

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET

Mirjana T. Cvetković

Metabolomička studija balkanskih vrsta roda
Amphoricarpos Vis. (Asteraceae)

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY

Mirjana T. Cvetković

The metabolomic study of the Balkan species of
the genus *Amphoricarpos* Vis. (Asteraceae)

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Mentori:

dr Vele Tešević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

dr Iris Đorđević, venredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Fakultet veterinarske medicine

Komisija:

dr Slobodan Milosavljević, profesor emeritus
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet
Redovni član Srpske akademije nauke i umetnosti

dr Petar Matin, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet,
Institut za botaniku i botanička bašta „Jevremovac”

dr Dejan Gođevac, naučni savetnik
Naučna ustanova Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju
Institut od nacionalnog značaja, Univerzitet u Beogradu

Zahvalnica

Mentoru profesoru dr Veletu Teševiću i profesoru emeritusu dr Slobodanu Milosavljeviću se zahvaljujem na predloženoj temi, ukazanom poverenju, nesebičnoj pomoći i korisnim savetima tokom izrade disertacije. Profesoru dr Petru Marinu se zahvaljujem na pomoći tokom pisanja disertacije. Dr Dejanu Gođevcu, koji je rukovodio jednim delom ove disertacije, se zahvaljujem na pomoći i savetima tokom izrade teze. Mentoru dr Iris Đorđević, dr Milki Jadranin i dr Ivanu Vučkoviću se zahvaljujem na savetima i velikoj pomoći u toku rada i rešavanju spektara.

Kolegama iz Centra za instrumentalnu analizu dr Vlatki Vajs, Marini Todosijević, dr Nini Todorović, dr Ljubodragu Vujisiću, dr Miroslavu Novakoviću, dr Borisu Mandiću, dr Snežani Trifunović, Dejanu Vučetiću, dr Neni Bajc i dr Ivani Aljančić se zahvaljujem na pomoći u svim fazama rada na disertaciji. Kolegama Jovani Stanković, Gordani Krstić, dr Bobanu Anđelkoviću, Ivani Sofrenić, Stefanu Ivanoviću, Katarini Simić i Ivani Lovre se zahvaljujem na saradnji i prijatnoj atmosferi u kojoj je ova disertacija nastala.

Dr Ani Damjanović (Institut za onkologiju i radiologiju Srbije) i dr Miroslavi Stanković (Nuklearni objekti Srbije), koje su učestvovala u ispitivanju bioloških aktivnosti, se zahvaljujem na izuzetnoj i uspešnoj saradnji.

Veliku zahvalnost dugujem dr Jasminki Koroliji, koja me je naučila da je hemija jedna velika igra bez granica.

Sanja, Majo, Jelena i Tamara hvala što ste uz mene svih ovih godina, što se iskreno radujete svakom mom uspehu i što znam da u svakom trenutku mogu da računam na vas. Marta, Milice i Brankice hvala što ste ovo putovanje učinile veselijim i zabavnijim. Didi, Kidi, Đoletu, Peci, Bebi, Urošu i Lazi se zahvaljujem na lepim trenucima višedecenijskog divnog druženja. Zahvaljujem se kolegama Jelena Đ., Jelena T., Kaća i Miloše V. hvala što ste studentske dane učinili zanimljivim i nezaboravnim. Veliku zahvalnost dugujem Milošu na pruženoj nesebičnoj i bezgraničnoj podršci.

Zahvaljujem se čika Jovi, tetka Milanki i čika Mići, koji su bodrili svaki moj korak i uz prave reči doprineli u velikoj meri mojim uspesima.

Na kraju, najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici, sestri Biljani, bratu Draganu, majci Snežani i ocu Tomici, na razumevanju i strpljenju kakvu samo oni mogu

da pruže. Mama i Tata, hvala vam što ste verovali u mene, svakim danom ulivali novu snagu i naučili da su uz snažnu volju i trud sve prepreke premostive. Bez vašeg odricanja, nesebične ljubavi i neograničene podrške ovo ne bi bilo moguće.

Mama i Tata, ovu disertaciju posvećujem vama, jer ovo je vaš uspeh.

Autor

IZVOD

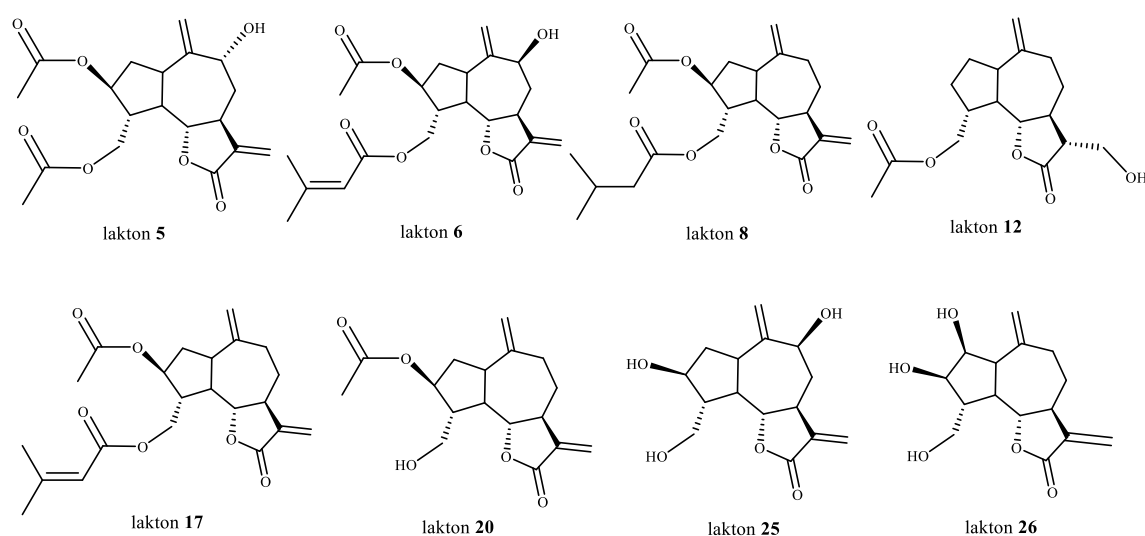
Metabolomika je nova naučna multidisciplinarna oblast koja obuhvata različite aspekte biologije, hemije i matematike. Koristi moderne spektroskopske i hromatografske tehnike (NMR, IC, UV, MS, GC, LC) i multivarijantnu statističku analizu podataka sa ciljem da se izmere kvantitativno i kvalitativno svi metaboliti u ispitivanom organizmu i na taj način dobije jasna metabolomička slika pod ispitivanim uslovima. Primena metabolomike nije ograničena samo na biljni svet, već se može primeniti na sve žive organizme, pa tako i na ljude. Posebno je značajna mogućnost primene u medicini kao dijagnostičke metode ili u farmakognoziji za otkrivanje novih lekovitih sirovina. U ovoj disertaciji primena metabolomike na endemski biljni rod *Amphoricarpos* Vis. imala je dva cilja: (a) sticanje novih saznanja o mogućnosti primene dobijenih rezultata u diferencijaciji balkanskih vrsta ovog roda i (b) razvoj metode za brzo otkrivanje novih farmakološki aktivnih sastojaka u biljnom materijalu.

Vrste roda *Amphoricarpos* Vis. rasprostranjene su na Balkanskom poluostrvu. Anatoliji i Kavkazu. Da bi se dobilo više uvida u taksonomski status balkanskih taksona ovog roda, koji nije do kraja raščišćen, primenjena je metabolomička studija. Po Blečiću i Mayeru¹ postoje tri taksona: dve vrste *A. neumayeri* Vis. i *A. autariatus* Blečić et Mayer, koja se deli na dve podvrste - ssp. *autariatus* i ssp. *bertisceus* Blečić et Mayer. S druge strane, Webb² priznaje samo jednu vrstu - *A. neumayeri* Vis., koja sadrži dve podvrste - ssp. *neumayeri* i ssp. *murbeckii* Bošnjak. U novije vreme, na osnovu ispitivanja genoma vrsta ovog roda predložena je samo jedna vrsta, *A. neumayerianus* (Vis.) Greuter.³ U ovom radu analizirana su sva tri taksona (prema Blečiću i Mayeru), a uzorci su sakupljeni na različitim lokalitetima u Crnoj Gori u fazi cvetanja. Primenjena je ¹H NMR spektroskopija kombinovana sa multivarijantnom analizom podataka. Pokazano je da je OPLS-DA (engl. Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis) najefikasniji metod za diskriminaciju ispitivanih uzoraka na osnovu metabolita prisutnih u ekstraktima. Utvrđeno je da je glavna razlika između *A. autariatus* i *A. neumayeri* prisustvo karakterističnih seskviterpenskih laktona gvajanolidnog tipa (amforikarpolida). Glavni seskviterpenski lakton vrste *A. neumayeri* je oksidovan u položaju 2, dok laktoni prisutni u obe podvrste *A. autariatus* su oksidovani u poziciji 9, što potvrđuje da seskviterpenski laktoni mogu biti

hemotaksonomski markeri u porodici Asteraceae. Za razlikovanje dve podvrste, *A. autariatus* ssp. *autariatus* i *A. autariatus* ssp. *bertisceus* utvrđeno je da hlorogenska i jabučna kiselina mogu biti diferencijalni marker. Međutim, ova jedinjenja nemaju praktičan hemotaksonomski značaj jer njihov sadržaj može u značajnoj meri da zavisi od ekoloških faktora, fiziološkog stanja biljke, kao i s obzirom na činjenicu da su ova jedinjenja široko rasprostranjena u biljnom svetu. Međutim, povećan sadržaj hlorogenske kiseline u ssp. *bertisceus* u odnosu na sadržaj u ssp. *autariatus*, gde preovladava jabučna kiselina, je omogućilo razlikovanje ove dve podvrste. Dobijeni rezultati ovog istraživanja bili su u skladu sa infrageneričkom klasifikacijom roda *Amphoricarpos* po Blečiću i Mayeru.

U ovoj tezi prikazan je razvoj metode za brzu identifikaciju biološki aktivnih jedinjenja biljnog porekla. Primenom kombinacije brze hromatografije na suvoj koloni (engl. dry-column flash chromatography) za frakcionisanje sirovog ekstrakta *A. autariatus* ssp. *autariatus* sa infracrvenom (IC), kao i sa nuklearno-magnetnom rezonantnom spektroskopijom (NMR) integrisanom sa multivarijantnom analizom došlo se do saznanja o jedinjenjima koja imaju izrazitu citotoksičnu aktivnost bez prethodnog izolovanja čistih jedinjenja. Ispitivan je *A. autariatus* identifikovan prema Blečiću i Mayeru, sakupljen u fazi cvetanja u kanjonu Tare. Za korelaciju hemijskog sastava ekstrakta *A. autariatus* ssp. *autariatus* sa rezultatima citotoksične aktivnosti na humane ćelijske linije adenokarcinoma cerviksa (HeLa) i ćelijske linije adenokarcinoma pluća (A549) korišćena je OPLS metoda multivarijantne analize. Na ovaj način, identifikovana su jedinjenja koja imaju najveći doprinos citotoksičnoj aktivnosti. Prema dobijenim rezultatima, seskviterpenski laktoni gvajanolidnog tipa su identifikovani kao jedinjenja odgovorna za izuzetnu biološku aktivnost u ispitivanim frakcijama. Infracrveni spektralni podaci ukazuju da bioaktivni molekuli poseduju α,β -nezasićenu γ -laktonsku grupu koja je odgovorna za jaku aktivnost. NMR podacima uspešno je određena struktura bioaktivnih amforikarpolida. Ispitivane (aktivne) frakcije su pokazale značajnu biološku aktivnost na obe ćelijske linije. Test citotoksičnosti frakcija na ćelijskoj liniji HeLa pokazao je da su frakcije najefikasnije u opsegu IC_{50} vrednosti od 8,34 do 9,55 $\mu\text{g/mL}$, dok za ćelijsku liniju adenokarcinom pluća IC_{50} vrednosti najefikasnijih frakcija iznose 14,46 i 15,57 $\mu\text{g/mL}$.

Pored metabolomičkih studija, ispitivanje vrsta roda *Amphoricarpos* obuhvatilo je i preparativno izolovanje seskviterpenskih laktona, budući da su vrste roda bogate ovim sekundarnim metabolitima. Ispitivana su tri taksona - *A. neumayeri*, *A. autariatus* ssp. *bertisceus* i *A. autariatus* ssp. *autariatus* identifikovana prema Blečiću i Mayeru. Biljni materijal je sakupljan u fazi cvetanja 2011. i 2014. godine na različitim lokalitetima u Crnoj Gori. U okviru ovog rada izolovano je 26 seskviterpenskih laktona gvajanolidnog tipa nazvanih amforikarpolidi, karakterističnih za ovaj rod. Od identifikovanih laktona osam (**5**, **6**, **8**, **12**, **17**, **20**, **25** i **26**) je po prvi put izolovano.



Cilj ovog istraživanja bio je i da se identifikuju komponente sa biološkom aktivnošću koja može da obezbedi terapijski efekat protiv oštećenja DNK izazvanog karcinogenim agensima iz životne sredine. Dva 3,9,15- (**3** i **4**) kao i dva 2,3,15-trioksigenovana laktone (**9** i **19**) izolovanih iz ovih ekstrakata su testirani *in vitro* na protektivni efekat na oštećenje hromozoma perifernih humanih limfocita, korišćenjem ekspresije mikronukleusa blokiranjem citokineze (CBMN), dobro poznate metode za praćenje oštećenja hromozoma u ljudskim populacijama. Rezultati pokazuju da su laktone veoma aktivni i pokazuju veću aktivnost nego amifostin, sintetički prolek koji je sposoban da uklanja slobodne radikale generisane zračenjem i sprečava oštećenja ćelija. Analizirajući odnos između strukture laktone i njihovog zaštitnog efekta na DNK humanih limfocita, zaključeno je da su aktivniji laktone hidroksilovani na poziciji 9 (**3** i **4**) u poređenju sa onim oksigenovanim na C-2 (**9** i **19**).

Ključne reči: Metabolomika, NMR, IR, *Amphoricarpos*, hemotaksonomija, citotoksična aktivnost, protektivni efekat na DNK humanih limfocita, seskviterpenski laktoni

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Organska hemija

UDK broj: 547

ABSTRACT

Metabolomics is a new scientific multidisciplinary field that includes various aspects of biology, chemistry and mathematics. It uses modern spectroscopic and chromatographic techniques (NMR, IC, UV, MS, GC, LC) and multivariate statistical data analysis to measure quantitatively and qualitatively all of the metabolites in the test organism and thereby obtain a clear metabolic profile under test conditions. The use of metabolomics is not limited to the plant world, but can be applied to all living organisms as well as humans. A particularly important possibility is the application in medicine as a diagnostic method or in pharmacognosy for the discovery of new natural sources of drugs. In this thesis, the application of metabolomics to the endemic plant genus *Amphoricarpos* Vis. was applied with two objectives: (a) acquiring new knowledge of the systematization of the genus, and (b) developing a method for rapid detection of new pharmacologically active ingredients in plant material.

Genus *Amphoricarpos* Vis. is an endemic of the western part of the Balkan Peninsula. In order to gain more insight into the taxonomic status of the genus that is still ambiguous, a metabolomic study was applied. Blečić and Mayer¹ proposed three taxa: two species *A. neumayeri* Vis. and *A. autariatus* Blečić et Mayer, the latter divided into two subspecies, ssp. *autariatus* i ssp. *bertisceus* Blečić et Mayer. On the other hand, Webb² recognized only one species, *A. neumayeri* Vis. divided into two subspecies, ssp. *neumayeri* i ssp. *murbeckii* Bošnjak. Recently, on the basis of a genome examination of the taxa from the West Balkans, only one species was proposed, *A. neumayerianus* (Vis.) Greuter.³

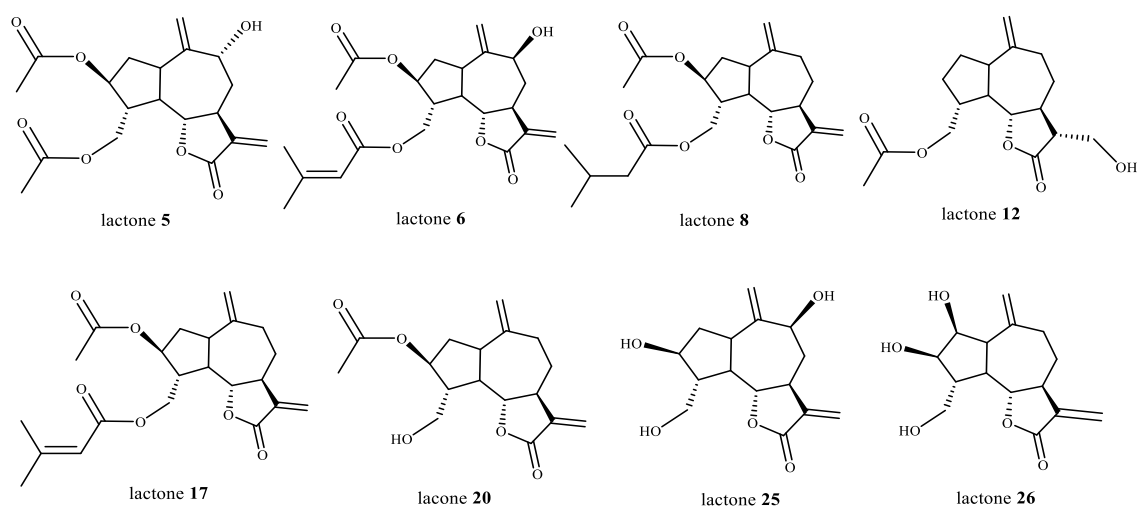
In this dissertation all three taxa (according to Blečić and Mayer)¹ were analysed. The samples were collected at different locations in Montenegro at the stage of flowering. ¹H NMR spectroscopy combined with multivariate data analysis was applied. Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis (OPLS-DA) has been shown to be the most effective method for discrimination of the tested samples, based on the metabolites present in the extracts. It was found that the main difference between *A. autariatus* and *A. neumayeri* was the presence of characteristic guaianolide sesquiterpene lactones (amforicarpolides). The major sesquiterpene lactones in the extract of *A. neumayeri* were oxidized in position 2, while the lactones present in both

subspecies of *A. autariatus* were oxidized at position 9, which confirms that sesquiterpene lactones may be chemotaxonomic markers in the Asteraceae family. To distinguish between two subspecies, *A. autariatus* ssp. *autariatus* and *A. autariatus* ssp. *bertisceus* it was found that chlorogenic and malic acid may be decisive markers, although these compounds generally have no practical chemotaxonomic significance. However, the increased content of chlorogenic acid in ssp. *bertisceus* in comparison to that in ssp. *autariatus*, where malic acid was predominating, enabled differentiation of these subspecies. The obtained results of this study were in accordance with the classification of the examined genus proposed by Blečić and Mayer.¹

In this thesis the development of a method for rapid identification of biologically active compounds of plant origin is presented. A combination of dry-column flash chromatography (DCFC) for the fractionation of crude extract *A. autariatus* ssp. *autariatus* with Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), as well as ¹H nuclear-magnetic resonance spectroscopy (¹H NMR) integrated with multivariate analysis, afforded identification of constituents exhibiting distinct cytotoxic activity without prior isolation of pure compounds. The examined *A. autariatus* (Blečić and Mayer)¹ was collected in the flowering stage in the canyon of river Tara. The OPLS method of multivariate analysis was used to correlate the chemical composition of the plant extract of *A. autariatus* ssp. *autariatus* with the cytotoxic activity on the human cervical adenocarcinoma cell line (HeLa) and the lung adenocarcinoma cell line (A549). In this way, compounds with the greatest contribution to cytotoxic activity have been identified. The guaianolide sesquiterpene lactones were identified as the compounds responsible for exceptional biological activity in the test fractions. Infrared spectral data indicated an α,β -unsaturated γ -lactone group which could be responsible for strong activity. The structure of bioactive amphoricarpolides was determined using ¹H NMR data. The investigated (active) fractions showed significant biological activity against both cell lines. Thus, they exhibited IC₅₀ values ranging from 8.34 to 9.55 $\mu\text{g} / \text{mL}$, on the HeLa cell line, whereas the IC₅₀ values for the lung adenocarcinoma line were between 14.46 and 15.57 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

In addition to the above metabolomic studies, the subject of this thesis included preparative isolation of sesquiterpene lactones, since the genus is rich in these secondary metabolites. Three taxa *A. neumayeri*, *A. autariatus* ssp. *bertisceus* and *A.*

autariatus ssp. *autariatus* (Blečić and Mayer).¹ The plant material was collected during the flowering season in 2011 and 2014 at different locations in Montenegro, specified in the thesis. Chemical analysis of the collected samples resulted in isolation of 26 sesquiterpene lactones of guaianolide type named amphoricarpolides, typical for the genus. Eight of them (**5**, **6**, **8**, **12**, **17**, **20**, **25**, **26**) were the new compounds.



