sistema elongaze koji učestvuje u biosintezi masnih kiselina i jedinjenja koja se iz njih izvode.

◆ U cilju identifikacije glavnog sastojka pomenute malozastupljene frakcije etarskog ulja korena vrste *I. helenium*, koja je pokazivala izrazito antistafilokokalno dejstvo, veća količina ulja je podvrgnuta hromatografskom razdvajaju. Ovim frakcionisanjem dobijeno je nekoliko miligrama uzorka koji je bio obogaćen ovim jedinjenjem (oko 85%), a nakon velikog broja 1D-i 2D-NMR eksperimenata na datom uzorku rasvetljeni su samo neki delovi strukture ovog molekula. Stoga smo odlučili da ispitamo da li bi eventualna primena lantanidnih reagenasa hemijskog pomeranja dovela do rezolucije i tako omogućila asignaciju signala u  $^1\text{H}$  NMR spektru koji potiču od pojedinačnih sastojaka ove složene smeše. Postepeni dodatak Eu(fod)<sub>3</sub> je doveo do značajnog pojednostavljenja izgleda NMR spektara usled razdvajanja pojedinih preklopljenih signala i uklanjanja degeneracije hemijskih pomeranja, a što je omogućilo dobijanje krucijalnih podataka iz ovih NMR spektara. 2D NMR ( $^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY, NOESY, HSQC i HMBC) spektri uzorka pomešanog sa Eu(fod)<sub>3</sub> su se pokazali veoma korisnim u ovom pogledu. Primenom ove nove metode koja se zasniva na analizi 1D-i 2D-NMR analizi pomenute smeše utvrđeno je da je reč o elemenalu (elemenala-1,3,11(13)-trien-12-al), seskviterpenu koji ima veoma retku rasprostranjenost u prirodi. Pored potpune NMR asignacije elemenala, podaci dobijeni iz NMR spektara snimljenih nakon dodatka Eu(fod)<sub>3</sub> (vinilno-alilna kuplovanja, nOe korelacioni signali i vrednosti gradijenta pomeranja ( $\Delta\text{Eu}$ )), kao i rezultati eksperimenata molekulskog modelovanja, omogućili su određivanje konformacije elemenal-Eu(fod)<sub>3</sub> kompleksa. Pored toga, u ovom istraživanju je jasno pokazano da hemijska pomeranja indukovana lantanidom mogu biti u budućnosti od velikog značaja pri identifikaciji nepoznatih jedinjenja čak i ako nisu dostupna u potpuno čistom stanju.

## SUMMARY

SECONDARY METABOLITES FROM SELECTED PLANT SPECIES FROM GENERA *LYCOPUS* AND *INULA*

This PhD thesis gives the results of an investigation of the chemical composition of the essential oils and extracts of three plant species: *Lycopus europaeus* L., *Lycopus exaltatus* L.f. and *Inula helenium* L. The essential oils were obtained by hidrodistillation using a Clevenger-type apparatus and analyzed by GC and GC-MS. Chromatographic fractionations of the essential oils and extracts resulted in the isolation of several compounds in pure state. The structures of the isolated compounds were elucidated through both extensive spectral (1D and 2D NMR, GC-MS, HRMS, FTIR, UV-Vis) and chemical analyses (various derivatization reactions, e.g. silylation, esterification, transesterification etc.). If the isolation of a specific compound was not possible, its identity was inferred from synthetic work (GC co-injection of an authentic sample with the essential oil sample) or by the application of a new NMR methodology based on the lanthanide shifts reagents in analysis of complex samples (mixtures of several compounds). The essential oils and isolated/synthetized pure compounds were screened for their *in vitro* antimicrobial activity using a microdilution assay.

The following results were obtained:

- ◆ The detailed chemical analyses of the essential-oil and non-volatile lipid profiles of the aerial parts (blooming and fruit-forming stages) and ripe and unripe fruits of *L. europaeus*, respectively, revealed that both of these profiles were distinguished by components with a restricted occurrence in the Plant Kingdom. These rare compounds included (*E*)-hotrienol in the volatiles, numerous unusual fatty acids (such as very long chain, odd-numbered and branched-chain) in the bound lipids and a high amount of *iso*- and *anteiso*-alkanes in the epicuticular waxes. A feature of the epicuticular wax alkane profiles was their Gaussian-like appearance. These normal distributions could be interpreted as the end result of the work of the second elongase enzyme system(s) where the Gaussian parameter  $\mu$  should match the length of the "ideal" fatty acid biosynthesized and  $\sigma$  would represent the error of this enzyme system. These curve parameters were shown to correspond excellently to the ACL and CPI values usually utilized to describe the natural distribution of wax alkanes. An antimicrobial screening of *L. europaeus* essential oil revealed a selective action of the tested oil towards two Gram-negative strains, *Escherichia coli* (isolate) and *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031).

- ◆ A new diacetylated highly oxygenated abietane-type diterpenoid named euroabienol was isolated in pure state from *L. europaeus* fruits as well, and its structure was elucidated through both extensive spectral and chemical means. The presence of a phenolic C ring with

SECONDARY METABOLITES FROM SELECTED PLANT SPECIES FROM GENERA *LYCOPUS* AND *INULA*

a rare substitution pattern in euroabienol and its high relative amount in the fruits (1%, based on the weight of the fruits) urged us to try to establish its possible biological role. Thus, it was screened for its *in vitro* antimicrobial activity against fifteen strains of bacteria and six fungal strains. Euroabienol showed a broad spectrum of activity and probably is a first line defense plant metabolite against pathogen attack. This is the very first report on the occurrence of abietanes in the genus *Lycopus*.

◆ The detailed chemical analyses of the essential oils obtained from two populations of *L. exaltatus* (from Serbia and Germany) enabled the identification of more than 170 compounds. In general, the composition of these two oils were mutually similar, with 3,4-dihydroxystirene, (*Z,Z*)-9,12-octadecadienoic acid, 4-*epi*-abietal and β-phellandrene as the main constituents, but differed significantly, both qualitatively and quantitatively, from the one previously reported for the oil isolated from this plant species grown in Canada. The noted variations in the volatile profiles between European and North American populations could be a result of differing eco-geological factors. Some of the identified constituents in the presently analyzed *L. exaltatus* oils, *Massoia*-eicosalactone and docosalactone, represented new natural compounds.

◆ Chromatographic fractionations of the *L. exaltatus* aerial parts extract resulted in the isolation and successful identification of a number of wax constituents (*n*-, *iso*-, *anteiso*- and internally branched methyl alkanes), two pentacyclic triterpenes (ursolic and oleanolic acids), three hydroxycinnamic acids (*trans-p*-coumaric, *trans*-ferulic and *trans*-caffeic acid) and two flavones (apigenin and luteolin). The structures of these compounds were established on extensive spectroscopic analyses. Previous phytochemical studies of several *Lycopus* species have shown that (poly)phenolic compounds are very frequent within this genus, whereas pentacyclic triterpenes were up to now found only in *L. lucidus* Turcz.

◆ Some vegetative characters of *Lycopus* taxa show a high degree of variability leading to difficulty in their classification, as well as, in their infrageneric delimitation. Hence, the essential-oil composition data from the presently analyzed *Lycopus* species and those so far reported for additional four *Lycopus* taxa were statistically compared to test if the differences in these volatile profiles could provide some further insights into the complex taxonomic relationships between the members of this genus. The results of multivariate statistical analyses (MVA) performed using original variables (percentage composition of the oils) indicated that the composition of the volatiles within the members of this genus could also be

SECONDARY METABOLITES FROM SELECTED PLANT SPECIES FROM GENERA *LYCOPUS* AND *INULA*

noticeably affected by abiotic factors. However, the grouping of *Lycopus* samples obtained after MVA analyses using sums of constituent classes as variables was consistent with the previously proposed infrageneric classification based on nutlet morphological and anatomical characteristics. Interestingly, although *L. lucidus* is considered to be morphologically closely related to *L. europaeus*, the results of this study revealed that this taxon was chemotaxononomically, according to the composition of both volatile and non-volatile secondary metabolites, related to *L. exaltatus*.

◆ Very recently, we reported that *I. helenium* root essential oil possesses a very potent antistaphylococcal activity. Bioassay-guided fractionation of the oil pointed to eudesmane sesquiterpene lactones as the main carriers of the observed activity. However, the chemical composition of one minor fraction with a noteworthy minimal inhibitory concentration (MIC = 0.8 µg/mL) remained unknown. This fraction contained an unidentified sesquiterpene aldehyde and a series of nine compounds showing regularities in their GC retention behavior and possessing an analogous mass spectral data. These MS and GC data hinted that the compounds of this series could be 3-methyl-2-alkanones of varying chain lengths (C<sub>11</sub>–C<sub>19</sub>). As the isolation of single compounds from this fraction was impossible, herein, a combinatorial library of long-chain 3-methyl-2-alkanones was created in three synthetic steps with the overall yields of 50–65%. Gas chromatographic analyses of *I. helenium* essential-oil samples with spiked compounds from the synthesized library corroborated the tentative identifications of the long-chain 3-methyl-2-alkanones. The construction of GC-FID calibration curves for the synthesized 3-methyl-2-alkanones enabled the determination of their content in the plant material: 0.08–24.2 mg/100 g of dry roots. The *in vitro* antimicrobial activity assay revealed that 3-methyl-2-alkanones were not active against *Staphylococcus aureus* at the tested concentrations, but manifested selectivity toward one fungal strain –*Candida albicans*. This implied that the very high activity against *S. aureus* of this oil fraction comes from the still unidentified sesquiterpene aldehyde. Herein applied small combinatorial library approach enabled the first unequivocal identification of long-chain 3-methyl-2-alkanones as plant secondary metabolites, and, also, allowed determination of not only a single compound and biological properties, but those of a group of structurally related compounds.

◆ A predominantly odd-numbered, Gaussian-like distribution of the relative amounts of 3-methyl-2-alkanones, from *I. helenium* root essential oil, was also observed. This

distribution pattern indicated that their biosynthesis is related to that of fatty acids and related compounds, so we proposed three possible biosynthetic pathways by which 3-methyl-2- alkanones could be generated. Thus, for this class of wax compounds the Gaussian parameter  $\sigma$  could be interpreted as the error of the first elongase enzyme system involved in the biosynthesis of fatty acid-derived compounds.

♦ In order to identify the major component and active principle of the mentioned *I. helenium* essential-oil fraction with very potent anti-staphylococcal activity, larger quantity of the oil was fractionated by chromatography on  $\text{SiO}_2$ . However, chromatographic fractionation enabled only the isolation of a milligram-scale sample enriched with this unknown compound (*ca.* 85%). Detailed analyses of 1D and 2D NMR spectra of this original complex sample allowed access to a very limited amount of structural data for the unknown aldehyde. We decided to investigate the potential usefulness of lanthanide-induced shift reagents for the resolution and assignation of overlapped  $^1\text{H}$  NMR signals originating from different components of this complex mixture (*i.e.* for a qualitative analysis). The incremental addition of  $\text{Eu}(\text{fod})_3$  led to a simplification of NMR spectra in terms of signal overlap and removal of chemical shift degeneracy, allowing the mining of crucial data from the shifted NMR spectra. 2D NMR spectra ( $^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY, NOESY, HSQC and HMBC) of the sample mixed with  $\text{Eu}(\text{fod})_3$  proved to be particularly valuable in this respect. The application of this new structural elucidation methodology based on the analyses of shifted 1D- and 2D-NMR spectra of the mentioned mixture revealed that the unknown compound was a rare sesquiterpene - elemenal (elema-1,3,11(13)-trien-12-al). Alongside the total NMR assignments of elemenal, the data obtained from the shifted spectra (vinyl-allylic couplings, NOESY cross-peaks and  $\Delta\text{Eu}$  values) enabled a detailed assessment of the conformation that this sesquiterpene aldehyde adopts in its complex with  $\text{Eu}(\text{fod})_3$ . Providing this much data, this new approach in structure elucidation promises to be of great help in the NMR analysis of complex samples comprising of several compounds.

# LITERATURA

---

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS I INULA*

---

- Abdelhalim A, Chebib M, Aburjai T, Johnston GAR, Hanrahan JR (2014) *Adv Biol Chem* **4**:148-159
- Adams RP (2007) *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA
- Ahmad W, Nazir M, Chaudhary FM, Ahmad A (1996) *Z Naturforsch C* **51**:291-295
- Aladesanmi AJ, Odediran SA (2000) *Fitoterapia* **71**:179-182
- Al-Mekhlafi NA, Shaaria K, Abas F, Jeyaraj EJ, Stanslas J, Khalivulla SI, Lajis NH (2013) *Nat Prod Commun* **8**:447-451
- Andrade MS, Sampaio TS, Nogueira PCL, Ribeiro AS, Bittrich V, Amaral MCE (2007) *Chem Nat Compd* **43**:221-224
- Assimopoulou AN, Papageorgiou VP (2005) *Biomed Chromatogr* **19**:285-311
- Aufmkolk M, Amir SM, Kubota K, Ingbar SH (1985) *Endocrinology* **116**:1677-1686
- Auldridge ME, Guo Y, Austin MB, Ramsey J, Fridman E, Pichersky E, Noela JP (2012) *Plant Cell* **24**:1596-1607
- Baby S, Dan M, Thaha ARM, Johnson AJ, Kurup R, Balakrishnapillai P, Lim CK (2009) *Flavour Frag J* **24**:301-308
- Bağci E, Başer KHC, Kürkçüoğlu M, Babaç T, Çelik S (1999) *Flavour Frag J* **14**:47-49
- Baldovini N, Tomi F, Casanova J (2003) *Phytochem Anal* **14**:241-244
- Barrero AF, Herrador MM, Quílez del Moral JF, Arteaga P, Meine N, Pérez-Morales MC, Catalán JV (2011) *Org Biomol Chem* **9**:1118-1125
- Barros MESB, Freitas JCR, Oliveira JM, da Cruz CHB, da Silva PBN, de Araújo LCC, Militão GCG, da Silva TG, Oliveira RA, Menezes PH (2014) *Eur J Med Chem* **76**:291-300
- Baser KHC, Demirçakmak B, Duman H (1997) *J Essent Oil Res* **9**:545-549
- Beer AM, Wiebelitz KR, Schmidt-Gayk H (2008) *Phytomedicine* **15**:16-22
- Bell DJ, Palmer A (1952) *J Chem Soc* 3763-3770
- Bel-Rhlid R, Thapa D, Krahenbuehl K, Hansen CE, Fischer L (2013) *AMB Express* **3**:28
- Bernini R, Mincione E, Barontini M, Provenzano G, Setti L (2007) *Tetrahedron* **63**:9663-9667
- Biondi D, Cianci P, Gerad C, Ruberto G, Piattelli M (1993) *Flavour Frag J* **8**:331-337
- Blagojević PD, Radulović NS (2012) *Nat Prod Commun* **7**:1407-1410

## SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

- Bohlmann F, Mahanta PK, Jakupović J, Rastogi RC, Natu AA (1978) *Phytochemistry* **17**:1165-1172
- Bohlmann F, Zdero C (1977) *Phytochemistry* **16**:1243-1245
- Boukhebt H, Chaker AN, Belhadj H, Sahli F, Ramdhani M, Laouer H, Harzallah D (2011) *Der Pharma Lett* **3**:267-275
- Briquet J, Labiateae (1896) In: Engler A, Prantl K (Eds), *Die natürlichen pflanzenfamilien* 4, Engelmann, Leipzig, Germany, pp. 183-375
- Brophy JJ, Goldsacka RJ, Forster RI (1998) *J Essent Oil Res* **10**:73-75
- Brown PD, Tokuhisa JG, Reichelt M, Gershenson J (2003) *Phytochemistry* **62**:471-481
- Bucar F, Kartnig Th (1994) *Planta Med* **61**:378-380
- Bucar F, Kartnig Th, Paschek G, Winkler E, Schubert-Zsilavecz M (1995) *Planta Med* **61**:489
- Budzikiewicz H, Wilson JM, Djerrassi C (1963) *J Am Chem Soc* **85**:3688-3699
- Burger BV, Viviers MZ, Bekker JPI, le Roux M, Fish N, Fourie WB, Weibchen G (2008) *J Chem Ecol* **34**:659-671
- Burns DC, Ellis DA, March RE (2007) *Magn Reson Chem* **45**:835-845
- Cantrell CL, Abate L, Froncsek FR, Franzblau SG, Quijano L, Fischer NH (1999) *Planta Med* **65**:351-355
- Cantrell CL, Fischer NH, Urbatsch L, McGuire MS, Franzblau SG (1998) *Phytomedicine* **5**:137-145
- Cantrell CL, Mamonov LK, Ryabushkina N, Kustova TS, Fischer NH, Schrader KK (2007) *Arkivoc* **2007**:65-75
- Cantrell CL, Pridgeon JW, Froncsek FR, Becnel JJ (2010) *Chem Biodivers* **7**:1681-1697
- Cardona W, Quiñones W, Robledo S, Vélez ID, Murga J, García-Fortanet J, Carda M, Cardona D, Echeverri F (2006) *Tetrahedron* **62**:4086-4092
- Castaño M, Cardona W, Quiñones W, Robledo S, Echeverri F (2009) *Molecules* **14**:2491-2500
- Cisowski W, Zielinska-Stasiek M, Stolyhwo A, Dembinska-Migas W, Migas P, Luczkiewicz M (1996) *Acta Chromatogr* **6**:54-60
- Chakrabarty T, Poddar G, st. Pyrek J (1982) *Phytochemistry* **21**:1814-1816
- Chase J, Touhara K, Prestwich GD, Schal C, Blomquist GJ (1992) *P Natl Acad Sci USA* **89**:6050-6054

---

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

---

- Chaturvedi D (2011) In: Tiwari VK (Ed) *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*, Research Signpost, Kerala, India, pp. 313-334
- Chen C-N, Huang H-H, Wu C-L, Lin CPC, Hsu JTA, Hsieh H-P, Chuang S-E, Lai G-M (2007) *Cancer Lett* **246**:237-252
- Cheng X-R, Ye J, Ren J, Zeng Q, Zhang F, Qin J-J, Shen Y-H, Zhang W-D, Jin H-Z (2012) *Biochem Syst Ecol* **42**:75-78
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2007) *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth informational supplement. Document M 100-S17*, NCCLS, Wayne, PA, USA
- Cockerill AF, Davies GLO, Harden RC, Rackam DM (1973) *Chem Rev* **73**:552-588
- Crellin JK, Philpott J (1997) *Herbal Medicine Past and Present: A Reference Guide to Medicinal Plants* (2<sup>nd</sup>edn.), Duke University Press, Durham, NC, USA
- Čanadanović-Brunet JM, Đilas SM, Ćemković GS, Tumbas VT, Malešević ZN (2002) *Acta periodica technologica* **33**:127-134
- de Kraker J-W, Franssen MCR, de Groot A, Shibata T, Bouwmeester HJ (2001) *Phytochemistry* **58**:481-487
- De Pasquale A (1984) *J Ethnopharmacol* **11**:1-16
- De Sousa Menezes F, Kaplan MAC (2006) *Rev Latinoamer Quím* **34**:1-3
- Denic V, Weissman JS (2007) *Cell* **130**:663-677
- Deriu A, Zanetti S, Sechi LA, Marongiu B, Piras A, Porcedda S, Tuveri E (2008) *Int J Antimicrob Ag* **31**:588-590
- Dewick PM (2002) *Medicinal Natural Products*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England
- Dorn DC, Alexenizer M, Hengstler JG, Dorn A (2006) *Phytother Res* **20**:970-980
- Drew BT, Sytsma KJ (2012) *Am J Bot* **99**:933-953
- Evans GB, Furneaux RH, Gravestock MB, Lynch GP, Scott GK (1999) *Bioorg Med Chem* **7**:1953-1964
- Faraldos JA, Wu S, Chappell J, Coates RM (2007) *Tetrahedron* **63**:7733-7742
- Fecka I, Cisowski W (1999) *Chromatographia* **49**:256-260
- Finocchiaro P, Recca A, Maravigna P, Montaudo G (1974) *Tetrahedron* **30**:4159-4169
- Fischer NH, Lu T, Cantrell CL, Castañeda-Acosta J, Quijano L, Franzblau SG (1998) *Phytochemistry* **49**:559-564

---

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

---

- Fitsiou I, Tzakou O, Hancianu M, Poiata A (2007) *J Essent Oil Res* **19**:183-185
- Flockhart BD, Thorburn Burns D (1987) *Pure Appl Chem* **59**:915-926
- Francke W (2010) *Chemoecology* **20**:163-169
- Fridman E, Wang J, Iijima Y, Froehlich JE, Gang DR, Ohlrogge J, Pichersky E (2005) *Plant Cell* **17**:1252-1267
- Furuya T, Orihara Y, Hayashi C (1987) *Phytochemistry* **26**:715-719
- Gansow OA, Willcott MR, Lenkinski RE (1971) *J Am Chem Soc* **93**:4295-4297
- Garbisch EW (1964) *J Am Chem Soc* **86**:5561-5564
- Gibbons S, Oluwatuyi M, Veitch NC, Gray AI (2003) *Phytochemistry* **62**:83-87
- Gökçen OA, Morgan ED, Dani FR, Agosti D, Wehner R (2002) *J Chem Ecol* **28**:71-87
- Grayer RJ, Eckert MR, Veitch NC, Kite GC, Marin PD, Kokubun, Simmonds MSJ, Paton AJ (2003) *Phytochemistry* **64**:519-528
- Gumbinger HG, Winterhoff H, Sourgens H, Kemper FH, Wylde R (1990) *Contraception* **23**:661-666
- Gumbinger HG, Winterhoff H, Wylde R, Sosa A (1992) *Planta Med* **58**:49-50
- Haraguchi H, Saito T, Okamura N, Yagi A (1995) *Planta Med* **61**:333-336
- Harley RM, Atkins S, Budantsev AL, Cantino PD, Conn BJ, Grayer R, Harley MM, De Kok R, Krestovskaja T, Morales R, Paton A, Ryding O, Upson T (2004) In: Kadereit JW (Ed) *The families and genera of vascular plants, vol VII. Flowering plants: dicotyledons* (Lamiales except Acanthaceae including Avicenniaceae). Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 167-275
- Harvey AL (2008) *Drug Discov Today* **13**:894-901
- Henderson NC (1962) *Am Midl Nat* **68**:95-138
- Hertz-Schünemann R, Dorfner R, Yeretzian C, Streibel T, Zimmermann R (2013) *J Mass Spectrom* **48**:1253-1265
- Hinckley CC (1969) *J Am Chem Soc* **91**:5160-5162
- Hinckley CC, Klotz MR, Patil F (1971) *J Am Chem Soc* **93**:2417-2420
- Hochmut DH, Koning WA, Joulain D (2003) *Massfinder 2.3: Software and Data Bank*, Hamburg, Germany; available at <http://www.massfinder.com>
- Hoerhammer L, Wagner H, Schilcher H (1962) *Arznei-Forschung* **12**:1-7
- Hofer O (1976) In: Allinger NL, Eliel EL (Eds.) *Topics in Stereochemistry*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 111-197

**SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

- Howard RW, Blomquist GJ (2005) *Annu Rev Entomol* **50**:371-393
- Howell DC (2008) *Fundamental statistics for the behavioral sciences* (6<sup>th</sup> edn.), Thomson Wadsworth, Belmont, CA, USA
- Huang S-C, Hoc C-T, Lin-Shiau S-Y, Lin J-K (2005) *Biochem Pharmacol* **69**:221-232
- Hube B (2004) *Curr Opin Microbiol* **7**:336-341
- Huo Y, Shi H, Wang M, Li X (2008a) *Magn Reson Chem* **46**:1208-1211
- Huo Y, Shi HM, Wang MY, Li XB (2008b) *Pharmazie* **63**:699-703
- Hussein AA, Rodriguez B (2000) *J Nat Prod* **63**:419-421
- Hussein AA, Rodriguez B, de la Paz Martínez-Alcázar M, Cano FH (1999) *Tetrahedron* **55**:7375-7388
- Hwang DR, Wu YS, Chang CW, Lien TW, Chen WC, Tan UK, Hsu JT, Hsieh HP (2006) *Bioorg Med Chem* **14**:83-91
- Ikeda Y, Murakami A, Ohigashi H (2008) *Mol Nutr Food Res* **52**:26-42
- Inagaki F, Miyazawa T (1980) *Prog Nucl Mag Res Sp* **14**:67-111
- Itô S, Endo K, Honma H, Ota K (1965) *Tetrahedron Lett* **6**:3777-3781
- Jaiswal R, Kiprotich J, Kuhnert N (2011) *Phytochemistry* **72**:781-790
- Jeremić D, Macura S, Milosavljević S, Vajs V (1985) *Tetrahedron* **41**:357-364
- Jiang H-L, Chen J, Jin X-J, Yang J-L, Li Y, Yao X-J, Wu Q-X (2011) *Tetrahedron* **67**:9193-9198
- Josifović M (1974) *Flora SR Srbije*, Tom VI, SANU, Naučno delo, Beograd, Srbija
- Jossang A, Jossang P, Hadi HA, Sevenet T, Bodo B (1991) *J Org Chem* **56**:6527-6530
- Kabouche A, Kabouche Z, Öztürk M, Kolak U, Topçu G (2007) *Food Chem* **102**:1281-1287
- Kaneda T (1991) *Microbiol Rev* **55**:288-302
- Kartnig Th, Bucar F (1995) *Planta Med* **61**:392
- Kaur N, Lacasse M, Fürtösa A, Waldrona KC, Morin A (2009) *J Chromatogr A* **1216**:4703-4712
- Kavouras IG, Stratigakas N, Stephanou EG (1998) *Environ Sci Technol* **32**:1369-1377
- Khan A, Rahman M, Islam MS (2009) *Pharm Biol* **47**:1187-1191
- Khan M, Yi F, Rasul A, Li T, Wang N, Gao H, Gao R, Ma T (2012) *IUBMB Life* **64**:783-794
- Koizumi S, Matsushima Y, Nagatsu T, Iinuma H, Takeuchi T, Umezawa H (1984) *Biochim Biophys Acta* **789**:111-118

---

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

---

- Kolak U, Kabouche A, Öztürk M, Kabouche Z, Topçu G, Ulubelen A (2009) *Phytochem Analysis* **20**:320-327
- Kolesnikov MP, Gins VK (2001) *Appl Biochem Micro+* **37**:392-399
- König GM, Wright AD (1995) *Magn Reson Chem* **33**:178-183
- Konishi T, Shigeo K, Nahoko U (2008) *Appl Entomol Zool* **43**:77-81
- Konishi T, Shimada Y, Nagao T, Okabe H, Konoshima T (2002) *Biol Pharm Bull* **25**:1370-1372
- Kowalewska K, Lutomski J (1978) *Herba Pol* **24**:107-113
- Kozłowski J, Dedio I, Krzyzaniak M (1998) *Herba Pol* **44**:161-164
- Kuhnz W, Rembold H (1977) *Z Naturforsch C* **32**:563-566
- Kunst L, Samuels L (2009) *Curr Opin Plant Biol* **12**:721-727
- Kuźma Ł, Różalski M, Walencka E, Różalska B, Wysokińska H (2007) *Phytomedicine* **14**:31-35
- Lamaison JL, Petitjean-Freytet C, Carnat A (1991) *Pharm Acta Helv* **66**:185-188
- Lampman GM, Aumiller JC (1988) *Org Synth* **6**:179
- Lanfranchi DA, Tomi F, Casanova J (2010) *Phytochem Anal* **21**:597-601
- Lawrence BM (1989) Labiate Oils – Mother Nature’s Chemical Factory, *11<sup>th</sup> International Congress of Essential Oils, Fragrances and Flavors*, November 11-16, New Delhi, India
- Lazarević JS, Palić RM, Radulović NS, Ristić NR, Stojanović GS (2010) *J Serb Chem Soc* **75**:1347-1359
- Lee WS, Im K-R, Park Y-D, Sung N-D, Jeong T-S (2006) *Biol Pharm Bull* **29**:382-384
- Li C, Li Z-L, Wang T, Qian S-H (2014) *Chem Nat Compd* **50**:288-290
- Li QQ, Wang G, Huang F, Li JM, Cuff CF, Reed E (2013) *Med Oncol* **30**:488-498
- Li Y, Ni Z-Y, Zhu M-C, Dong M, Wang S-M, Shi Q-W, Zhang M-L, Wang Y-F, Huo C-h, Kiyota H, Cong B (2012) *Z Naturforsch C* **67**:375-380
- Licandro-Seraut H, Roussel C, Perpetuini G, Gervais P, Cavin JF (2013) *Appl Microbiol Biot* **97**:7853-7864
- Liu J (1995) *J Ethnopharmacol* **49**:57-68
- Liu J (2005) *J Ethnopharmacol* **100**:92-94
- Lotti G, Averna V (1969) *Riv Ital Sostanze Gr* **46**:668-672
- Ma X-C, Liu K-X, Zhang B-J, Xin X-L, Huang J (2008) *Magn Reson Chem* **46**:1084-1088
- Maffei M (1994) *Biochem Syst Ecol* **22**:711-728