In course of our investigations aimed to identify herbal constituents with biological activity that can provide therapeutic effect against DNA damage caused by environmental carcinogens, two 3,9,15- (**3** and **4**) as well as two 2,3,15-trioxygenated lactones (**9** and **19**) isolated from these extracts were tested for *in vitro* protective effect against chromosome aberrations in peripheral human lymphocytes, using the standard cytochalasin-B blocked micronucleus (CBMN) which is a well-established as method for monitoring chromosome damage in human populations. The results indicate that lactones are very active showing greater activity than amifostine, a synthetic prodrug which is capable of scavenging radiation-generated free radicals and preventing cell damages. Analyzing the relationship between the structure of the lactones and their protective effect on the DNA of human lymphocytes, it has been concluded that more active lactones are hydroxylated at position 9 (**3** and **4**) in comparison with those oxygenated at C-2 (**9** and **19**).

Keywords: Metabolomics, NMR, FTIR, *Amphoricarpos*,
chemotaxonomy, cytotoxic activity, in vitro protective effect on chromosome
aberrations, sesquiterpene lactone

Academic Expertise: Chemistry

Field of Academic Expertise: Organic Chemistry

UDK: 547

Sadržaj

UVOD.....	1
1. OPŠTI DEO	2
1.1. Uvod u metabolomiku	3
1.1.1. Uzorkovanje biljnog materijala i ekstrakcija metabolita.....	5
1.1.2. Analitičke metode primenjene u metabolomici biljaka.....	7
1.1.3. Uvod u multivarijantnu analizu.....	7
1.1.3.1. Vrste multivarijantnih metoda	10
1.1.3.2. Parametri za evaluaciju kvaliteta modela	11
1.1.3.3. Interpretacija rezultata multivarijantne analize	13
1.2. Primena metabolomike u taksonomiji biljaka	15
1.3. Primena metabolomike u detektovanju bioaktivnih komponenti biljnog materijala	19
1.4. Problem sistematike vrsta roda <i>Amphoricarpos</i>	25
1.5. Opis vrsta roda <i>Amphoricarpos</i>	27
1.5.1. <i>Amphoricarpos neumayeri</i> Vis.	27
1.5.2. <i>Amphoricarpos autariatus</i> Blečić et Mayer.....	28
1.5.2.1. <i>Amphoricarpos autariatus</i> ssp. <i>autariatus</i> Blečić et Mayer.....	28
1.5.2.2. <i>Amphoricarpos autariatus</i> ssp. <i>bertisceus</i> Blečić et Mayer.....	28
1.6. Biološke aktivnosti metabolita iz vrsta roda <i>Amphoricarpos</i>	29
1.6.1. Seskviterpenski laktoni	31
1.6.1.1. Funkcija α -metilen- γ -laktonske grupe	33
2. NAŠI RADOVI	35
2.1. Primena metabolomike kao hemotaksonomske metode za klasifikaciju vrsta roda <i>Amphoricarpos</i>	37
2.2. Primena metabolomike u određivanju biološki aktivnih (citotoksičnih) komponenti ekstrakata <i>Amphoricarpos autariatus</i> ssp. <i>autariatus</i>	45
2.2.1. Metabolomičko određivanje aktivnih komponenti ekstrakata <i>Amphoricarpos autariatus</i> ssp. <i>autariatus</i> primenom infracrvene spektroskopije.....	47
2.2.2. Metabolomičko određivanje aktivnih komponenti ekstrakata <i>Amphoricarpos autariatus</i> ssp. <i>autariatus</i> primenom NMR spektroskopije.....	54
2.3. Izolovanje i karakterizacija seskviterpenskih laktona iz vrsta roda <i>Amphoricarpos</i>	61

2.3.1. Seskviterpenski laktoni vrste <i>Amphoricarpos autariatus</i> ssp. <i>autariatus</i> sa lokaliteta kanjon Tare.....	62
2.3.1.1. Karakterizacija 3,15-di- <i>O</i> -acetil-9 α -hidroksiamforikarpolida	64
2.3.1.2. Karakterizacija 3- <i>O</i> -acetil-15- <i>O</i> -senecioil-9 β -hidroksiamforikarpolida	70
2.3.2. Seskviterpenski laktoni vrste <i>Amphoricarpos autariatus</i> ssp. <i>bertisceus</i> sa lokaliteta planine Zeletin.....	73
2.3.2.1. Karakterizacija 3- <i>O</i> -acetil-15- <i>O</i> -izovaleroilamforikarpolida.....	75
2.3.2.2. Karakterizacija 15- <i>O</i> -acetil-3-deoksi-11 β ,13-dihidro-13-hidroksiamforikarpolida	78
2.3.3. Seskviterpenski laktoni vrste <i>Amphoricarpos neumayeri</i> sa lokaliteta planine Lovćen	82
2.3.3.1. Karakterizacija 3 β - <i>O</i> -acetil-15- <i>O</i> -senecioilamforikarpolida.....	83
2.3.3.2. Karakterizacija 3 β - <i>O</i> -acetilamforikarpolida.....	86
2.3.3.3. Karakterizacija 9 β -hidroksiamforikarpolida	89
2.3.3.4. Karakterizacija 2 α -hidroksiamforikarpolida	92
2.4. Određivanje bioloških aktivnosti	95
2.4.1. Citotoksična aktivnost ekstrakata <i>Amphoricarpos autariatus</i> ssp. <i>autariatus</i> <i>in vitro</i>	95
2.4.2. Protektivni efekat seskviterpenskih laktona gvajanolidnog tipa na DNK humanih limfocita	97
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	101
3.1. Aparati i rastvarači.....	102
3.2. Priprema uzoraka za metabolomičku analizu vrsta roda <i>Amphoricarpos</i>	103
3.2.1. Biljni materijal.....	103
3.2.2. Priprema uzoraka.....	103
3.2.3. Snimanje spektara i obrada podataka	104
3.3. Priprema uzoraka za metabolomičko određivanje biološki aktivnih komponenti ekstrakta <i>Amphoricarpos autariatus</i> ssp. <i>autariatus</i>	105
3.3.1. Biljni materijal.....	105
3.3.2. Priprema uzorka	105
3.3.2.1. Frakcionisanje ekstrakta brzom hromatografijom na suvoj koloni (dry-column flash chromatography).....	105
3.3.3. Snimanje spektara i obrada podataka	106
3.4. Izolovanje seskviterpenskih laktona iz vrsta roda <i>Amphoricarpos</i>	108
3.4.1. Biljni materijal.....	108

3.4.2. Izolovanje seskviterpenskih laktona iz vrste <i>Amphoricarpos autariatus</i> ssp. <i>autariatus</i> sa lokaliteta kanjona Tare	108
3.4.2.1. Ekstrakcija i frakcionisanje ekstrakta	108
3.4.2.2. Izolovanje laktona semi-preparativnom tečnom hromatografijom	110
3.4.3. Izolovanje seskviterpenskih laktona iz vrste <i>Amphoricarpos autariatus</i> ssp. <i>bertisceus</i> sa lokaliteta planine Zeletin	113
3.4.3.1. Ekstrakcija i frakcionisanje ekstrakta	113
3.4.3.2. Izolovanje laktona semi-preparativnom tečnom hromatografijom	114
3.4.4. Izolovanje laktona iz vrste <i>Amphoricarpos autariatus</i> ssp. <i>neumayeri</i> sa lokaliteta planine Lovćen	118
3.4.4.1. Ekstrakcija i frakcionisanje ekstrakta	118
3.4.4.2. Izolovanje laktona semi-preparativnom tečnom hromatografijom	119
3.5. Određivanje bioloških aktivnosti	123
3.5.1. Ispitivanje citotoksične aktivnosti <i>Amphoricarpos autariatus</i> ssp. <i>autariatus</i> <i>in vitro</i>	123
3.5.1.1. Čelijske linije	123
3.5.1.2. Ispitivanje citotoksične aktivnosti frakcija <i>Amphoricarpos autariatus</i> ssp. <i>autariatus</i>	123
3.5.1.3. Određivanje preživljavanja ćelija	124
3.5.2. Određivanje protektivnog efekta laktona izolovanih iz <i>Amphoricarpos neumayeri</i> na DNK humanih limfocita	126
Literatura	128
Prilog	139
Biografija	175

UVOD

Osnovni cilj ovog istraživanja je metabolomička studija balkanskih vrsta roda *Amphoricarpos* Vis. (Asteraceae), koja obuhvata hemijsku analizu sekundarnih metabolita uzoraka sa različitih lokaliteta. Ovaj rad je nastavak hemotaksonomskog proučavanja biljnih vrsta roda *Amphoricarpos* i cilj je da se primenom strukturnih instrumentalnih metoda i multivarijantnih statističkih analiza izvrši klasifikacija ovog roda. Ova doktorska teza obuhvata i izolovanje jedinjenja i njihovu identifikaciju primenom savremenih spektroskopskih i spektrometrijskih metoda, kao i ispitivanje njihove biološke aktivnosti.

Opšti deo ovog rada obuhvata, u prvom delu, osnove metabolomike, zatim primenu metabolomike u taksonomiji i detektovanju bioaktivnih komponenti iz biljnog materijala. Drugi deo se bavi problematikom klasifikacije roda *Amphoricarpos* i prikazane su do sada istražene biološke karakteristike vrsta ovog roda. Dat je pregled do sada izolovanih seskviterpenskikh laktona iz ovog roda - amforikarpolida, kao i botanički opis analiziranih taksona ovog roda *Amphoricarpos*.

U delu **Naši radovi** prikazani su postignuti rezultati ove disertacije. U prvom delu predstavljeni su rezultati metabolomičke studije vrsta roda *Amphoricarpos*. Drugi deo sadrži opis identifikacije izolovanih i do sada nepoznatih seskviterpenskikh laktona, kao i ispitivanje biološke aktivnosti pojedinih amforikarpolida.

Eksperimentalni deo obuhvata opis prikupljanja biljnog materijala i pripreme uzoraka za metabolomičke analize, postupak izolovanja jedinjenja i određivanja bioloških aktivnosti.

Ova doktorska disertacija urađena je na Odeljenju za instrumentalnu analizu Centra za hemiju IHTM-a i Katedre za organsku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom "Bioaktivni prirodni proizvodi samoniklih, gajenih i jestivih biljaka: određivanje strukture i aktivnosti" (172053).

1. OPŠTI DEO

1.1. Uvod u metabolomiku

Metabolomika se definiše kao sveobuhvatna kvalitativna i kvantitativna analiza svih metabolita (metaboloma) prisutnih u biološkim sistemima.^{4,5} Predstavlja analitički pristup koji se koristi za proučavanje složenih smeša različitih tipova uzoraka (biljnih ekstrakata, biofluida, ćelijskih tkiva).⁵ Doživela je ekspanziju tokom poslednjih deset godina i našla je primenu u različitim istraživačkim sferama.⁴⁻⁶

Metabolomika je prvobitno predložena kao metoda funkcionalne genomike, ali se njena primena proteže dalje od toga.⁴ Našla je primenu u medicini, dijagnostici (otkrivanju kancera i dijabetesa), toksikologiji, razvoju bolesti, genetskoj modifikaciji specifičnih organizama, fitomedicini i otkrivanju i razvoju lekova.^{4,6,7} Metabolomikom je moguće pratiti promene u nivoima metabolita koji su od interesa.⁶ Profilisanje metabolita daje detaljne informacije o metaboličkim putevima biohemijskih procesa. Poređenje nivoa metabolita različitih bioloških stanja može otkriti informacije o fenotipovima bolesti, kao i uticaju različitih faktora kao što su ishrana, uslovi i agensi životne sredine.⁸

Metabolizam unutar ćelija organizma je proizvod njegovog genoma i staništa, a svi metaboliti koje sintetiše organizam formiraju njegov metabolom. Budući da se metabolomi različitih organizama razlikuju, pa čak i kada se radi o jedinkama iste vrste, metabolom se može se iskoristiti za njihovo razlikovanje. Na primer, za veliki broj stabala iste vrste je moguće odrediti koja od njih su rasla u suvoj klimi i koja su rasla u vlažnoj klimi, jer različiti klimatski uslovi ostavljaju različite tragove na metabolomu stabala.⁹ Veliku primenu metabolomika je našla u izučavanju biljnih vrsta i njihovih sekundarnih metabolita.⁶

Metabolomika sekundarnih metabolita biljaka obuhvata praćenje nivoa određenih klasa metabolita u odnosu na primenjene egzogene hemijske i/ili fizičke agenese, poređenje sadržaja metabolita mutantnih, hibridnih vrsta sa sadržajem metabolita nekultivisanih vrsta istog roda, praćenje interakcija biljaka sa okolinom, biljojedima ili patogenima, proučavanje razvojnih procesa, kao što su sazrevanje ploda ili klijanje, kontrola kvaliteta lekovitih biljaka i fitofarmaceutika, određivanje aktivnosti lekovitog bilja i uticaja na zdravlje određenih jedinjenja i “fingerprinting” - uzimanje otiska prsta, genotipova ili ekotipova za taksonomska ili biohemijska istraživanja.⁶

Identifikacija i kvantifikacija svih metabolita je otežana zbog nedostataka jednostavnih, automatizovanih i dovoljno osjetljivih analitičkih metoda za analizu veoma složenih smeša kakvi su često metabolomi. Postoje različite metode analize metabolita.⁶ Tri pristupa koja se najčešće koriste za analize metaboloma su ciljana analiza (engl. targeted analysis), analiza metaboličkih profila (engl. metabolite profiling) i analiza metaboličkog otiska prsta (engl. metabolic fingerprinting).^{4,9}

Ciljana analiza je najrazvijeniji analitički pristup u metabolomici. Koristi se za merenje koncentracije ograničenog broja poznatih metabolita.⁴ U ciljanoj analizi strukture jedinjenja od interesa su poznate.^{4,9} Uzorak često prolazi opsežno frakcionisanje i prečišćavanje kako bi se dostigle niske granice detekcije i kvantifikacije jedinjenja od interesa.^{4,6,9} Kvantifikacija se vrši na osnovu referentnih standarda.⁹ Glavno ograničenje ciljane analize jeste potreba da jedinjenja od interesa budu poznata i da su njihovi standardi dostupni. Međutim, trenutno u velikom broju slučajeva se veliki broj metabolita ne može identifikovati u uzorcima koristeći postojeće analitičke tehnike. Sa druge strane za mnoge metabolite koji se mogu identifikovati, prečišćeni standardi nisu dostupni.⁴

Metabolički otisak prsta predstavlja brzo skeniranje što većeg broja metabolita koji se mogu detektovati u uzorku. Nije potrebno identifikovati sve detektovane metabolite.⁶ Umesto toga, razmatra se ukupan profil, ili „otisak prsta“, kao jedinstvena karakteristika uzorka.^{4,9} Cilj ovakvog pristupa analizi metabolita je da se pronađu razlike između uzoraka poređenjem spektara i njihove klasifikacije na osnovu multivarijatne analize. Metabolički otisak prsta je najkorisniji za otkrivanje biomarkera i primenu u dijagnostici.⁴ Metaboliti, koji definišu klase uzoraka, se identifikuju u daljim analizama, dok se priprema uzoraka, razdvajanje i detekcija maksimalno pojednostavljaju.⁶ Metabolički „otisak prsta“ se obično dobija spektroskopskim tehnikama kao što je nuklearna magnetna rezonancija (NMR), infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) ili masena spektrometrija (MS) direktnom analizom uzoraka bez prethodnog razdvajanja.⁴ Nedostatak ove metode je nemogućnost direktnog poređenja metaboličkih puteva jer komponente uzoraka nije lako identifikovati.⁴

Metaboličko profilisanje meri nivoe unapred definisanog seta metabolita u uzorku,⁴ pri čemu nisu potrebne referentne supstance.⁹ Analiza je ograničena na identifikaciju i kvantifikaciju određenih metabolita. Svi ovi metaboliti mogu biti povezani istim metaboličkim putem, ili pripadati istoj klasi jedinjenja. Na osnovu toga, analitički postupak se može uskladiti sa hemijskim svojstvima izabranih metabolita.

Spektri se obrađuju računarskim metodama i na taj način se omogućava analiziranje metabolita i kvantitativno, a ne samo kvalitativno kao što je slučaj kod fingerprint metode. Rezultati treba da budu nezavisni od primenjenih analitičkih metoda.⁶ Jedan od ciljeva metaboličkog profilisanja je procena razlika između uzoraka. Metaboličko profilisanje se rutinski koristi u biomedicinskim naukama za praćenje zdravstvenog stanja pacijenta.^{4,9}

1.1.1. Uzorkovanje biljnog materijala i ekstrakcija metabolita

Izolovanje metabolita je kritični korak u svakom eksperimentu i mora mu se posvetiti posebna pažnja. Prve poteškoće javljaju se već prilikom sakupljanja biljnog materijala.¹⁰ Nekoliko faktora utiče na metabolome. Glavni izvor varijabilnosti tokom uzorkovanja biljnog materijala je uticaj svetlosti. Razlog za to je fotosinteza, jer intenzitet metaboličkih procesa u velikoj meri zavisi od izloženosti svetlosti,¹¹ pri čemu i različite talasne dužine svetlosti imaju različite uticaje na profile metabolita. Tako, na primer, gornji listovi mogu imati različite profile metabolita u odnosu na donje listove iste biljke, jer nije svaki list izložen svetlosti u istoj meri.¹² Ovo ne utiče samo na listove već i na podzemne delove biljke. Drugi faktor koji utiče na profil metaboloma jeste vreme sakupljanja biljnog materijala.¹¹ Neki izvori navode da postoje varijacije u profilima metabolita iste biljne vrste u zavisnosti od doba dana kada su prikupljeni.^{13,14} Profil metabolita u velikoj meri zavisi i od faze razvoja biljke u vreme uzorkovanja. Da bi se odredile biološke varijacije potrebno je analizirati niz uzoraka sakupljanog u različita doba dana i u različitim fazama razvoja.¹¹ Takođe, važno je i standardizovati uslove eksperimenata.¹⁴ Jedno od mogućih rešenja za smanjenje varijabilnosti metabolita je sakupljanje svih biljaka pod istim intenzitetom svetlosti (isti period dana ili noći) u vrlo kratkom vremenskom periodu, kao i odabir listova ili drugih delova

biljke koji su pod sličnom izloženosti svetlu. Naravno, ovaj metod je primenljiv samo na male količine biljnog materijala.¹¹

Sakupljanje biljaka dovodi do oštećenja biljke i izazivanje stresa, što može da promeni profil metaboloma.^{12,14} Ove promene u metabolizmu biljaka odvijaju se veoma brzo, u roku od nekoliko sekundi do nekoliko minuta, tako da se berba mora obaviti brzo, a metabolizam se mora zaustaviti odmah nakon sakupljanja biljnog materijala.¹⁴ Najčešće korišćena i trenutno najbolja metoda za zaustavljanje metabolizma nakon prikupljanja uzoraka je zamrzavanje biljnog materijala u tečnom azotu. Međutim, kako se ćelije uništavaju tokom zamrzavanja, otapanje može izazvati sve vrste biohemijskih procesa (konverzija). Enzimaska aktivnost se može zaustaviti ekstrakcijom metabolita iz zamrznutog materijala denaturisanim rastvaračima ili ekstrakcijom potpomognutom mikrotalasima.¹⁴ Ipak, izmene u profilima metabolita mogu da se dese i tokom kratkog perioda između uzorkovanja biljnog materijala i njegovog skladištenja u tečni azot.¹³

Takođe, treba napomenuti da svaki organ, tkivo ili tip ćelije sadrži različite, karakteristične metabolite zbog različitih spoljašnjih stimulanasa. Analitičke tehnike koje se trenutno koriste u metabolomici nemaju sposobnost za diskriminaciju ovakvih uzoraka, zbog čega se različiti tipovi ćelija i tkiva moraju ekstrahovati zajedno. Sa druge strane, na ovaj način se dobija dovoljna količina metabolita za analizu. Dakle, rezultati metabolomičkih ispitivanja biljaka pokazuju samo prosek sadržaja metabolita različitih organa i tkiva biljaka.¹¹

Iz istih razloga zbog kojih uzorkovanje mora biti brzo, ekstrakcija se takođe mora izvršiti u kratkom roku.¹³ Metode ekstrakcije moraju biti jednostavne i brze.¹⁵ Degradacija, modifikacija i gubitak metabolita tokom ekstrakcije moraju biti svedeni na minimum. Izbor rastvarača je izuzetno važan za postizanje pouzdanih rezultata, budući da mora biti adekvatan za metabolite koji su ciljani za ekstrakciju, kao i za analitičke metode. Dakle, selektivnost i polarnost rastvarača, toksičnost, ometanje analitičkih procedura i mogući kontaminanti se moraju uzeti u obzir tokom izbora.¹⁴ Da bi se dobila dobra reproduktivnost određene klase metabolita, drugi tipovi metabolita moraju biti žrtvovani. Rastvarači koji se kriste obično izvlače srednje polarna ili polarna jedinjenja.¹⁶

Najčešći način izolovanja metabolita je ekstrakcijom organskim rastvaračima, prethodno homogenizovanog biljnog tkiva. Rastvarači koji se koriste za ekstrakciju

polarnih metabolita su metanol, etanol i voda, dok se hloroform najčešće koristi za lipofilna jedinjenja.¹³

Dobro poznate standardne metode ekstrakcije su i dalje najprikladnije za ciljanu analizu, dok je idealan metod ekstrakcije za istraživanje metabolomike još nije razvijen. S obzirom da priprema uzorka nije specifična za određenu komponentu, fokus stoga trebada bude uglavnom na ponovljivosti procedura za obradu uzoraka. Da bi se uporedili različiti uzorci, njihova priprema mora biti identična.^{12,17,18}

1.1.2. Analitičke metode primenjene u metabolomici biljaka

Različite analitičke metode koriste se za analizu metaboloma biljaka.¹⁹ Najčešće korišćene metode su masena spektrometrija povezana sa gasnom ili tečnom hromatografijom (GC-MS i LC-MS)²⁰ i nuklearna magnetna rezonancija (NMR), ali i druge metode kao što je kapilarna elektroforeza povezana sa masenom spektrometrijom (CE-MS), tečna hromatografija visokih performansi sa fotodiodnom detekcijom (HPLC-PDA), tankoslojna hromatografija sa UV detekcijom (TLC-UV) i jonska ciklotronska rezonancijska masena spektrometrija uz Furijeovu transformaciju (FT ICRMS). Svaka od ovih metoda ima svoje prednosti kao i nedostatke.^{4,6} Od suštinskog značaja je izbor odgovarajuće kombinacije analitičke metode u odnosu na analizirani biljni materijal. Kombinacije LC, NMR i MS sistema imaju veliku primenu u metabolomici, jer je njima moguće kvantifikovati i identifikovati metabolite u velikom broju.^{4,6}

1.1.3. Uvod u multivarijantnu analizu

Analizom metaboloma dobija se veliki broj podataka. Da bi se analizirala tako velika količina podataka neophodna je upotreba računarskih tehnika. Pri tome se primenjuju matematičke i statističke metode za sumiranje podatka i za utvrđivanje značajnih informacija iz celog seta podataka.⁹

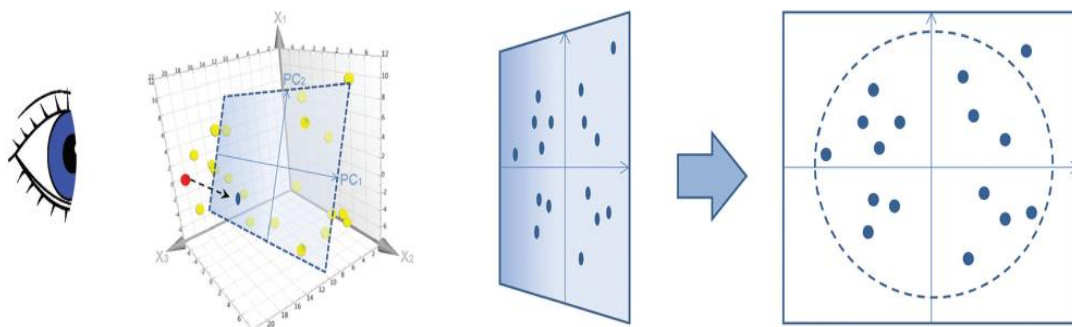
Analiziranje hemijskih podataka matematičkim ili statističkim metodama se postiže multivarijantnom statističkom analizom.⁹ Multivarijantna statistika se može opisati kao grupa metoda za smanjenje dimenzionalnosti velikih skupova podataka kako bi se lakše prikazali i interpretirali, (slika 1).²¹ Za multivarijantnu analizu se mogu primeniti

različiti računarski programi.^{3,21} Postoji više statističkih programa koji omogućavaju izvođenje multivarijantne analize uključujući MetaboAnalist, Multibase, IFRNOPLS, kao i komercijalno dostupni programi kao što su STATISTICA (StatSoft), Unscrambler (CAMO Software) i SIMCA (MKS Umetrics).²¹ Najviše korišćeni softver je SIMCA, koji je komercijalno lako dostupan i jednostavan za obradu podataka i interpretaciju rezultata multivarijantne analize.²¹ Mnogi programi za analizu i obradu podataka u metabolomici su još uvek u razvoju. Danas se teži da metabolomika postane standardna analitička metoda u različitim istraživačkim oblastima.⁶

Spektralne ili hromatografske podatke je potrebno obraditi pre analize. Ova obrada podataka obuhvata sve korake koji umanjuju njihovu složenost i ekstrahuju najvažnije iz sirovih podataka kao ključne. Neki od koraka koji se primenjuju su smanjenje šuma, detekcija i poravnanje pikova, normalizacija, skaliranje i identifikacija.^{6,8,9,22} Cilj obrade (engl. preprocessing) podataka je eliminacija varijacija i uticaja koji nastaju tokom analize uzoraka, koji se ne mogu pripisati stvarnim razlikama između pojedinih uzoraka i koji mogu prikriti stvaran rezultat hemometrijskih metoda.²³

Nakon pripreme seta podataka pristupa se multivarijantnoj statističkoj analizi. Metabolomički setovi podataka su obično multivarijantni, što znači da uključuju više varijabli, a multivarijantne statističke metode posmatraju i analiziraju više od jedne varijable u istom trenutku.⁶ Multivarijantna analiza pruža metode koji omogućavaju otkrivanje zakonitosti u odnosima varijabli koje su skrivene ili jedva primetne. Većina tehnika je dovoljno precizna da se preko testiranja statističke značajnosti utvrdi da li su otkrivene zakonitosti značajne ili slučajne, odnosno plod slučajnih varijacija podataka u uzorku. Multivarijacione tehnike se koriste za simultanu analizu međusobnog odnosa između velikog broja varijabli (više od dve) na bazi određenog modela na kojem se zasniva data tehnika. Ove tehnike identifikuju šablone ili sličnosti u odnosima između varijabli i na osnovu toga daju objašnjenje tog odnosa ili čak njegovo predviđanje.²⁴ Glavna primena multivarijantne analize može biti u opštem pregledu podataka ili kontroli njihovog kvaliteta, identifikaciji podskupova biomarkera za diskriminaciju između grupa i u uspostavljanju korelacija između dva seta podataka (X i Y, npr. spektralni podaci i parametri bioaktivnosti).^{21,22}

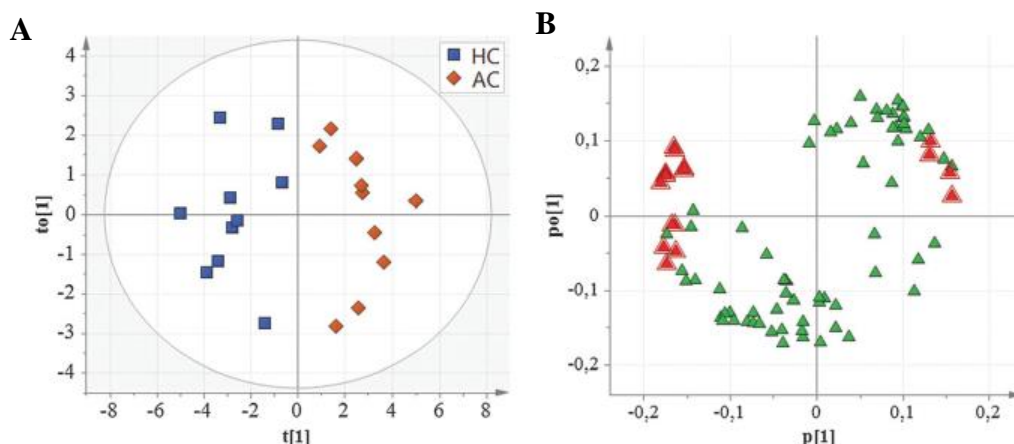
Metode multivarijantne analize pružaju projekcije dominantnih trendova u višedimenzionalnom skupu podataka na nekoliko reprezentativnih virtualnih varijabli, nazvanih latentne varijable ili glavne komponente, (slika 1).



Slika 1. Smanjenje dimenzionalnosti podataka i fokusiranje na informacije od interesa na nekoliko latentnih varijabli multivarijantnim modelom. Proces je ilustriran crvenom tačkom, koja je projektovana na ravni kao plava tačka. (Slika preuzeta iz reference 21)

Broj glavnih komponenti može biti prilično velik, ali uopšteno, prvih nekoliko komponenti je dovoljno za opisivanje trendova od interesa. Nove vrednosti koordinata nakon primene multivarijantne analize se nazivaju skorovi (engl. scores). Svaki subjekt je predstavljen kao jedna tačka u grafiku skorova (Slika 2 A). Uticaj pojedinih izvornih varijabli na novoformirane glavne komponente naziva se „doprinos“ (engl. loading). Svaka originalna varijabla je predstavljena kao tačka u dijagramu doprinosa (slika 2 B). Uobičajeno je da su skorovi i doprinosi prikazuju u odvojenim graficima (slika 2 A).

Rezultat jedne multivarijantne analize se može nazvati modelom u smislu da on



Slika 2. A) OPLS grafik skorova gde je prikazano razdvajanja subjekata; B) grafik doprinosa koji pokazuje uticaj varijabli na razdvajanje. Varijable duž ose x su važne za razdvajanje subjekata između grupa (obeleženo crvenom bojom), dok varijable locirane duž y-ose doprinose razdvajanju unutar grupe. (Slika preuzeta iz reference 21)

daje statistički opis ili model odnosa u originalnim podacima. Značajna razlika multivarijantnih u odnosu na univarijantne metode je da su sve varijable analizirane u jednom „testu“ (tj. modelu), čime se smanjuju problemi povezani sa testiranjem više hipoteza kod univarijantnih metoda.

Osim toga, numerički i kategorički podaci mogu se uključiti u jedan model. To daje dodatnu korist jer se kovarijansa ili međusobne povezanosti u skupu podataka uzimaju u obzir pri konstrukciji modela.²¹⁻²³

1.1.3.1. Vrste multivarijantnih metoda

Postoje višestruki oblici multivarijantnih statistika, kao što je faktorska analiza, linearna diskriminativna analiza, kanonska korelaciona analiza, analiza grupisanja i druge.^{21,24}

Najviše korišćeni i najjednostavniji modeli multivarijantne analize su analiza glavnih komponenti (PCA), hijerarhijska klaster analiza (HCA) i parcijalna regresija najmanjih kvadrata (PLS).⁶ Od naprednijih metoda najveću primenu imaju ortogonalna parcijalna regresija najmanjih kvadrata (OPLS), diskriminantna parcijalna regresija najmanjih kvadrata (PLS-DA) i diskriminantna ortogonalna parcijalna regresija najmanjih kvadrata (OPLS-DA).^{21,22,25}

Ovi modeli predstavljaju formalne prezentacije realnih podataka. Sadrže tri komponente: varijable, konstante i relacije. Varijable su obeležja koja mogu da variraju na način koji može da se identifikuje ili izmeri. Konstante su fiksne vrednosti koje po definiciji ne variraju i delimo ih na one koje stoje same i na one koje stoje uz varijable i zovu se koeficijenti. Koeficijenti pokazuju koliko varijabla utiče na ishod modela. Relacije pokazuju međusobni odnos varijabli i konstanti i predstavljaju se simbolima za matematičke operacije. U prirodnim naukama, posmatrano sa aspekta preciznosti, koriste se deterministički modeli, koji pokazuju precizan odnos između svih varijabli u modelu.²⁴

Metode multivarijantne analize se mogu grupisati u nadzirane i nenadzirane metode. Pristup kod nenadziranih metoda je takav da se ne koriste informacije o identitetu grupe za konstruisanje modela. Podaci se analiziraju kao da pripadaju jednom setu opservacija i promenljivih, koje se nazivaju X-set. Dominantni trendovi

razdvajanja koji su inherentni u setu podataka su naglašeni u rezultirajućem modelu. PCA je najčešće korišćeni nenadzirani multivarijantni metod. Glavni izazov je povezivanje razdvajanja posmatranih grupa sa originalnim promenljivama (varijablama) u PCA modelu, što je neophodno za tumačenje modela. Primarna snaga i korisnost PCA je stoga u proceni kvaliteta i homogenosti skupa podataka. Prema tome, PCA je često prvi korak u multivarijantnoj analizi. Za otkrivanje biomarkera ili testiranje hipoteza, nadzirane metode su od veće koristi. Nadzirani znači da je za tu grupu identitet definisan, fokusirajući analizu na izvlačenje varijable važne za razdvajanje grupe (tj. hipoteza) ili za pronalaženje korelacija između dva seta podataka. Podaci su podeljeni u dva odvojena seta: X-set koji sadrži prediktivne varijable (npr. spektralni podaci) i Y-set koji sadrži varijable odgovora (npr. bioaktivnost). Parcijalna regresija najmanjih kvadrata (PLS) je najčešće korišćeni nadzirani metod multivarijantne analize. Koristan je za izvođenje multivarijacione korelacione analize između dva definisana seta podataka. Kao i kod PCA, varijable u svakom setu moraju da prikažu slično ponašanje da bi se identifikovale podgrupe; varijable koje u velikoj meri odstupaju mogu oslabiti razdvajanje ili korelaciju.

Ortogonalna parcijalna regresija najmanjih kvadrata (OPLS) predstavlja proširenje PLS-a, gde su varijanse od interesa odvojene od varijansi koje nisu povezane (ortogonalne) sa definisanim varijablama Y-seta. Ovo dovodi do rotacije standardnog PLS modela tako da je varijansa važna za razdvajanja grupe fokusirana na prediktivne komponente (x-osa; slika 2 A i B), a varijansa koja nije u vezi sa testiranom hipotezom se filtrira u ortogonalne komponente (y-osa; slika 2 A i B). OPLS analiza se uglavnom vizuelno predstavlja grafikom skorova.^{21,22}

1.1.3.2. Parametri za evaluaciju kvaliteta modela

Kod multivarijantne analize potrebno je opisati uslove izabrane metode kako ne bi došlo do pogrešnog vizuelnog tumačenja rezultata.

Postoje brojni parametri koji su od značaja za tumačenje procene kvaliteta modela. U daljem tekstu biće opisani parametri koji se smatraju ključnim za bilo kakvo predstavljanje rezultata multivarijantne analize. Pre svega, broj komponenti koji se koristi u konstruisanju modela je povezan sa stepenom predefinisivanja i potrebno je obezbediti odgovarajući broj. Prilikom opisivanja modela potrebno je navesti R^2 i Q^2

parametre. Vrednost R^2 pokazuje koliko dobro model objašnjava skup podataka. Predstavlja frakciju originalnih podataka objašnjenih modelom ($R^2 = 1.0$ objašnjava 100% podataka).

Parametar Q^2 predstavlja meru sposobnosti modela da predvidi novi skup podataka pri čemu je frakcija originalnih podataka objašnjena unakrsnim validiranim modelom (engl. Cross-validation). Unakrsna validacija podrazumeva podelu subjekata na podskupove i uklapanje modela nakon slučajnog isključivanja jednog podskupa za vreme analize. Q^2 je parametar zasnovan na usrednjavanju rezultata od ponavljanja unakrsne validacije i predstavlja meru prediktivne sposobnosti modela (tj. koliko dobro će model odgovarati novim podacima). U idealnom modelu R^2 i Q^2 bi trebalo da budu slični, što znači da svaki subjekt jednako i uniformno doprinosi posmatranom razdvajanju grupe. U stvarnosti, Q^2 je uvek niži od R^2 , međutim, ako je Q^2 znatno niži od R^2 onda je robusnost modela loša.^{21,22} Za nadzirane metode, može se izračunati p-vrednost unakrsno validirane ANOVA-e (CV-ANOVA) kao mera značajnosti za posmatrano razdvajanje grupe u PLS analizama zasnovana na unakrsnom validiranom modelu.^{21,26} Postoji nekoliko dodatnih opcija dostupnih u SIMCA softveru koji su korisni za kontrolu kvaliteta multivarijantne analize. Hotellingov (Hotelling) T^2 parametar je merilo koliko je daleko neka observacija od centra PCA ili PLS modela. Obično se koristi interval pouzdanosti 95% za identifikaciju podataka koji ne pripadaju grupi. Ovaj region je vizuelizovan elipsom prikazanim u SIMCA softveru kada generiše grafike skorova za PCA i PLS modele (slika 2 A). Ako su podaci normalno raspodeljeni, onda 95% spada u Hotellingovu T^2 elipsu.