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

- Maffei M, Scannerini S (1993) *Biochem Syst Ecol* **21**:475-486
- Malakov PY, Papanov GY, Tomova KN, Rodriguez B, de la Torre MC (1998) *Phytochemistry* **48**:557-559
- Marin P, Sajdl V, Kapor S, Tatić B, Petković B (1991) *Phytochemistry* **30**:2979-2982
- Marbles MJ (1966) *New Zeal J Ecol* **13**:29-34
- Mastronicolis SK, Arvanitis N, Karaliota A, Litos C, Stavroulakis G, Moustaka H, Tsakirakis A, Heropoulos G (2005) *Food Microbiol* **22**:213-219
- Matsui K, Sugimoto K, Mano J, Ozawa R, Takabayashi J (2012) *PLoS ONE* **7**:e36433
- Maurer B, Grieder A (1977) *Helv Chim Acta* **60**:2177-2190
- Mayo BC (1973) *Chem Soc Rev* **2**:49-74
- McDowell PG, Lwande W, Deans SG, Waterman P (1988) *Phytochemistry* **27**:2519-2521
- Mendes E, Marco JL, Rodriguez B, Jimeno ML, Lobo AM, Prabhakar S (1989) *Phytochemistry* **28**:1685-1690
- Milosavljević S, Jeremić D, Macura S, Vajs V (1986) *Croat Chem Acta* **58**:399-405
- Milosavljević SM (2004) *Strukturne instrumentalne metode*, Hemijski fakultet, Beograd, Srbija
- Miyazawa M, Hisama M (2003) *Biosci Biotech Bioch* **67**:2091-2099
- Mongrand S, Badoc A, Patouille B, Lacomblez C, Chavent M, Cassagne C, Bessoule JJ (2001) *Phytochemistry* **58**:101-115
- Montaudo G, Librando V, Caccamese S, Maravigna P (1973) *J Am Chem Soc* **95**:6365-6370
- Moon H-K, Hong S-P (2006) *J Plant Res* **119**:633-644
- Moon H-K, Hong S-P (2003) *Ann Bot Fenn* **40**:191-198
- Moon H-K, Smets E, Huysmans S (2010) *Taxon* **59**:1065-1076
- Murata T, Watahiki M, Tanaka Y, Miyase T, Yoshizaki F (2010) *Chem Pharm Bull* **58**:394-397
- Murga J, García-Fortanet J, Carda M, Marco JA (2004) *J Org Chem* **69**:6967-7402
- Nahrstedt A, Albrecht M, Wray V, Gumbinger HG, John M, Winterhoff H, Kemper FH (1990) *Planta Med* **56**:395-398
- Nakamura S, Hatanaka A (2002) *J Agr Food Chem* **50**:7639-7644
- Nan M, Vlase L, Eşianu S, Tămaş M (2011) *Acta Medica Marisiensis* **57**:319-323
- Nelson DR, Sukkestad DR, Zaylskie RG (1972) *J Lipid Res* **13**:413-421
- Ntalli NG, Manconi F, Leonti M, Maxia A, Caboni P (2011) *J Agr Food Chem* **59**:7098-7103

**SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

- Nuriddinov KhR, Khodzimatov KKh, Aripov KhN, Ozek T, Demirchakmak B, Baser KHC (1997) *Chem Nat Compd* **33**:299-300
- Ohnuma S-I, Ito M, Koyama T, Ogura K (1989) *Tetrahedron* **45**:6145-6160
- Olešnikov DN, Tankhaeva LM (2012) *Chem Nat Compd* **48**:317-318
- Orjala J, Wright AD, Rali T, Sticher O (1993) *Nat Prod Lett* **2**:231-236
- O'Shea S, Lucey B, Cotter L (2009) *Brit J Biomed Sci* **66**:186-189
- Ovesná Z, Vachálková A, Horváthová K, Tóthová D (2004) *Neoplasma* **51**:327-333
- Pádua TA, de Abreu BS, Costa TE, Nakamura MJ, Valente LM, Henriques Md, Siani AC, Rosas EC (2014) *Arch Pharm Res* **37**:1487-1495
- Palić R, Eglinton E, Benítez-Nelson BC, Eglinton G, Veličković J, Stojanović G (1999) *J Serb Chem Soc* **64**:443-446
- Park EJ, Kim YM, Park SW, Kim HJ, Lee JH, Lee DU, Chang KC (2013) *Food Chem Toxicol* **55**:386-395
- Pinn G (2005) In: Yaniv Z, Bachrach U (Eds.) *Handbook of Medicinal Plants*, The Haworth Press, Inc., Binghamton, NY, USA, pp. 383-398
- Pedersen JA (2000) *Biochem Syst Ecol* **28**:229-253
- Petinatti Pavarini D, Petinatti Pavarini S, Niehues M, Peoporine Lopes N (2012) *Anim Feed Sci Tech* **176**:5-16
- Petitjean D, Schmitt JF, Laine V, Bouroukba M, Cunat C, Dirand M (2008) *Energ Fuel* **22**:697-701
- Petitjean D, Schmitt JF, Laine V, Cunat C, Dirand M (2010) *Energ Fuel* **24**:3028-3033
- Post-Beittenmiller D (1996) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**:405-430
- Prachayashittikul S, Suphapong S, Worachartcheewan A, Lawung R, Ruchirawat S, Prachayashittikul V (2009) *Molecules* **14**:850-867
- Praczko A, Gora J (2001) *Herba Pol* **47**:191-202
- Qiu J, Luo M, Wang J, Dong J, Li H, Leng B, Zhang Q, Dai X, Zhang Y, Niu X, Deng X (2011) *FEMS Microbiol Lett* **324**:147-155
- Quang DN, Hashimoto T, Stadler M, Radulović N, Asakawa Y (2005) *Planta Med* **71**:1058-1062
- Queiroz EF, Marston A, Hostettmann K (2005) In: Elisabetsky E, Etkin NL (Eds.) *Ethnopharmacology: Encyclopedia of Life Support Systems* (EOLSS), Developed under

---

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

---

the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, England; available at  
<http://www.eolss.net>

Radulović N, Đorđević N, Denić M, Martins Gomes Pinheiro M, Dias Fernandes P, Boylan F

(2012) *Food Chem Toxicol* **50**:274-279

Radulović N, Mišić M, Aleksić J, Doković D, Palić R, Stojanović G (2007) *Fitoterapia* **78**:565-570

Radulović NS, Blagojević PD (2012) *Chem Biodivers* **9**:2324-2341

Rali T, Wossa SW, Leach DN (2007) *Molecules* **12**:149-154

Rates SMK (2001) *Toxicon* **39**:603-613

Raymer J, Wiesler D, Novotny M, Asa C, Seal US, Mech LD (1986) *J Chem Ecol* **12**:297-314

Reddy CM, Eglinton TI, Palić R, Benitez-Nelson BC, Stojanović G, Palić I, Djordjević S, Eglinton G (2000) *Org Geochem* **31**:331-336

Reich HJ (1995) *J Chem Educ* **72**:108

Řezanka T, Sigler K (2009) *Prog Lipid Res* **48**:206-238

Richheimer SL, Bernart MW, King GA, Kent MC, Bailey DT (1996) *J Am Oil Chem Soc* **73**:507-514

Ristorcelli D, Tomi F, Casanova J (1998) *Flavour Frag J* **13**:154-158

Rogge WF, Hildemann LM, Mazurek MA, Cass GR, Simoneit BRT (1994) *Environ Sci Technol* **28**:1375-1388

Rompel A, Fischer H, Meiws D, Buëldt-Karentzopoulos K, Dillinger R, Tuczak F, Witzel H, Krebs B (1999a) *J Biol Inorg Chem* **4**:56-63

Rompel A, Fischer H, Meiws D, Buëldt-Karentzopoulos K, Magrini A, Eicken C, Gerdemann C, Krebs B (1999b) *FEBS Lett* **445**:103-110

Różalski M, Kuźma Ł, Krajewska U, Wysokińska H (2006) *Z Naturforsch C* **61**:483-488

Sabulal B, Dan M, John AJ, Kurup R, Chandrika SP, George V (2007) *Flavour Frag J* **22**:521-524

Salum ML, Robles CJ, Erra-Balsells R (2010) *Org Lett* **12**:4808-4811

Sánchez-Maldonado AF, Schieber A, Gänzle MG (2011) *J Appl Microbiol* **111**:1176-1184

Sato K, Sugawara K, Takeuchi H, Park H-S, Akiyama T, Koyama T, Aoyagi Y, Takeya K, Tsugane T, Shimura S (2008) *Chem Pharm Bull* **56**:1691-1697

**SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

- Savina AA, Sheichenko VI, Fadeev NB, Sokol'skaya TA, Kir'yanova IA, Lasskaya OF, Maslyakoff VU, Nazarova EA (2013) *Voprosy Biologicheskoi, Meditsinskoi i Farmatsevticheskoi Khimii* **11**:154-157
- Schenato RA, dos Santos ÉM, Gonçalves PFB, Tenius BSM, de Oliveira ER, Caracelli I, Zukerman-Schpector J (2003) *Magn Reson Chem* **41**:53-60
- Schwab W, Mahr C, Schreier P (1989) *J Agr Food Chem* **37**:1009-1012
- Seger C, Hofer O, Greger H (2000) *Monatsh Chem* **131**:1161-1165
- Seo JY, Lim SS, Kim JR, Lim JS, Ha YR, Lee IA, Kim EJ, Park JH, Kim JS (2008) *Phytother Res* **22**:1500-1505
- Seo JY, Park J, Kim HJ, Lee IA, Lim JS, Lim SS, Choi SJ, Park JH, Kang HJ, Kim JS (2009) *J Med Food* **12**:1038-1045
- Setzer WN, Noletto JA, Lawton RO, Haber WA (2005) *Mol Divers* **9**:3-13
- Shepherd T, Griffiths DW (2006) *New Phytol* **171**:469-499
- Sharipov ShN, Goryaev MI, Khazanovich RL, Pulatova TP, Sharipova FS (1969) *Khim Prir Soedin+* **5**:316
- Shelukhina NA, Savina AA, Sheichenko VI, Kir'yanova IA, Osipov VI, Sokol'skaya TA, Bykov VA, Lasskaya OF (2011) *Voprosy Biologicheskoi, Meditsinskoi i Farmatsevticheskoi Khimii* **3**:6-9
- Shelukhina NA, Savina AA, Sheichenko VI, Sokol'skaya TA, Bykov VA (2010) *Voprosy Biologicheskoi, Meditsinskoi i Farmatsevticheskoi Khimii* **11**:7-11
- Simerský R, Novák O, Morris DA, Pouzar V, Strnad M (2009) *J Plant Growth Regul* **28**:125-136
- Ślusarczyk S, Hajnos M, Skalicka-Woźniak K, Matkowski A (2009) *Food Chem* **113**:134-138
- Smith ECJ, Kaatz GW, Seo SM, Wareham N, Williamson EM, Gibbons S (2007) *Antimicrob Agents Chemother* **51**:4480-4483
- Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L (1998) *Lett Appl Microbiol* **26**:118-122
- Spiridon I, Bodirlau R, Teaca C-A (2011) *Cent Eur J Biol* **6**:388-396
- Spiridonov NA, Konovalov DA, Arkhipov VV (2005) *Phytother Res* **19**:428-432
- Staib F, Tompak B, Thiel D, Blisse A (1978) *Mycopathologia* **66**:27-30
- Stedman RL (1968) *Chem Rev* **68**:153-207
- Steinmetz I, Schmolz E, Ruther J (2003) *Proc R Soc London B* **270**:385-391

### SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

- Stojakowska A, Kędzia B, Kisiel W (2005) *Fitoterapia* **76**:687-690
- Stojakowska A, Malarz J, Kisiel W (2004) *Z Naturforsch C* **59**:606-608
- Stojakowska A, Malarz J, Zubek S, Turnau K, Kisiel W (2010) *Biochem Syst Ecol* **38**:232-235
- Stojakowska A, Michalska K, Malarz J (2006) *Phytochem Analysis* **17**:157-161
- Stojanović-Radić Z, Čomić Lj, Radulović N, Blagojević P, Denić M, Miltojević A, Rajković J, Mihajilov-Krstev T (2012) *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**:1015-1025
- Su B-N, Takaishi Y, Yabuuchi T, Kusumi T, Tori M, Takaoka S, Honda G, Ito M, Takeda Y, Kodzhimatov OK, Ashurmetov O (2001) *J Nat Prod* **64**:466-471
- Sun I-C, Kashiwada Y, Morris-Natschke SL, Lee K-H (2003) *Curr Top Med Chem* **3**:155-169
- Swiatek L, Grabias B, Rozga M (1987) *Herba Pol* **33**:87-89
- Takeneda K (1974) *Tetrahedron* **30**:1525-1534
- Teng RW, Wang DZ, Wu YS, Lu Y, Zheng QT, Yang CR (2005) *Magn Reson Chem* **43**:92-96
- Terpinc P, Polak T, Negatin N, Hanzlowsky A, Poklar Ulrich N, Abramović H (2011) *Food Chem* **128**:62-69
- Thies W (1995) *Lipid/Fett* **97**:411-413
- Tomas-Barberan FA, Wollenweber E (1990) *Plant Syst Evol* **173**:109-118
- Topcu G, Turkmen Z, Schilling JK, Kingston DGI, Pezzuto JM, Ulubelen A (2008) *Pharm Biol* **46**:180-184
- Tsydendambaev VD, Christie WW, Brechany EY, Vereshchagin AG (2004) *Phytochemistry* **65**:2695-2703
- Tucakov J (1984) *Lečenje biljem*, Rad, Beograd, Srbija
- Turov AV, Bondarenko SP, Thachuk AA, Khilya VP (2005) *Russ J Org Chem* **41**:47-53
- Urzúa A, Rezende MC, Mascayano C, Vásquez L (2008) *Molecules* **13**:882-891
- Vajs V, Jeremić D, Milosavljević S, Macura S (1989) *Phytochemistry* **28**:1763-1764
- Vogel AI (1989) *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry* (5<sup>th</sup> edn.), Longman Scientific & Technical, Harlow, England
- von Wettstein-Knowles P (2007) *Plant J* **49**:250-264
- Vonhoff C, Baumgartner A, Hegger M, Korte B, Biller A, Winterhoff H (2006) *Life Sci* **78**:1063-1070

**SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

- Waechter AI, Ferreira ME, Fournet A, Rojas de Arias A, Nakayama H, Torres S, Hocquemiller R, Cavé A (1997) *Planta Med* **63**:433-435
- Wagner H, Chari VM, Sonnenbichler J (1976) *Tetrahedron Lett* **21**:1799-1802
- Wagner H, Hoerhammer L, Frank U (1970) *Arznei-Forschung* **20**:705-713
- Wagstaff SJ, Olmstead RG, Cantino PD (1995) *Am J Bot* **82**:886-892
- Wang Q, Yang Y, Zhao X, Zhu B, Nan P, Zhao J, Wang L, Chen F, Liu Z, Zhong Y (2006) *Food Chem* **98**:52-58
- Wei W, Huang H, Zhao S, Liu W, Liu CX, Chen L, Li JM, Wu YL, Yan H (2013) *Apoptosis* **18**:1060-1070
- Wineburg JP, Swern D (1972) *J Am Oil Chem Soc* **49**:267-273
- Wink M (2009) *Annual Plant Reviews* **39**:1-20
- Winterhoff H, Gumbinger HG, Sourges H (1988) *Planta Med* **54**:101-106
- Wojciechowski H, Gumbinger HG, Vahlensieck U, Winterhoff H, Nahrstedt A, Kemper FH (1995) *J Chromatogr A* **717**:261-270
- Wojdyło A, Oszmiański J, Czemerys R (2007) *Food Chem* **105**:940-949
- Wright AD, König GM, Sticher O (1992) *Phytochem Anal* **3**:73-79
- Wu M, Zhang H, Hu J, Weng Z, Li C, Li H, Zhao Y, Mei X, Ren F, Li L (2013) *PLoS One* **8**:e76000
- Yan H, Haiming S, Cheng G, Xiaobo L (2012) *Chem Nat Compd* **48**:522-524
- Yan H, Haiming S, Weiwei L, Mengyue W, Xiaobo L (2010) *J Pharm Biomed Anal* **51**:942-946
- Yang B-c, Peng T, Zhang Q, Yin Z-h, Kang W (2014) *Chem Nat Compd* **50**:169-171
- Yang C, Yang J, Sun M, Yan J, Meng X, Ma T (2013) *IUBMB Life* **65**:435-444
- Yang J-Y, Lee H-S (2012) *Pest Manag Sci* **68**:564-572
- Yang Z, Kitano Y, Chiba K, Shibata N, Kurokawa H, Doi Y, Arakawa Y, Tada M (2001) *Bioorg Med Chem* **9**:347-356
- Yi B, Hu L, Mei W, Zhou K, Wang H, Luo Y, Wei X, Dai H (2010) *Molecules* **16**:10157-10167
- Yoshioka T, Inokuchi T, Fujioka S, Kimura Y (2004) *Z Naturforsch C* **59**:509-514
- Yoshitaka U, Seiji H, Hiromichi N, Kiyoshi F (1990) *Flavour Frag J* **5**:85-88
- Youping Z, Grice K, Stuart-Williams H, Farquhar GD, Hocart CH, Lu H, Liu W (2010) *Phytochemistry* **71**:388-403

**SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

- Yu J-Q, Lei J-C, Zhang X-Q, Yu H-D, Tian D-Z, Liao Z-X, Zou G-L (2011) *Food Chem* **126**:1593-1598
- Yuasa Y, Yasushi K (2003) *J Agr Food Chem* **51**:4036-4039
- Zaikin VG, Borisov RS (2002) *J Anal Chem+* **57**:653-660
- Zaima K, Wakana D, Demizu Y, Kumeta Y, Kamakura H, Maruyama T, Kurihara M, Goda Y (2014) *J Nat Med* **68**:432-435
- Zhang Y, Bao YL, Wu Y, Yu CL, Huang YX, Sun Y, Zheng LH, Li YX (2013) *Mol Med Rep* **8**:967-972
- Zhao J, Li Y, Liu Q, Gao K (2010a) *Food Chem* **120**:512-516
- Zhao Y-M, Wang Y-j, Dong M, Zhang M-L, Huo C-H, Gu Y-C, Shi Q-W (2010b) *Chem Nat Compd* **46**:373-376
- Zhao Y-M, Zhang M-L, Shi Q-W, Kiyot H (2006) *Chem Biodivers* **3**:371-384
- Zong M-r, Zhao Y-h, Zhang K, Yang L-f, Zheng Y-c, He C-y (2011) *Chem Res Chinese U* **27**:241-244

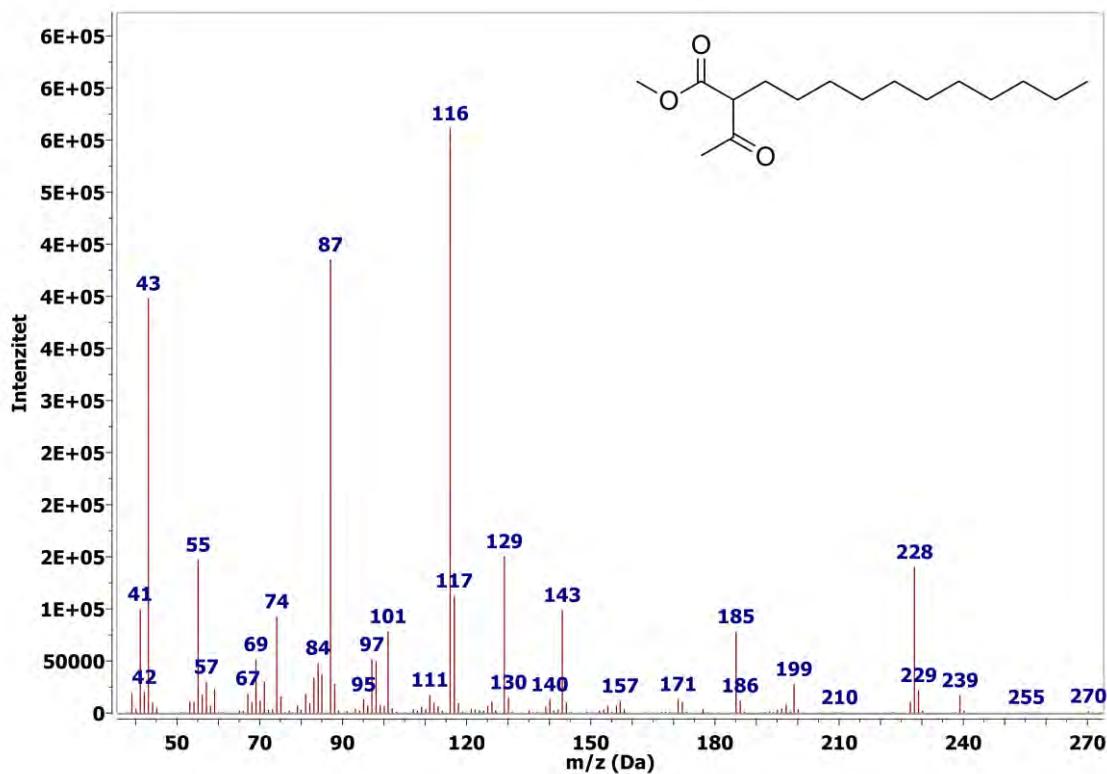
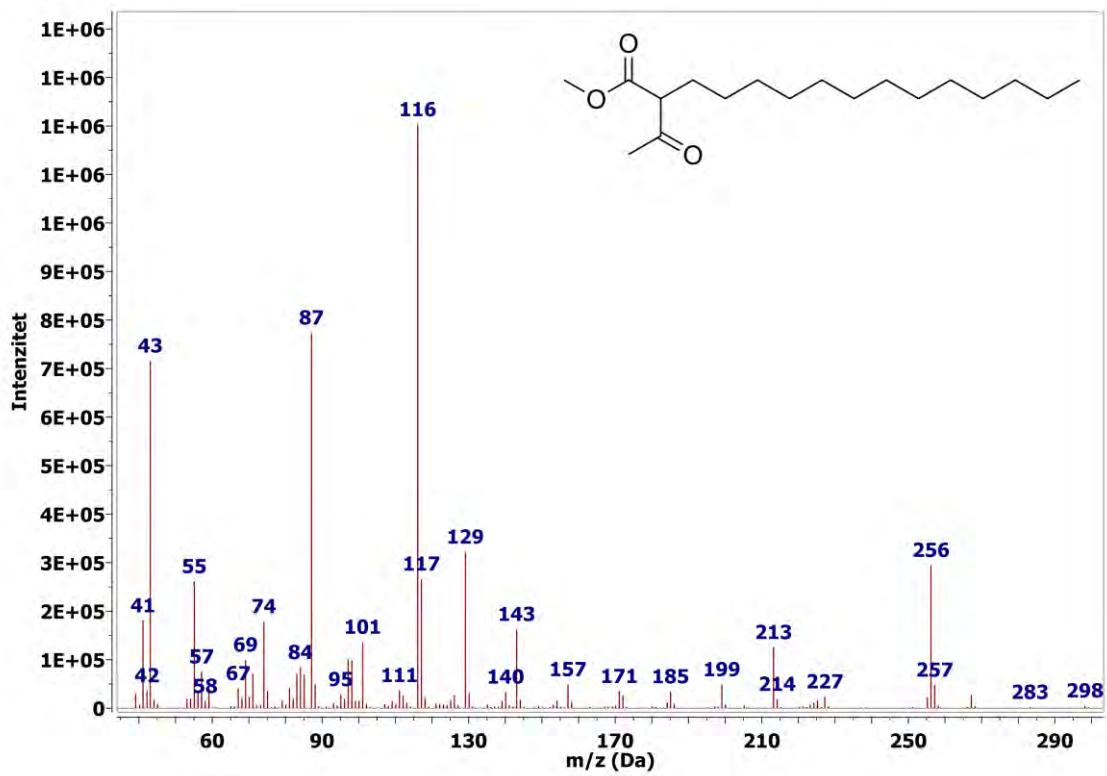


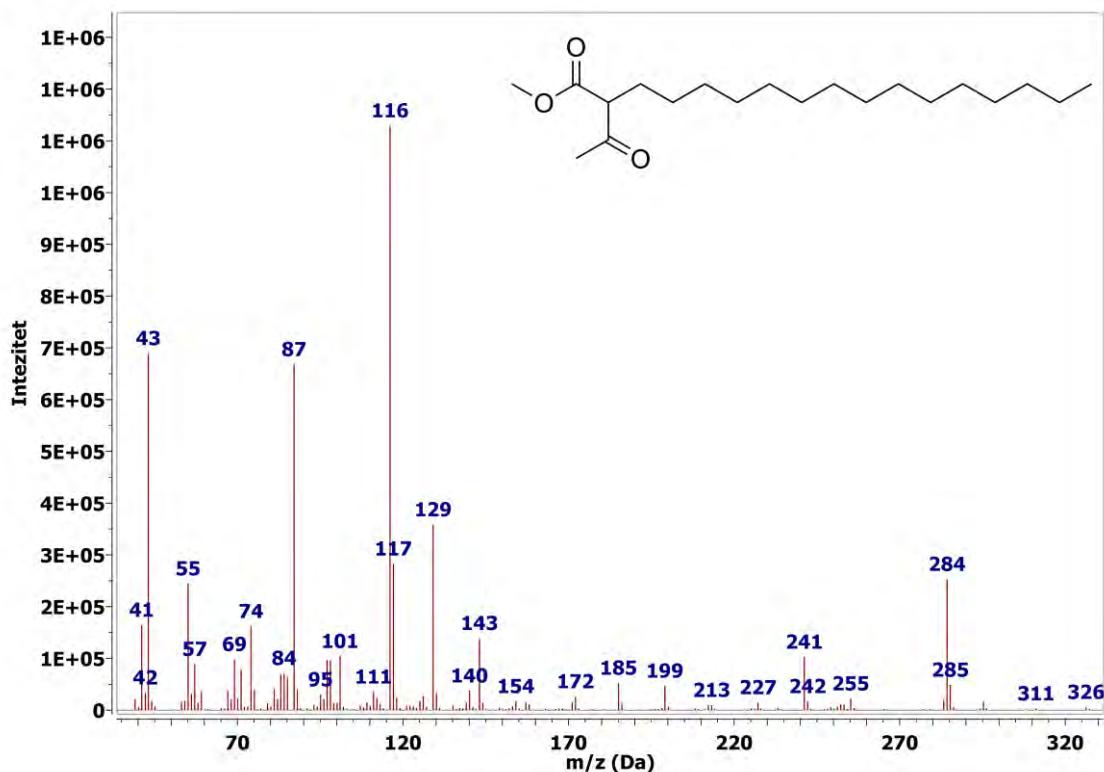
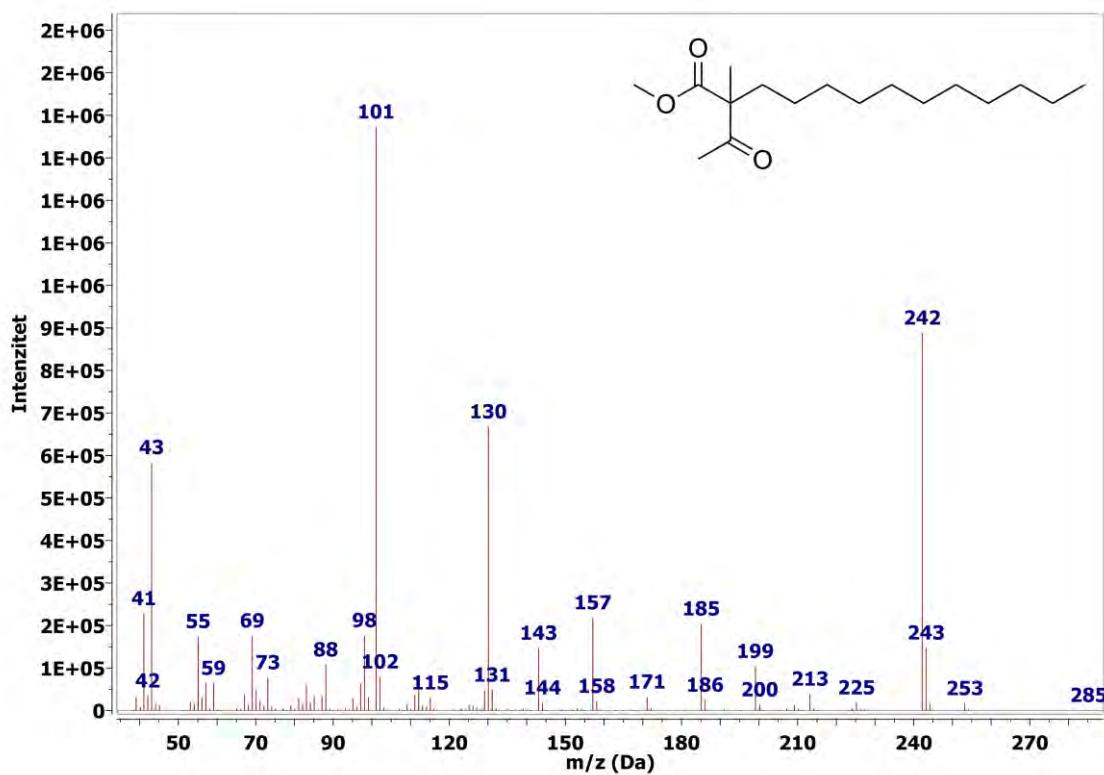
SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***- SPISAK PRILOGA -**