Mnoge multivarijantne metode veoma zavise od razlike u opsezima pojedinih varijabli i potrebno je opisati svako skaliranje.²¹ Skaliranje je operacija koja se izvodi unutar kolone kako bi kolone bile što više uporedive.²³ Ako skaliranje nije primenjeno, najintenzivnije varijable mogu dovesti do pogrešnog razdvajanja. UV skaliranje (engl. unit variance) i centriranje (engl. mean centering) se obično primenjuju kako bi se osiguralo da velike relativne promene sadržaja biomolekula male obilnosti imaju isti uticaj kao sadržaj biomolekula visoke zastupljenosti.²¹ UV skaliranje podrazumeva da su „dugačke“ varijable smanjene, a „kratke“ promenljive razvučene, tako da će sve varijable biti na jednakim osnovama, tj. jedinici varijanse. Kod UV skaliranja se primenjuje faktor $1/s_k$, gde s_k predstavlja standardnu devijaciju varijable k .²⁷ Centriranje

je često korištena metoda u kojoj se svaka vrednost u koloni izražava kao odstupanje od srednje vrijednosti čitave kolone.²³ Izračunava se prosečna vrednost svake kolone, a zatim se oduzima od pojedinačnih podataka, što poboljšava interpretativnost modela.^{23,27} Česta opcija skaliranja koja se primenjuje kod spektroskopskih tehnika je „pareto“ skaliranje.^{22,23} „Pareto“ skaliranje daje svakoj varijabli varijansu numerički jednaku njegovoj početnoj standardnoj devijaciji umesto jedinične varijanse. Skaliranje se vrši prema faktoru $1/\sqrt{s_k}$, tj. deljenjem pojedinih podataka unutar kolone korenom standardne devijacije čitave kolone.^{23,27} „Pareto“ skaliranje je alternativa za matematičke skupove podataka sa velikim rasponom. Međutim, ovakvo skaliranje samo delimično uklanja razlike u obilnosti, kao i rizik od uticaja varijabli bliskih limitu detekcije potrebnih za razdvajanje. Ipak, ove metode izvlače maksimalna odstupanja u podacima i nedostatak odgovarajućih transformacija podataka može dovesti do toga da pogrešna varijansa dominira modelom.²¹⁻²³

1.1.3.3. Interpretacija rezultata multivarijantne analize

Jedna od glavnih prednosti nadziranih metoda, posebno OPLS, je njegoa primena u izboru promenljivih. Izbor promenljive je bitan korak u identifikaciji i proceni učinka podskupova varijabli za klasifikaciju (npr. otkrivanje biomarkera). U multivarijantnoj analizi, na pitanje koje su varijable od interesa nije jednostavno odgovoriti. Jedan od parametara modela je vrednost varijable od uticaja na projekciju (engl. Variable Influence on Projection) ili varijabila od značaja u projekciji (engl. Variable Importance in Projection - VIP). VIP je parametar koja sumira važnost svake varijable u posmatranom razdvajanju grupe, rangira izvorne varijable prema njihovom individualnom doprinosu modela. Međutim, VIP vrednost veća od 1.0 implicira samo da varijabla doprinosi modelu više od proseka i presek varijabli kada je VIP veći od 1.0 rezultira selekcijom samo do 50% varijabli. Osim toga, VIP rezultat je relativni termin koji se menja sa svakom ponovljenom selekcijom varijabli. Često je teško odrediti optimalan model zasnovan isključivo na VIP vrednostima.^{21,28}

Alternativni i komplementarni parametar je p (corr) vrednost koji predstavlja koeficijent korelacije između modela i originalnih podataka, standardizovanog opsega od -1.0 do 1.0. Kada su apsolutne vrednosti p (corr) veće od 0,4 smatra se da takve

varijable značajno doprinose modelu. Konstanta p (corr) se može koristiti kao granična tačka za izbor promenljivih ako je cilj povećanje statističke moći.²¹

Kada se pravilno primjenjuje multivarijantna statistička analiza je moćno sredstvo za integraciju i tumačenje složenih skupova podataka u cilju identifikacije biomarkera i analize prirodnih proizvoda. Međutim, interpretacija rezultata multivarijantnih statističkih analiza može biti pogrešna usled odabira loših parametara. S obzirom da multivarijantna analiza nalazi primenu u praktično svim sferama istraživanja, predlaže se da se parametri pri konstruisanju različitih statističkih modela standardizuju i uniformišu, kako bi se izbegla pogrešna tumačenja rezultata.²¹

1.2. Primena metabolomike u taksonomiji biljaka

Taksonomija, kao nauka o opisu, identifikaciji, nomenklaturi i klasifikaciji biljaka, ima važnu ulogu u razumevanju biološke raznovrsnosti.^{6,29} Potreba za tačnom karakterizacijom rasprostranjenosti vrsta, kao i za lokalizacijom staništa vrsta, je velika.³ Sistematska i filogenetska analiza biljaka se tradicionalno zasniva na makroskopskim i mikroskopskim morfološkim, kao i molekularnim karakteristikama i poznato je da između njih postoje izvesna neslaganja.²⁶ Stoga je neophodno razviti nove taksonomske metode, kako bi se bolje razumeli taksonomski odnosi između biljnih vrsta.^{6,30}

Klasifikacija biljaka se zasniva na rezultatima uporedne analize morfoloških, anatomskih, fizioloških, hemijskih, palinoloških, molekularnih i drugih karakteristika biljaka. Među različitim metodama biljne taksonomije, hemotaksonomija je metod koji se zasniva na sličnostima i razlikama u hemijskim jedinjenjima koje biljke sintetišu i koristan je pristup u klasifikaciji na različitim taksonomskim novoima.^{30,31} Klasifikacija biljaka na osnovu specifičnih klasa sekundarnih metabolita i njihovih biosintetskih puteva predstavlja hemotaksonomiju. Hemotaksonomska analiza može biti vrlo značajna za rešavanje taksonomskih problema^{30,32} i bila je veoma uspešna u mnogim slučajevima.²⁹

Svi živi organizmi proizvode sekundarne metabolite koji su izvedeni iz primarnih metabolita. Često je hemijska struktura sekundarnih metabolita specifična i ograničena na taksonomski povezane vrste.³² Biljke sadrže veliki broj različitih metabolita. Ukupan broj metabolita prisutnih u biljnom svetu procenjuje se na preko 200.000. Veliki broj biljnih metabolita uvek je dobijao posebnu pažnju u različitim oblastima istraživanja. U sistematici biljaka, tj. biološkoj klasifikaciji biljaka, sekundarni metaboliti se često koriste kao taksonomski markeri.⁶ Hemijska struktura sekundarnih metabolita i njihovi biosintetski putevi su često specifični i ograničeni na taksonomski srodne organizme i stoga su korisni u klasifikaciji.³² Pojavom hemotaksonomije, analiza sekundarnih metabolita biljaka postala je značajan pokušaj određivanja taksonomske klasifikacije biljaka.^{6,30} Analiza samih metabolita i upotreba metabolita kao taksonomskih markera u sistematici biljaka je u širokoj upotrebi. Klasična analiza metabolita je fokusirana na mali broj ciljanih analita koji su prethodno

izabrani u skladu sa njihovom pretpostavljenom važnošću ili zbog tehničkih ograničenja eksperimenta, dok metabolomika nastoji da istovremeno meri sve metabolite, tj. metabolom. Ova metoda klasifikacije se smatra boljom u poređenju sa tradicionalnim metodama zbog jednostavnosti same metodologije. Takođe, omogućava praćenje promena u metabolizmu biljaka uzrokovanih ekološkim, genetskim ili razvojnim promenama.

Klasična hemotaksonomska istraživanja se uglavnom fokusiraju na analizu i poređenje prisustva, odsustva ili količine jedne grupe sekundarnih metabolita,⁶ što je daleko od holističkog pristupa analize sadržaja metabolita.²⁹ Nepotpuni podaci o metabolitima biljaka ograničavaju sposobnost rešavanja taksonomskih problema i otkrića novih prirodnih proizvoda ili lekovitih svojstava biljaka.²⁹ Kod taksonomije biljaka, metabolomika može da zaobiđe nekoliko problema koji su svojstveni klasičnim hemotaksonomskim istraživanjima biljnih metabolita. Uz brzi razvoj metabolomike, stvorene su povezane baze podataka metabolita, koje sadrže informacije o mnogim sekundarnim metabolitima biljaka. Takve informacije mogu se koristiti u sistemsko-biološkim analizama interakcija između biljaka, uključujući i aktivnosti lekovitih biljnih vrsta kao i interakcije između biljaka i njihovog okruženja.³³ Sadržajem metabolita biljaka dominiraju sekundarni metaboliti, koje odlikuje velika strukturna raznolikost. Sekundarni metaboliti su obično slični unutar članova familije i unutar nižih taksona. Dakle, sadržaj metabolita biljaka se može koristiti kao taksonomski marker za njihovo razlikovanje.

Međutim, ekspresija sekundarnih metabolita određenog strukturnog tipa često se pojavljuje u više biljnih vrsta. Ova razlika bi mogla biti posledica konvergentne evolucije ili diferencijalne ekspresije gena. Klasifikacija zasnovana na sadržaju metabolita, ne samo da otkriva filogenetski odnos biljaka, već se može koristiti za proučavanje odnosa biljaka u smislu njihovih bioaktivnih svojstva, istraživanja novih prehrambenih ili ekonomskih koristi od biljaka i rešavanje taksonomskih problema.

To znači da je moguće klasifikovati biljne vrste na osnovu sličnosti i sadržaja metabolita.²⁶ Sistem hemotaksonomske klasifikacije oslanja se na hemijsku sličnost taksona. U hemotaksonomiji se koriste primarni i sekundarni metaboliti.^{32,34} Fenoli, alkaloidi, terpenoidi i amino kiseline su četiri važne grupe jedinjenja za hemotaksonomiju. Ove grupe jedinjenja pokazuju veliku hemijsku raznolikost,

distribuciju i funkciju. Tako se, na primer, seskviterpenski laktoni koriste kao taksonomski markeri za razlikovanje biljnih vrsta iz porodice Asteraceae.^{35,36} Metabolomika, međutim, daje sliku metaboloma kao celine i stoga ima holistički pristup.

Neka novija istraživanja u hemotaksonomske svrhe primenjuju tehniku gasne hromatografije (GC). Naime, ovom tehnikom proučavan je hemijski sastav i varijabilnost terpenoida i kanabinoida u 11 sorti kanabisa uzgajanih pod standardizovanim uslovima. Podaci su analizirani metodom glavnih komponenti (PCA) ukazujuća se svaka sorta kanabisa jasno razlikuje. Metoda se pokazala kao izuzetno korisna za hemotaksonomska razlikovanja sorti kanabisa, kao i kontrolu kvaliteta biljnog materijala.³⁷

Šezdeset dve autohtone korejske vrste porodica Aceraceae, Betulaceae, Fagaceae, Rosaceae, Asteraceae i Fabaceae su analizirane UHPLC-MS sistemom. Daljom analizom primenom analize glavnih komponenti (PCA) i diskriminantne parcijalne regresije najmanjih kvadrata (PLS-DA), 62 vrste su grupisane u zavisnosti od njihove filogenije iako su sakupljane na različitim staništima i u različito vreme. Klasteri Betulaceae, Fagaceae i Aceraceae razlikovali su se od klastera Asteraceae, Fabaceae i Rosaceae. Glavni metaboliti za razlikovanje biljnih vrsta bili su flavonoidi i njihovi derivati. Nivoi izoramnetina i kvercetina su najviši u biljkama porodice Betulaceae, korišćeni su kao hemotaksonomski marker za vrste iz ove porodice. Izoramnetin i kempferol-7-*O*-rutinozid su najzastupljeniji kod vrsta porodice Fagaceae, dok se katehin u ovom slučaju može koristiti kao hemotaksonomski marker za Asteraceae. Genistein je glavni izoflavon u biljkama porodice Fabaceae.³⁰

Primena metabolomike u klasifikaciji biljnih vrsta prikazana je i na primeru roda *Ilex*. NMR spektroskopija sa multivarijantnom analizom primenjena je za klasifikaciju 11 južnoameričkih *Ilex* vrsta. Analiza glavne komponente (PCA), diskriminantna parcijalna regresija najmanjih kvadrata (PLS-DA) i hijerarhijska klaster analiza (HCA) ¹H NMR podataka pokazale su jasno razdvajanje između vrsta. Vrste roda *Ilex* razvrstane su u četiri grupe na osnovu metaboličkih sličnosti i razlika. Prvu grupu je karakterisao veći sadržaj ksantina i fenola uključujući fenilpropanoide i flavonoide, druga grupa je imala veći sadržaj saponina tipa oleanana. Za treću grupu je bilo karakteristično prisustvo arbutina i fenilpropanoida, dok je u četvrtoj grupi detektovan

veći nivo saponina ursana. Ovako jasna metabolička diskriminacija biljnih vrsta roda *Ilex* primer je mogućnosti koje pruža hemotaksonomija moguća i uspešna u klasifikaciji biljnih vrsta.³⁸

Sledeći primer je metabolomičko ispitivanje roda *Vernonia*. Metabolički otisci prsta deset biljnih vrsta ovog roda dobijenih pomoću LC-MS analizirani su metodom glavnih komponenti (PCA) i hijerarhijskom klaster analizom (HCA). Na osnovu multivarijante analize utvrđeno je da vrste *V. brasiliiana*, *V. discolor*, *V. ferruginea* i *V. polianthes* pripadaju grupi *Vernonanthura*, dok *V. linearifolia*, *V. glabrata* i *V. onopordioides* pripadaju grupi *Lessingianthus*. *V. herbacea* i *V. platensis* se nalaze u grupi *Chrisolaena*. Preostala vrsta, *V. rufogrisea* pripisana je grupi *Lepidaploa*. Glavni metaboliti za klasifikaciju su bili hlorogenska kiselina, flavonoidi, seskviterpeni laktoni i saponini. Seskviterpenski laktone su pronađeni samo u *V. brasiliiana*, *V. platensis*, *V. polianthes* i *V. rufogrisea*. Jedina vrsta koja sadrži seskviterpenske laktone pipetokarfin A i piptokarfin B je *V. polyanthes*. Izokvercetin je pronađen u svim vrsta iz grupe *Vernonanthura*, dok je rutin pronađen samo u *V. discolor* i *V. ferruginea*. Sa druge strane, flavoni hrisoeriol-7-*O*-glikuronil i akacetin-7-*O*-glikuronil se nalaze samo u *V. polyanthes*, dok je flavanon hesperetin-7-*O*-ramnoglukozid prisutan samo u *V. rufogrisea*. Dobijena hemotaksonomska klasifikacija je potvrdila već utvrđenu podelu biljnih vrsta roda *Vernonia*.³⁹

Metabolomička ispitivanja su bila uspešna i u klasifikaciji biljnog roda *Ephedra*,⁴⁰ zatim kultivara *Vaccinium macrocarpon*,⁴¹ kao i u razlikovanju biljnih vrsta *Senecio scandens* i *S. vulgaris* na osnovu njihovih metabolita.⁴² Kao što je već prikazano, različite analitičke tehnike (¹H NMR, LC-MS, GC-MS i druge) su se pokazale kao uspešne u hemotaksonomiji prilikom klasifikacije biljaka, a primenom statističkih metoda u analizi spektralnih podataka dobija se još moćniji pristup u rešavanju taksonomskih problema.

1.3. Primena metabolomike u detektovanju bioaktivnih komponenti biljnog materijala

Svi živi organizmi proizvode sekundarne metabolite koji su izvedeni iz primarnih metabolita. Biljke su glavni proizvođači prirodnih proizvoda (sekundarnih metabolita) i obično su bogate nutritivnim ili lekovitim svojstvima. Mnogi prirodni proizvodi su biološki aktivni i već se hiljadama godina koriste kao tradicionalni lekovi.^{29,32} Sekundarni metaboliti imaju različita bioaktivna svojstva kao što su antioksidativno, antiinflamatorno, antibakterijsko, inhibitorna aktivnost tirozinaze i još mnoga druga.²⁰ Mnoge autohtone biljke se danas koriste u medicinske svrhe kao lekovi protiv gojaznosti, antioksidansi, antitumorski lekovi i kozmetička sredstva.²⁰

Prilikom analize i izolovanja komponenti biljnih ekstrakata može doći do gubitka velikog broja metabolita prisutnih u početnoj smeši, kao i njihovih bioaktivnih svojstava, što postaje velika prepreka u razvoju lekova. Nedavno, nove metode koje favorizuju holistički pristup nasuprot klasičnim metodama koje su prethodno korišćene, uvedene su sa ciljem prevazilaženja mnogih problema u istraživanju prirodnih proizvoda. Ovaj pristup se zasniva na primeni novih tehnologija, uključujući i metabolomiku.⁴³ Metabolomika omogućava sistematsko proučavanje kompleksnih smeša,⁴⁴ a može biti direktno povezana sa opažanjima dobijenim biološkim testiranjima bez prethodnog izolovanja aktivnih komponenti. Ovakav način analize dovodi otkrivanje lekova iz prirodnih proizvoda ponovo u centar pažnje, samim tim što poslednjih godina razvoj novih (sintetičkih) lekova postaje sve teži, skuplji i dugotrajniji. Kombinacija novih metoda pruža veoma moćno sredstvo za otkrivanje potencijalnih lekovitih komponenti iz prirodnih izvora.^{45,46}

Danas je moguće kombinovanje biblioteka ekstrakata prirodnih proizvoda sa analitičkim metodama što takođe izgleda interesantno, iako to nije uvek lak zadatak. Ekstrakt prirodnih proizvoda je složena smeša pretežno neokarakterisanih jedinjenja koja mogu maskirati bioaktivnost ciljnih jedinjenja ili uzrokovati lažno pozitivne rezultate. Prirodni proizvodi su još uvek važan izvor novih lekova i stoga je izazovan zadatak učiniti prirodne proizvode dostupnim za otkrivanje lekova. Najčešći pristup detektovanja prirodnih proizvoda kao lekova je analiza usmerena na pojedinačna jedinjenja sa određenom biološkom aktivnošću. Ovaj pristup, bio je najčešće korišćen

za uspešno otkrivanje mnogih lekova u prošlosti, ali zapravo nije najbolji pristup za analize prirodnih proizvoda jer prisustvo sinergizma i prolekova u ekstraktu može dati pogrešan rezultat. Ovakav pristup zahteva mnogo vremena za analizu kao i visoke troškove.⁴³ Danas se teži zameni ovakvog načina analiziranja prirodnih proizvoda holističkim pristupom. U holističkom pristupu, čitav biljni preparat, koji se sastoji od brojnih komponenti, posmatra se kao jedan aktivni entitet sa višestrukim efektima u živim organizmima. Za takav pristup potrebno je posmatrati ceo sistem, što može biti korisno za bolji uvid u različite promene u organizmu.^{47,48} Smatra se da je metabolomika, kao relativno nov holistički metod, najinformativnija u pogledu razumevanja sistemske biologije. Stoga je ona vredan metod koji pruža potrebne informacije, predstavlja posebno zanimljiv pristup za proučavanje lekovitog bilja i nudi nove mogućnosti za otkrivanje prirodnih proizvoda kao lekova.⁴³

Detektovanje aktivnih komponenti predstavlja izazove, uglavnom povezane sa njihovim prisustvom u kompleksnoj smeši.⁴⁹⁻⁵² Brza identifikacija poznatih i nepoznatih jedinjenja iz delimično prečišćenih smeša je jedna od mogućnosti. U brojnim do sada ispitivanim uzorcima aktivna komponenta je identifikovana na samom početku analize aktivnog ekstrakta. Problem kod detektovanja aktivne komponente predstavlja interakcija između metabolita prisutnih u ekstraktima. Ekstrakti se često sastoje od smeša mnogih jedinjenja koja zahtevaju detaljno prečišćavanje da bi se izolovala nova čista jedinjenja. Drugi problem kod kompleksnih ekstrakata je sinergizam koji se može pojaviti između komponenti u smeši. Problem predstavlja i izolovanje aktivne komponente ukoliko je njen sadržaj u ekstraktu mali.⁴³ Predložen je veliki broj rešenja za prevazilaženje navedenih problema, kao što su poboljšanje frakcionisnja ekstrakata, korišćenje analitičkih metoda sa visokim stepenom osetljivosti, selektivnosti i reproduktivnosti.^{43,53} Smatra se da ekstrakcija smešama rastvarača različite polarnosti doprinosi sveobuhvatnoj ekstrakciji. Za metabolomičke analize je važno posmatrati kompletan metabolom i ne sme se dozvoliti gubitak metabolita usled lošeg izbora rastvarača.

Novija istraživanja navode procedure i metode za brzo izolovanje i detektovanje bioaktivnih komponenti biljnog materijala. Na primeru biljne vrste *Orthosiphon stamineus* je pokazano da NMR tehnika udružena sa multivarijantnom analizom predstavlja moćan pristup detektovanja bioaktivnih jedinjenja. NMR spektri ekstrakata

O. stamineus podvrgnuti su multivarijantnoj analizi podataka da bi se pronašla korelacija hemijskog sastava ekstrakta i aktivnosti vezivanja adenzina A1. Na osnovu ovih rezultata, dva flavonoida (tetrametilskutelarin i sinensetin) iz smeše ekstrakta su identifikovana kao jedinjenja sa visokom aktivnošću vezivanja adenzina A1 bez bilo kakvih daljih koraka prečišćavanja.⁵

Sledeći primer je utvrđivanje je korelacija metaboličkih razlika i bioaktivnosti vrsta porodica Fagaceae i Asteraceae. Na osnovu PLS-DA metode jasno se uočavaju razlike u antioksidativnoj aktivnosti ispitivanih porodica. Da bi se odredili njihovi značajni metaboliti, primenjena je diskriminantna ortogonalna parcijalna regresija najmanjih kvadrata (OPLS-DA). Četrnaest diskriminiranih metabolita je odabrano za razlikovanje ovih rodova. Prosečno veći sadržaj kininske kiseline, kvercetina, kempferola i njihovih glikozida kod Fagaceae nego kod Asteraceae je uticao na razlikovanje. Različiti flavonoidi i njihovi glikozidi identifikovani u Fagaceae, poseduju izuzetna antioksidativna svojstva. Ovi rezultati ukazuju da visoka bioaktivnost Fagaceae može biti povezana sa visokim sadržajem ovih metabolita i zbog njihovih pozitivnih korelacija sa biološkom aktivnošću. Dobijeni rezultati svakako ukazuju da postoje razlike u metabolizmu između Fagaceae i Asteraceae i da ove metaboličke razlike doprinose različitim bioaktivnostima Fagaceae i Asteraceae.³⁰

Određivanje metaboličkog profila GC-MS sistemom i kombinovanjem ovih podataka sa rezultatima antiinflamatorne aktivnosti đumbira (*Zingiber officinale*) sa različitim lokaliteta i drugih vrsta roda *Zingiber*, pokazalo je da su vrste blisko povezane. Ostale *Zingiber* vrste su imale sličnu antiinflamatornu aktivnost kao *Z. officinale*, a da nije bilo korelacije sa sadržajem gingerola, specifičnog jedinjenja *Z. officinale* za koji se mislio da je odgovoran za antiinflamatornu aktivnost. Zaključeno je da i druga neidentifikovana jedinjenja doprinose biološkoj aktivnosti i da ih je potrebno identifikovati i kvantifikovati kako bi se odredila bioaktivnost pojedinačnih uzoraka vrsta roda *Zingiber*.⁵⁴

LC povezana sa TOFMS je korišćena za upoređivanje sastojaka i antitumorskog potencijala đumbira - *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae) koji su tretirani na različite načine. Utvrđeno je da ekstrakcija vodenom parom na 120 °C tokom 4 h pojačava antikancerogeni efekat đumbira na humane HeLa ćelije raka. Sadržaj

gingerola bio je smanjen, dok je sadržaj šogaola povećan ovim tretmanom, zaključeno je da i šogaoli u đumbiru imaju doprinos antitumorskom potencijalu.⁵⁵

LC i LC-ESIMS su korišćene za određivanje “otisaka prstiju” metanolnih ekstrakata dve biljne vrste roda *Hypericum*. Utvrđeno je da *H. gentianoides* ima veoma različit profil u odnosu na *H. perforatum*. Na osnovu UV spektara, retencionog vremena i molekulskih jona jedinjenja, glavnih komponenti u aktivnoj frakciji, pretpostavljeno je se da su acil-floroglucinoli aktivna jedinjenja odgovorna anti-inflamatornu aktivnost.⁵⁶

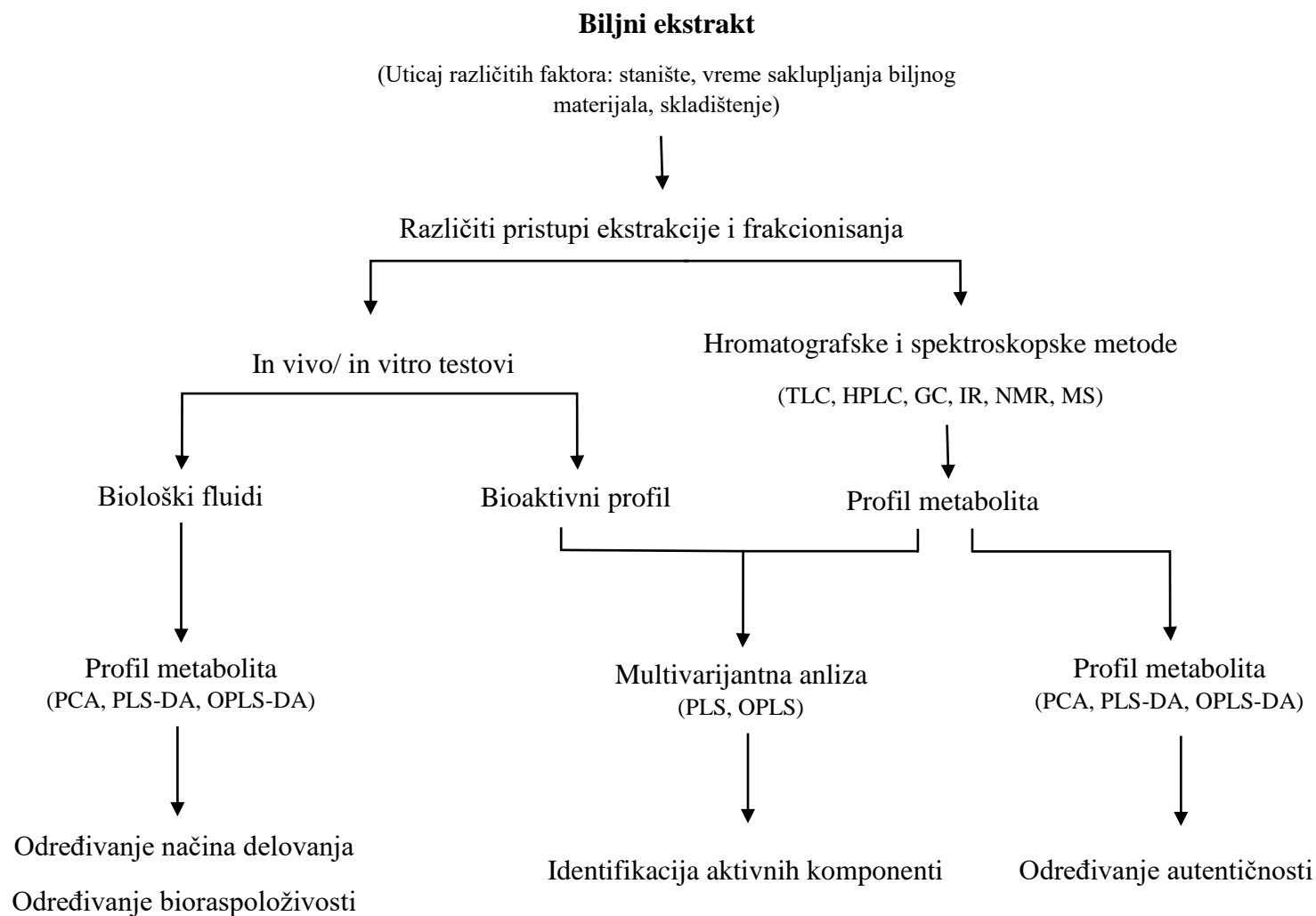
Ciljanom analizom LC-DAD tehnikom i PCA analizom osušene kore *Citrus tangerine* Tanaka (koristi se u kineskoj tradicionalnoj medicini za lečenje probavnih tegoba i inflamatornih sindroma) uspešno su uočene razlike između uzoraka, koji su čuvani od jedne do tri godine. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidanasa bio je veći u uzorcima koji su duže skladišteni, a i ovi uzorci su pokazali da je aktivnost veća u uzorcima koji se čuvaju duži vremenski period.⁵⁷

Mekinje riže pokazuju blagotvoran učinak na hronične bolesti upotrebom kao dijetetskog dodatka. Rezultati GC-MS analize tri fermentisane i tri nefermentisane sorte riže su pordvrgnuti multivarijantnoj analizi (PCA, PLS-DA i OPLS). Dobijeni rezultati ukazuju da su fermentisane sorte aktivnije u poređenju sa nefermentisanim sortama. Promenjen metabolomski profil pronađen je u bioaktivnim fermentisanim sortama, gde su salicilna, *p*-kumarinska, ferulična i kafeinska kiseline, kao i α -tokoferol i β -sitosterol glavni diskriminišući metaboliti prema PCA, PLS– DA i OPLS analizi.⁵⁸

Proučavan je sedativni efekat lekovite biljne vrste *Galphimia glauca*. Sakupljeno je šest uzoraka na različitim lokalitetima u Meksiku. Od šest uzoraka dva su bila mnogo aktivnija od preostala četiri. PCA analiza NMR spektara svih biljnih uzoraka pokazala je velike razlike između uzoraka, dok su multivarijantne metode PLS-DA i OPLS-DA klasifikovale uzorke na dve grupe (aktivne i neaktivne). Razmatrani su signali koji se odnose na aktivnost i na taj način su identifikovani triterpenoidi, kao jedinjenja koja se mogu korelirati sa biološkom aktivnošću.⁵⁹

Prikazane metode bi mogle da obezbede rešenje glavnih nedostataka prirodnih proizvoda u postupku razvoju lekova. Sveukupno, na osnovu statističkih i hemijskih validacija, ovakve metode obećavaju brzo i jednostavno otkrivanje lekova na bazi prirodnih proizvoda. Na ovaj način se otvara mogućnost za rešavanje problema zbog kompleksnosti smeše. Detektovana biološka aktivnost određuje direktno i aktivna

jedinjenj akoja se na taj način identifikuju bez prethodnog izolovanja. Na osnovu toga, već u početnoj fazi pojednostavljen je odabir između jedinjenja koja su važna za testiranu bioaktivnost i onih koja uzrokuju lažne pozitivne rezultate.⁵ Na slici 3 prikazana je šema metabolomičkog pristupa analize biljnih ekstrakata.



Slika 3. Šema metabolomičkog pristupa analize biljnih ekstrakata (Slika preuzeta iz reference 60 i modifikovana)

1.4. Problem sistematike vrsta roda *Amphoricarpus*

Balkansko poluostrvo nastanjuje obilje najrazličitijih biljnih vrsta. Na ovom prostoru se može naći veliki broj endemičnih vrsta. Uzroci različitosti su geografski položaj, topografija, klimatska i geološka kompleksnost.⁶¹

Jedan od najinteresantnijih rodova Balkanskog poluostrva je *Amphoricarpus* Vis. (Asteraceae, *Carduoideae*, *Cardueae*). Pored vrsta koje rastu na Balkanskom poluostrvu, neke vrste su rasprostranjene na području Anatolije u Turskoj i na Kavkazu u Gruziji. Oligotipski balkansko-anatolsko-kavkaski rod *Amphoricarpus* Vis. obuhvata pet vrsta. *Amphoricarpus exsul* O. Schwarz i *A. praedictus* Aiasligil & Grierson su endemične vrste za jugozapadnu Anatoliju,^{62,63} dok je *A. elegans* Albov endemična vrsta za Kavkaz. Molekularne filogenetske studije pokazale su da je *A. exsul* vrlo bliska balkanskoj vrsti *A. neumayeri* (Vis.) Vis.⁶⁴ Ostale vrste nastanjuju Balkansko poluostrvo. Klasifikacija balkanskih vrsta nije no do danas sasvim razjašnjena. Predloženo je nekoliko podela, ali botaničari i dalje vode polemiku oko klasifikacije ovog roda.

Vrstu *A. neumayeri*, je opisao Visiani na osnovu prikupljenih biljnih primeraka F. Neumayera na Dinarskim planinama, na Orjenu, planini na granici između Crne Gore i Bosne i Hercegovine. Daljim istraživanjem Balkanskog poluostrva pokazale su se varijacije oblika listova i karakteristika cvetova širom populacije.⁶⁵ Murbeck opisuje varijetet sa širokim listovima iz Hercegovine kao var. *velezensis* Murbeck.⁶⁶ Međutim, Beck smatra da je oblik lista promenljiv i da nije u korelaciji sa drugim karakteristikama.⁶⁷ Bošnjak opisanu biljnu vrstu sa širokim listom definiše kao subsp. *murbeckii* Bošnjak.⁶⁸

Fukarek, koji je detaljno proučavao rasprostranjenost i ekološke karakteristike vrsta roda *Amforicarpus* na Balkanu, navodi da postoje razlike u obliku listova. Naglašava da su biljne vrste sa dugim uskim listovima (var. *neumayeri*) uobičajene u priobalju Jadranskog mora, na planinama Orjen, Bijela gora, Lovćen, dok su u drugim područjima zastupljenije biljne vrste sa širokim listovima var. *murbeckii*.⁶⁹

Blečić i Mayer su opisali populacije širokog lista kao *A. autariatus* Blečić et Mayer. Oni navode da se pored razlika u obliku lista, dva taksona mogu razlikovati i po obliku ahenija. *A. autariatus* dele u dve podvrste, subsp. *autariatus* i subsp. *bertisceus* Blečić et Mayer.¹ Napominju i da je *A. subsp. autariatus* karakteristična za

severozapadni deo Balkanskog poluostrva, kao i da je endemska za Bosnu i Hercegovinu i Crnu Goru, dok se *A. subsp. bertisceus* može naći jugozapadno, u Crnoj Gori, Makedoniji, Albaniji, kao i na Kosovu i na severu Grčke. Smatra se da se na planini Durmitor u Crnoj Gori mogu naći obe podvrste. *A. autariatus* nastanjuje klisure na 600– 900 m nadmorske visine, dok *A. bertisceus* raste na većim nadmorskim visinama iznad 1,600 m.¹ Schwarz priznaje samo jednu vrstu *A. neumayeri* i deli je u tri podvrste, subsp. *neumayeri*, subsp. *bertisceus* i subsp. *murbeckii*.⁶² Webb u svom opisivanju roda *Amphoricarpos* prepoznaje samo *A. neumayeri* sa dve podvrste, subsp. *neumayeri* i subsp. *murbeckii*.²

Farr i Greuter su ukazali na neprikladnost imena *A. neumayeri*, jer se zasniva na *Jurinea neumayeriana* Vis. Predlažu novo ime *A. neumayerianus* (Vis.) Greuter, koje je prihvaćeno i danas je u širokoj upotrebi.^{3,70}

Nedavni rezultati genetske analize ukazuju da su sve vrste i podvrste roda *Amphoricarpos* sa Balkana jedinstvene, genetski, morfološki i ekološki promenljive vrste, bez intraspecijske diferencijacije.⁶¹ Obzirom na prikazan opis vrsta roda *Amphoricarpos* i kako je klasifikacija zbunjujuća, ovaj rod i dalje pruža mnoge mogućnosti istraživanja kako bi se utvrdili srodnički odnosi unutar ovog roda.

1.5. Opis vrsta roda *Amphoricarpos*

Vrste roda *Amphoricarpos* Vis. (Asteraceae) su disjunktno rasprostranjene na Balkanskom poluostrvu, Anatoliji i Kavkazu.^{1,2} Pojedine vrste ovog roda, *A. elegans* i *A. exsul*, mogu se naći na zapadnom Kavkazu, odnosno na jugu Anatolije.⁶² U svom radu, Blečić i Mayer priznaju dve endemske vrste Balkanskog poluostrva: *A. neumayeri* Vis. i *A. autariatus* Blečić et Mayer, od kojih ova druga obuhvata dve podvrste, ssp. *autariatus* i ssp. *bertisceus* Blečić et Mayer.¹

Rasprostranjenost *A. neumayeri* ograničena je na priobalne crnogorske planine, Orjen i Lovćen, dok se *A. autariatus* može naći u široj oblasti. Vrsta koja raste u planinama Bosne, Hercegovine i severozapadne Crne Gore definisana je kao *A. autariatus* ssp. *autariatus*, a ona koja naseljava planinski venac Prokletije i planine severne Grčke kao *A. autariatus* ssp. *bertisceus*. S druge strane, Webb priznaje samo jednu vrstu, *A. neumayeri* Vis., podeljenu na dve podvrste - ssp. *neumayeri* i ssp. *murbeckii* Bošnjak (Syn. *Amphoricarpos autariatus* Blečić & E. Mayer).²

1.5.1. *Amphoricarpos neumayeri* Vis.

Višegodišnja biljka. Stabljika je uspravna, jednostavna, u donjem delu sa listovima, ovi razmaknuti, u gornjem delu bez listova. Listovi su lancetasti, sa drškama, šiljati, 3–9 mm široki, sa gornje strane zeleni, sa donje pokriveni belim dlakama. Glavice srednje veličine, 1,5–2 cm u prečniku, pojedinačne. Cvetna loža sa panjama. Cvetovi beli.