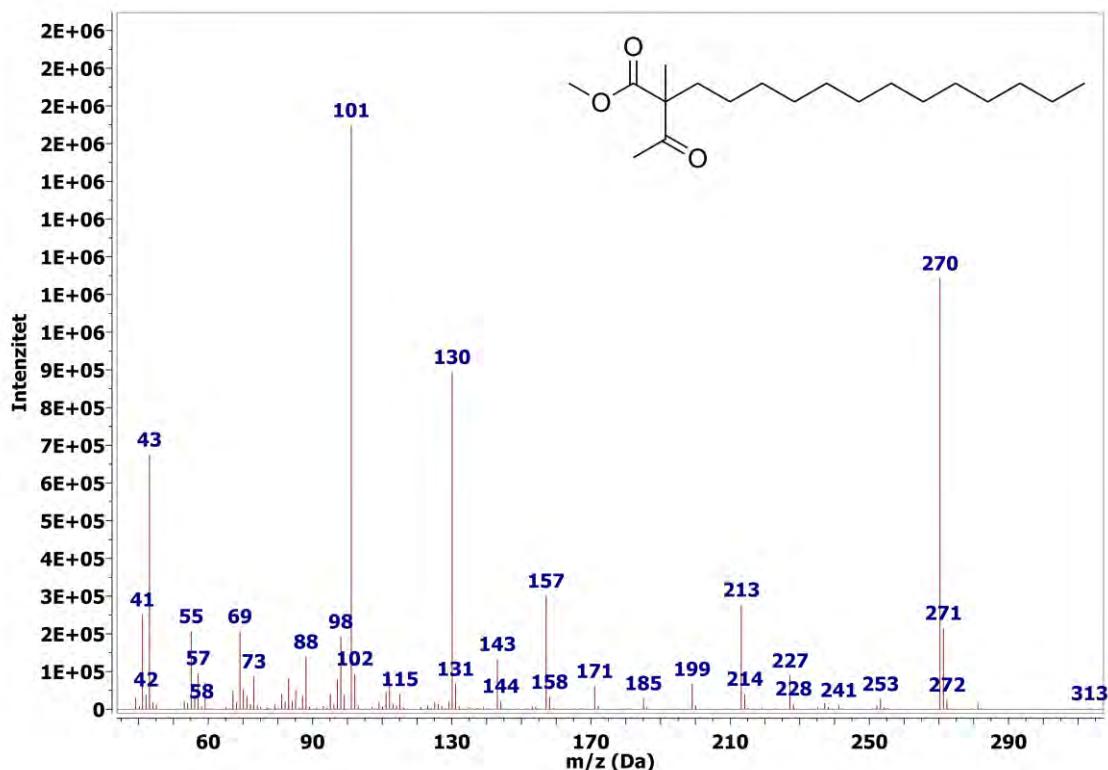
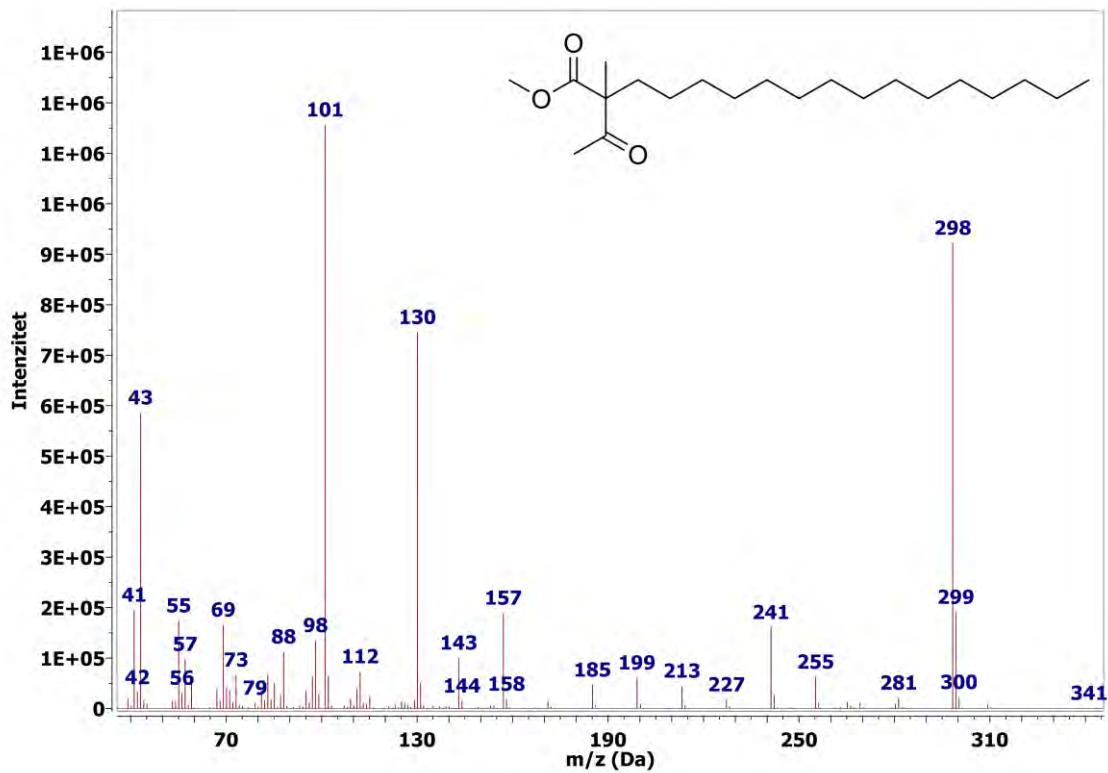
- PRILOG 1** (EI)MS SPEKTAR METIL-2-ACETILTRIDEKANOATA (**S<sub>5A</sub>**)
- PRILOG 2** (EI)MS SPEKTAR METIL-2-ACETILPENTADEKANOATA (**S<sub>7A</sub>**)
- PRILOG 3** (EI)MS SPEKTAR METIL-2-ACETILHEPTADEKANOATA (**S<sub>9A</sub>**)
- PRILOG 4** (EI)MS SPEKTAR METIL-2-ACETIL-2-METILTRIDEKANOATA (**S<sub>5B</sub>**)
- PRILOG 5** (EI)MS SPEKTAR METIL-2-ACETIL-2-METILPENTADEKANOATA (**S<sub>7B</sub>**)
- PRILOG 6** (EI)MS SPEKTAR METIL-2-ACETIL-2-METILHEPTADEKANOATA (**S<sub>9B</sub>**)
- PRILOG 7** (EI)MS SPEKTAR 3-METIL-2-TETRADEKANONA (**S<sub>5</sub>**)
- PRILOG 8** IR SPEKTAR 3-METIL-2-TETRADEKANONA (**S<sub>5</sub>**)
- PRILOG 9** <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) SPEKTAR 3-METIL-2-TETRADEKANONA (**S<sub>5</sub>**)
- PRILOG 10** <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) SPEKTAR 3-METIL-2-TETRADEKANONA (**S<sub>5</sub>**)
- PRILOG 11** (EI)MS SPEKTAR 3-METIL-2-HEKSADEKANONA (**S<sub>7</sub>**)
- PRILOG 12** IR SPEKTAR 3-METIL-2-HEKSADEKANONA (**S<sub>7</sub>**)
- PRILOG 13** <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) SPEKTAR 3-METIL-2-HEKSADEKANONA (**S<sub>7</sub>**)
- PRILOG 14** <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) SPEKTAR 3-METIL-2-HEKSADEKANONA (**S<sub>7</sub>**)
- PRILOG 15** (EI)MS SPEKTAR 3-METIL-2-OKTADEKANONA (**S<sub>9</sub>**)
- PRILOG 16** IR SPEKTAR 3-METIL-2-OKTADEKANONA (**S<sub>9</sub>**)
- PRILOG 17** <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) SPEKTAR 3-METIL-2-OKTADEKANONA (**S<sub>9</sub>**)
- PRILOG 18** <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) SPEKTAR 3-METIL-2-OKTADEKANONA (**S<sub>9</sub>**)
- PRILOG 19** DEPT135 (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) SPEKTAR 3-METIL-2-OKTADEKANONA (**S<sub>9</sub>**)
- PRILOG 20** <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H COSY SPEKTAR 3-METIL-2-OKTADEKANONA (**S<sub>9</sub>**)
- PRILOG 21** HSQC SPEKTAR 3-METIL-2-OKTADEKANONA (**S<sub>9</sub>**)
- PRILOG 22** (EI)MS SPEKTAR EUROABIENOLA (**I**)
- PRILOG 23** IR SPEKTAR EUROABIENOLA (**I**)
- PRILOG 24** UV-VIS SPEKTAR EUROABIENOLA (**I**)
- PRILOG 25** <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) EUROABIENOLA (**I**)
- PRILOG 26** <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) EUROABIENOLA (**I**) - UVEĆANJE OBLASTI OD 1,1 DO 2,3 PPM
- PRILOG 27** <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) EUROABIENOLA (**I**) - UVEĆANJE OBLASTI OD 2,45 DO 5,20 PPM
- PRILOG 28** <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) EUROABIENOLA (**I**) - UVEĆANJE OBLASTI OD 6,20 DO 6,80 PPM
- PRILOG 29** <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) SPEKTAR EUROABIENOLA (**I**)
- PRILOG 30** <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) SPEKTAR EUROABIENOLA (**I**) - UVEĆANJE OBLASTI OD 18 DO 34 PPM
- PRILOG 31** <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) SPEKTAR EUROABIENOLA (**I**) - UVEĆANJE OBLASTI OD 36 DO 77 PPM
- PRILOG 32** <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) SPEKTAR EUROABIENOLA (**I**) - UVEĆANJE OBLASTI OD 110 DO 185 PPM
- PRILOG 33** HSQC SPEKTAR EUROABIENOLA (**I**)
- PRILOG 34** UVEĆANJE HSQC SPEKTRA EUROABIENOLA (**I**) ( $\delta_H = 2 - 7 \text{ ppm}$ ,  $\delta_C = 15 - 135 \text{ ppm}$ )
- PRILOG 35** UVEĆANJE HSQC SPEKTRA EUROABIENOLA (**I**) ( $\delta_H = 1,15 - 2,30 \text{ ppm}$ ,  $\delta_C = 15 - 35 \text{ ppm}$ )
- PRILOG 36** HMBC SPEKTAR EUROABIENOLA (**I**)
- PRILOG 37** UVEĆANJE HMBC SPEKTRA EUROABIENOLA (**I**) ( $\delta_H = 4,95 - 6,90 \text{ ppm}$ )
- PRILOG 38** UVEĆANJE HMBC SPEKTRA EUROABIENOLA (**I**) ( $\delta_H = 2,7 - 4,6 \text{ ppm}$ )
- PRILOG 39** UVEĆANJE HMBC SPEKTRA EUROABIENOLA (**I**) ( $\delta_H = 1,15 - 2,25 \text{ ppm}$ )
- PRILOG 40** <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H COSY SPEKTAR EUROABIENOLA (**I**)
- PRILOG 41** NOESY SPEKTAR EUROABIENOLA (**I**)

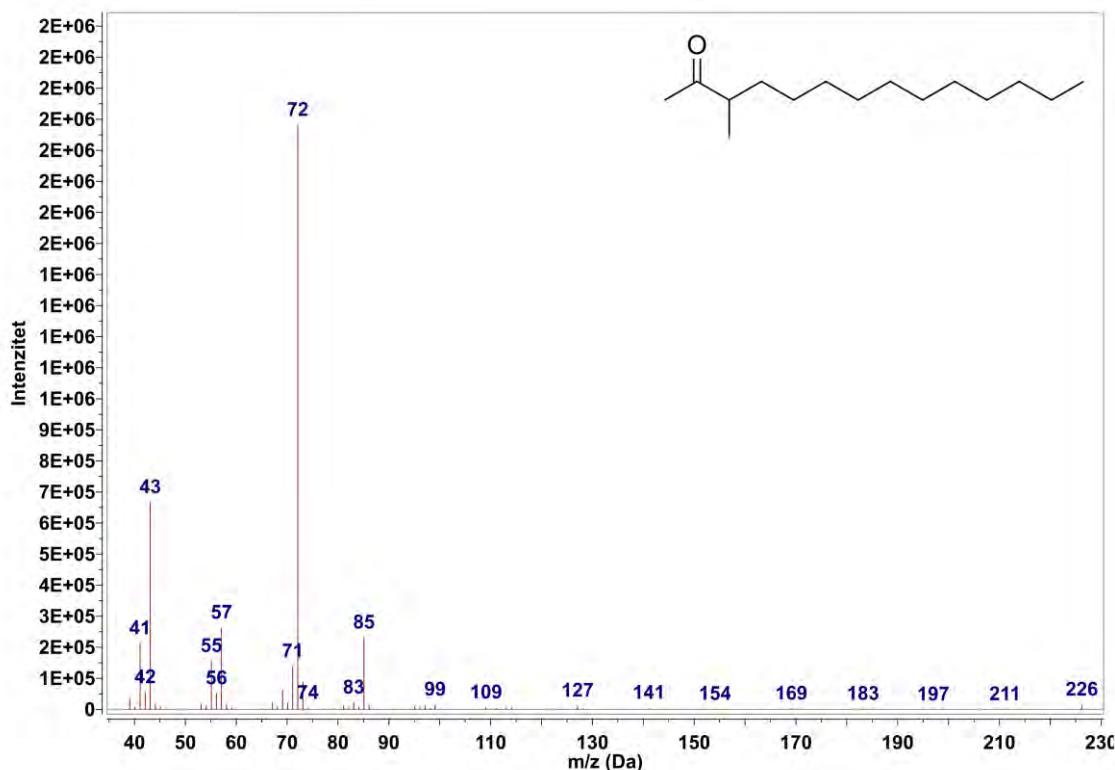
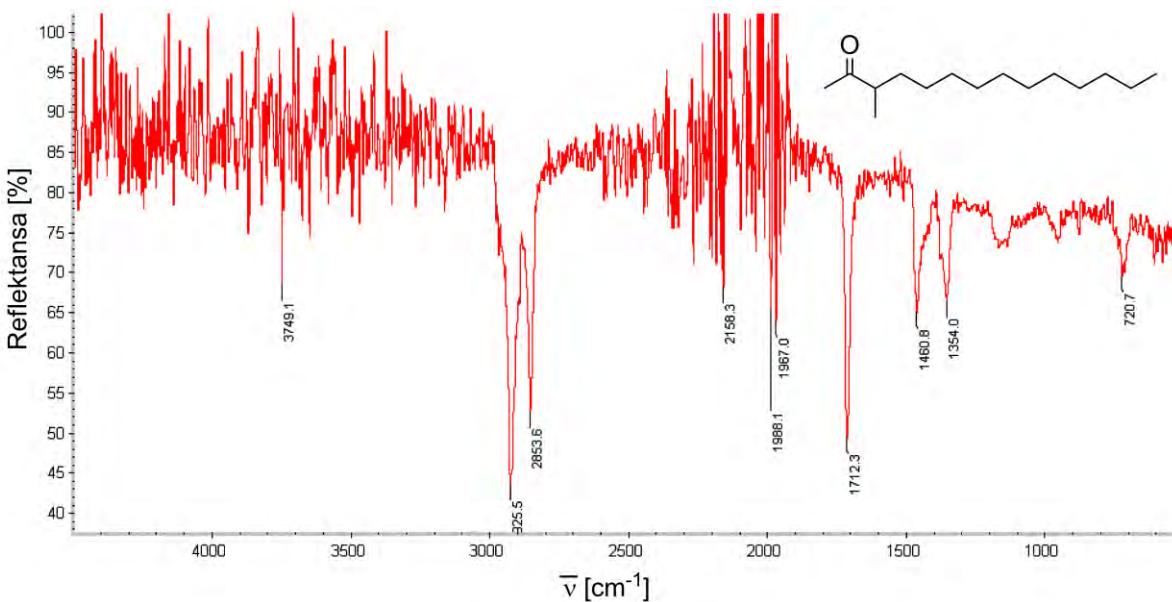
**SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA***

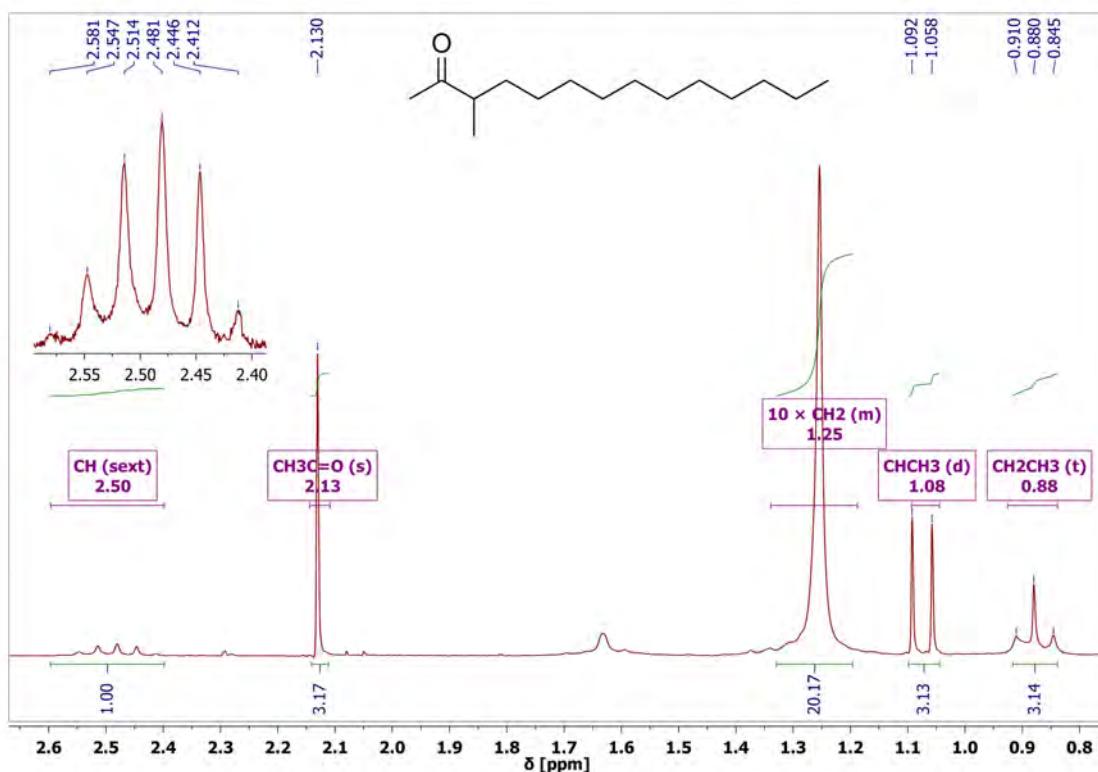
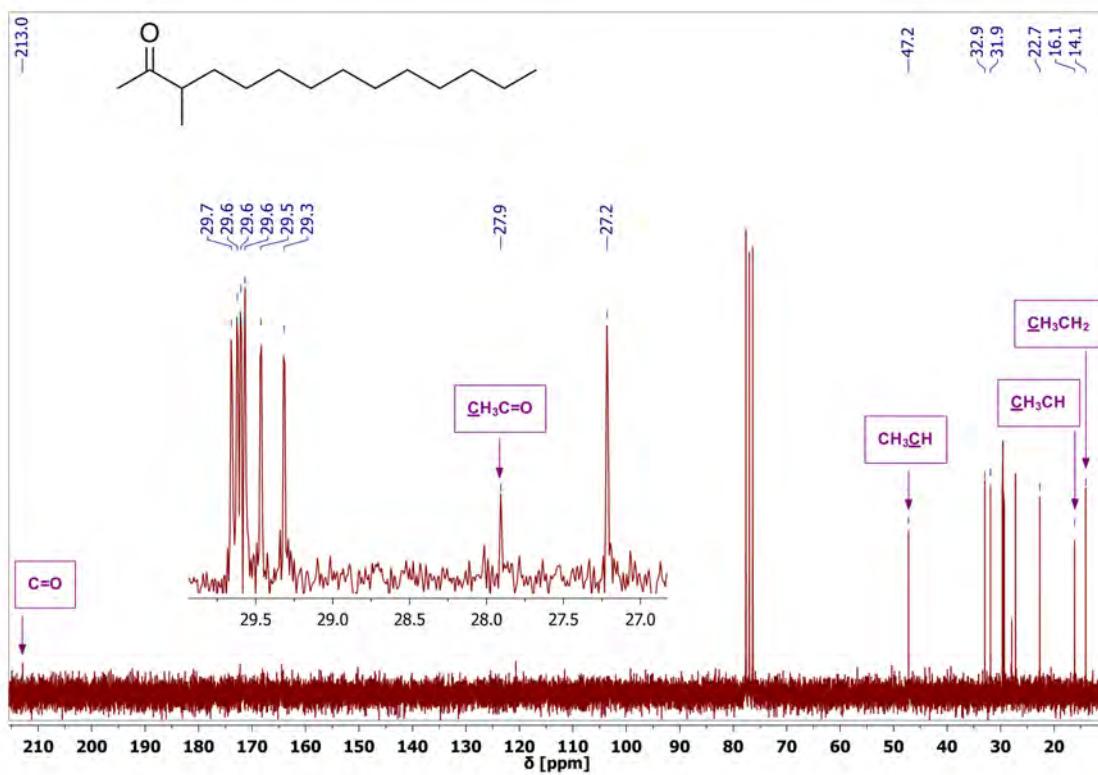
- 
- PRILOG 42** IR SPEKTAR POVRŠINSKIH ALKANA NEZRELIH PLODOVA BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS* (UZORAK **C<sub>1</sub>**)
- PRILOG 43** IR SPEKTAR POVRŠINSKIH ALKANA ZRELIH PLODOVA BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS* (UZORAK **D<sub>1</sub>**)
- PRILOG 44** IR SPEKTAR TRIACILGLICEROLA IZOLOVANIH IZ NEZRELIH PLODOVA BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS* (UZORAK **C<sub>2</sub>**)
- PRILOG 45** IR SPEKTAR TRIACILGLICEROLA IZOLOVANIH IZ ZRELIH PLODOVA BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS* (UZORAK **D<sub>2</sub>**)
- PRILOG 46** IR SPEKTAR METIL ESTARA DOBIJENIH BAZNO-KATALIZOVANOM TRANSESTERIFIKACIJOM TRIACILGLICEROLA IZOLOVANIH IZ NEZRELIH PLODOVA BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS* (UZORAK **C<sub>3</sub>**)
- PRILOG 47** IR SPEKTAR METIL ESTARA DOBIJENIH BAZNO-KATALIZOVANOM TRANSESTERIFIKACIJOM TRIACILGLICEROLA IZOLOVANIH IZ ZRELIH PLODOVA BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS* (UZORAK **D<sub>3</sub>**)
- PRILOG 48** PROCENTUALNI SADRŽAJ SASTOJAKA (> 1%) ETARSKIH ULJA VRSTA RODA *LYCOPUS* KOJI SU KORIŠĆENI ZA STATISTIČKU ANALIZU
- PRILOG 49** PROCENTUALNA ZASTUPLJENOST POJEDINIH KLASA JEDINJENJA U ETARSKIM ULJIMA VRSTA RODA *LYCOPUS* KOJA SU KORIŠĆENA ZA MULTIVARIJANTNU STATISTIČKU ANALIZU
- PRILOG 50** TRIVIJALNI NAZIVI I STRUKTURE JEDINJENJA KOJA SU IDENTIFIKOVANA U ETARSKIM ULJIMA VRSTA *L. EUROPAEUS* I *L. EXALTATUS*

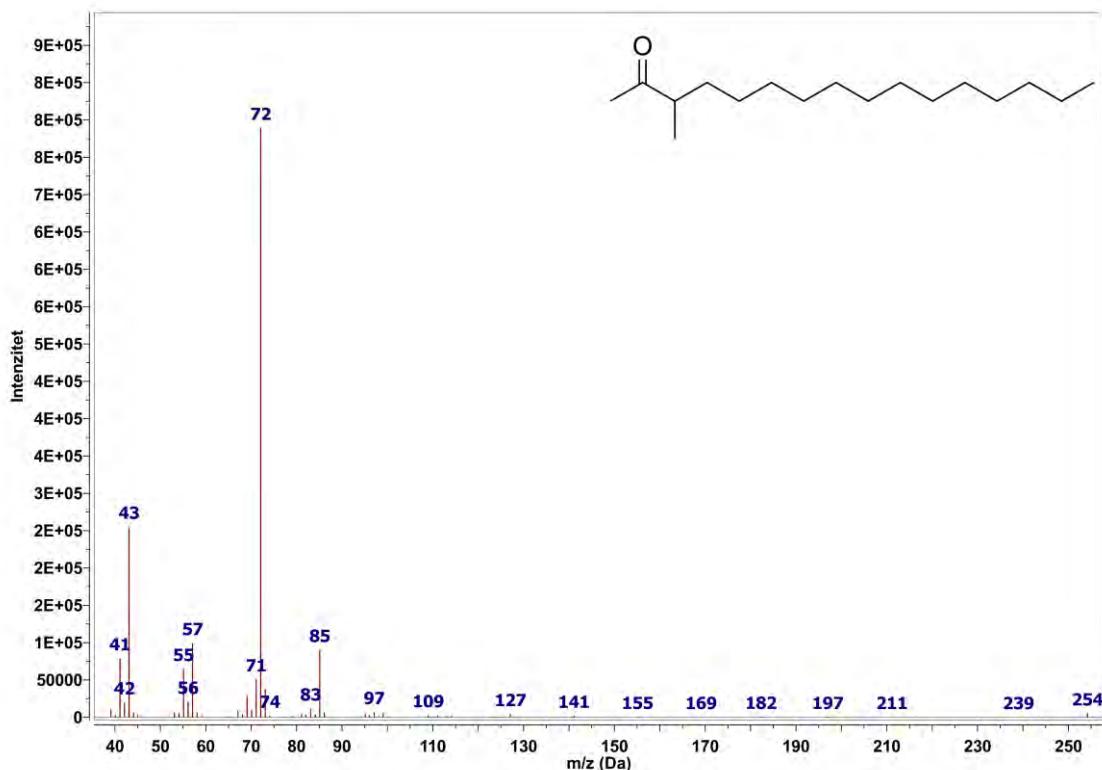
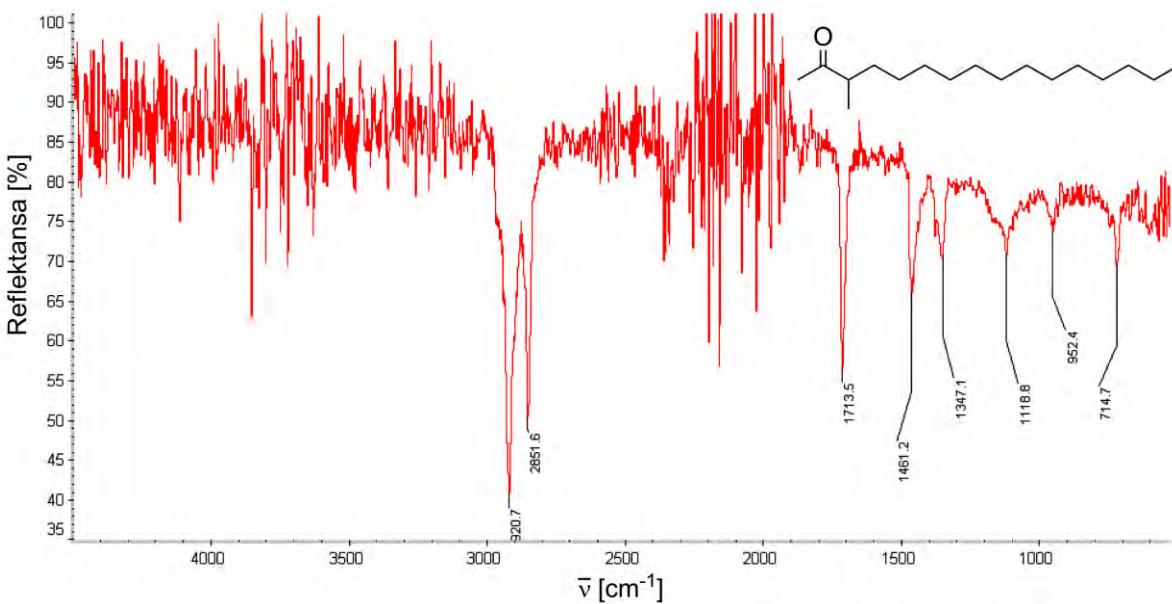
SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*PRILOG 1. (EI)MS SPEKTAR METIL-2-ACETILTRIDEKANOATA ( $S_{5A}$ )PRILOG 2. (EI)MS SPEKTAR METIL-2-ACETILPENTADEKANOATA ( $S_{7A}$ )

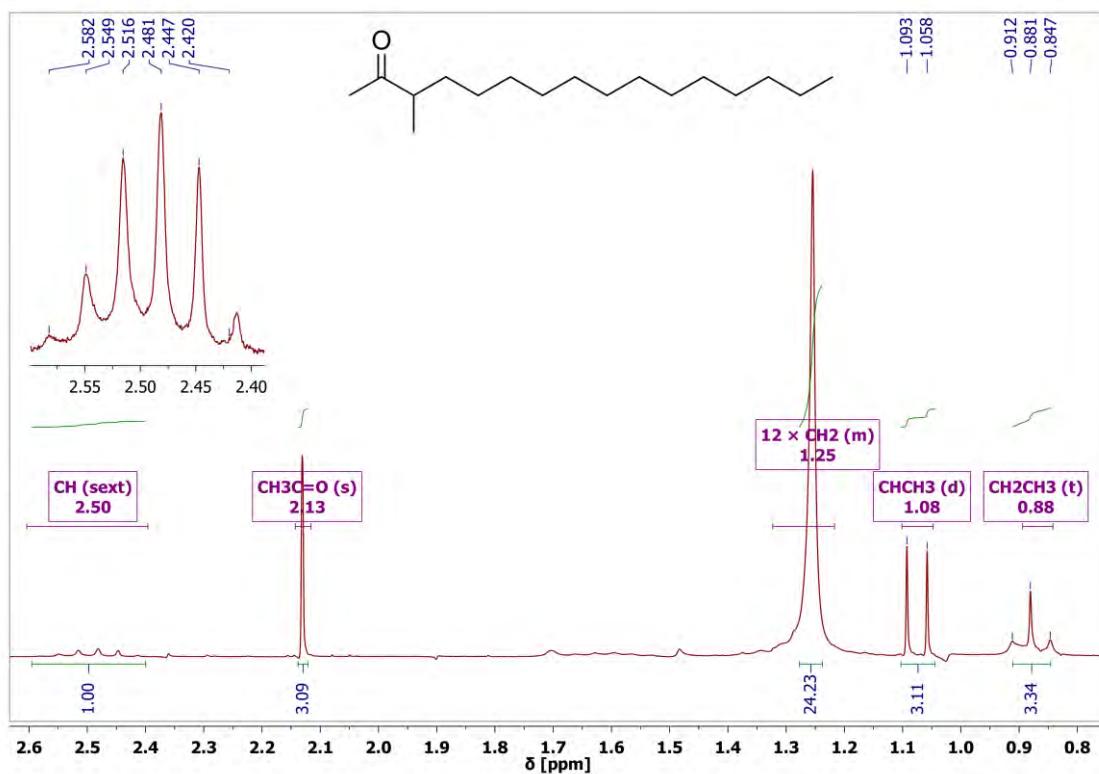
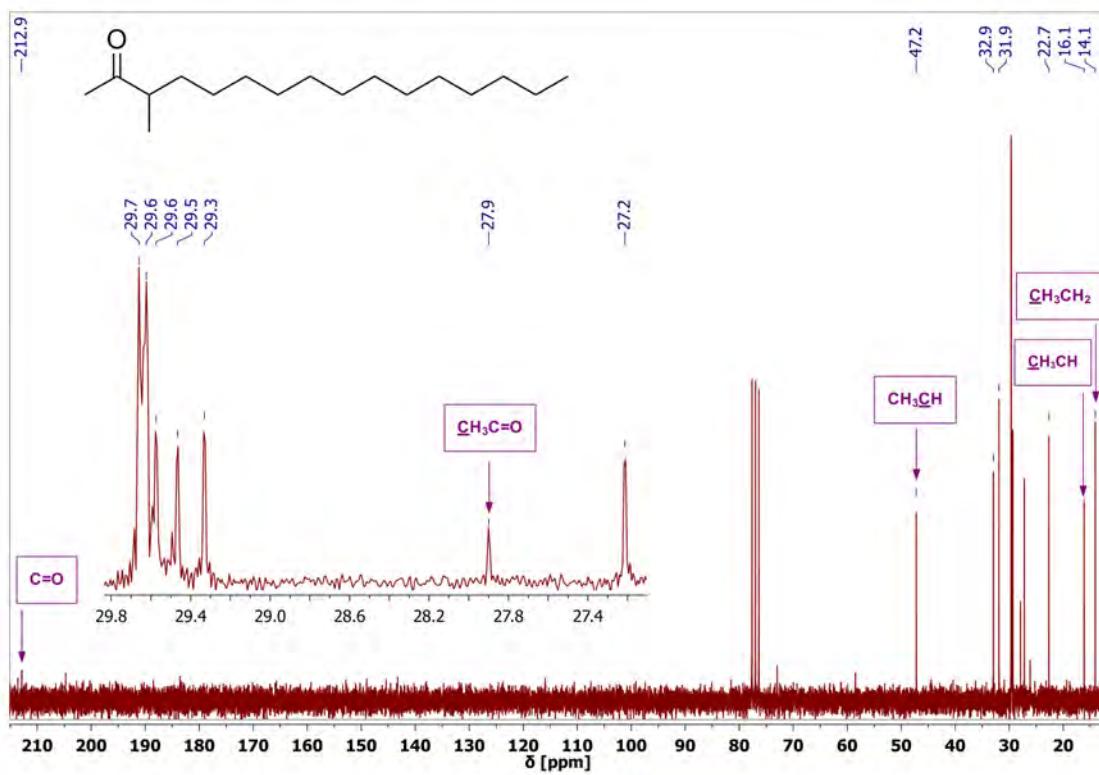
SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*PRILOG 3. (EI)MS SPEKTAR METIL-2-ACETILHEPTADEKANOATA ( $S_{9A}$ )PRILOG 4. (EI)MS SPEKTAR METIL-2-ACETIL-2-METILTRIDEKANOATA ( $S_{5B}$ )

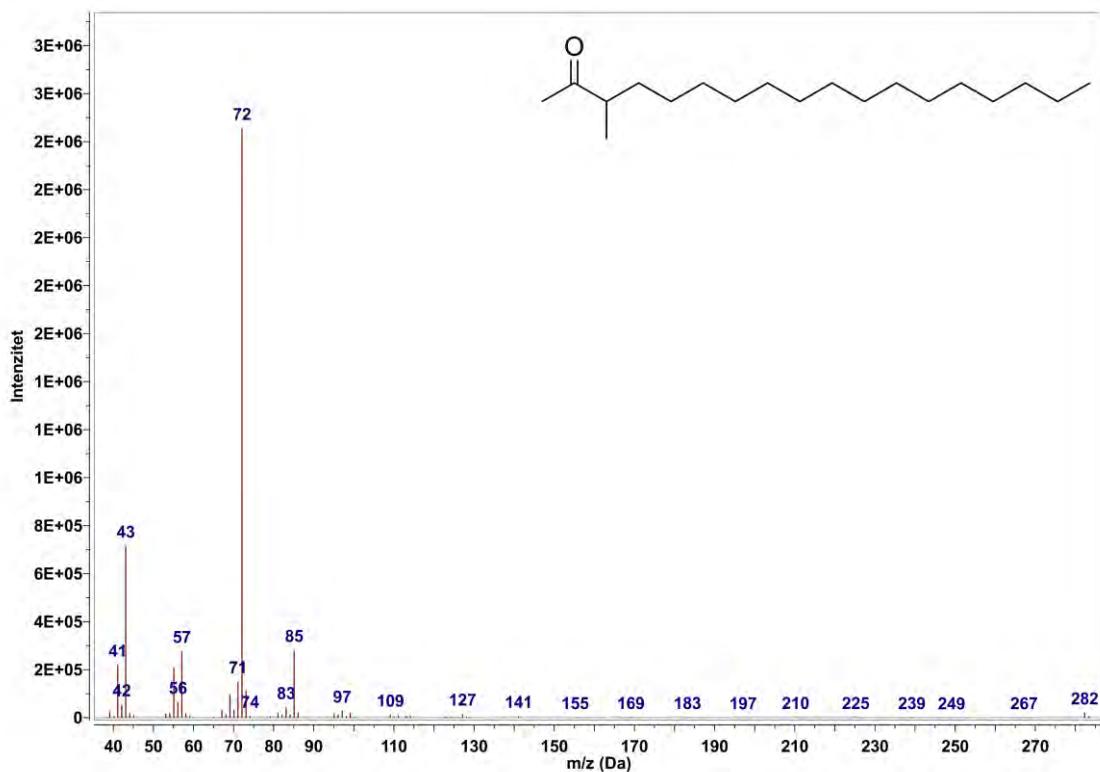
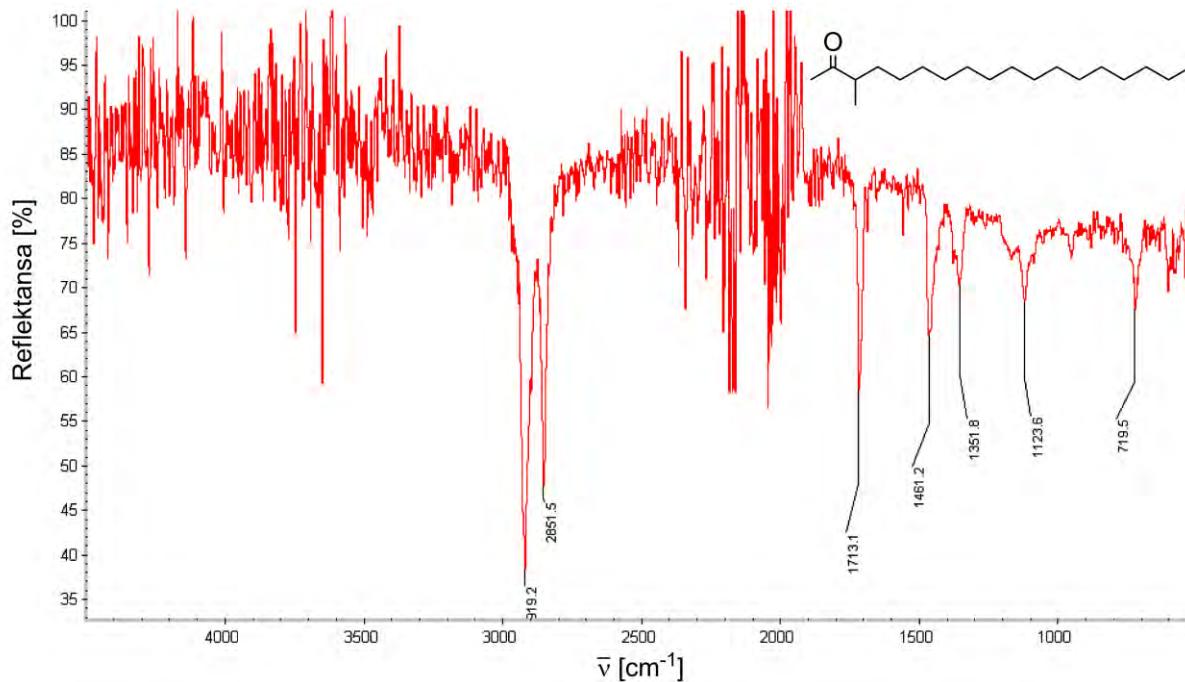
SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*PRILOG 5. (EI)MS SPEKTAR METIL-2-ACETIL-2-METILPENTADEKANOATA ( $S_{7B}$ )PRILOG 6. (EI)MS SPEKTAR METIL-2-ACETIL-2-METILHEPTADEKANOATA ( $S_{9B}$ )

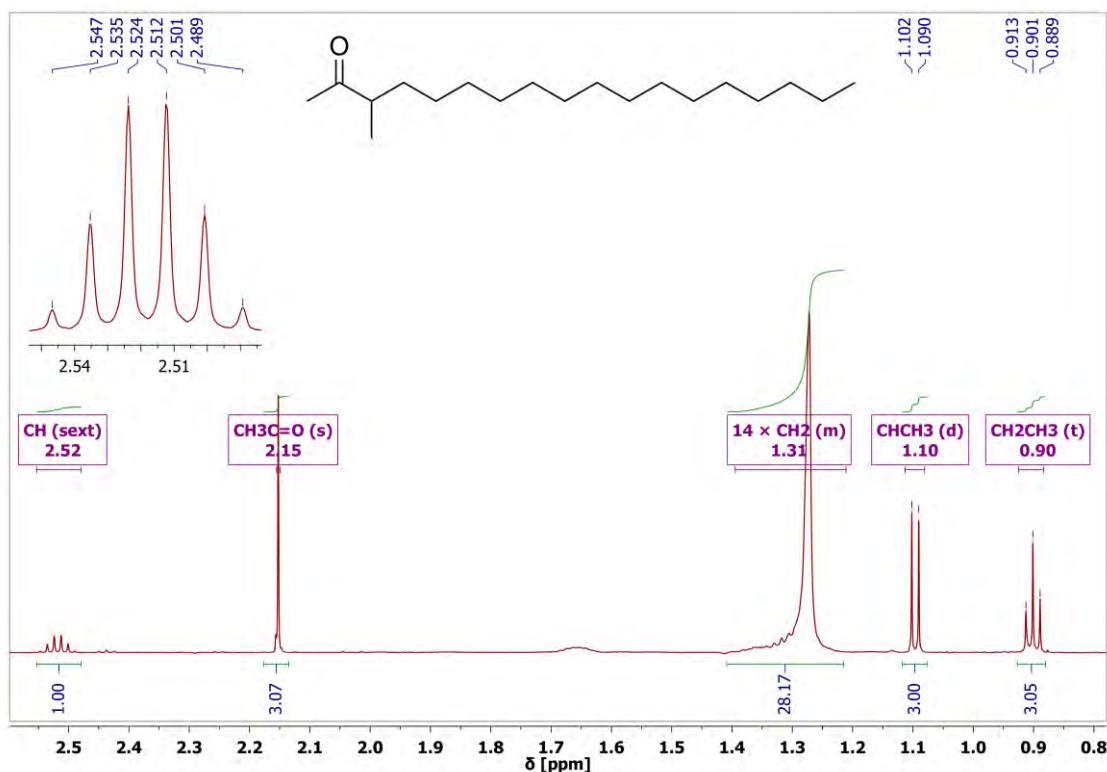
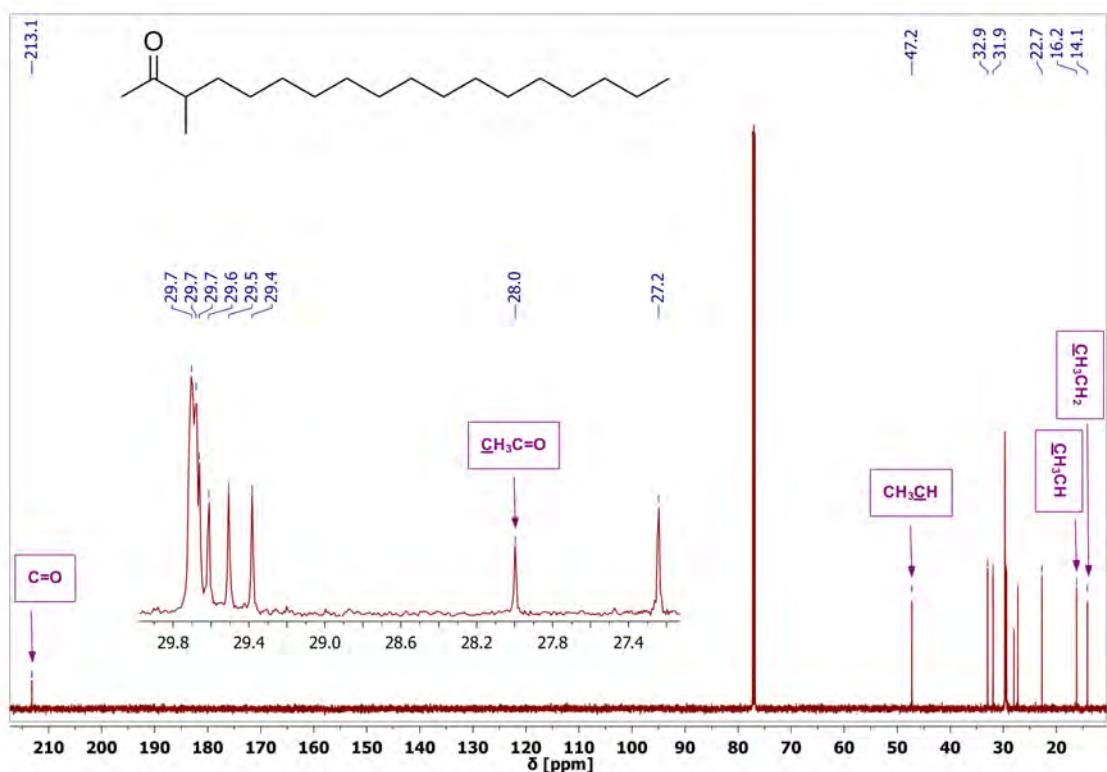
SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*PRILOG 7. (EI)MS SPEKTAR 3-METIL-2-TETRADEKANONA ( $S_5$ )PRILOG 8. IR SPEKTAR 3-METIL-2-TETRADEKANONA ( $S_5$ )

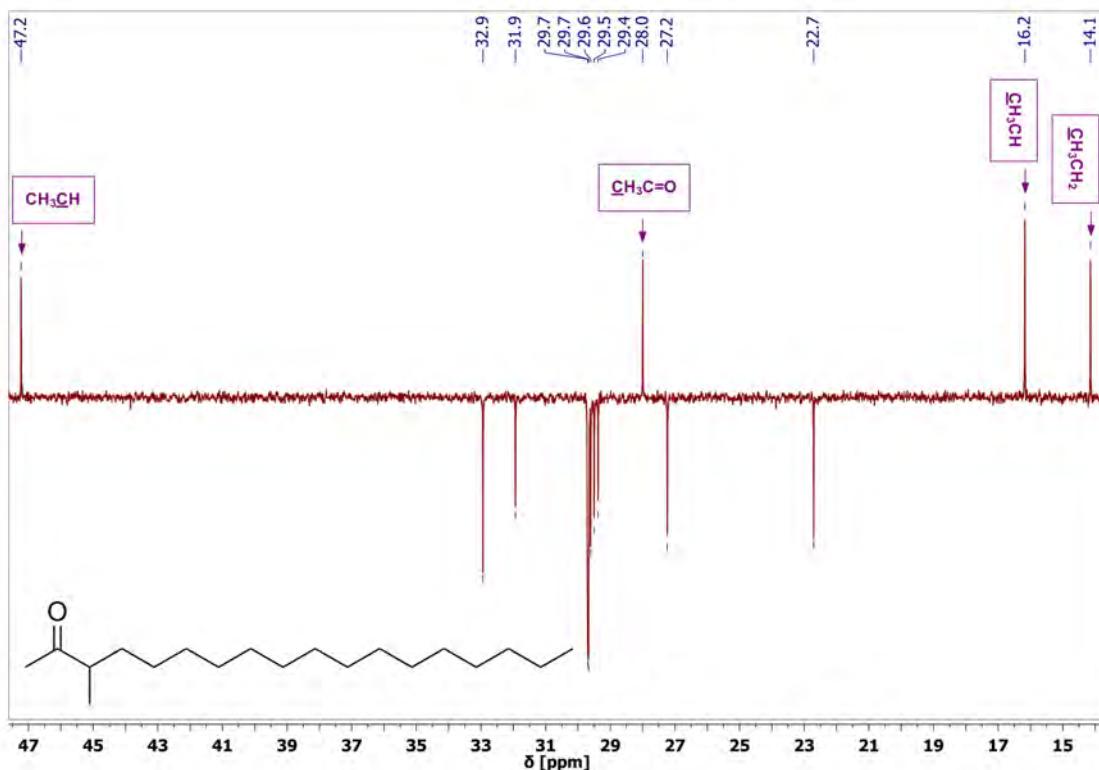
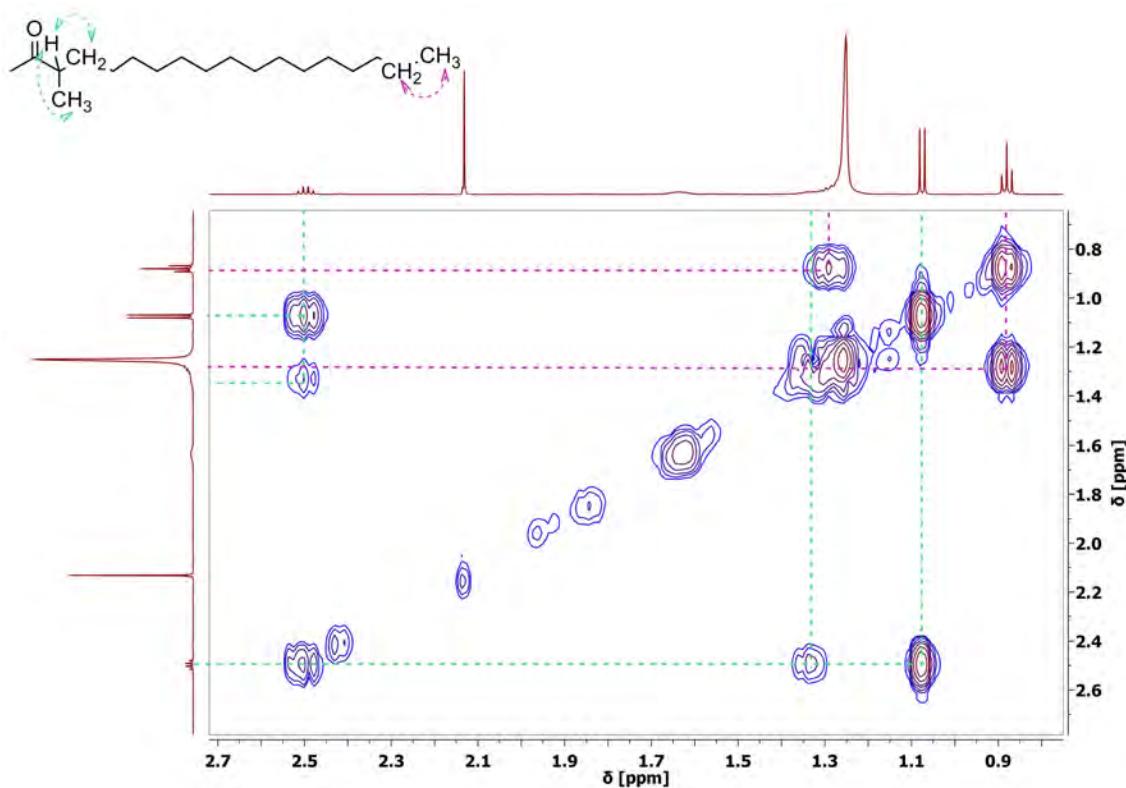
SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*PRILOG 9.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) SPEKTAR 3-METIL-2-TETRADEKANONA ( $\mathbf{S}_5$ )PRILOG 10.  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) SPEKTAR 3-METIL-2-TETRADEKANONA ( $\mathbf{S}_5$ )

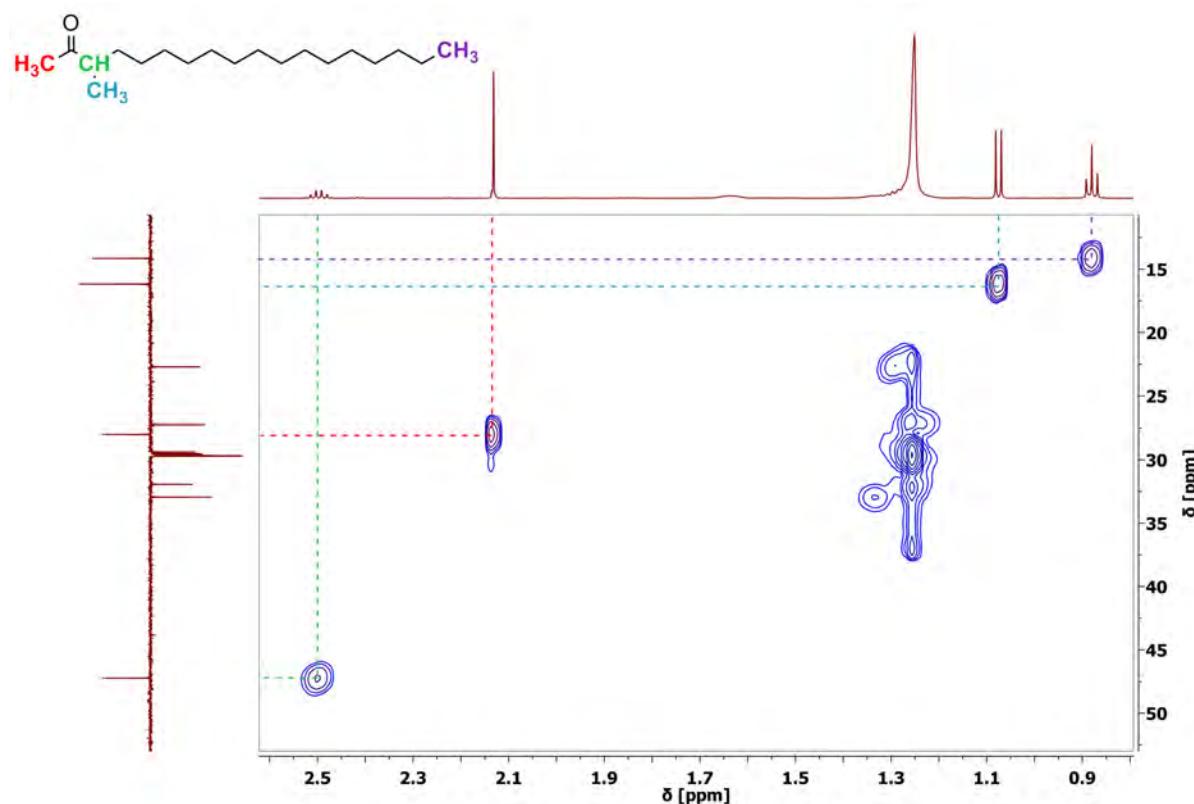
SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*PRILOG 11. (EI)MS SPEKTAR 3-METIL-2-HEKSADEKANONA (**S<sub>7</sub>**)PRILOG 12. IR SPEKTAR 3-METIL-2-HEKSADEKANONA (**S<sub>7</sub>**)

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*PRILOG 13.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) SPEKTAR 3-METIL-2-HEKSADEKANONA (**S<sub>7</sub>**)PRILOG 14.  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) SPEKTAR 3-METIL-2-HEKSADEKANONA (**S<sub>7</sub>**)

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*PRILOG 15. (EI)MS SPEKTAR 3-METIL-2-OKTADEKANONA (**S<sub>9</sub>**)PRILOG 16. IR SPEKTAR 3-METIL-2-OKTADEKANONA (**S<sub>9</sub>**)

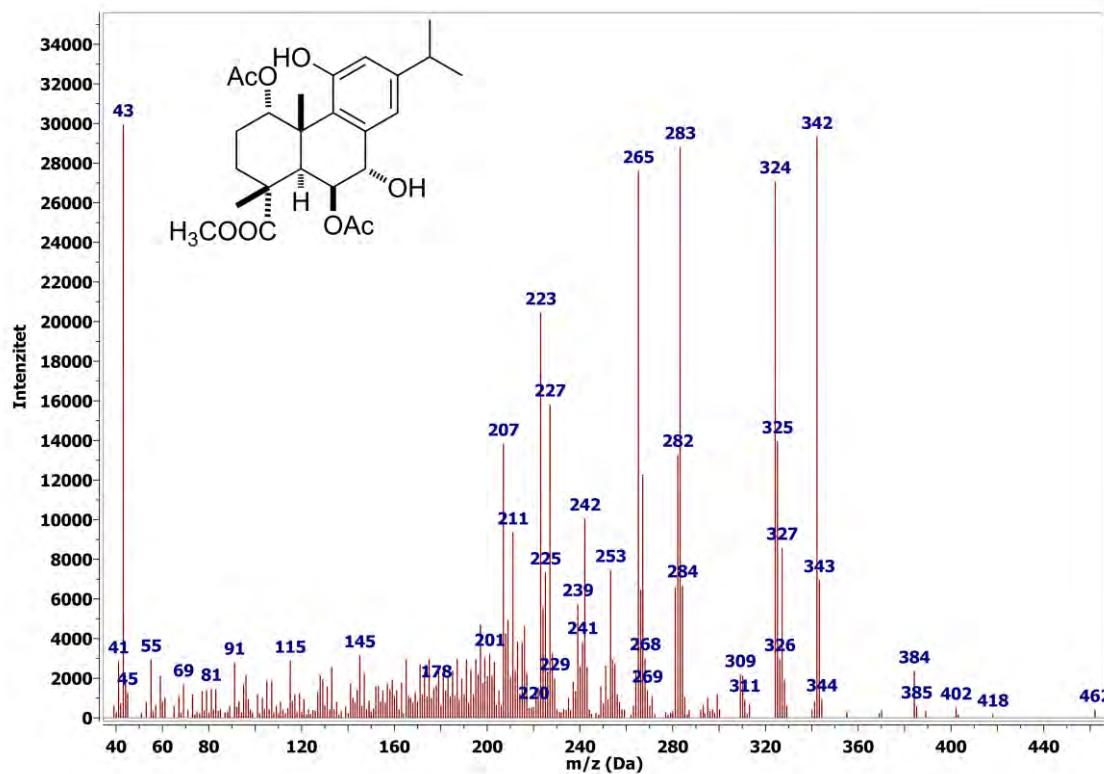
SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*PRILOG 17.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) SPEKTAR 3-METIL-2-OKTADEKANONA ( $\mathbf{S}_9$ )PRILOG 18.  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) SPEKTAR 3-METIL-2-OKTADEKANONA ( $\mathbf{S}_9$ )

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*PRILOG 19. DEPT135 (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) SPEKTAR 3-METIL-2-OKTADEKANONA (S<sub>9</sub>)PRILOG 20. <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H COSY SPEKTAR 3-METIL-2-OKTADEKANONA (S<sub>9</sub>)

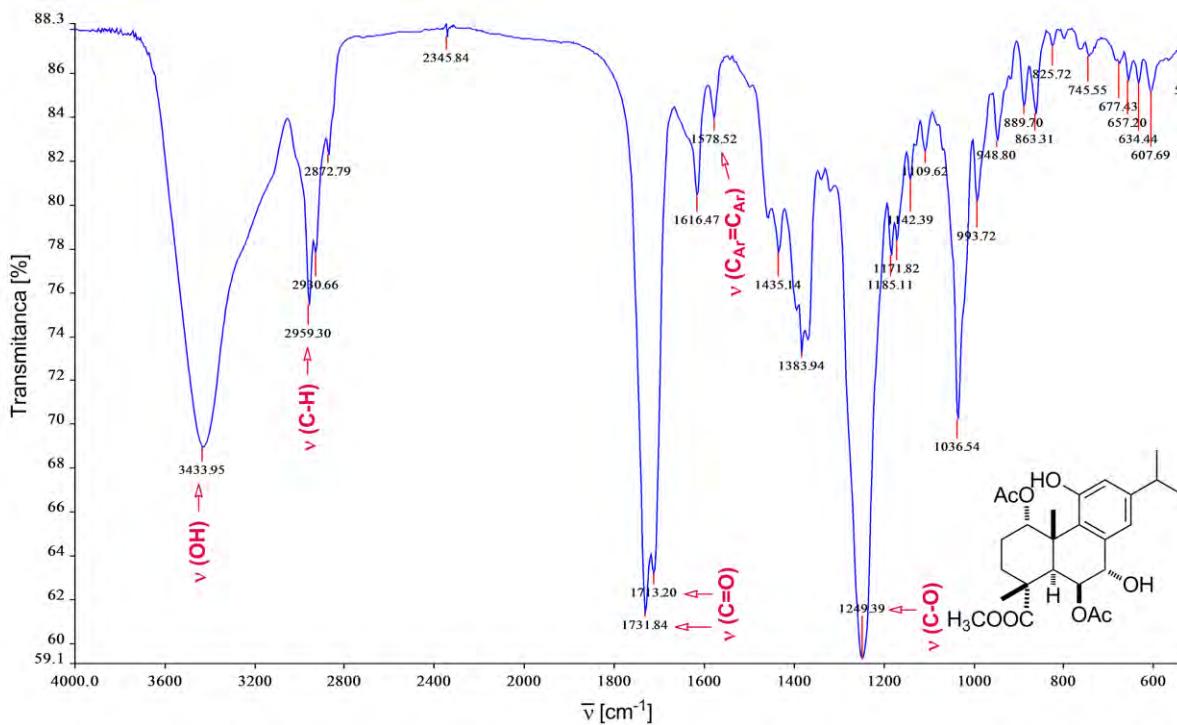
SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*PRILOG 21. HSQC SPEKTAR 3-METIL-2-OKTADEKANONA (**S<sub>9</sub>**)