Slika 4. *A. neumayeri* Vis. Blečić et Mayer

Središnji cvetovi hermafroditni, cevasti, obodni ženski, plodni, cevasti, sa pet pravilnih režnjeva. Prašnici sa nastavkom. Papus od jedne serije uskih ljuspi. Ahenije središnjih cvetova cilindrične, sa dlakama; ahenije obodnih cvetova spljoštene, dvokrilate, gole.⁷¹

1.5.2. *Amphoricarpos autariatus* Blečić et Mayer

Rizom snažan i razgranat, sa dosta tankih korenova.⁷² Stabljika uspravna, jednostavna ili slabo razgranata,⁷² sa jednom glavicom, retko sa 2–3. Prizemni listovi i listovi sterilne rozete celi, sa gornje strane zeleni, skoro goli, sa donje strane belo dlakavi ili široko lancetasti, pri osnovi dugačko ušiljeni i spuštaju se niz dršku, na vrhu okruglasto tupoliki ili naglo ušiljeni, po obodu ravni ili malo savijeni ili linearno lancetasti, manje – više šiljati, po obodu savijeni, 8–25 mm široki. Donji i srednji listići involokruma jasno oivičeni, široko jajasti ili okruglasto jajasti, ispod vrha sa vrlo kratkim šiljkom. Cvetovi beli ili ružičasti,⁷³ srednji-hermafroditni, cevasti, obodni ženski, fertilni i sa pet pravilnih režnjeva. Prašnici su sa nastavkom.⁷² Ahenija spljoštena, oivičena, gola, bez uvaca.⁷³

1.5.2.1. *Amphoricarpos autariatus* ssp. *autariatus* Blečić et Mayer

Stabljika sa 1–3 glavice. Listovi široko lancetasti, na vrhu okruglasto tupoliki ili naglo ušiljeni, po obodu ravni, 12–25 mm široki. Cvetovi beli. Ahenija manje–više gola.

1.5.2.2. *Amphoricarpos autariatus* ssp. *bertisceus* Blečić et Mayer

Stabljika sa jednom, retko dve glavice. Listovi lancetasti ili linearno lancetasti, šiljati po obodu, savijeni, 7–11 mm široki. Cvetovi otvoreno ružičasti. Ahenija manje–više gola.



Slika 5. *A. autariatus* ssp. *bertisceus* Blečić et Mayer

1.6. Biološke aktivnosti metabolita iz vrsta roda *Amphoricarpos*

Biološka aktivnost biljnih vrsta roda *Amphoricarpos* nije dovoljno istražena. Naime, postoji mali broj literaturnih podataka o ispitivanjima bioloških aktivnosti. U jednoj studiji određivan je sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida kao i antioksidativni potencijal tri taksona: *A. neumayerianus*, *A. autariatus* ssp. *autariatus* i *A. autariatus* ssp. *bertisceus*. Pokazalo se da metanolni ekstrakt *A. autariatus* ssp. *autariatus* ima veći sadržaj ukupnih polifenola kao i flavonoida u odnosu na metanolne ekstrakte druga dva taksona. Najveću antioksidativnu aktivnost je pokazao metanolni ekstrakt *A. autariatus* ssp. *autariatus*, što se i očekivalo nakon prikaza rezultata ukupnog sadržaja polifenola i flavonoida. Pretpostavlja se da je ova vrsta ili sadrži različite fenolne i flavonoide u odnosu na druge dve vrste ili da poseduje iste komponente koje su odgovorne za antioksidativnu aktivnost, ali u većoj koncentraciji. U istoj studiji ispitana je i antibakterijska i antifungalna aktivnost ova tri taksona. Napravljeni su ekstrakti u 80 % metanolu, dietil-etru i 50 % acetonu sve tri uzorka, koji su podvrgnuti testovima. Ispitivani ekstrakti su pokazali izuzetno antibakterijsko dejstvo, veće i od, korišćenih standardnih antibiotika, streptomocina i ampicilina. Najbolji antibakterijski potencijal imao je metanolni ekstrakt *A. neumayerianus*, dok je njegov dietil-etarski ekstrakt pokazao najniži efekat. Najviši antifungalni efekat je određen u ekstraktu dietil-etra *A. autariatus* ssp. *autariatus*, dok je acetonski ekstrakt pokazao najnižu antifungalnu aktivnost.⁷⁴

Druga studija navodi antifungalnu aktivnost komponenti sa površine listova *A. autariatus* ssp. *autariatus*. Ispitivana je laktonska frakcija ove biljne vrste. Ispitivani uzorak je pokazao aktivnost, čak veću od bifonazola na *Aspergillus versicolor*, *Fusarium verticillioides* i *F. fulvum*, kao i vrste iz roda *Penicillium*. U slučaju drugih gljiva uzorak je imao sličnu aktivnost kao bifonazol.⁷⁵

Navedena istraživanja bioloških aktivnosti su se uglavnom odnosila na ekstrakte ili njihove frakcije. Malo je studija koja se odnose na ispitivanja aktivnosti izolovanih jedinjenja iz biljnih vrsta *Amphoricarpos*. Jedna od takvih istraživanja prikazuje citotoksičnu aktivnost *A. neumayerianus*. Ispitana je citotoksična aktivnost nekoliko seskviterpenskih laktona izolovanih iz *A. neumayerianus* na humanu malignu ćelijsku

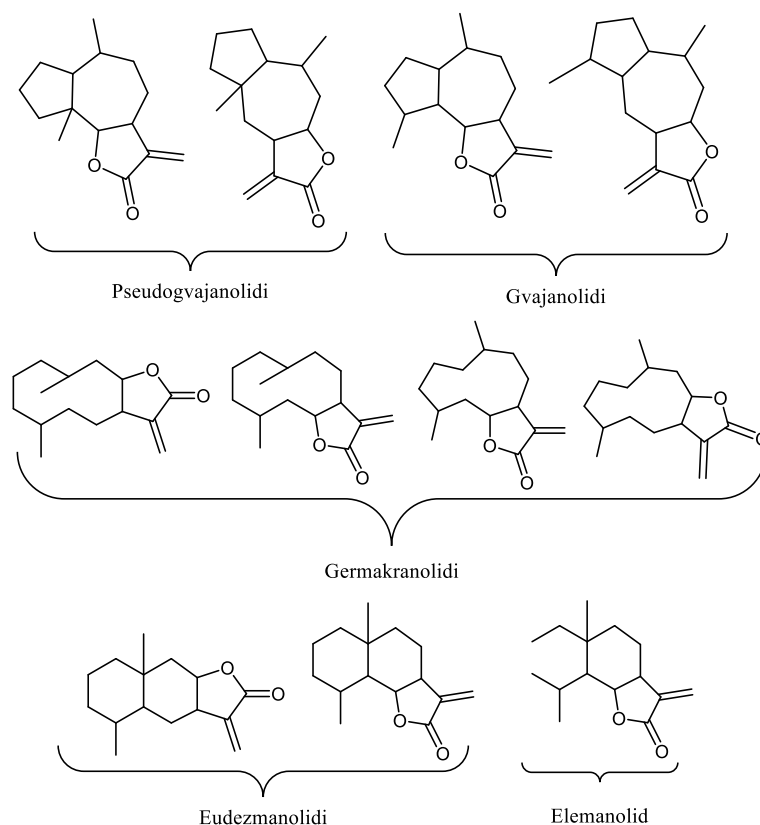
liniju adenokarcinom cerviksa (HeLa) i melanoma miša (B16). Dobijeni rezultati ukazuju na značajan citotoksični potencijal ispitivanih amforikarpolida.⁷⁶

1.6.1. Seskviterpenski laktoni

Više od 250.000 poznatih biljnih vrsta se koristi u medicinske i terapijske svrhe.⁷⁷ Obilje bioaktivnih jedinjenja izolovano je iz biljaka porodice Asteraceae, kao što su terpenoidi, alkaloidi, fenoli i poliacetileni, što čini porodicu veoma značajnom i biohemijski i farmakološki. Velika grupa sekundarnih metabolita izolovana iz biljnih vrsta porodice Asteraceae su seskviterpenski laktoni.^{77,78} Seskviterpenski laktoni su, kao najrasprostranjenija i biološki značajna klasa sekundarnih metabolita, predmet brojnih istraživanja.⁷⁸ Predstavljaju najveću grupu prirodnih proizvoda koja broji više od 5000 različitih poznatih struktura.⁷⁷

Seskviterpenoidi se obično nalaze u laticiferama, specijalizovanim sekrecionim ćelijama u većini Asteraceae, ali se mogu naći unutar vakuola i drugih tipova ćelija u biljkama, posebno kada nastaju kao odgovor na biotičke stresove.⁷⁸

Ova lipofilna jedinjenja se sastoje iz tri C₅ izoprenoidne jedinice čija se biosinteza odvija preko farnezil-pirofosfata u endoplazmatičnom retikulumu.⁷⁸ Raznovrsnost ove klase jedinjenja proističe iz toga što mogu da sadrže veliki broj kiseoničnih funkcionalnih grupa (hidroksilna, karboksilna, aldehidna, laktonska i sl.), kao i različite ciklične forme.⁷⁸ Na osnovu strukture klasifikuju se u pet grupa: germakranolide, elemanolide, eudezmanolide, gvajanolide i pseudogvajanolide.^{78,79} Strukture osnovnih klasa sveskviterpenskih laktona su prikazane na slici 6.^{78,80-82} Oksidacija C₃-bočnog lanca germakranolida je odgovorna za formiranje laktonskog prstena u germakranolidnom tipu seskviterpena, a dalji biosintetski put (transanularne ciklizacije) vodi ka gvajanolidima i eudezmanolidima.⁷⁸



Slika 6. Prikaz osnovnih klasa seskviterpenskih laktona (Slika preuzeta iz referenci 78, 80-82)

Različitim biosintetskim putevima nastaje veliki broj proizvoda. Dalje modifikacije nastalih seskviterpenskih laktona, kao što je oksidacija i glikozilovanje, doprinose velikom broju različitih struktura. Međutim, različiti biosintetski putevi u različitim taksonima mogu proizvesti iste proizvode, u različitim koncentracijama koji utiču na profil metabolita, što se dalje može iskoristiti za klasifikaciju bliskih vrsta ili podvrsta.⁷⁷

Seskviterpenski laktani su aktivna jedinjenja mnogih lekovitih biljaka, koje se koriste u tradicionalnoj medicini i poseduju široku raznolikost bioloških i farmakoloških aktivnosti. Velika strukturalna raznolikost uzrokuje širok spektar bioloških aktivnosti i čine ova jedinjenja vrlo zanimljivim za istraživanje.⁷⁷ Imaju veliki raspon alelopatskih efekta kao što je stimulacija klijanja i rasta drugih biljaka.^{77,83}

Mnogi germakranolidi, eudezmanolidi, gvajanolidi i pseudogvajanolidi poseduju antitumorsku i citotoksičnu aktivnost.^{81,84-90} Često su snažna antimikrobna sredstva,⁷⁷ a dokazana je izuzetna antibakterijska^{79,81,84} i antifungalna aktivnost.^{75,79,81,84,91,92} Ometaju fiziološke procese gljiva, uništavaju ćelije i usporavaju njihov rast.^{91,92}

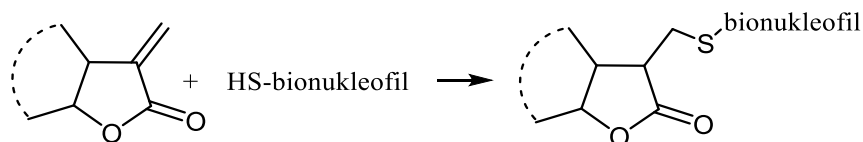
Seskviterpenski laktoni deluju i kao stimulans centralnog nervnog sistema, a sprečavaju i stvaranje čira na želudcu. Koriste se za iskašljavanje, snižavanje krvnog pritiska, smanjenje nivoa šećera u krvi, lečenje astme, itd.⁸⁴ Međutim, neki seskviterpenski laktoni su alergeni i izazivaju alergijski kontaktni dermatitis kod ljudi.^{81,84}

Seskviterpenski laktoni gvajanolidnog tipa često imaju ulogu u prevenciji i regulaciji oksidativnog oštećenja ćelija i upala. Mehanizam antioksidativne zaštite seskviterpenskih laktona je nepoznat, pretpostavlja se da su antioksidativni efekti povezani sa biosintezom endogenih antioksidanata (npr. prostaglandina).⁹³ Najaktivnija su jedinjenja sa gvajanolidnim i pseudogvajanolidnim tipom skeleta.⁸⁵ Sve veća pažnja im se posvećuje zbog bioloških i farmakoloških aktivnosti.⁷⁷

1.6.1.1. Funkcija α -metilen- γ -laktonske grupe

Biološka aktivnost seskviterpenskih laktona zavisi od alkilovanja reakcionog centra, bočnog lanaca i lipofilnosti i geometrije molekula.⁷⁷ Smatra se da je α -metilen- γ -laktonska grupa ($\alpha M\gamma L$), ciklična struktura koja sadrži kiseonik sa karbonilnom grupom, najodgovornija za biološke aktivnosti.^{77,78} Ispitivano je više od 50 seskviterpenskih laktona i utvrđena je indirektna veza prisustva α -metilen- γ -laktona i biološke aktivnosti.⁷⁷

α -Metilen- γ -laktonski prsten je ključan za citotoksičnu aktivnost seskviterpenskih laktona, pri čemu druge funkcionalne grupe u strukturi samo modifikuju potencijal prstena sternim i hemijskim efektima.⁷⁸ Smatra se da je Michaelova reakcija konjugovane 11(13)-dvočubne veze (sl. 7) sa bionukleofilima glavni uzrok bioloških efekata α,β -nezasićenih laktonskih prstenova.⁷⁷ Najčešći nukleofili su tiolne grupe, npr., cisteina. Pored cisteina, seskviterpenski laktoni formiraju adukte sa lizinom, histidinom i glutationom. Izložene tiolne grupe cisteinskih ostataka u proteinima i enzimima su aktivna mesta za seskviterpenske laktone, čime se inhibiraju različite ćelijske funkcije.^{79,83,85,94}



**Slika 7. Vezivanje seskviterpenskog laktona za tiolne grupe enzima i protein
(Slika preuzeta iz referenci 77 i 83)**

Hidrogenizacija ili adicija na dvostruku vezu uzrokuje gubitak aktivnosti.⁷⁹ Poznato je da su veliki supstituenti ti koji redukuju aktivnost. Međutim, kod manjih fleksibilnih germakranolida i molekula sa -OH ili O-acil grupama u susedstvu α M γ L povećana je biološka aktivnost.⁷⁷ Dodatni konjugovani estar, ciklopentenon, epoksi-grupa i dodatne alkil-grupe znatno poboljšavaju citotoksičnost.⁷⁹ Modifikacije Michael-ovom reakcijom dovode do niza efekata kao što je regulacija ekspresije gena aktiviranjem i deaktiviranjem transkripcionih faktora. α -Metilen- γ -laktonska grupa je najodgovornija za biološke efekte kao što je lečenje tumora i smanjenje krvnog pritiska kod ljudi.⁷⁸

Međutim, drugi faktori, kao što su lipofilnost, geometrija i hemijsko okruženje mogu da utiču na aktivnost seskviterpenskih laktona.^{79,85,95} Veća lipofilnost može da olakša njihov prolazak kroz ćelijske membrane, čime se povećava aktivnost. Prisustvo hidroksilne grupe u molekulu drastično menja aktivnost, što se može povezati sa porastom broja vezivnih mesta. Iako hidroksilna grupa smanjuje lipofilnost, prisustvo na određenom mestu može da poboljša aktivnost seskviterpenskih laktona.⁸⁶ Međutim, drugi faktor koji utiče na prolazak kroz ćelijsku membranu jesu sterne smetnje, koje ograničavaju prolazak kroz ćelijsku membranu. Međutim, lipofilnost smanjuje rastvorljivost u vodi, a samim tim smanjuje i biorasploživost ovih jedinjenja.⁷⁷ Biorasploživost i rastvorljivost je moguće povećati. Jedna od metoda je uvođenje amino grupe u α -metilen- γ -laktonski prsten kako bi se povećala njena rastvorljivost.^{77,78}

2. NAŠI RADOVI

Osnovni cilj ovog rada je metabolomička studija vrsta roda *Amphoricarpos* Vis. (Asteraceae), koja obuhvata hemijsku analizu sekundarnih metabolita uzoraka sa različitih lokaliteta iz Crne Gore.

Dosadašnje hemijske analize biljnih vrsta ovog roda nisu omogućile donošenje konačnog zaključka o klasifikaciji. Zbog toga je preduzeto dalje hemotaksonomsko ispitivanje koje je obuhvatilo biljke sa različitih lokaliteta. Cilj je bio da se na osnovu metabolomičkog profila taksona (vrsta, podvrsta) istraže fitohemijski markeri koji bi bili korisni u diferencijaciji analiziranih taksona, a time i u rešavanju intrageneričke klasifikacije ovog veoma kompleksnog roda.

Drugi cilj ovog istraživanja je identifikacija bioaktivnih jedinjenja sirovog ekstrakta biljne vrste roda *Amphoricarpos* korišćenjem modernih spektroskopskih tehnika integrisanih sa multivarijatom analizom spektralnih podataka i citotoksične aktivnosti.

U okviru dosadašnjih fitohemijskih ispitivanja predstavnika ovog roda izolovano je dvadeset devet seskviterpenskih laktona gvajanolidnog tipa (amforikarpolida). Neki od ovih laktona su pokazali antifungalne, kao i citotoksične aktivnosti na ćelije kancera grlića materice i melanoma miševa. S tim u vezi, ova doktorska disertacija obuhvata izolovanje i identifikaciju ovih jedinjenja savremenim spektroskopskim i spektrometrijskim metodama, kao i ispitivanje njihovih bioloških aktivnosti.

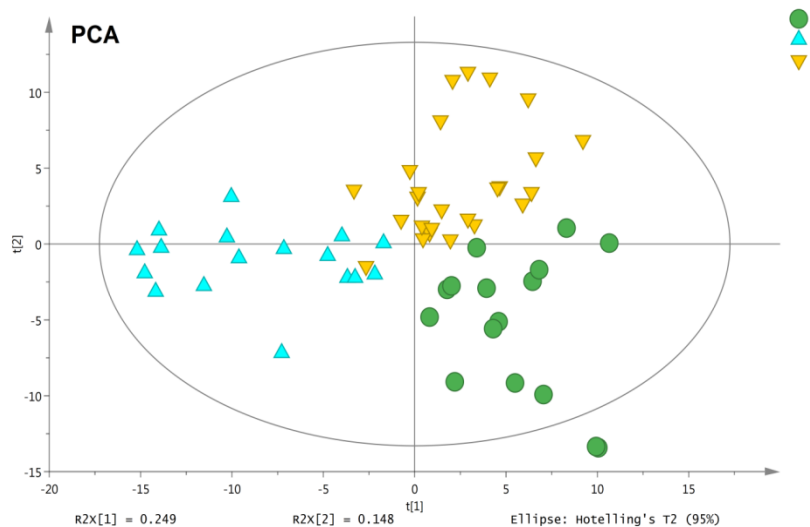
Za metabolomičke studije su korišćene NMR i IC spektroskopija i multivarijantna statistička analiza podataka. Jedinjenja su izolovana različitim hromatografskim tehnikama (stubna hromatografija, dry-column flash hromatografija i preparativna tečna hromatografija). Za određivanje strukture izolovanih jedinjenja primenjene su ^1H i ^{13}C NMR spektroskopija, kao i druge 1D i 2D NMR tehnike, kao što su DEPT, COSY, NOESY, HSQC i HMBC. Korišćena je UV i IC spektroskopija, kao i masena spektrometrija i polarimetrija.

Odabrane frakcije su testirane na citotoksičnu aktivnost na ćelije adenokarcinoma cerviksa (HeLa) i adenokarcinoma pluća (A549), a čista jedinjenja na protektivnu aktivnost prema DNK humanih limfocita.

2.1. Primena metabolomike kao hemotaksonomske metode za klasifikaciju vrsta roda *Amphoricarpos*

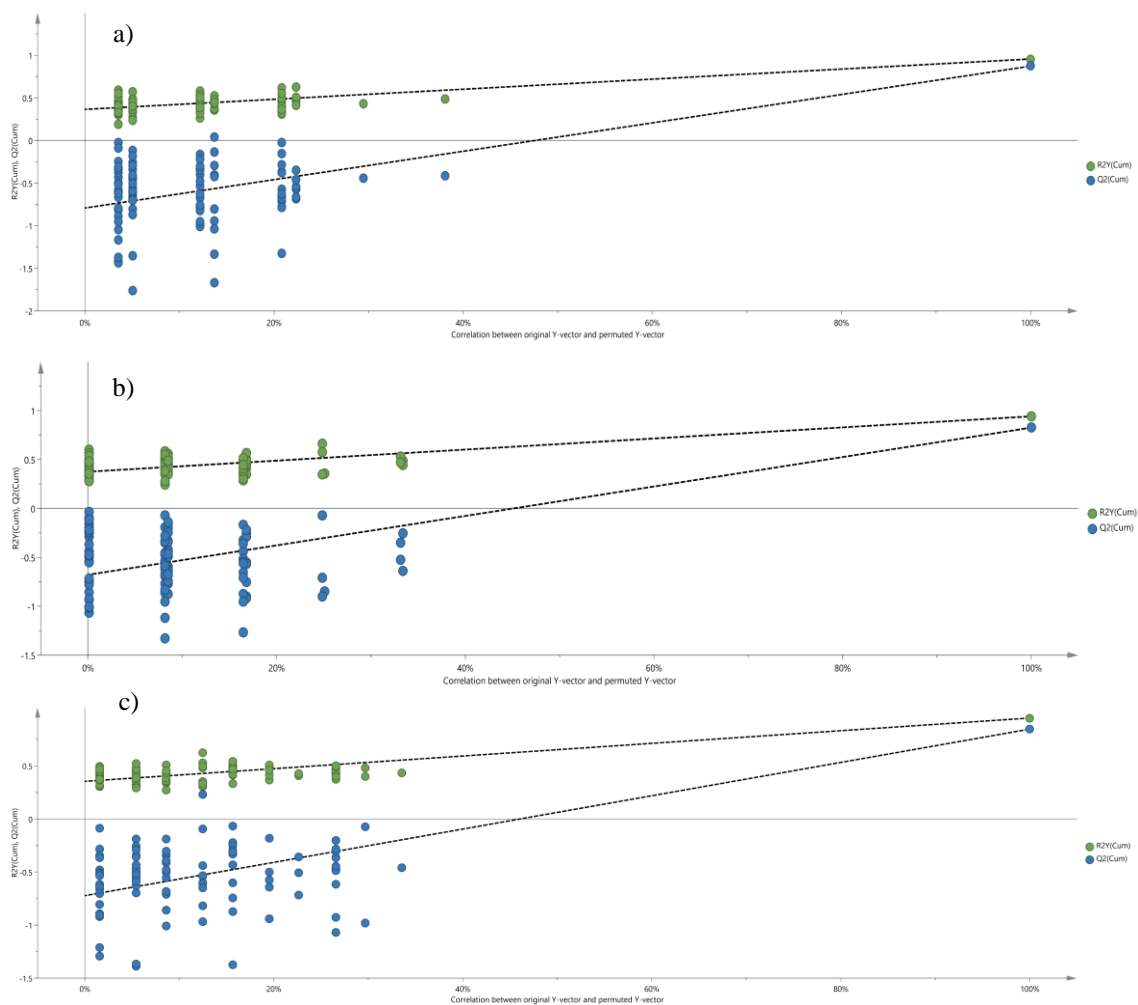
Varijabilnosti primarnih i sekundarnih metabolita vrsta roda *Amphoricarpos* analizirani su na 58 uzoraka, sakupljenih sa sedam lokaliteta u Crnoj Gori (tabela 21). Uzorci su ekstrahovani smešom fosfatnog pufera i metanola-d₄ (1:1, v/v) (priprema uzoraka opisana je u eksperimentnom delu u odeljku 3.2.2.). ¹H NMR spektri vodeno-metanolnih ekstrakata su dalje analizirani multivarijantnom analizom. S obzirom da je površina signala u ¹H NMR spektru je proporcionalna molarnoj koncentraciji analita, na ovaj način je omogućeno direktno poređenje koncentracija komponenti smeše.⁹⁵ Identifikacija jedinjenja je izvršena na osnovu 1D i 2D NMR spektara, poređenjem spektralnih podataka sa već poznatim literaturnim podacima i spektrima jedinjenja izolovanih iz ovog roda.^{96,97} Preklopljeni signali su identifikovani na osnovu COSY, TOCSY, ROESY, HSQC i HMBC spektara, dok su konstante sprezanja određene iz 2D *J* spektara. Spektri dati u prilogu 1-12. Spektralni podaci su prethodno obrađeni kako bi bili primenljivi za multivarijantnu statističku analizu. Izvršeno je “pakovanje podataka” (engl. binning), zatim su podaci normalizovani na ukupnu površinu, centirani (engl. mean centered) i skalirani (engl. unit variance). Ovako pripremljeni podaci su podvrgnuti analizi glavnih komponenti (PCA). Dobijen je model od dvanaest komponenti koji objašnjava 86,6% varijacija, pri čemu prve dve komponente objašnjavaju 39,6%.

Prema grafiku skorova (slika 8) PCA analize dobijena je podela uzoraka na tri različita taksona roda *Amphoricarpos*, pri čemu se ne mogu uočiti jasne granice između različitih taksona.



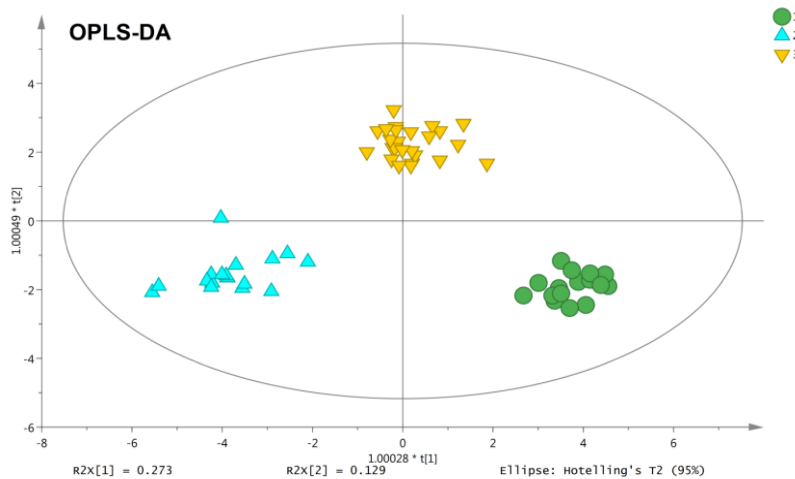
**Slika 8. PCA grafik ekstrakata biljnih vrsta roda *Amphoricarpos*:
1. *A. autariatus* ssp. *autariatus*, 2. *A. autariatus* ssp. *bertisceus*, 3. *A. neumayeri***

Za identifikaciju jedinjenja koja su značajna za razlikovanje ispitivanih vrsta korišćena je metoda diskriminantne ortogonalne parcijalne regresije najmanjih kvadrata (OPLS-DA). NMR spektralni podaci su korišćeni kao X varijable, dok su kao Y varijable korišćeni vektori za opisivanje klase. Prednost ortogonalne metode je olakšana interpretacija dobijenih zavisnosti jer se sistematske X varijable dele u dve grupe, jedna linearno povezana sa Y varijablama a druga ortogonalno.⁹⁹ Nakon obrade NMR spektara i njihove OPLS-DA analize dobijen je model sa dve prediktivne i šest ortogonalnih komponenti. Valjanost modela opisuje se koeficijentom korelacije R^2 (procenat varijacije Y promenljivih koji se može objasniti varijacijom X promenljivih) i predikcionom sposobnošću modela Q^2 . Što su ove vrednosti veće, i bliže vrednosti 1 to je model značajniji.²¹ U primenjenom modelu R^2 iznosi 0,907, dok je za Q^2 dobijena vrednost 0,841. Validnost OPLS-DA modela je određena i permutacionim testom, korišćenjem 100 permutacija, kao i analizom varijanse nakon unakrsne validacije (CV-ANOVA test). Rezultati permutacionog testa ukazuju da regresione linije Q^2 seku vertikalnu osu ispod vrednosti nula, kao i da se sve Q^2 i R^2 vrednosti permutovanih Y vektora nalaze znatno niže od originalnih (na slici 9 R^2 vrednosti permutovanih Y vektora obeležene su zelenom bojom, a Q^2 vrednosti permutovanih Y vektora su označene plavom bojom).



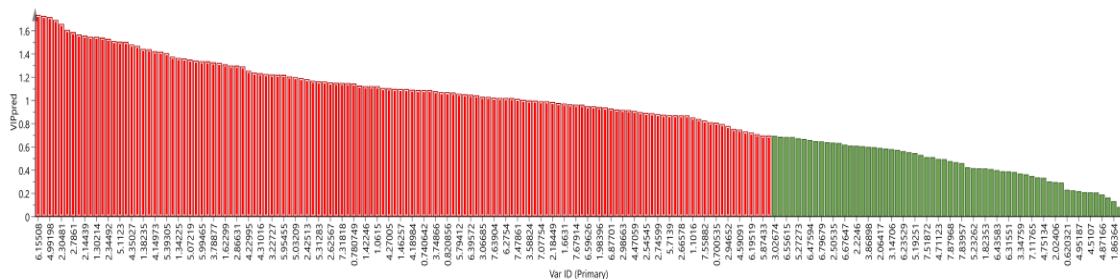
Slika 9. Permutacioni test OPLS-DA metode za sva tri taksona roda *Amphoricarpos*
a) *A. autariatus* ssp. *autariatus*; b) *A. autariatus* ssp. *bertisceus*; c) *A. neumayeri*

Dobijene rezultate potvrđuje i analiza CV-ANOVA testa, koji ukazuje da je primenjeni model značajan prema p vrednosti koja iznosi $2,6 \times 10^{-31}$. Na dijagramu skorova (slika 10) može se jasno uočiti razdvojenost različitih taksona roda *Amphoricarpos* duž prediktivnih komponenti.



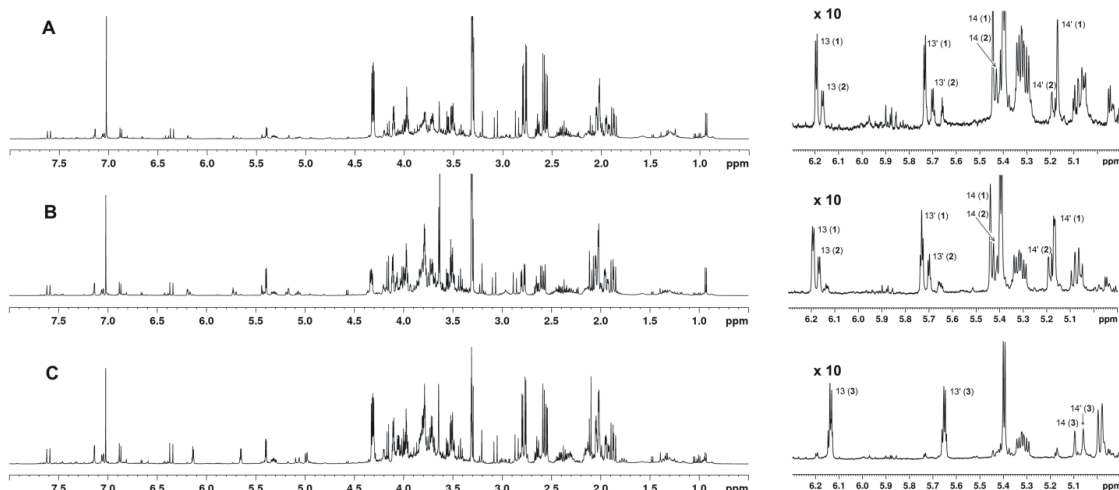
**Slika 10. OLPS-DA grafik skorova ekstrakta vrsta roda *Amphoricarpos*.
1. *A. autariatus* ssp. *autariatus*; 2. *A. autariatus* ssp. *bertisceus*; 3. *A. neumayeri***

Značajne varijable određene su pomoću regresionih grafika, na osnovu VIP (engl. Variable Influence on Projection) skorova predikcionih komponenti pri čemu su promenljive veće od 0,7 smatrane značajnim za razdvajanje, obeležene crvenom bojom (sl. 11).



Slika 11. Grafik značajnih varijabli (VIP) OPLS-DA metode ekstrakta tri taksona roda *Amphoricarpos*

Na slici 12 su prikazani primeri ^1H NMR spektara ekstrakta sva tri taksona roda *Amphoricarpos*. Kao primarni metaboliti ispitivanih ekstrakata ovog roda identifikovani su holin i jabučna kiselina, zatim amino-kiseline alanin i valin. Saharoza, galna kiselina i hlorogenska kiselina su, takođe, identifikovani kao značajni metaboliti, ^1H NMR spektralni podaci su prikazani u tabeli 1.

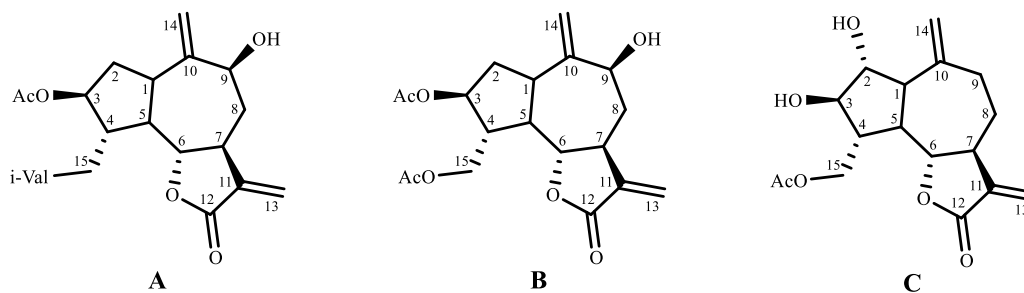


Slika 12. ^1H NMR spektri ekstrakata vrsta roda *Amphoricarpos*.
A: *A. autariatus* ssp. *autariatus*; **B:** *A. autariatus* ssp. *bertisceus*; **C:** *A. neumayeri*

Tabela 1. ^1H NMR podaci identifikovanih primarnih metabolita vrsta roda *Amphoricarpos*

Jedinjenje	Hemijsko pomeranje δ (ppm)
Alanin	δ 3,70 (m); 1,48 (d, $J=7,3$)
Valin	2,83 (m); 1,00 (d, $J=7,0$); 1,05 (d, $J=7,0$)
Saharoza	5,40 (d, $J=3,8$); 4,16 (d, $J=8,6$); 4,05 (dd, $J=8,6; 2,5$); 3,50 (dd, $J=9,8; 3,8$)
Holin	3,21 (s)
Jabučna kiselina	δ 2,57 (dd, $J=16,0; 7,8$); 2,78 (dd, $J=16,0; 4,3$); 4,32 (dd, $J=7,7; 4,3$)
Hlorogenska kiselina	7,60 (d, $J=15,9$); 7,14 (d, $J=2,3$); 7,05 (dd, $J=8,7; 2,3$); 6,88 (d, $J=8,7$); 6,36 (d, $J=15,9$); 5,32 (td, $J=10,6; 4,8$); 4,20 (br q, $J=3,1$); 3,80 (m); 2,16 (m); 2,04 (m)
Galna kiselina	δ 7,02 (s)

Tri seskviterpenska γ -laktona gvajanolidnog tipa su identifikovana kao glavni sekundarni metaboliti (Slika 13).



Slika 13. Strukture identifikovanih laktona

Signali egzometilenskih grupa H₂-13 i H₂-14 laktona nisu međusobno preklapljeni što omogućava lakšu identifikaciju karakterističnih jedinjenja u smeši. ¹H NMR spektralni podaci identifikovanih laktona su prikazani u tabeli 2.

Tabela 2. Hemijska pomeranja protona (δ) identifikovanih seskviterpenskih laktona i konstante kuplovanja (Hz)

Redni broj	Lakton A	Lakton B	Lakton C
1	2,95 (m)	2,95 (m)	2,67 (t, $J=9,6$)
2	2,30 (m, H-2) 1,88 (dd, $J=7,2$; 8,0; H-2')	2,30 (m; H-2) 1,88 (dd, $J=7,2$; 8,0; H-2')	4,08 (dd, $J=9,1$; 10,6)
3	5,07 (dd, $J=7,2$; 8,0)	5,07 (dd, $J=7,2$; 8,0)	3,76 (m)
4	2,30 (m)	2,30 (m)	2,13 (m)
5	2,30 (m)	2,30 (m)	2,32 (m)
6	4,02 (t, $J=8,2$)	4,02 (t, $J=8,2$)	4,20 (dd, $J=6,8$; 3,2)
7	2,95 (m)	2,95 (m)	2,81 (m)
8	2,65 (m; H-8) 1,34 (m; H-8')	2,65 (m; H-8) 1,34 (m; H-8')	2,32 (m; H-8) 1,44 (m; H-8')
9	4,15 (m)	4,15 (m)	2,52 (m; H-9) 2,13 (m; H-9')
13	6,19 (d, $J=3,6$; H-13) 5,73 (d, $J=3,6$; H-13')	6,16 (d, $J=3,6$; H-13) 5,70 (d, $J=3,6$; H-13')	6,14 (d, $J=3,6$; H-13) 5,65 (d, $J=3,6$; H-13')
14	5,44 (s; H-14) 5,17 (s; H-14')	5,43 (s; H-14) 5,17 (s; H-14')	5,10 (s; H-14) 5,06 (s; H-14')
15	4,36 (m; H-15) 4,15 (m; H-15')	4,37 (m; H-15) 4,15 (m; H-15')	4,33 (m)
	2,23 (d, $J=7,1$; i-Val) 2,02 (m; i-Val) 0,93 (d, $J=6,8$; i-Val) 2,10 (s; OAc)	2,11 (s; OAc) 2,10 (s; OAc')	2,10 (s; OAc)