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

PRILOG 22. (EI)MS SPEKTAR EUROABIENOLA (I)

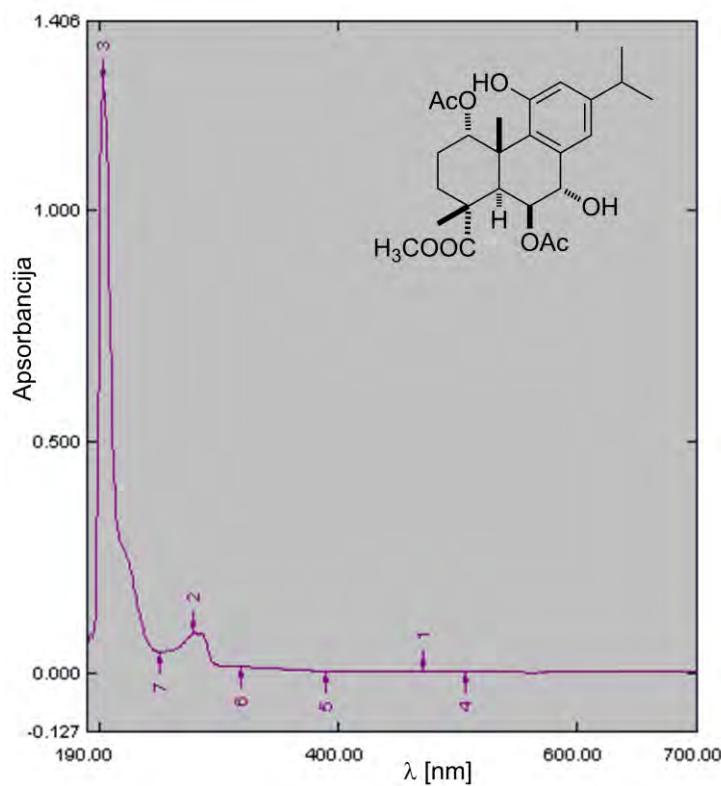
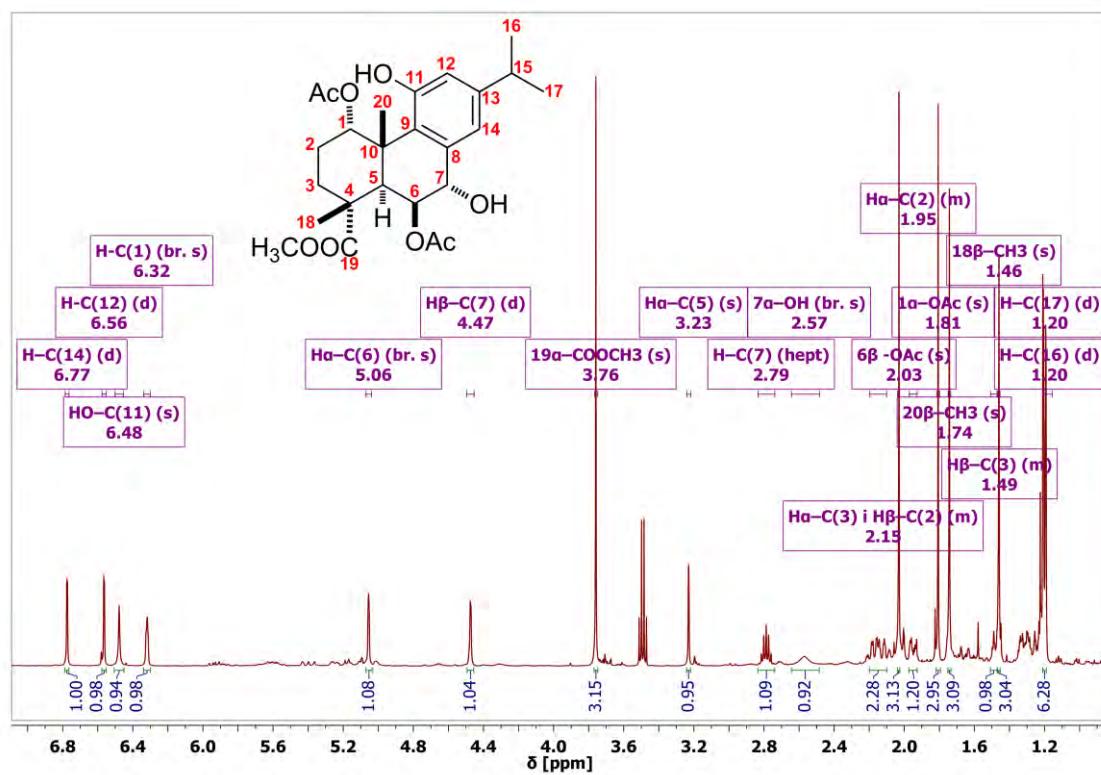


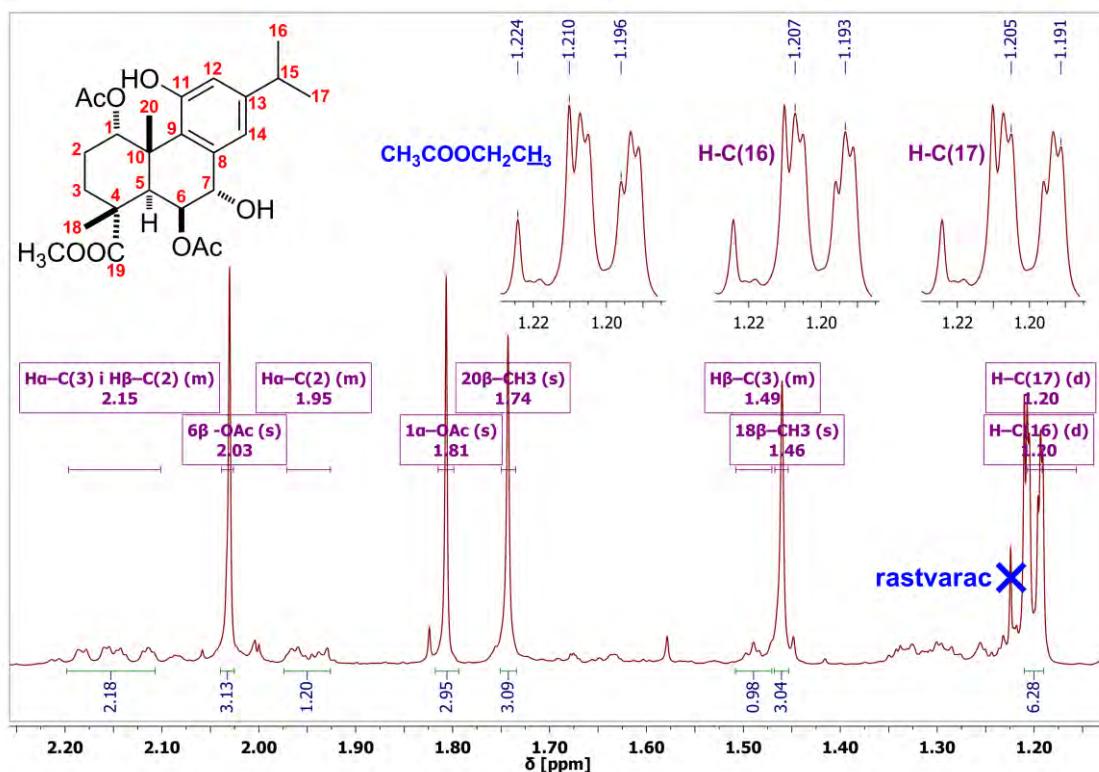
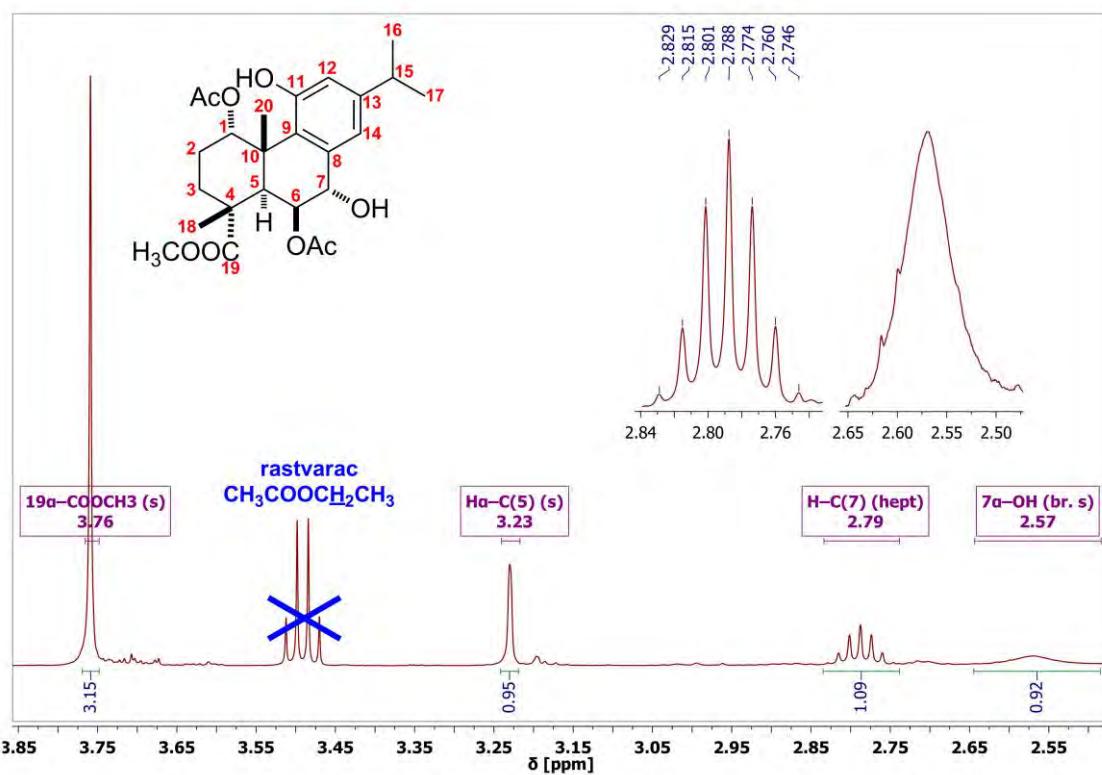
PRILOG 23. IR SPEKTAR EUROABIENOLA (I)



SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

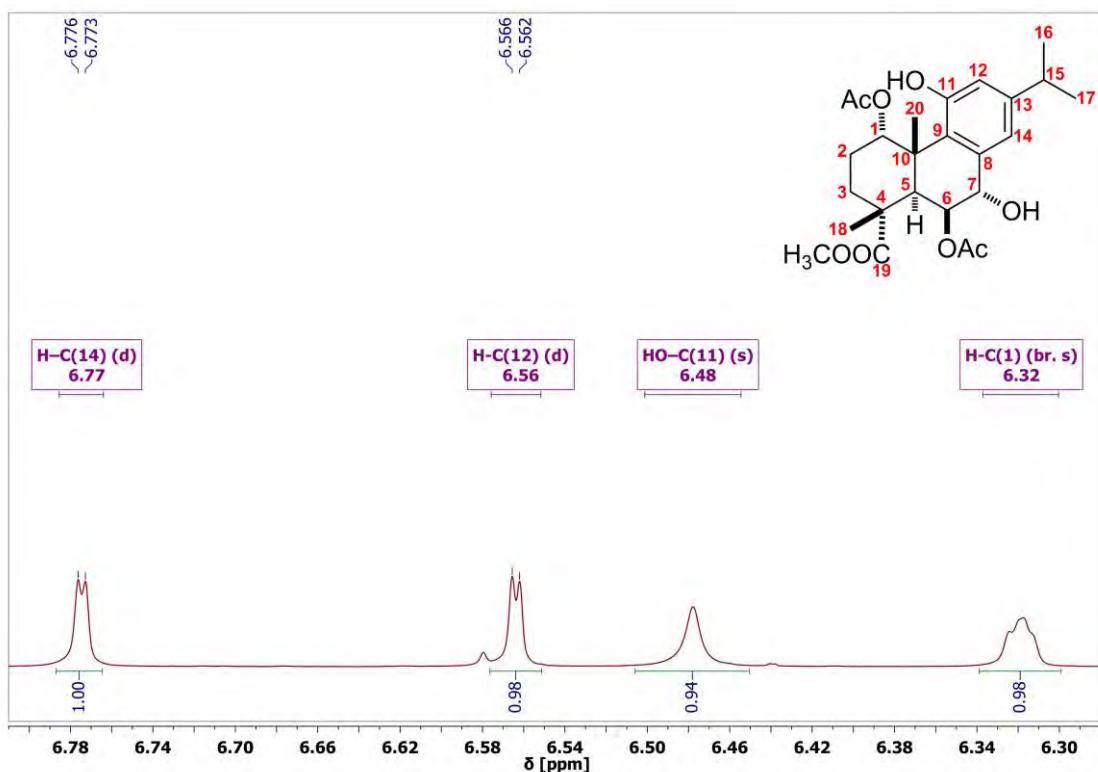
PRILOG 24. UV-VIS SPEKTAR EUROABIENOLA (I)

PRILOG 25.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) EUROABIENOLA (I)

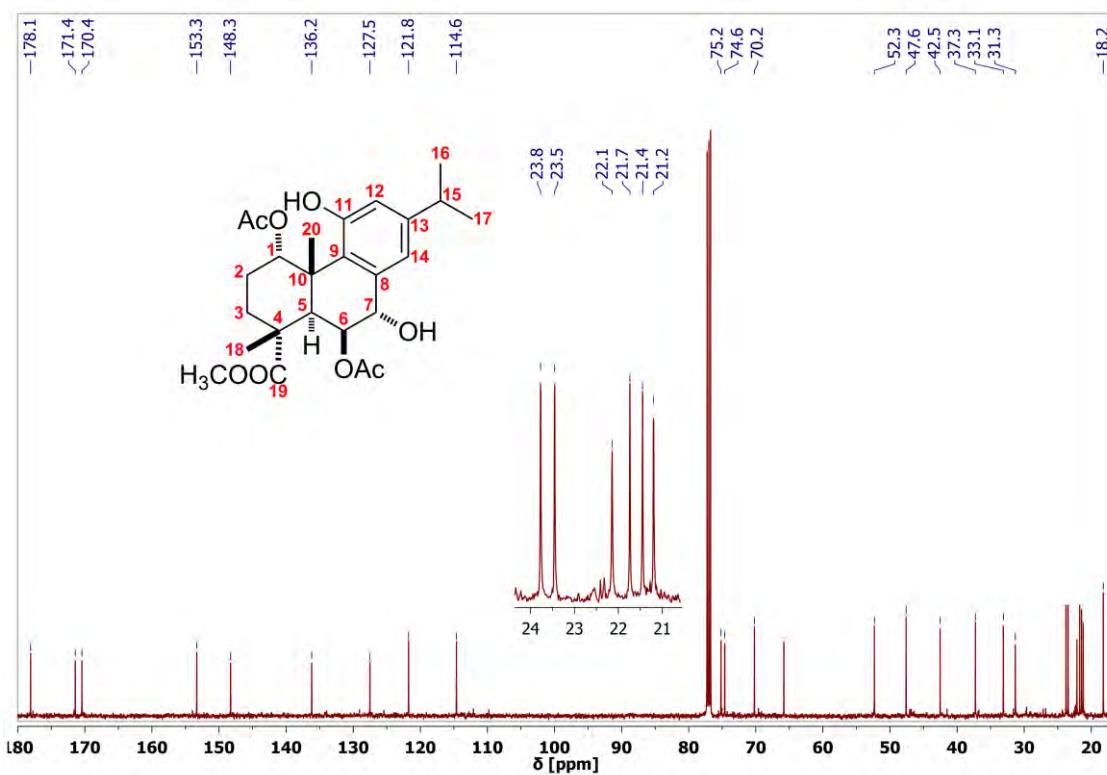
SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*PRILOG 26.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) EUROABIENOLA (I) - UVEĆANJE OBLASTI OD 1,1 DO 2,3 PPMPRILOG 27.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) EUROABIENOLA (I) - UVEĆANJE OBLASTI OD 2,45 DO 5,20 PPM

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

PRILOG 28.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) SPEKTAR EUROABIENOLA (**I**) - UVEĆANJE OBLASTI OD 6,20 DO 6,80 PPM

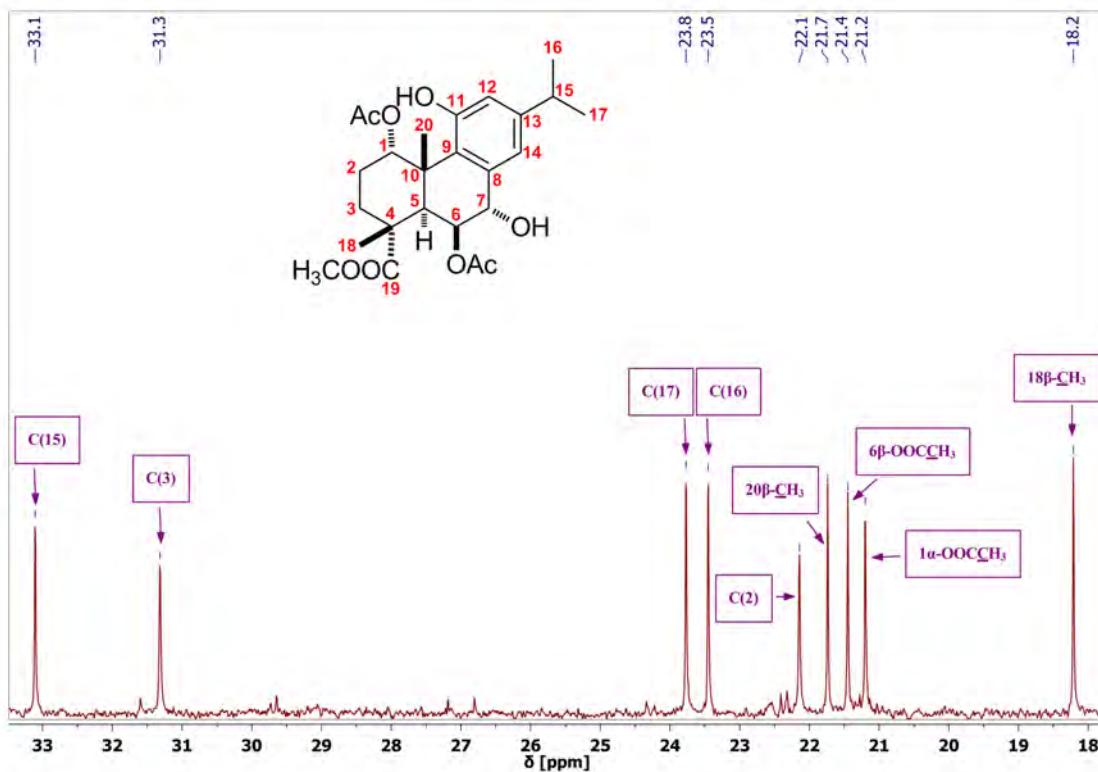


PRILOG 29.  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) SPEKTAR EUROABIENOLA (**I**)

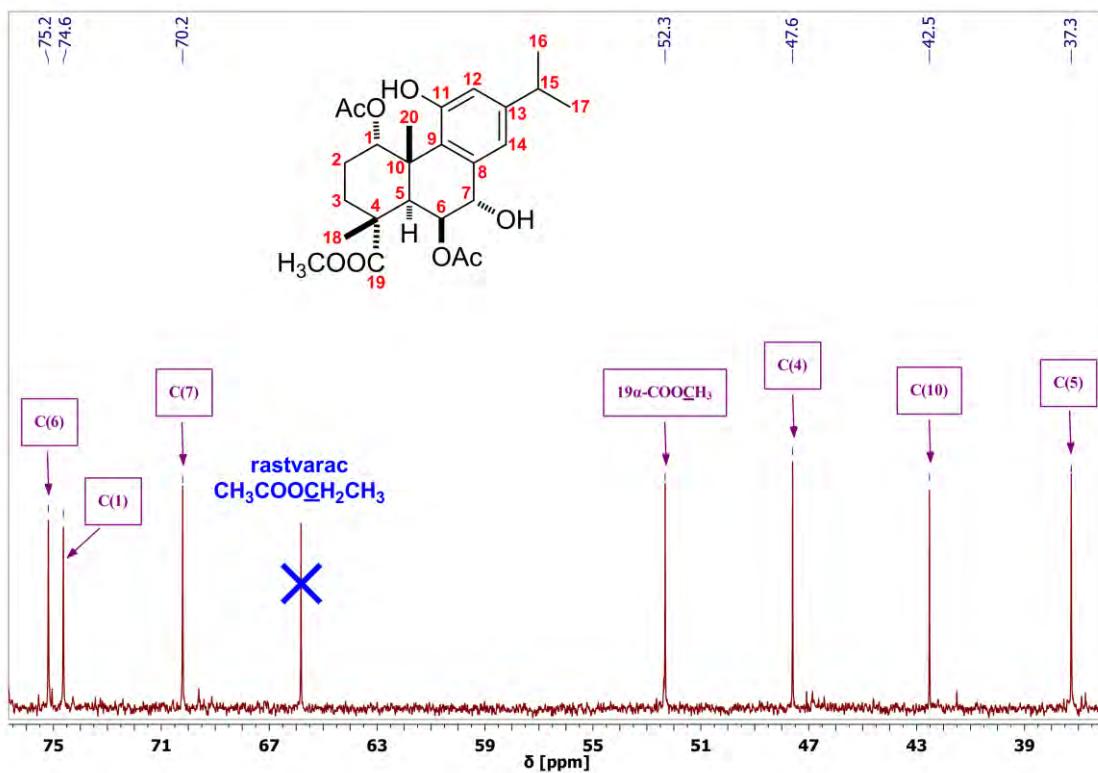


SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

PRILOG 30.  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) SPEKTAR EUROABIENOLA (**I**) - UVEĆANJE OBLASTI OD 18 DO 34 ppm

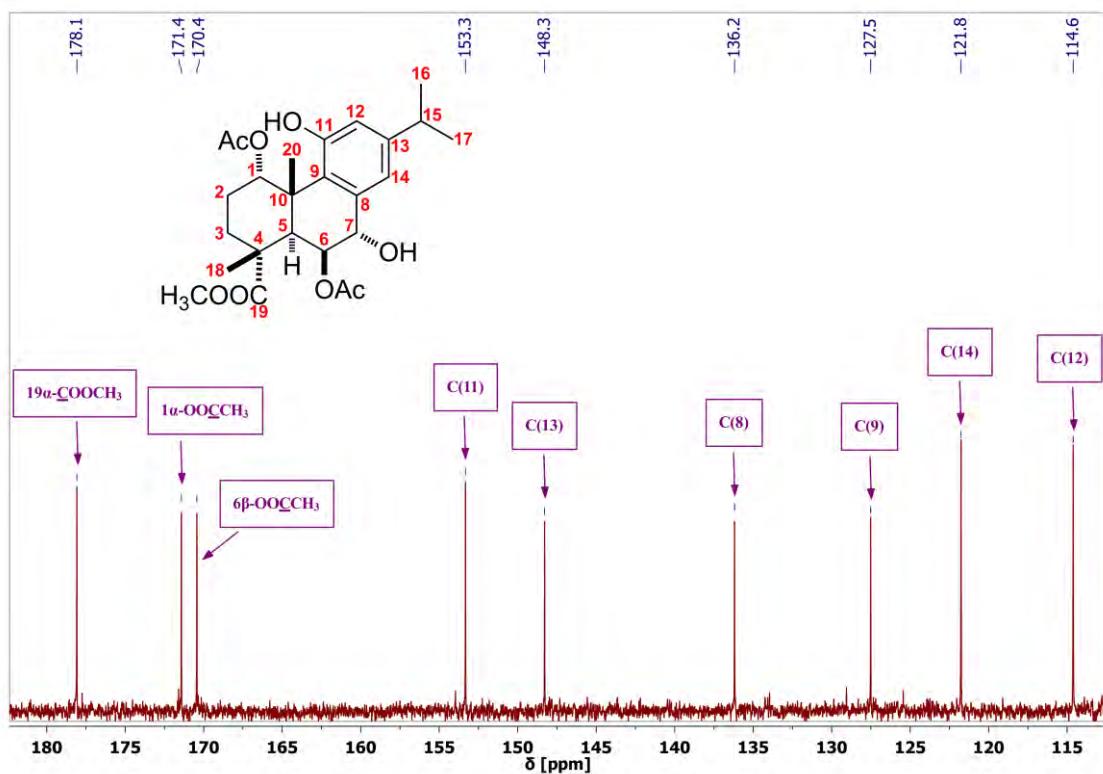


PRILOG 31.  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) SPEKTAR EUROABIENOLA (**I**) - UVEĆANJE OBLASTI OD 36 DO 77 ppm

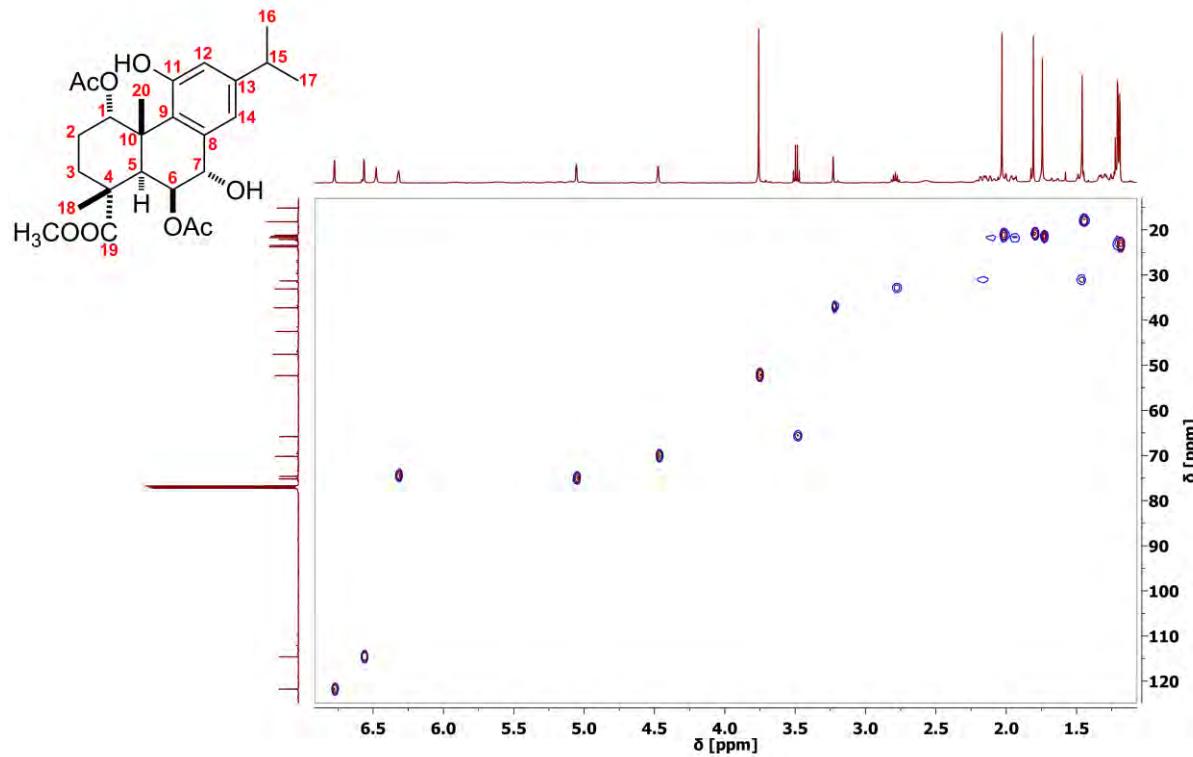


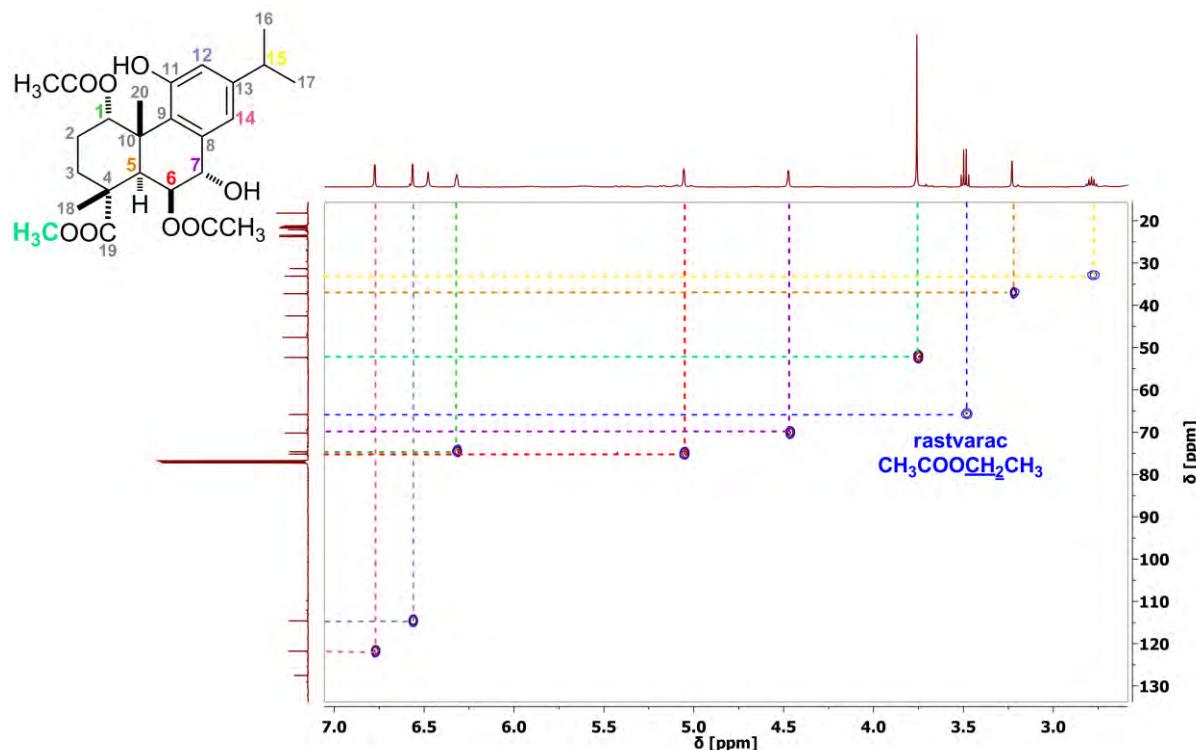
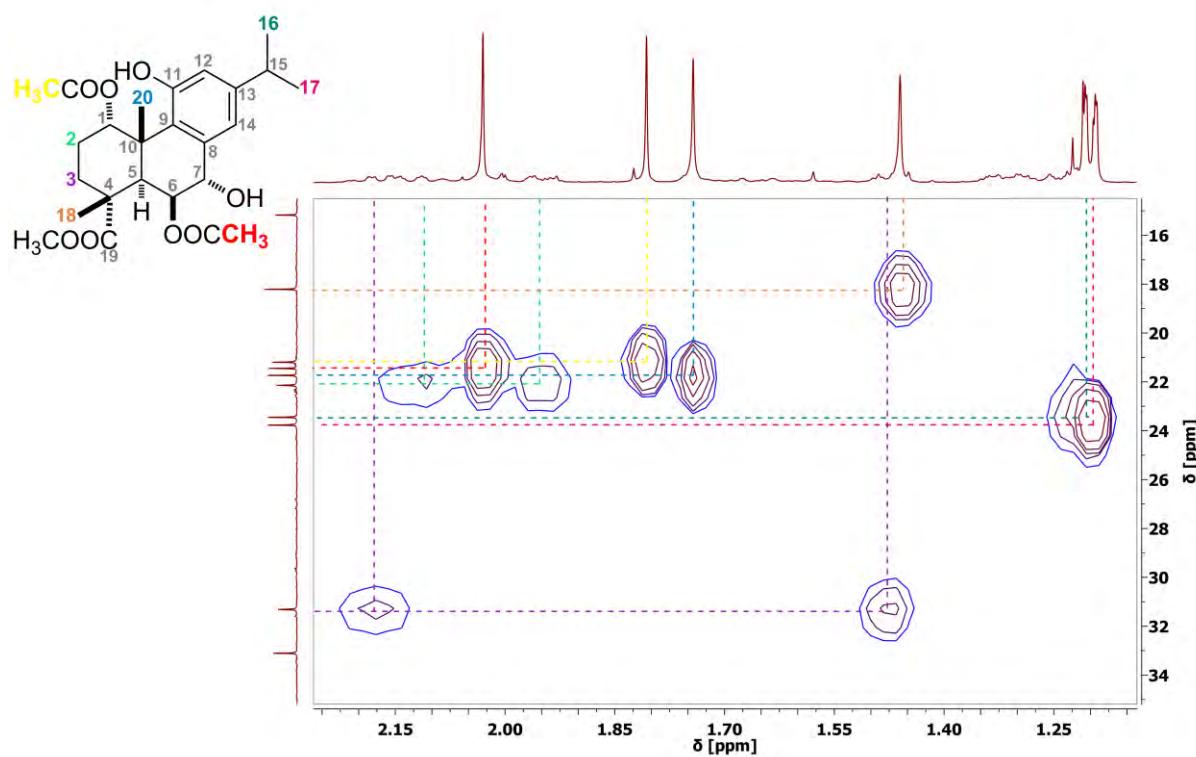
SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

PRILOG 32.  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) SPEKTAR EUROABIENOLA (**I**) - UVEĆANJE OBLASTI OD 110 DO 185 ppm



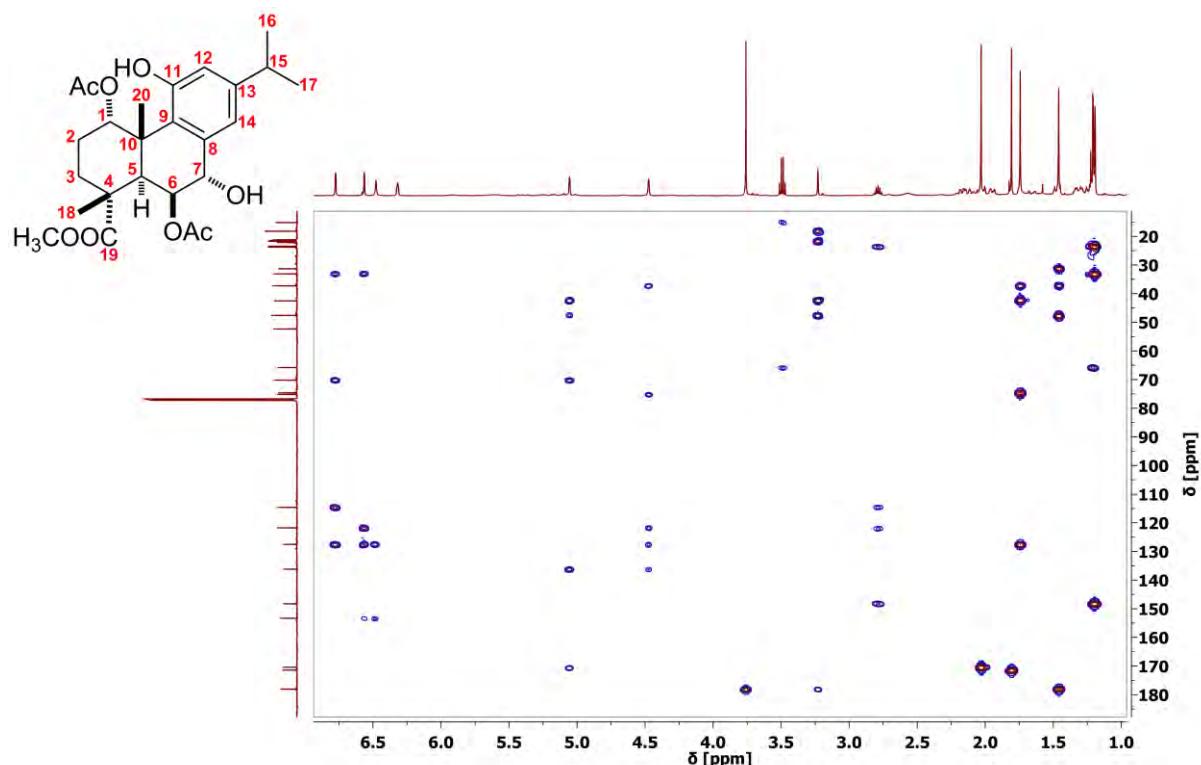
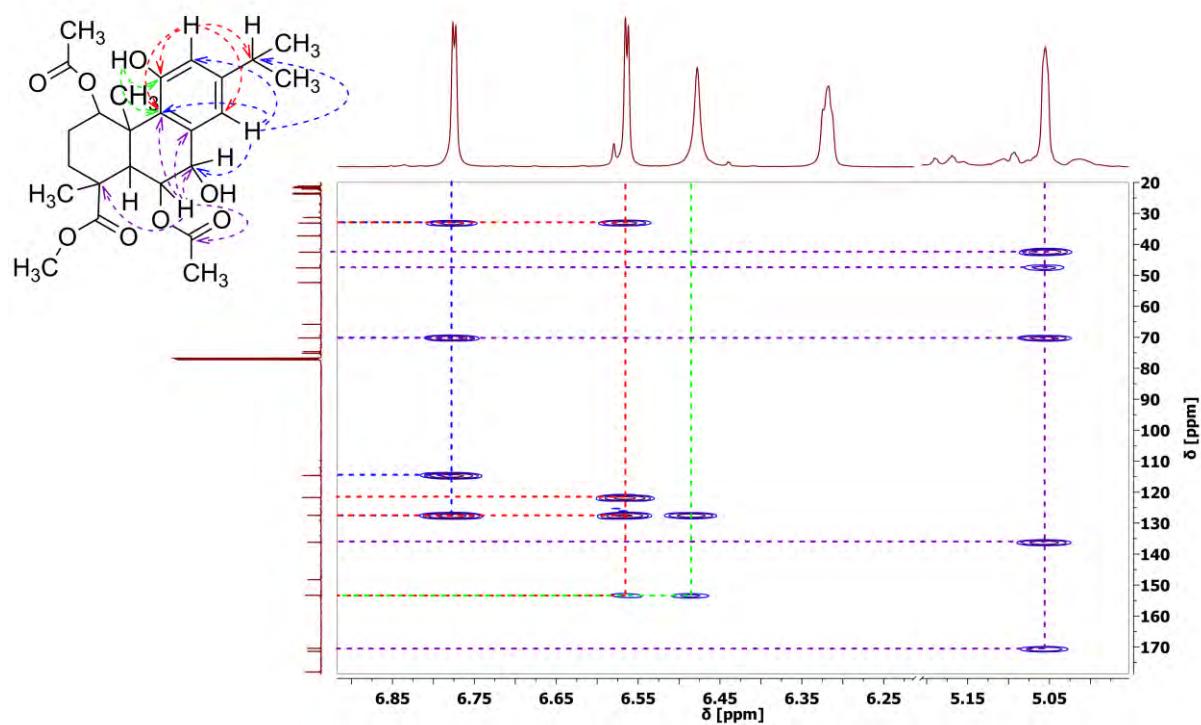
PRILOG 33. HSQC SPEKTAR EUROABIENOLA (**I**)

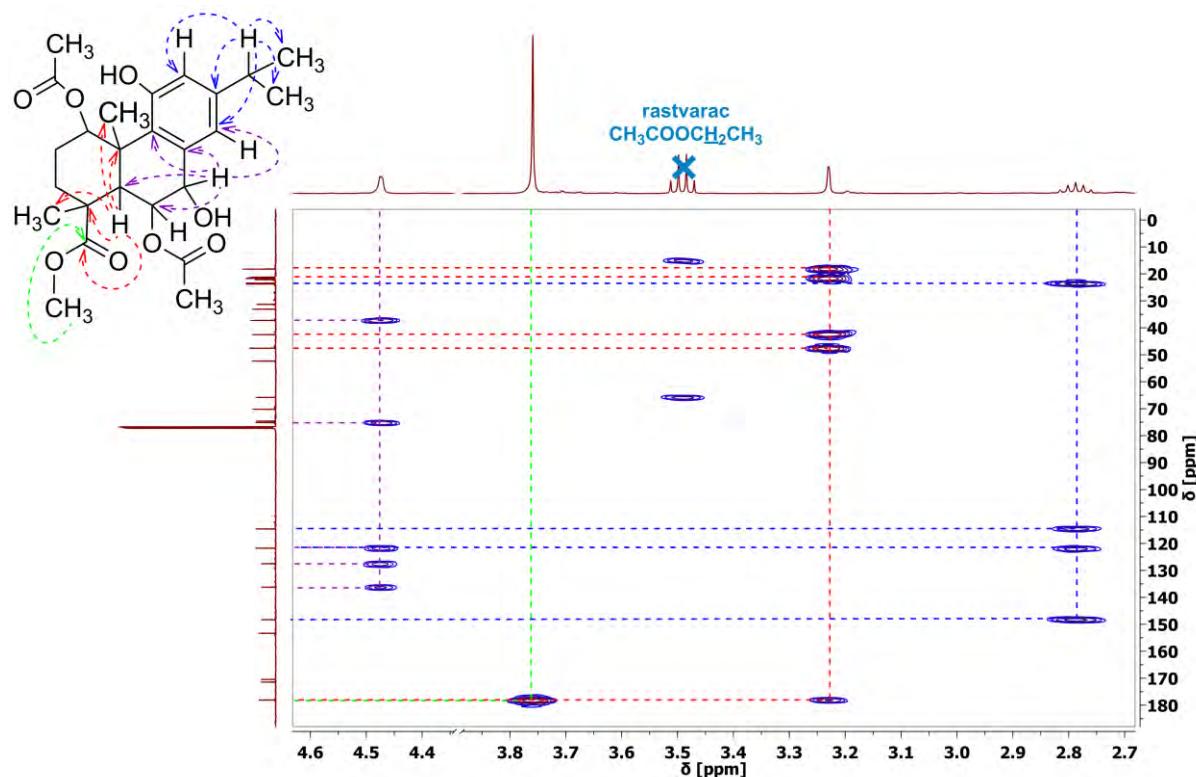
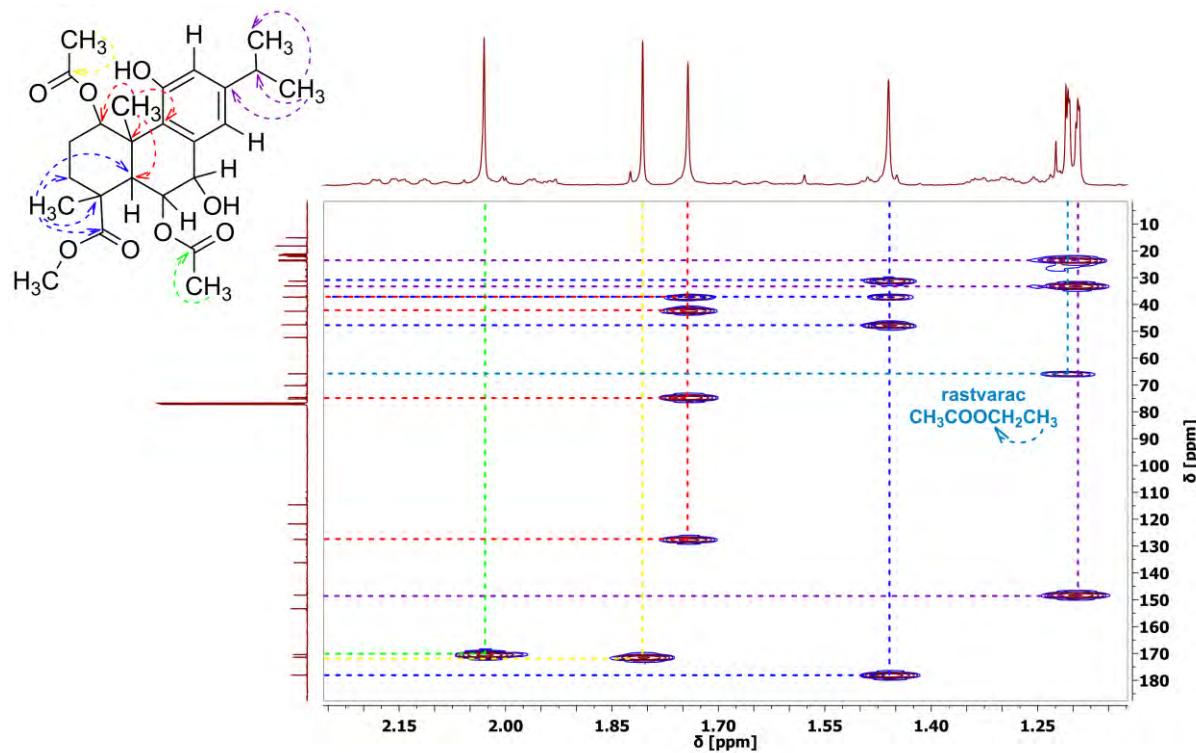


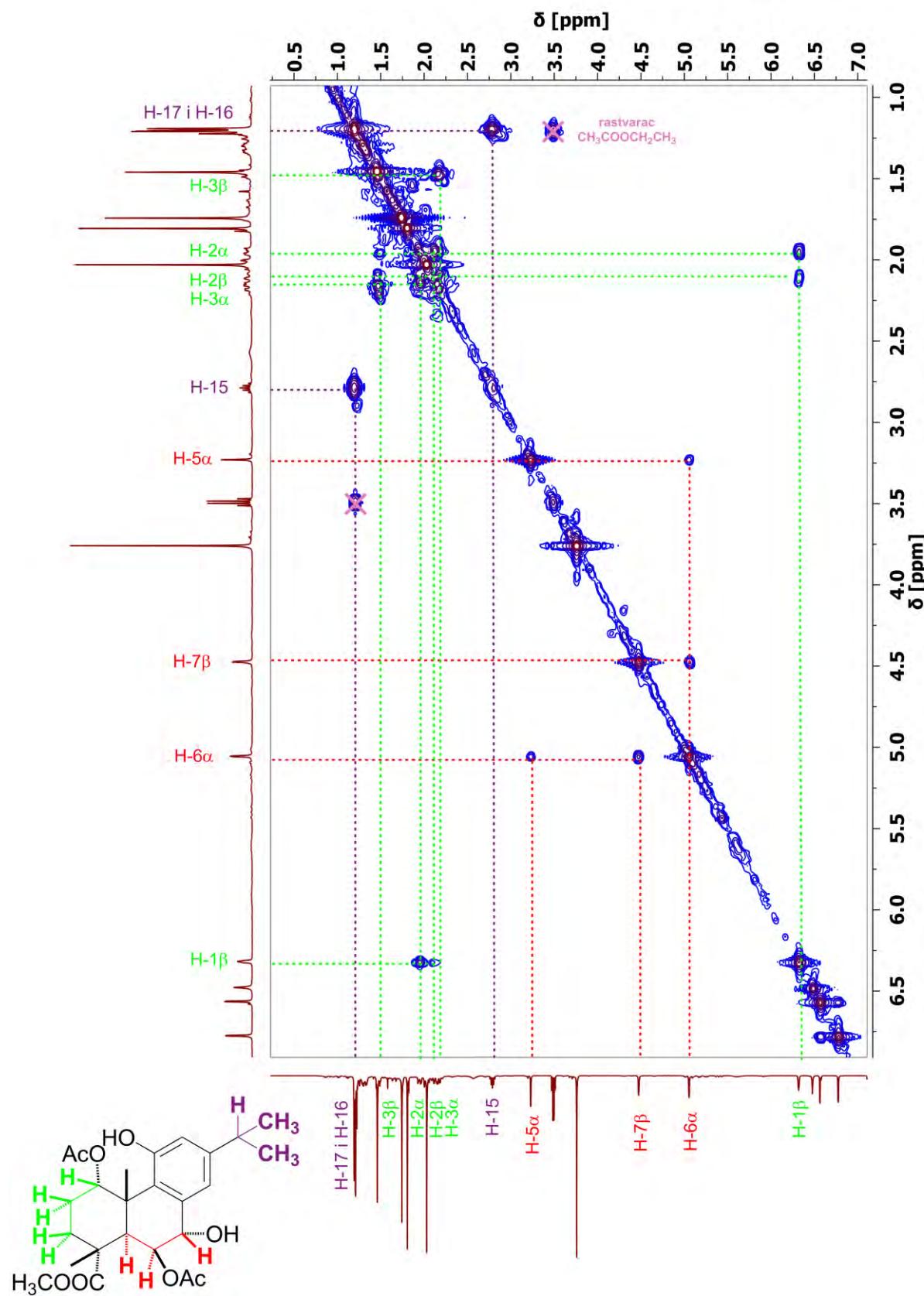
SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*PRILOG 34. UVEĆANJE HSQC SPEKTRA EUROABIENOLA (I) ( $\delta_H = 2 - 7 \text{ ppm}$ ,  $\delta_C = 15 - 135 \text{ ppm}$ )PRILOG 35. UVEĆANJE HSQC SPEKTRA EUROABIENOLA (I) ( $\delta_H = 1,15 - 2,30 \text{ ppm}$ ,  $\delta_C = 15 - 35 \text{ ppm}$ )

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

## PRILOG 36. HMBC SPEKTAR EUROABIENOLA (I)

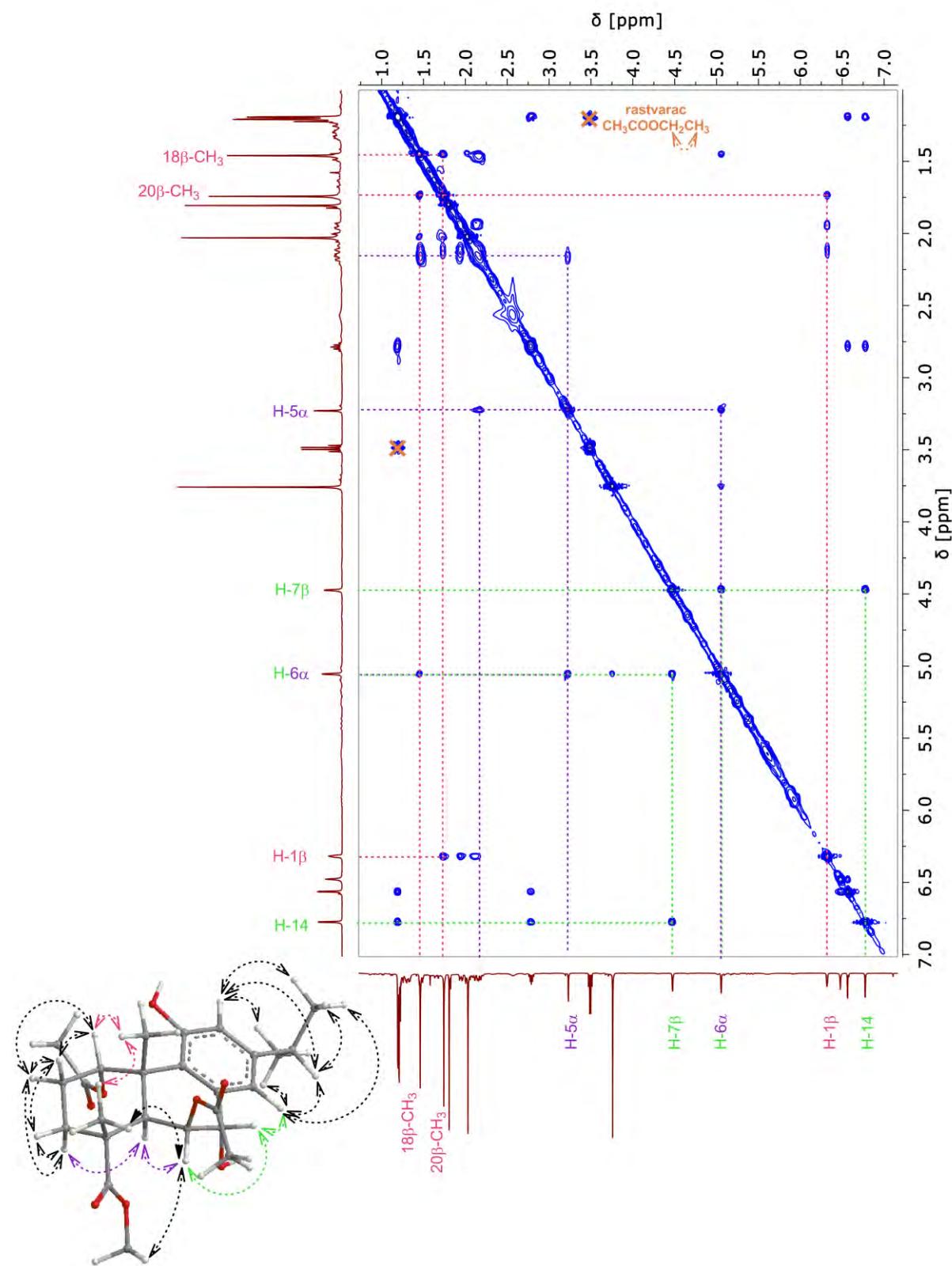
PRILOG 37. UVЕЌANJE HMBC SPEKTRA EUROABIENOLA (I) ( $\delta_H = 4,95 - 6,90$  PPM)

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*PRILOG 38. UVEĆANJE HMBC SPEKTRA EUROABIENOLA (I) ( $\delta_H = 2,7 - 4,6$  PPM)PRILOG 39. UVEĆANJE HMBC SPEKTRA EUROABIENOLA (I) ( $\delta_H = 1,15 - 2,25$  PPM)

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*PRILOG 40.  $^1\text{H}$  –  $^1\text{H}$  COSY SPEKTAR EUROABIENOLA (I)

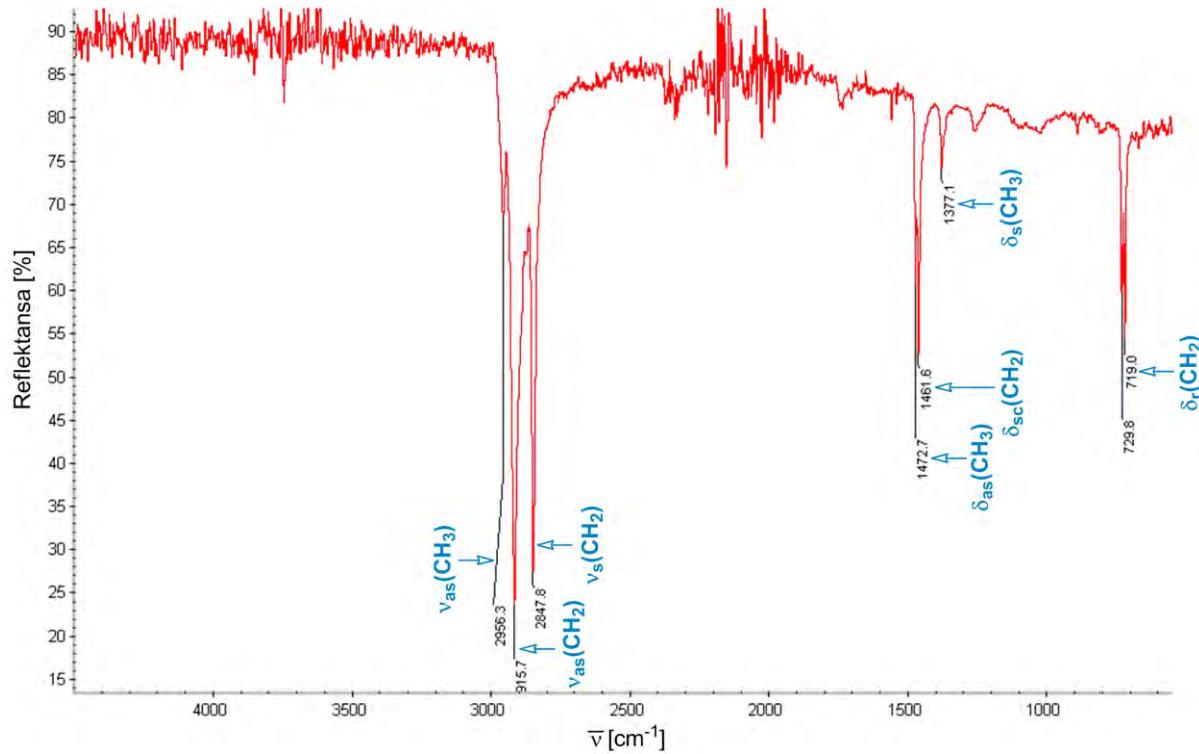
SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

PRILOG 41. NOESY SPEKTAR EUROABIENOLA (I)

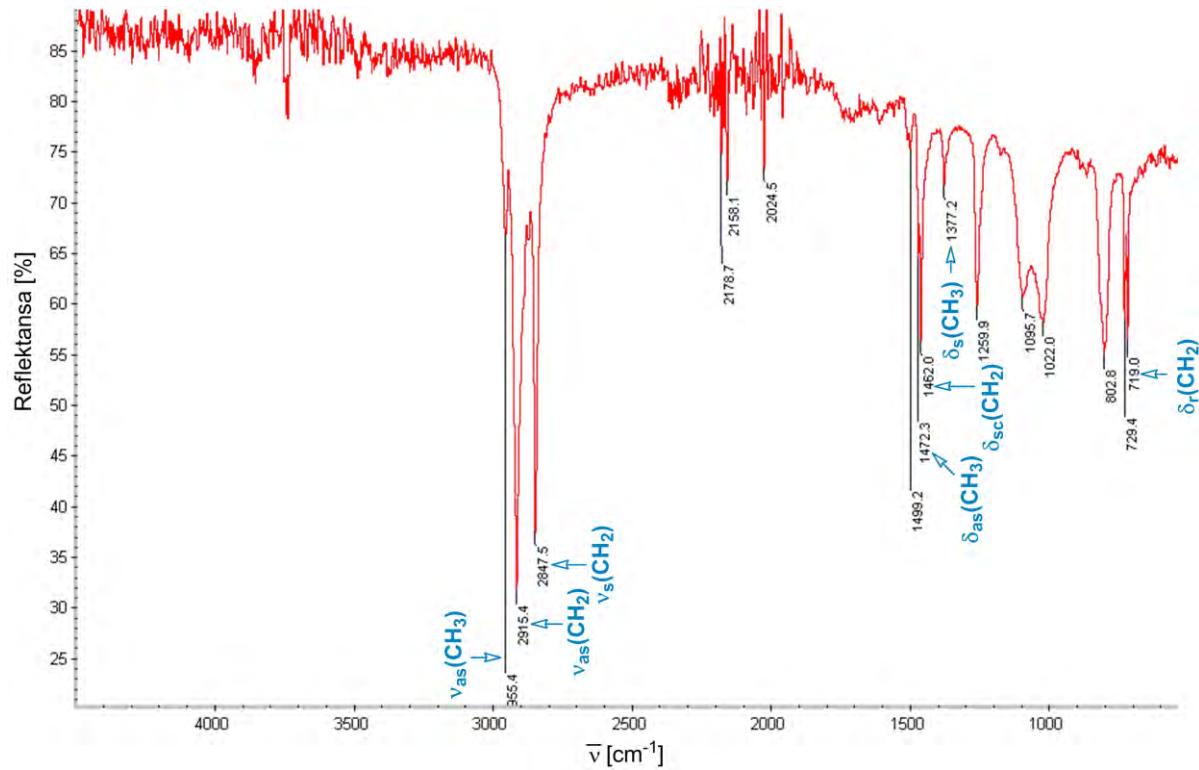


SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

PRILOG 42. IR SPEKTAR POVRŠINSKIH ALKANA NEZRELIH PLODOVA BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS* (UZORAK C<sub>1</sub>)

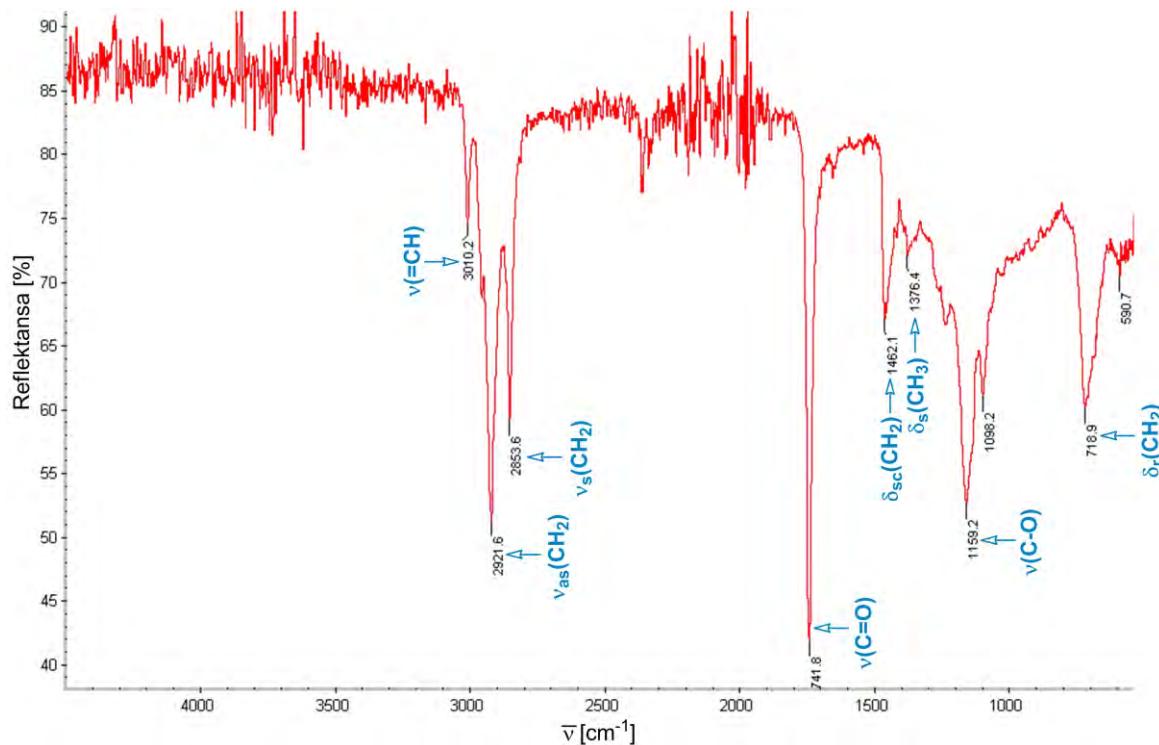


PRILOG 43. IR SPEKTAR POVRŠINSKIH ALKANA ZRELIH PLODOVA BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS* (UZORAK D<sub>1</sub>)

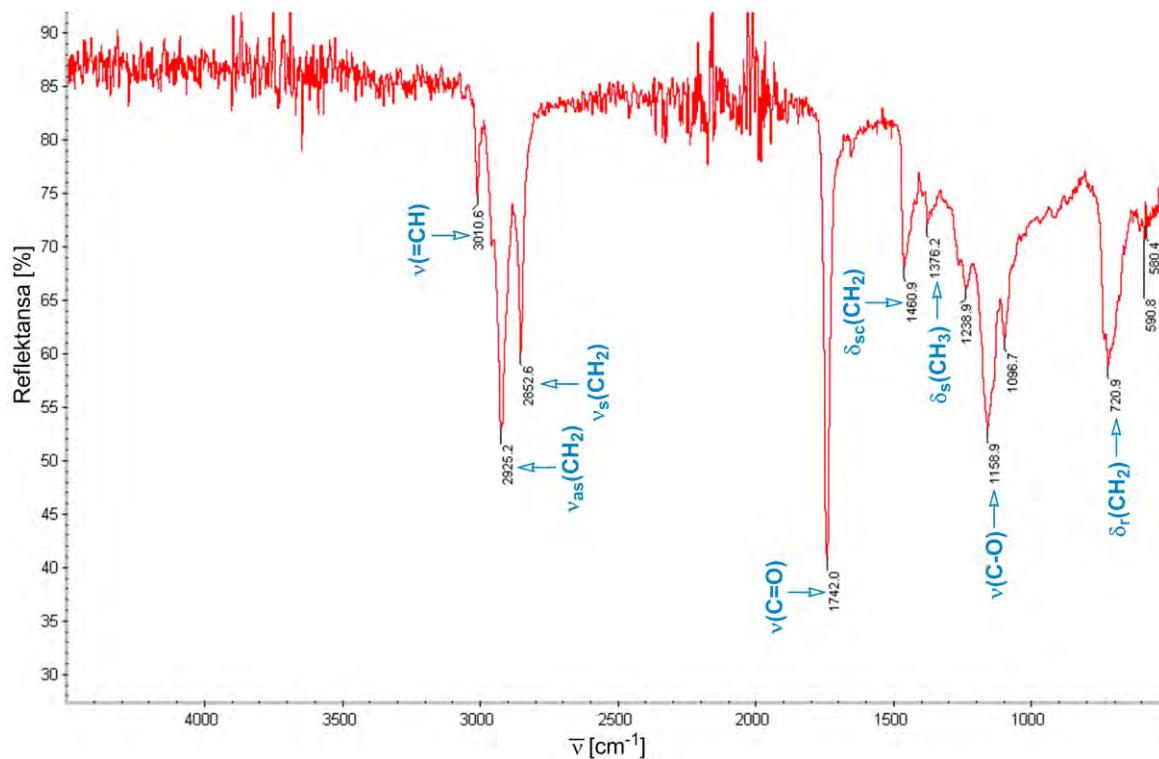


SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

**PRILOG 44.** IR SPEKTAR TRIACILGLICEROILA IZOLOVANIH IZ NEZRELIH PLODOVA BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS* (UZORAK **C<sub>2</sub>**)

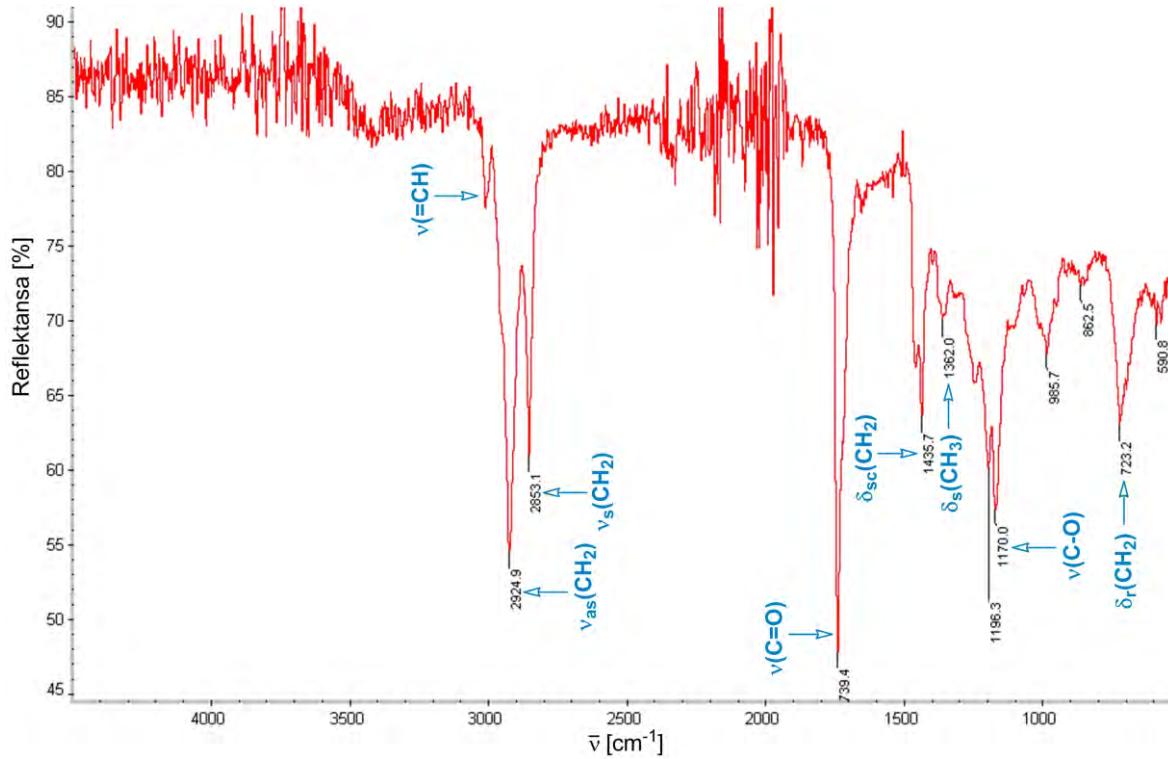


**PRILOG 45.** IR SPEKTAR TRIACILGLICEROILA IZOLOVANIH IZ ZRELIH PLODOVA BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS* (UZORAK **D<sub>2</sub>**)

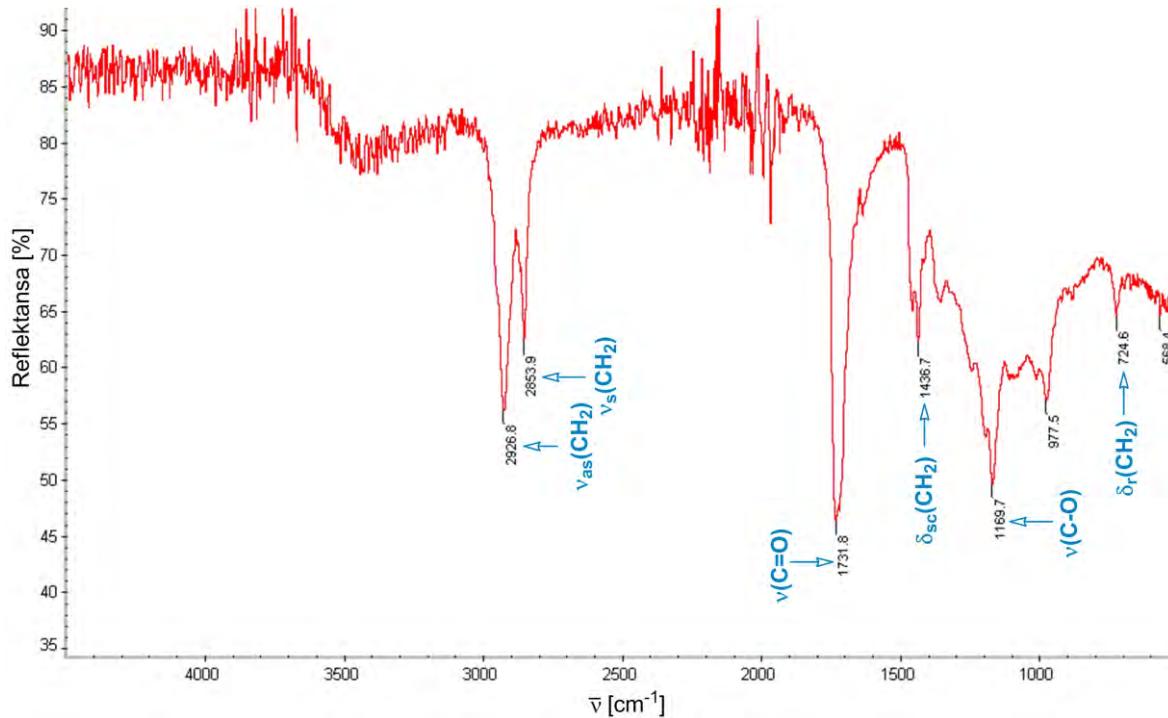


SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

**PRILOG 46.** IR SPEKTAR METIL ESTARA DOBIJENIH BAZNO KATALIZOVANOM TRANSESTERIFIKACIJOM TRIACILGLICEROILA IZOLOVANIH IZ NEZRELIH PLODOVA BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS* (UZORAK **C<sub>3</sub>**)



**PRILOG 47.** IR SPEKTAR METIL ESTARA DOBIJENIH BAZNO KATALIZOVANOM TRANSESTERIFIKACIJOM TRIACILGLICEROILA IZOLOVANIH IZ ZRELIH PLODOVA BILJNE VRSTE *L. EUROPAEUS* (UZORAK **D<sub>3</sub>**)



SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

**PRILOG 48.** PROCENTUALNI SADRŽAJ SASTOJAKA (> 1%) ETARSKIH ULJA VRSTA RODA *LYCOPUS* KOJI SU KORIŠĆENI ZA STATISTIČKU ANALIZU

JEDINJENJE	LYCEXA-1A	LYCEXA-2A	LYCEUR-1A	LYCEUR-2A	LYCEXA-B	LYCEUR-B	LYCAME-B	LYCVIR-B	LYCLUC-1	LYCLUC-2	LYCUNI-B
(Z)-3-Hekseni-1-ol	0,5	0,1	3,1	1,5	0	0	0	0	0	0	0
α-Pinen	1	0,4	0	0	16,6	0	0	33,3	0	1,26	3
Benzaldehid	0,01	0,01	0,01	0,01	0	0	0	0	0	1,9	0
Sabinen	0,3	0,2	0	0	1,5	0	0	0	0	0,1	1,75
1-Okten-3-ol	0,5	0,4	0,6	0,7	0	1	35,8	0	19,8	0,24	3,6
β-Pinen	0,8	1	0	0	12,5	0	0	24,9	0	2,07	11,85
β-Mircen	1,1	2	0	0	14,5	0	0	0,7	0	8,65	2,95
3-Oktanol	0,01	0,01	0,1	0,1	0,4	1,6	2,5	0	0	0	0
α-Terpineol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,5
p-Cimen	0,01	0,01	0	0	0,4	0	0	0	0	4,13	0
Limonen	0,01	0,01	0	0	0,7	2	12,4	1,3	0	0,59	28,5
β-Felandren	6,2	5	0	0	0,6	0	0	0	2,3	0	26,1
(Z)-β-Ocimen	0,01	0	0,1	0,2	0	0	0	0	0	1,06	0
Fenilacetetaldehid	0,3	0,8	0,1	0,6	0	0	0	0	8,5	0	0
Alilbenzen	0	0	0	0	0	0	0	0	2,6	0	0
γ-Terpinen	0,01	0,01	0	0	1,4	0	0	0	0	1,7	0
Undekan	0	0	0,01	0,01	0	0	0	0	3,5	0	0
Linalool	0,01	0,01	0	0	0	1	5	2,5	0	0,26	0,8
(E)-Hotrienol	0	0	4,5	13,7	0	0	0	0	0	0	0
Dihidrokarveol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,09	0
α-Terpineol	0,5	1,1	0,01	0,1	0	0	0	0	0	0	0
1-Dodecin	0	0	0	0	0	0	0	0	4,2	0	0

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS I INULA*

NASTAVAK PRILOGA 48											
2,4-Heptadien-1-ol	0	0	0	0	0	0	0	0	4,7	0	0
Neral	0	0	1,5	3,5	0	0	0	0	0	0	0
Pulegon	0,01	0	0	0	0	0	0	1,2	0	0,07	0
Geranal	0	0	2,4	5,9	0	0	0	0	0	0	0
Eugenol	1,2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$\beta$ -Burbonen	0,01	0,01	0,3	1,6	0	0	0	6,6	0	0,26	0
$\beta$ -Elemen	0,7	0,9	0,6	0	2	0	0	0	0	0,09	0
$\alpha$ -Gurjunen	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
(E)-Kariofilen	2,4	3,2	13,9	25,7	7	24,9	9,5	4	5,9	10,69	0,9
1-Dodekanol	0	0	0	0	0	0	0	0	2,9	0	0
3,4-Dihidroksistiren	15	11,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Geranilaceton	0	0	0,9	5,6	0	0	0	0	0	0,35	0
6,10-Dimetil-5,9-undekadien-2-ol	0	0	0,2	1,3	0	0	0	0	0	0	0
(Z)- $\beta$ -Farnezen	1	0,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(E)- $\beta$ -Farnezen	0	0	0	0	0	17	0	0	0	0	0
$\alpha$ -Humulen	0,3	0,5	1,3	1,7	0	2,6	0	0	0	15,97	0
trans-Kadina-1(6),4-dien	0	0	0,01	0	0	0	0	0	0	1,01	0
$\gamma$ -Muurolen	0	0	0,5	0,2	0,6	0	0	0,6	0	0	3,45
Germakren D	1,6	1	1,2	1	1,8	4,5	4,5	6,5	0	0	2,98
Selina-4,11-dien	0,01	0,01	0	0	6,6	0	0	0	0	0	0
Selina-3,11-dien	0	0	0	0	16,4	0	0	0	0	0	0
$\beta$ -Selinen	2,3	1,5	0,1	0	0,5	0	0	0	0	0,84	0,15
$\alpha$ -Selinen	3,2	3,5	0	0	15,5	0	0	0	0	0,64	0,15
Valencen	1	2,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

NASTAVAK PRILOGA 48	0	0	2,9	0,8	0	2	0	2	0	0	1,4
δ-Kadinen	0	0	2,9	0,8	0	2	0	2	0	0	1,4
7- <i>epi</i> -α-Selinen	0,3	0,5	0	0	0	0	0	0	0	1,34	0
Vanilinska kiselina	0,9	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Germakren D-4-ol	0,01	0,01	3,9	0,4	0	0	0	0	0	0	0
2-Metilpentadekan	0	0	0	0	0	0	0	0	2,6	0	0
(E)-Nerolidol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,18	0
Kariofilen-oksid	1,3	2	2,4	12,5	0,2	3,2	0	0	0	8,91	0
Heksadekan	0	0	0	0	0	0	0	0	9,6	0	0
Gvajol	0	0	1,4	1	0	0	0	0	0	0	0
Ledol	0	0	2,6	0	0	0	0	0	0	0	0
Humulen-epoksid II	0,01	0,01	0,01	0,7	0	0	0	0	0	10,51	0
α-Akorenol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,94	0
Kariofila-4(12),8(13)-dien-5β-ol	0	0	0,7	2,5	0	0	0	0	0	0	0
<i>epi</i> -α-Kadinol	0	0	1,2	0,4	0	0	0	0	0	0	0
<i>epi</i> -α-Murolol	0	0	1,8	0,01	0	0	0	0	0	0	0
α-Kadinol	0	0	3,6	0,6	0	0	0	0	0	1,35	0
Bulnezol	0	0	0,6	0,1	0	0	0	0	0	2,06	0
Šiobunol	0	0	9,7	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>trans</i> - <i>p</i> -Kumarna kiselina	1,2	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>trans</i> -Ferulnska kiselina	2,6	1,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Heksadekanska kiselina	2,4	0,6	0,01	0	0	0	0	0	2,8	1,8	0
(E,E)-Geranil-linalool	0	0	7,6	1,1	0	0	0	0	0	0	0
Etil- <i>trans</i> -kafeat	1,6	2,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9,12,15-Oktadekatrienal	0	0	0	0	0	0	0	0	28,6	0	0

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

NASTAVAK PRILOGA 48	1	1,7	0	0	0	0	0	0	0	0
Abieta-7,13-dien	1	1,7	0	0	0	0	0	0	0	0
(E)-Fitol	2,3	2	4,7	0,5	0	0	0	0	0	0,56
(Z,Z)-9,12-Oktadekanska kiselina	6,4	8,2	0	0	0	0	0	0	0	0
Abieta-8(14),13(15)-dien	0,3	1,2	0	0	0	0	0	0	0	0
4- <i>epi</i> -Abietal	8,2	5	0	0	0	0	0	0	0	0
(13E)-Labda-7,13-dien-15-ol	2,4	4,1	0	0	0	0	0	0	0	0
4- <i>epi</i> -Abietol	2,2	1,5	0	0	0	0	0	0	0	0
6-Pentadecil-5,6-dihidro-2 <i>H</i> -piran-2-on	2,8	2,6	0	0	0	0	0	0	0	0
Heptakozan	2	2,2	0,2	0,1	0	0	0	0	0	0
6-Heptadecil-5,6-dihidro-2 <i>H</i> -piran-2-on	1,5	1,2	0	0	0	0	0	0	0	0
Oktakozan	1,8	3,5	0,01	0,01	0	0	0	0	0	0
Nonakozan	4,9	6	0,2	0,1	0	0	0	0	0	0

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

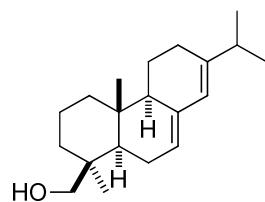
**PRILOG 49.** PROCENTUALNA ZASTUPLJENOST POJEDINIHL KLASA JEDINJENJA U ETARSKIM ULJIMA VRSTA RODA *LYCOPUS* KOJA SU KORIŠĆENA ZA MULTIVARIJANTNU STATISTIČKU ANALIZU

KLASA	LYCEXA-1A	LYCEXA-2A	LYCEUR-1A	LYCEUR-2A	LYCEXA-B	LYCEUR-B	LYCAME-B	LYCVIR-B	LYCLUC-1	LYCLUC-2	LYCUNI-B
Diterpeni ( <b>D</b> )	18,35	17,43	15,6	1,61	0	0	0	0	0	0,69	0
Jedinjenja izvedena iz metabolizma masnih kiselina ( <b>MMK</b> )	24,79	28,03	5,91	4,91	0,4	2,6	38,3	0	74,5	2,73	3,6
Monoterpeni ( <b>M</b> )	10,5	10,59	8,93	24,63	48,2	3	17,4	65,4	2,3	23,93	78,15
Ostalo ( <b>O</b> )	0,96	0,67	2,07	8,16	0	0	0	0	4,2	1,25	0
Seskviterpeni ( <b>S</b> )	16,56	16,96	57,19	54,46	50,6	54,2	14	19,7	5,9	63,19	11,33
Jedinjenja izvedena iz šikimatnog puta ( <b>SM</b> )	25,12	23,01	0,15	0,62	0	0	0	0	11,1	2,53	0

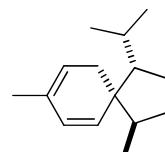
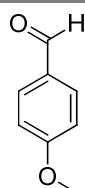
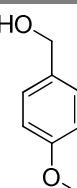
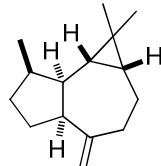
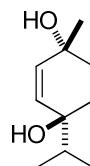
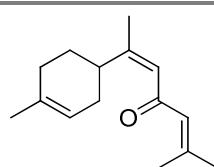
SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

**PRILOG 50.** TRIVIJALNI NAZIVI I STRUKTURE JEDINJENJA KOJA SU IDENTIFIKOVANA U ETARSKIM ULJIMA VRSTA *L. EUROPAEUS* I *L. EXALTATUS*

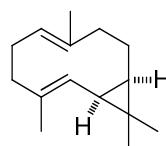
TRIVIJALNI NAZIV JEDINJENJA	STRUKTURA JEDINJENJA
Abieta-7,13-dien	
Abieta-8,12-dien	
Abieta-8(14),13(15)-dien	
Abietal	
Abietatrien	
Abietol	

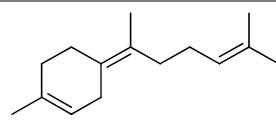
SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA**4-epi*-Abietol

Akora-3,5-dien

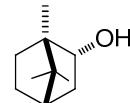
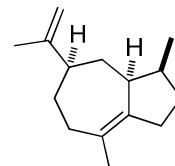
*p*-Anizaldehid*p*-Anizil alkohol*alo*-Aromadendren*trans*-Askaridol glikol(Z)- $\alpha$ -Atlanton

Biciklogermakren

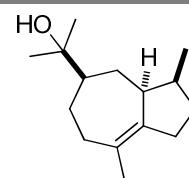


SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS I INULA*(Z)- $\gamma$ -Bisabolen

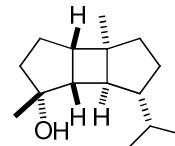
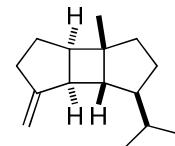
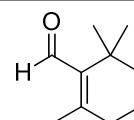
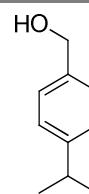
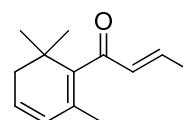
Borneol

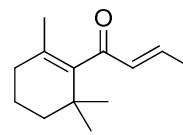
 $\alpha$ -Bulnezen

Bulnezol

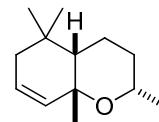
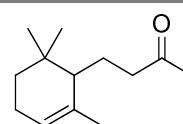
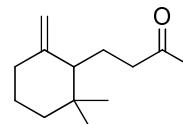
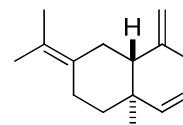


endo-1-Burbonanol

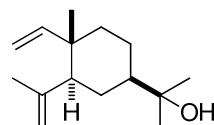
 $\beta$ -Burbonen $\beta$ -Ciklocitral*p*-Cimen-7-ol(E)- $\beta$ -Damascenon

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS I INULA*(E)- $\beta$ -Damaskon

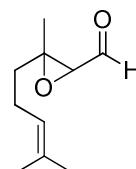
Dihidroedulan I

7,8-Dihidro- $\alpha$ -jononDihidro- $\gamma$ -jonon $\gamma$ -Elemen

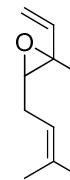
Elemol



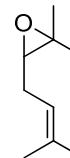
2,3-Epoksigeranal

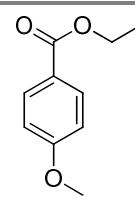
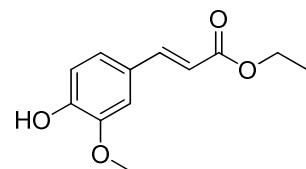


(E)-Epoksiocimen

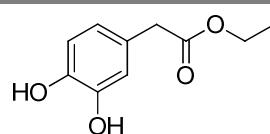
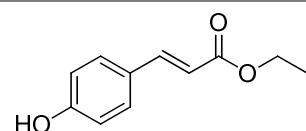
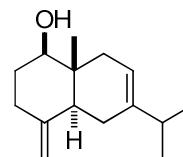


(Z)-Epoksiocimen

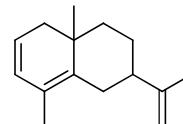


SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*Etil-*p*-anizat*trans*-Etil-ferulat

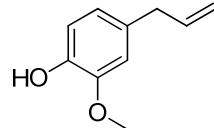
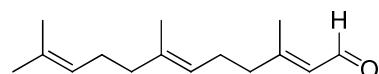
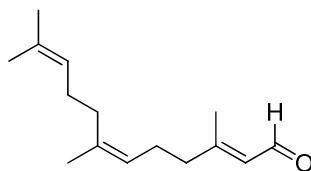
Etil-homoprotokatehuat

*trans*-Etil-*p*-kumaratEudezma-4(15),7-dien-1 $\beta$ -ol

Eudezma-2,4,11-trien

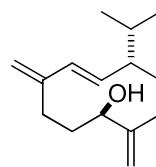


Eugenol

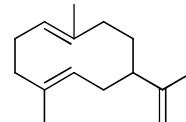
(2*E*,6*E*)-Farnezal(2*E*,6*Z*)-Farnezal

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS I INULA*

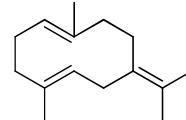
(5E,9E)-Farnezilaceton	
Felandral	
$\alpha$ -Felandren	
(E)-Fitol	
Furfural	
Geranal	
Geranylacetone	
(E,E)-Geranyl-linalool	
(E,Z)-Geranyl-linalool	
(Z,Z)-Geranyl-linalool	

Germakra-4(15),5,10(14)-trien-1 $\alpha$ -ol

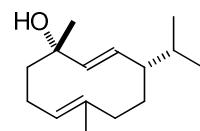
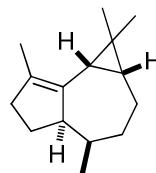
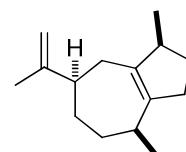
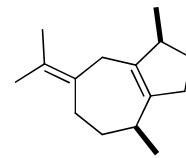
Germakren A



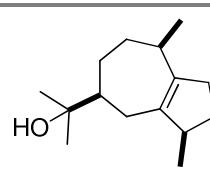
Germakren B



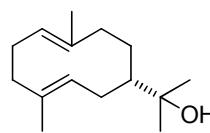
Germakren D-4-ol

 $\alpha$ -Gurjunen $\alpha$ -Gvajencis- $\beta$ -Gvajen

Gvajol

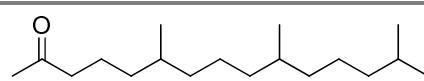


Hedikariol

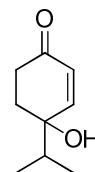


SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS I INULA*

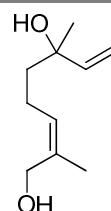
Heksahidrofarnezilaceton



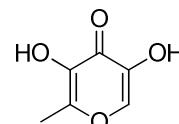
4-Hidroksikripton



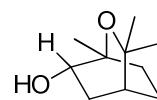
(Z)-8-Hidroksilinalool



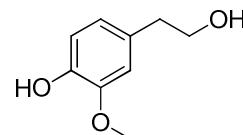
Hidroksimaltol



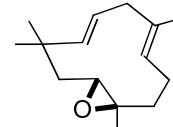
egzo-2-Hidroksi-1,8-sineol



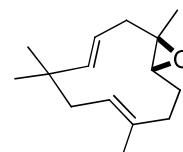
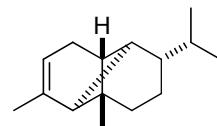
Homovanilil alkohol



Humulen-epoksid I

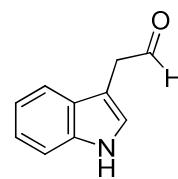


Humulen-epoksid II

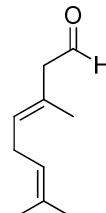
 $\alpha$ -Ilangen

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS I INULA*

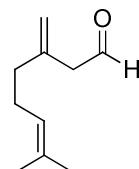
(Indol-3-il)acetaldehid



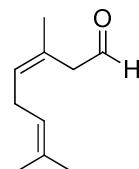
(E)-Izocitral



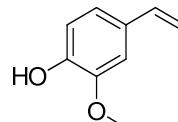
egzo-Izocitral



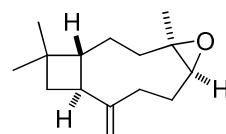
(Z)-Izocitral



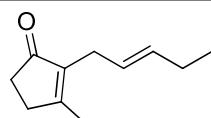
(Z)-Izoeugenol



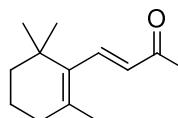
Izokariofilen-oksid

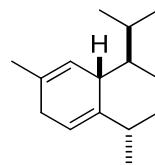
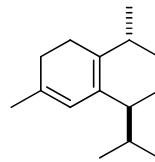
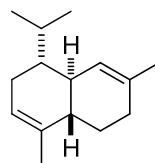
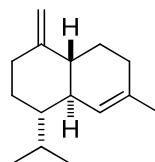
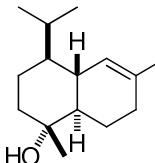
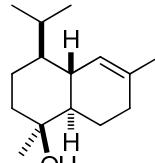
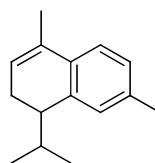
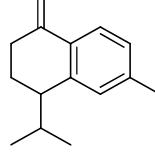


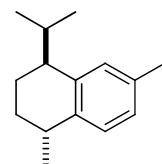
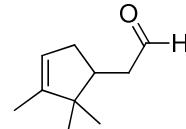
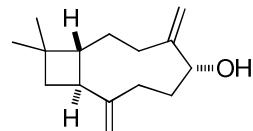
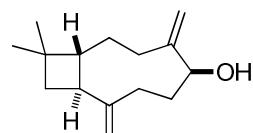
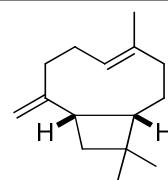
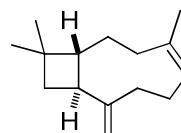
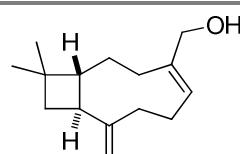
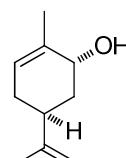
(E)-Jasmon



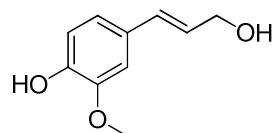
(E)-β-Jonon

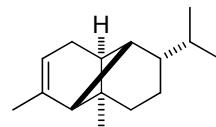
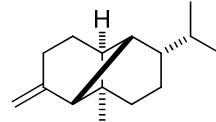


*trans*-Kadina-1,4-dien*trans*-Kadina-1(6),4-dien $\alpha$ -Kadinen $\gamma$ -Kadinen $\alpha$ -Kadinol*epi*- $\alpha$ -Kadinol (*syn*.  $\tau$ -Kadinol) $\alpha$ -Kalakoren $\beta$ -Kalakoren

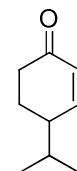
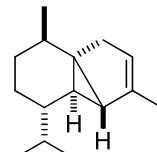
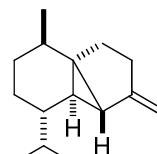
SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS I INULA**trans*-Kalamenen $\alpha$ -KamfolenalKariofila-4(12),8(13)-dien-5 $\alpha$ -olKariofila-4(12),8(13)-dien-5 $\beta$ -ol9-*epi*-(E)-Kariofilen(Z)- $\beta$ -Kariofilen9-*epi*-(E)-Kariofilen-14-ol*trans*-Karveol

(E)-Koniferil alkohol

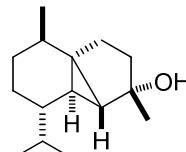
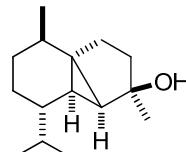
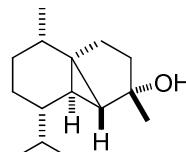


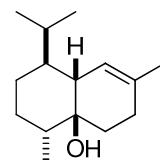
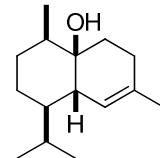
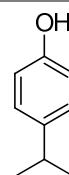
SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA* $\alpha$ -Kopaen $\beta$ -Kopaen

Kripton

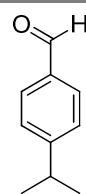
 $\alpha$ -Kubeben $\beta$ -Kubeben

Kubebol

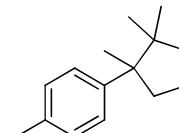
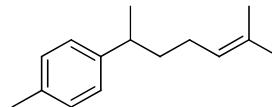
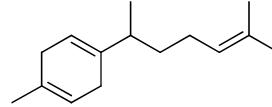
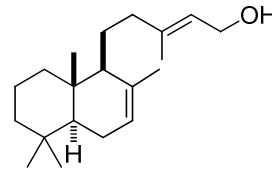
*epi*-Kubebol10-*epi*-Kubebol

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS I INULA* $\beta$ -Kurkumen1,10-di-*epi*-Kubanol*p*-Kumenol

Kumin aldehid

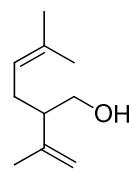


Kuparen

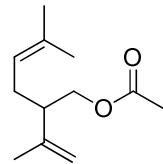
*ar*-Kurkumen $\beta$ -Kurkumen(13*E*)-Labda-7,13-dien-15-ol

SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS I INULA*

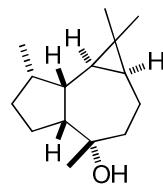
Lavandulol



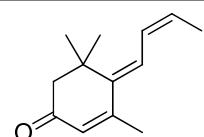
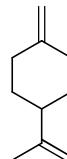
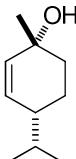
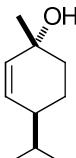
Lavandulil-acetat



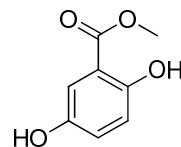
Ledol



(6E,8Z)-4,6,8-Megastigmatrien-3-on

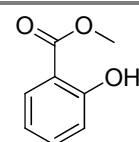
*p*-Menta-1(7),8-dien*cis*-*p*-Menta-2-en-1-ol*trans*-*p*-Menta-2-en-1-ol

Metil-gentizat

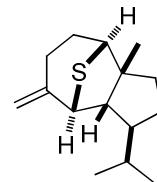


SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS I INULA*

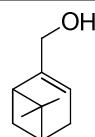
Metil-salicilat



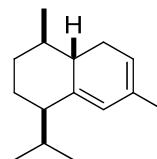
Mint-sulfid



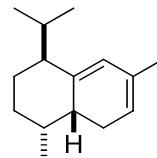
Mirtenol



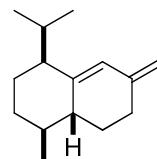
cis-Murola-3,5-dien



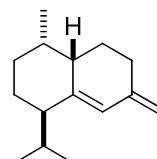
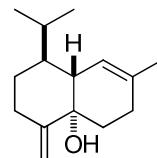
trans-Murola-3,5-dien

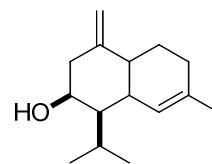
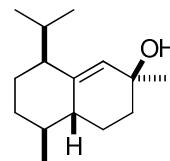
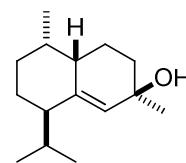
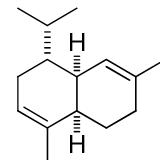
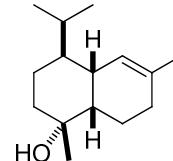
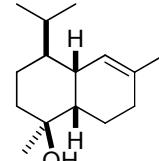


cis-Murola-4(14),5-dien

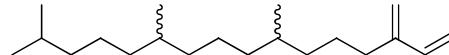


trans-Murola-4(14),5-dien

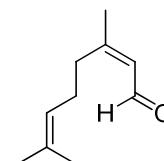
Murola-4,10(14)-dien-1 $\beta$ -ol

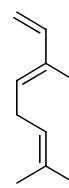
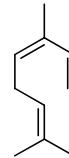
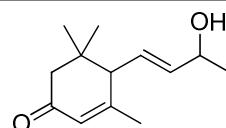
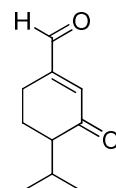
SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*Murola-4,10(14)-dien-8 $\beta$ -ol*cis*-Murola-5-en-4 $\beta$ -ol*trans*-Murola-5-en-4 $\beta$ -ol $\alpha$ -Murolen $\alpha$ -Murolol (*syn.* Torejol)*epi*- $\alpha$ -Murolol (*syn.*  $\tau$ -Murolol)

Neofitadien (izomeri I, II i III)

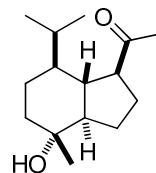


Neral

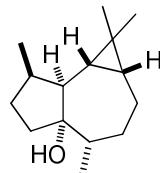
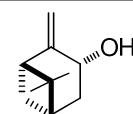


SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*(E)- $\beta$ -Ocimen(Z)- $\beta$ -Ocimen3-Okso- $\alpha$ -jonol3-Okso-*p*-menta-1-en-7-al

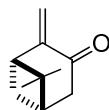
Oplopanon

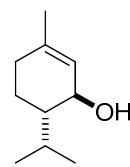


Palustrol

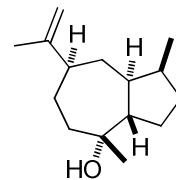
*trans*-Pinokarveol

Pinokarvon

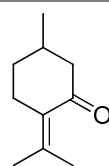


SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS I INULA**trans*-Piperitol

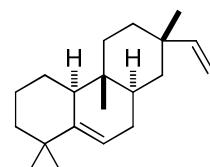
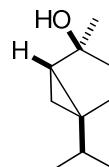
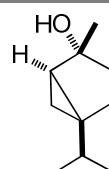
Pogostol



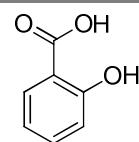
Pulegon



Rimuen

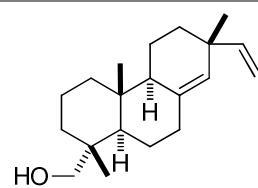
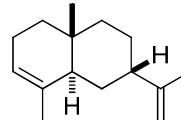
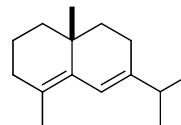
*cis*-Sabinen-hidrat*trans*-Sabinen-hidrat

Salicilna kiselina

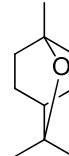


SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*

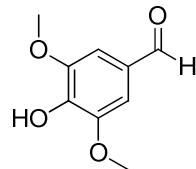
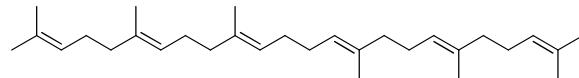
Sandarakopimarinol

7-*epi*- $\alpha$ -Selenin $\delta$ -Selenin

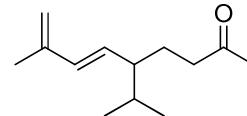
1,8-Sineol



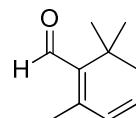
Siringaldehid

(sve *E*)-Skvalen

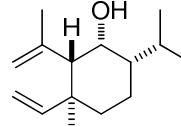
(E)-Solanon

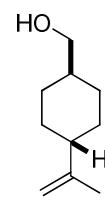


Šafranal

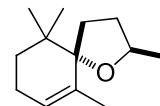


Šiobunol

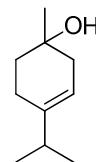


SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS I INULA**trans*-Šizool

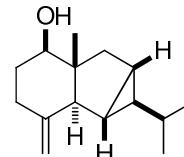
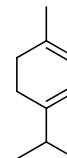
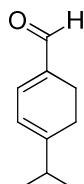
Teaspiran A



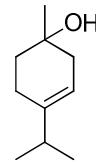
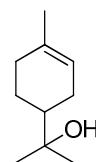
Terpinen-4-ol

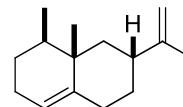
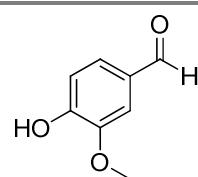
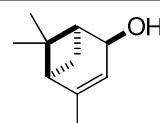
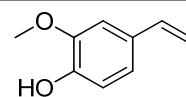
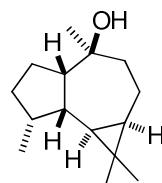
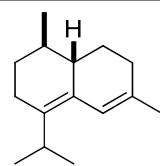


Torilenol

 $\alpha$ -Terpinen $\alpha$ -Terpinen-7-al

Terpinen-4-ol

 $\alpha$ -Terpineol

**SEKUNDARNI METABOLITI ODABRANIH BILJNIH VRSTA RODOVA *LYCOPUS* I *INULA*** **$\alpha$ -Tujen****Valencen****Vanilin****cis-Verbenol*****p*-Vinilgvajakol****Viridiflorol****Zonaren**

Marija Genčić (rođeno Denić) je rođena 01.09.1985. godine u Nišu. Osnovnu školu „Vuk Karadžić” i prirodno-matematički smer Gimnazije „Bora Stanković” završila je kao učenik generacije i nosilac diplome „Vuk Karadžić”. Tokom srednje škole redovno je učestvovala na Republičkim takmičenjima iz hemije i osvajala nagrade, među kojima je prvo mesto u kategoriji test i eksperimentalne vežbe, školske 2000/01 i 2002/03.

Prirodno-matematički fakultet u Nišu, Odsek za hemiju, upisala je školske 2004/05. Studije je završila 23.09.2009. godine, sa prosečnom ocenom 9,96 i ocenom 10 na diplomskom radu, pod nazivom: „*2-Pentilpiperidin, novi alkaloid iz biljne vrste Conium maculatum L: sinteza i spektralna karakterizacija*”. Ovaj diplomski rad je proglašen, na konkursu fonda „*Nenada M. Kostića za hemijske nauke*”, za najbolji diplomski/master rad iz svih oblasti hemijskih nauka na Univerzitetima u Srbiji u školskoj 2009/10. U toku studiranja dva puta je (2007. i 2009.), nagrađena diplomom Grada Niša kao najbolji student Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, a nosilac je i Srebrnog znaka Univerziteta u Nišu, kao najbolji diplomirani student u školskoj 2008/09. u polju prirodno-matematičkih nauka. Takođe, dobitnik je godišnje nagrade Srpskog hemijskog društva za 2010. godinu za izuzetan uspeh u toku studija. Doktorske akademske studije na Departmanu za hemiju istog fakulteta upisala je školske 2009/10. Položila je sve ispite predviđene studijskim programom sa ocenom 10.

Izabrana je u zvanje asistent na Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu 11.04.2014. godine i u tom svojstvu je do sada učestvovala u izvođenju vežbi na predmetima *Organska hemija 2, Principi organske sinteze i Organske sinteze*. U toku 2010. godine bila je angažovana kao istraživač na projektu „Sekundarni metaboliti: hemijski sastav, antimikrobna i antioksidantna aktivnost”, a od 2011. godine angažovana je na projektu „Kombinatorne biblioteke heterogenih katalizatora, prirodnih proizvoda, modifikovanih prirodnih proizvoda i njihovih analoga: put ka novim biološkim agensima”.

**- RADOVI OBJAVLJENI U VRHUNSKIM MEĐUNARODNIM ČASOPISIMA (M<sub>21</sub>) -**

1. Genčić, M. S.; Radulović, N. S. (2015) Lanthanide-induced shift reagents enable structural elucidation of natural products in inseparable complex mixtures - The case of elemenal from *Inula helenium* L. (Asteraceae). *RSC Advances*, 5, 72670-72682.
2. Ilic-Tomic, T; Genčić, M. S.; Živković, M. Z.; Vasiljević, B.; Djokic, L.; Nikodinovic-Runic, J.; Radulović, N. S. (2015) Structural diversity and possible functional roles of free fatty acids of the novel soil isolate *Streptomyces* sp. NP10. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(11), 4815-4833.
3. Mihajilov-Krstev T. M.; Denić, M. S.; Zlatković, B. K.; Stankov-Jovanović, V. P.; Mitić, V. D.; Stojanović, G. S.; Radulović, N. S. (2015) Inferring the origin of rare fruit distillates from compositional data using multivariate statistical analyses and the identification of new flavor constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(6), 1217-1235.
4. Pejović, A.; Denić, M. S.; Stevanović, D.; Damjanović, I.; Vukićević, M.; Kostova, K.; Tavlınova-Kirilova, M.; Randjelović, P.; Stojanović, N. M., Bogdanović, G. A.; Blagojević, P.; D'hooghe, M.; Radulović, N. S.; Vukićević, R. D. (2014) Discovery of anxiolytic 2-ferrocenyl-1,3-thiazolidin-4-ones exerting GABA<sub>A</sub> receptor interaction via the benzodiazepine-binding site, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 83, 57-73.
5. Radulović, N. S.; Denić, M. S.; Stojanović-Radić, Z. Z. (2014) Synthesis of small combinatorial libraries of natural products: Identification and quantification of new long-chain 3-methyl-2-alkanones from the root essential oil of *Inula helenium* L. (Asteraceae). *Phytochemical Analysis*, 25(1), 75-80.
6. Denić, Marko S.; Sunarić, S. M.; Kesić, Lj. G.; Minić, I. Z.; Obradović, R. R.; Denić, Marija S.; Petrović, M. S. (2013) RP-HPLC assay of doxycycline in human saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontal disease. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 78-79, 170-175.
7. Radulović, N.; Đorđević, N.; Denić, M.; Martins Gomes Pinheiro, M.; Dias Fernandes, P.; Boylan, F. (2012) A novel toxic alkaloid from poison hemlock (*Conium maculatum* L., Apiaceae): Identification, synthesis and antinociceptive activity. *Food and Chemical Toxicology*, 50(2), 274-279.

### - RADOVI OBJAVLJENI U ISTAKNUTIM MEĐUNARODNIM ČASOPISIMA (M<sub>22</sub>) -

8. Radulović, N. S.; **Denić, M. S.** (2013) Essential oils from the roots of *Echinops bannaticus* Rochel ex Schrad. and *Echinops sphaerocephalus* L. (Asteraceae): Chemotaxonomic and biosynthetic aspects. *Chemistry & Biodiversity*, 10(4), 658-676.
9. Stojanović-Radić, Z.; Čomić, Lj.; Radulović, N.; Blagojević, P.; **Denić, M.**; Miltojević, A.; Rajković, J.; Mihajlov-Krstev, T. (2012) Antistaphylococcal activity of *Inula helenium* L. root essential oil: eudesmane sesquiterpene lactones induce cell membrane damage. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31(6), 1015-1025.
10. Radulović, N. S.; **Denić, M.**; Stojanović-Radić, Z.; Skropeta, D. (2012) Fatty and volatile oils of the gypsywort *Lycopus europaeus* L. and the Gaussian-like distribution of its wax alkanes. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 89(12), 2165-2185.
11. Radulović, N. S.; **Denić, M.**; Stojanović-Radić, Z. (2010) Antimicrobial phenolic abietane diterpene from *Lycopus europaeus* L. (Lamiaceae). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(17), 4988-4991.

### - RADOVI OBJAVLJENI U MEĐUNARODNIM ČASOPISIMA (M<sub>23</sub>) -

12. Stevanović, D. D.; Pejović, A. Z.; Damljanović, I. S.; Vukićević, M. D.; Dobrikov, G.; Dimitrov, V.; **Denić, M. S.**; Radulović, N. S.; Vukićević, R. D. (2013) Electrochemical phenylselenoetherification as a key step in the synthesis of ( $\pm$ )-curcumene ether. *Helvetica Chimica Acta*, 96(6), 1103-1110.
13. Gutman, I.; Arsić, B.; **Denić, M.**; Stojanović, I. (2006) Benzoid isomers with greatest and smallest Kekulé structure counts. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 71(7), 785-791.

### - RAD OBJAVLJEN U ČASOPISU NACIONALNOG ZNAČAJA (M<sub>52</sub>) -

14. **Denić, M.**; Blagojević, P.; Radulović, N. (2013) Synthetic approaches to coniine and other 2-alkyl piperidines. *Facta Universitatis, Series: Physics, Chemistry and Technology*, 11(1), 1-26.

### - RADOVI SAOPŠTENI NA MEĐUNARODNIM NAUČNIM SKUPOVIMA OBJAVLJENIM U IZVODU (M<sub>34</sub>) -

15. Stojanović, M. N.; Radulović, N. S.; **Denić, M. S.**; Ranđelović, P. J.; Stojanović-Radić, Z. Z. Toxicity of thujone and thujone-containing medicinal plants? The case of *Salvia*

- officinalis*, *Artemisia absinthium*, *Thuja occidentalis* and *Tanacetum vulgare* essential oils. In: *Natural Volatiles and Essential Oils, Special Issue 2014*. Istanbul (Turkey), September 7 – 10, 2014, pp. 44.
16. Vukićević, D. R.; **Denić, M. S.**; Janković, S. M.; Radulović, N. S. The illusive floral scent of *Daphne blagayana* Freyer (Thymelaeaceae). In: *Natural Volatiles and Essential Oils, Special Issue 2014*. Istanbul (Turkey), September 7 – 10, 2014, pp. 45.
17. Stevanović, D. D.; Vukićević, D. R.; **Denić, M. S.**; Živković, M.; Blagojević, P. D.; Radulović, N. S. Chemical composition of *Cornus mas* L. essential oil: influence of ecological/geographical factors. In: *Natural Volatiles and Essential Oils, Special Issue 2014*. Istanbul (Turkey), September 7 – 10, 2014, pp. 95.
18. Vukićević, D. R.; Stevanović, D. D.; **Denić, M. S.**; Janković, S. M.; Radulović, N. Essential oil of *Cephalaria ambroisioides* (Sibth. & Sm.) Roem. & Schult. (Caprifoliaceae): chemical composition and chemotaxonomic significance. In: *Natural Volatiles and Essential Oils, Special Issue 2014*. Istanbul (Turkey), September 7 – 10, 2014, pp. 96.
19. Radulović, N.; **Denić, M.**; Stojanović-Radić, Z. Antimicrobial volatile oil of *Lycopus europaeus* L. (Lamiaceae). In: *Programme, Book of Abstracts and Participants List of the 43<sup>rd</sup> International Symposium on Essential Oils*. Lisbon (Portugal), September 5 – 8, 2012, pp. 67.
20. Radulović, N.; **Denić, M.**; Stojanović-Radić, Z. Long chain 3-methyl-2-alkanones from the essential oil of *Inula helenium* L. (Asteraceae). In: *Programme, Book of Abstracts and Participants List of the 43<sup>rd</sup> International Symposium on Essential Oils*. Lisbon (Portugal), September 5 – 8, 2012, pp. 65.
21. Radulović, N.; Đorđević, N.; **Denić, M.** Conmaculatin – a new alkaloid from the essential oil of *Conium maculatum* L. In: *Programme and Book of Abstracts of the 41<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils*. Wroclaw (Poland), September 5 – 8, 2010, pp. 50.

### - RADOVI SAOPŠTENI NA NACIONALNIM NAUČNIM SKUPOVIMA OBJAVLJENIM U IZVODU (M<sub>64</sub>) -

22. Živković, M. Z.; Vukićević, D. R.; **Genčić, M. S.**; Blagojević, P. D.; Radulović N. S. Flower volatiles of the Cornelian cherry (*Cornus mas* L., Cornaceae). In: *Book of Abstracts of the 23<sup>rd</sup> Congress of Chemists and Technologists of Macedonia with international participation*. Ohrid (Macedonia), October 8 – 11, 2014, pp. 56.

23. Živković, M. Z.; Ilic-Tomic, T.; **Denić, M. S.**; Nikodinovic-Runic, J.; Radulović, N. S. Streptomyces NP10 produces a large amount of *n*- and branched free fatty acids as a response to the presence of short-chain fatty acids. In: *Programme and Book of Abstracts of the 51<sup>st</sup> Meeting of the Serbian Chemical Society*. Niš (Serbia), June 5 – 7, 2014, pp. 59.
24. Vukićević, D. R.; **Denić, M. S.**; Janković, S. M.; Radulović, N. S. Chemical composition of the diethyl ether extract of *Daphne blagayana* Freyer (Thymelaeaceae) flowers In: *Programme and Book of Abstracts of the 51<sup>st</sup> Meeting of the Serbian Chemical Society*. Niš (Serbia), June 5 – 7, 2014, pp. 65.
25. Radulović, N.; **Denić, M.**; Marković, B. Phytochemical study of *Lycopus exaltatus* L. (Lamiaceae). In: *Book of abstracts of the 11<sup>th</sup> Symposium on the Flora of Southerneastern Serbia and Neighboring Regions*. Vlasina (Serbia), June 13 – 15, 2013, pp. 98-99.
26. Radulović, N. S.; **Denić, M. S.**; Stojanović-Radić, Z. 3-Metil-2-alkanoni dugog lanaca iz etarskog ulja korena biljne vrste *Inula helenium* L. (Asteraceae). In: *Program i kratki izvodi radova Prve konferencije mladih hemičara Srbije*. Beograd (Srbija), 19 – 20. oktobar, 2012, pp. 44.
27. Radulović, N. S.; **Denić, M. S.** Chemical composition of *Echinops bannaticus* Roch and *Echinops sphaerocephalus* L. root essential oils. In: *Programme and Book of Abstracts of the 50<sup>th</sup> Meeting of the Serbian Chemical Society*. Belgrade (Serbia), June 14 – 15, 2012, pp. 107.
28. Radulović, N. S.; **Denić, M. S.**; Stojanović-Radić, Z. Z. A new antimicrobial phenolic abietane diterpene from *Lycopus europaeus* L. (Lamiaceae). In: *Programme and Book of Abstracts of the 49<sup>th</sup> Meeting of the Serbian Chemical Society*. Kragujevac (Serbia), May 13 – 14, 2011, pp. 86.
29. Miltojević, A.; **Denić, M.** Nitrates from fertilizers – Environmental and health effects. In: *Book of Abstracts of the 1<sup>st</sup> Congress of Students of Environmental Protection of South Eastern Europe*. Kopaonik Mountain (Serbia), April 23 – 28, 2008, pp. III-6.



---

**Прилог 1.**

**ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ**

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом  
Изоловање, синтеза и биохемичка активност секундарних метаболита  
одобраних биљних врста горца *Lycopus (Lamiaceae)* и *Trula (Astrologaceae)*

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

У Нишу, 07.09.2015.

Аутор дисертације:

Марина С. Ђенчић

Потпис докторанда:

Марина Ђенчић



---

Прилог 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКЕ  
ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора: Марија Генчић

Студијски програм: Хемија

Наслов рада: Изоловање, синтеза и биолошка активност сесундарних метаболита одобраних биљних врста рогова *Lycopus* (Лакноглаве) и *Nicotia* (Астеродске)

Ментор: пр Нико С. Радуловић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 07.09.2015.

Аутор дисертације:

Марија С. Генчић

Потпис докторанда:

Марија Генчић



---

**Прилог 3.****ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ**

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

ИЗЛОВАЊЕ, СИНТЕЗА И БИОЛОШКА АКТИВНОСТ ОДСУНДАРНИХ НЕТАБОЛИТА ОДРЕДАНИХ ЕМЦИЈА ВРСА РОГОВА *Lycopus* (Lamiaceae) И *Tulsi* (Asteraceae)

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

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

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу, 07.09.2015.

Аутор дисертације:

Марина С. Ђенчић

Потпис докторанда:

Марина Ђенчић

## ТИПОВИ ЛИЦЕНЦИ

1. Ауторство. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци (CC BY 3.0).

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела (CC BY-NC 3.0).

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе вашег дела у делима других аутора, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела (CC BY-NC-ND 3.0).

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прераде (CC BY-NC-SA 3.0).

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе вашег дела у делима других аутора, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела (CC BY-ND 3.0).

6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода (CC BY-SA 3.0).