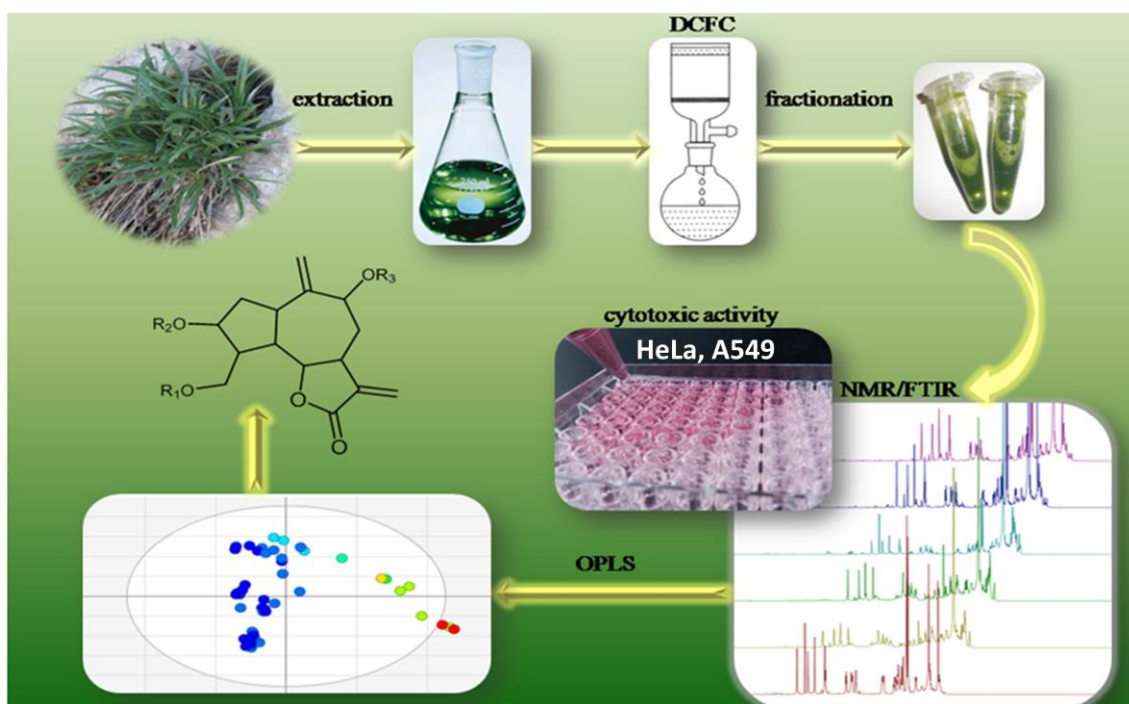
Glavni lakton prisutan u *A. neumayeri* je oksigenovan u položaju 2 (Lakton C), dok laktoni prisutni u obe podvrste *A. autariatus* imaju oksigenovan položaj 9 (Laktoni A i B). Na ovaj način, utvrđena je glavna razlika između *A. autariatus* i *A. neumayeri*. Prema tome, seskviterpenski laktoni kao hemotaksonomski markeri diferenciraju rod *Amphoricarpos* u dve vrste: *A. autariatus* i *A. neumayeri*, što je u skladu sa prethodnom klasifikacijom na osnovu morfologije prema Blečiću i Mayeru.¹

Prema multivarijantnoj analizi ^1H NMR podataka, dve podvrste *A. autariatus* se razlikuju samo na osnovu sadržaja hlorogenske i jabučne kiseline. Podvrsta *bertiseceus* ima povećan sadržaj hlorogenske kiseline u poređenju sa ssp. *autariatus* gde dominira jabučna kiselina. Hlorogenska kiselina ima ulogu u odbrani biljke od biljojeda, gljiva, bakterija i virusa. Njeno povećano prisustvo može biti posledica aktiviranja mehanizama odbrane biljaka.¹⁰⁰ Pokazalo se da biljke sa povišenim nivoom hlorogenske kiseline imaju i povećanu zaštitu od štetnog UV zračenja.¹⁰¹ Međutim, hlorogenska i jabučna kiselina nemaju hemotaksonomski značaj.

Pored uočenih razlika metaboloma, manje morfološke razlike između dve blisko povezane vrste nisu iznenađujuće među vrstama. Dakle, male morfološke razlike između dve blisko srodne vrste, kao što su one roda *Amphoricarpos* na Balkanskom poluostrvu, mogu biti dovoljne za njihovo razlikovanje.

2.2. Primena metabolomike u određivanju biološki aktivnih (citotoksičnih) komponenti ekstrakata *Amphoricarpos autariatus* ssp. *autariatus*

Primenjena je kombinacija *brze hromatografije na suvoj koloni* (engl. Dry Column Flash Chromatography, DCFC), dve *spektroskopske metode* (NMR i FTIR) i *testova citotoksičnosti* (na HeLa i A549 ćelije grlića raka materice, odnosno plućnog karcinoma) (sl. 14). Primenjena DCFC metoda sa silika gelom kao stacionarnom fazom je uobičajena hromatografska, relativno jeftina, preparativna tehnika za preliminarno i brzo razdvajanje složenih ekstrakata na više frakcija prema polarosti.



Slika 14. Postupak metabolomičkog pristupa (DCFC/NMR/OPLS i DCFC/FT IR/OPLS) određivanju biološki aktivnih komponenta ekstrakata roda *Amphoricarpos*

Isitnjeni osušeni listovi *A. autariatus* ssp. *autariatus* su ekstrahovani na sobnoj temperaturi smešom CH₂Cl₂-MeOH (1:1). Ekstrakt je razdvojen na 13 frakcija eluiranjem (DCFC) koje je započeto sa čistim CH₂Cl₂, posle čega je polarnost postepeno povećavana dodatkom MeOH (sve do 20%). Ovo hromatografsko

razdvajanje je izvršeno u triplikatu. Sve razdvojene frakcije su analizirane primenom dve spektroskopske metode, ^1H NMR i FTIR.

Citotoksični efekat ovih frakcija ispitan je na dve humane maligne ćelijske linije: HeLa (adenokarcinom cerviksa) i A549 (adenokarcinom pluća). Korišćen je MTT kolorimetrijski test za procenu potencijalne citotoksičnosti. Ispitane frakcije pokazale su različitu aktivnost. Najefikasnije frakcije na ćelijskoj liniji HeLa pokazale su opseg IC_{50} vrednosti od 8,34 do 9,55 $\mu\text{g/mL}$, dok za ćelijsku liniju adenokarcinom pluća (A549) IC_{50} vrednosti najefikasnih frakcija iznose 14,46 i 15,57 $\mu\text{g/mL}$.

Rezultati citotoksičnosti primenjeni su u multivarijantnoj analizi, gde su na osnovu NMR i IC podataka identifikovane komponente frakcija odgovorne za prikazanu aktivnost.

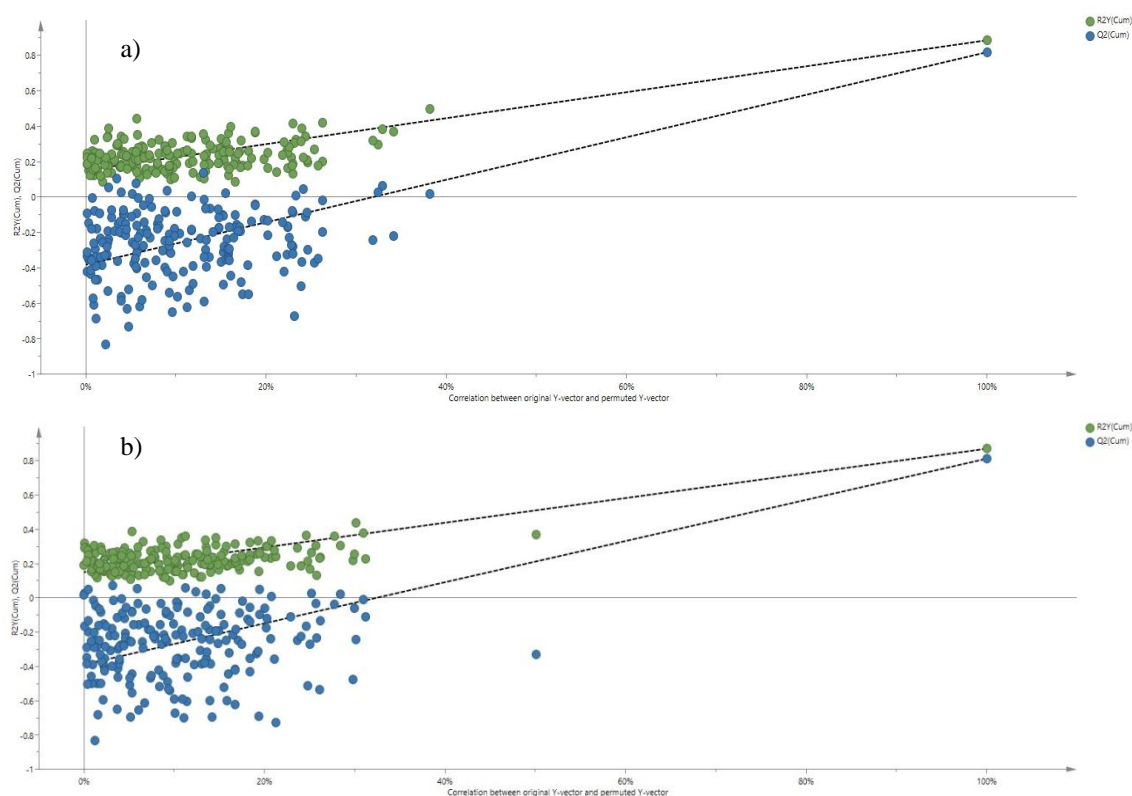
2.2.1. Metabolomičko određivanje aktivnih komponenti ekstrakata *Amphoricapos autariatus* ssp. *autariatus* primenom infracrvene spektroskopije

Infracrvena spektroskopija (FTIR) kao pristupačna, jednostavna i brza metoda može biti izuzetno efikasna alternativa za skrining metabolita.¹⁰¹ Metoda je nedestruktivna, jednostavna i zahteva male količine uzorka za dobijanje informacija o funkcionalnim grupama molekula.¹⁰² Ova tehnika, kombinovana sa odgovarajućim multivarijantnim statističkim metodama u istraživanju sekundarnih metabolita, može biti idealna za rešavanje mnogih analitičkih problema.¹⁰³

U ovom primeru, za praćenje biološki aktivnih jedinjenja u frakcijama *A. autariatus* ssp. *autariatus*, prethodno razdvojenim pomoću DCFC, primenjena je infracrvena spektroskopija u kombinaciji sa multivarijantnom analizom. Primenjena je metoda ortogonalne parcijalne regresije najmanjih kvadrata (OPLS), gde su kao X varijable korišćeni podaci IC spektara, a IC₅₀ vrednosti citotoksične aktivnosti su korišćeni kao Y varijable.

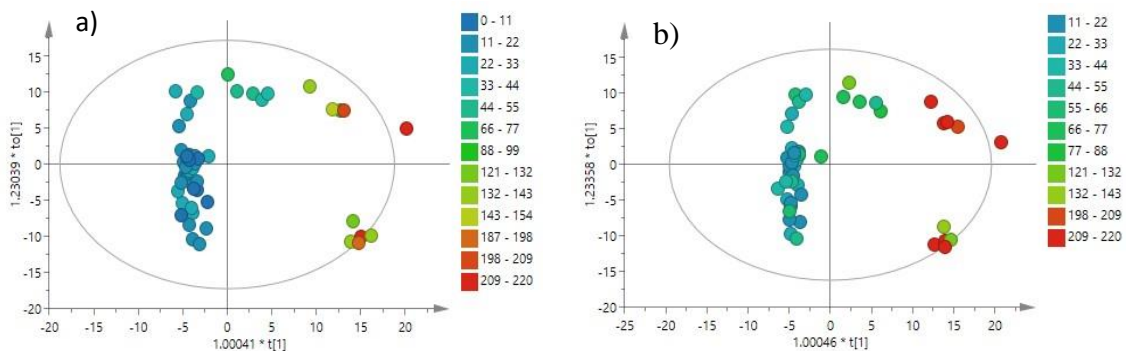
IC podaci su normalizovani SNV (engl. Standard Normal Variate) i metodom pareto skalirani. Na ovaj način je dobijen OPLS model sa jednom prediktivnom i tri ortogonalne komponente za HeLa linijske ćelije, kao i za ćelije adenokarcinoma pluća (A549).

Vrednosti parametara R² i Q² OPLS modela zasnovanih na IC podacima i IC₅₀ vrednostima citotoksične aktivnosti na ćelije HeLa, kao i na ćelije A549, su blizu vrednosti jedan (R²=0,928 i Q²=0,818 za HeLa ćelije i R² = 0,925, odnosno Q² = 0,814 za A549 ćelije), što ukazuje da su modeli dobri. Izvršena je i validacija dobijenih OPLS modela permutacionim testom, kao i CV-ANOVA testom. Oba validaciona testa su ukazala na značajnost dobijenih modela. Permutacioni testovi, čiji su dijagrami prikazani na slici 15, su izvršeni sa 200 permutacija, pri čemu regresione linije Q² seku apcisu ispod vrednosti nula, a dobijene Q² i R² permutovanih vrednosti su manje od originalnih (na slici 15 zelenom bojom su označene R² vrednosti permutovanih Y vektora, a plavom Q² vrednosti permutovanih X vektora).



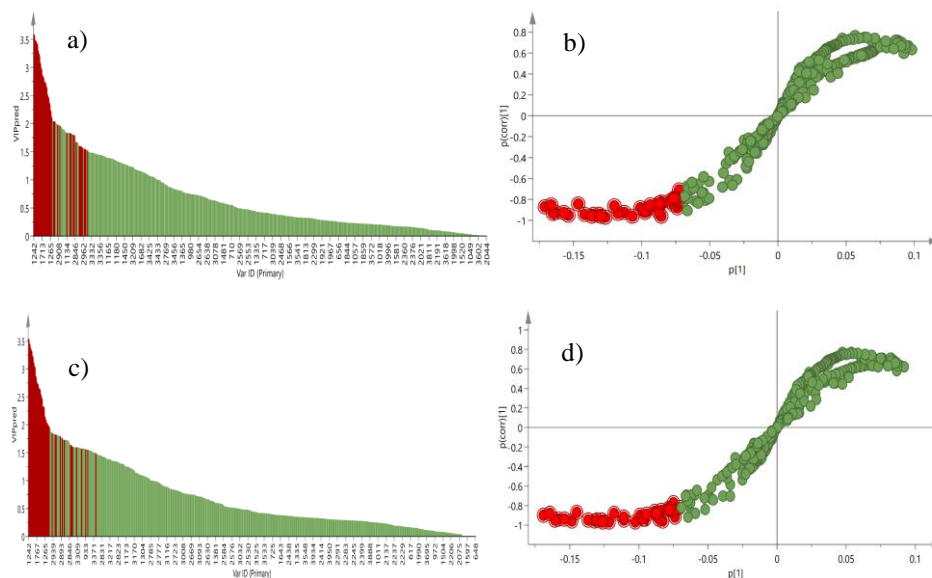
Slika 15. Dijagrami permutacionih testova OPLS modela frakcija *A. autariatus* ssp. *autariatus* zasnovanih na IC podacima i IC₅₀ vrednostima citotoksične aktivnosti na (a) ćelije HeLa i (b) ćelije A549.

CV-ANOVA testom određen je parametar p i iznosi $1,51 \times 10^{-13}$ za HeLa ćelije, odnosno $p = 2,80 \times 10^{-13}$ za ćelije A549, što je u skladu sa rezultatima permutacionih testova. Grafik skorova OPLS modela (slika 16) jasno pokazuje razdvajanje aktivnih frakcija, kako na HeLa ćelije tako i na A549 ćelije, od frakcija koje ne pokazuju aktivnost. Na grafikonima OPLS modela frakcije su svrstane u kategorije, prema IC₅₀ vrednostima, koje su obeležene različitim bojama – najtamnije plavom označene su frakcije koje su pokazale najveću citotoksičnu aktivnost, a sa opadanjem citotoksične aktivnosti kategorije menjaju boju ka svetlijim nijansama plave, preko zelene, žute i narandžaste do crvene kojom su obeležene najneaktivnije frakcije.

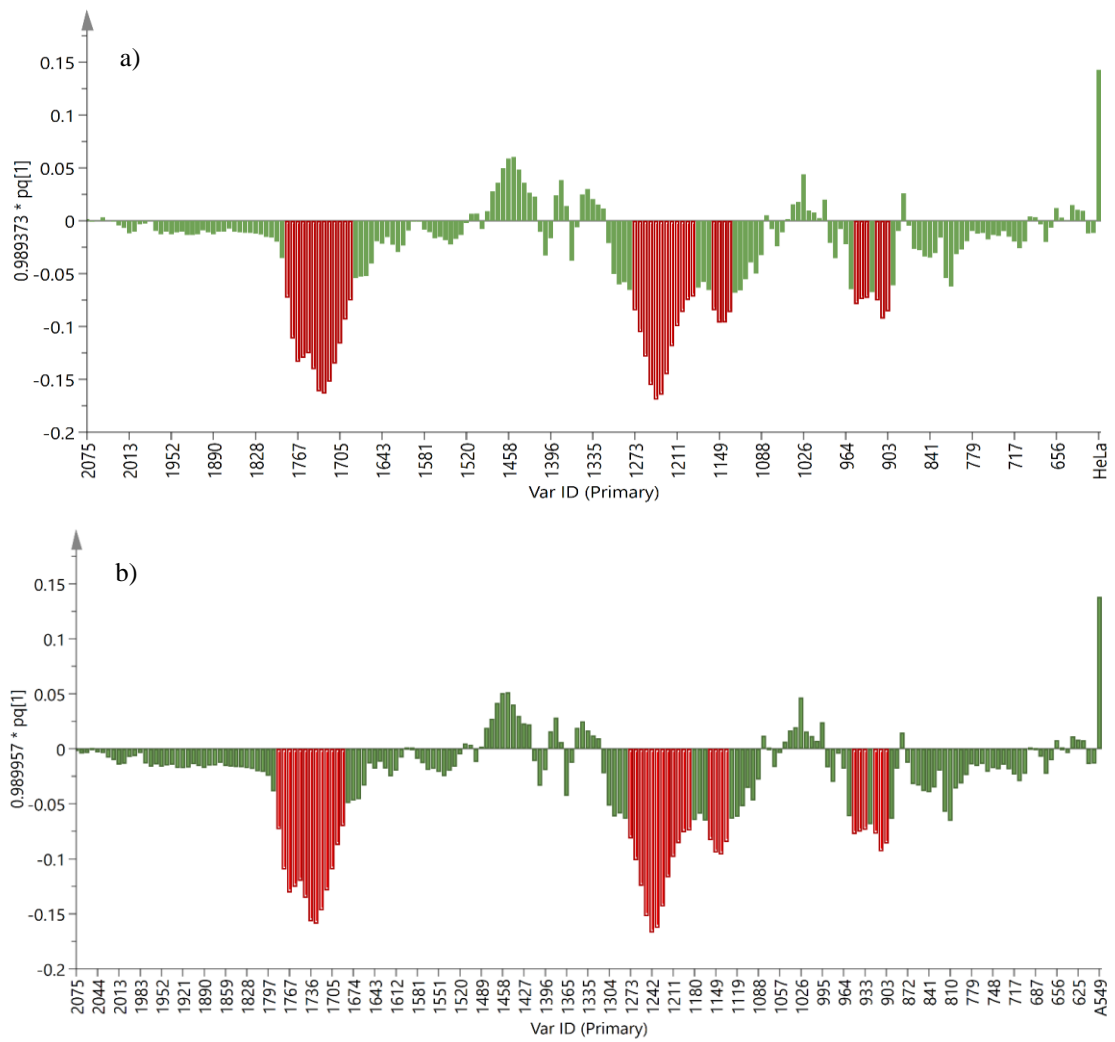


Slika 16. Grafici skorova OPLS modela frakcija *A. autariatus ssp. autariatus* zasnovanih na IC podacima i IC_{50} vrednostima citotoksične aktivnosti na a) ćelije HeLa i b) ćelije A549.

Značajne varijable su procenjene na osnovu VIP i $|p(\text{corr})|$ vrednosti (slika 17) i određene iz dijagrama doprinosa, (slika 18). Varijable čije su VIP vrednosti veće od 1,5 i $|p(\text{corr})|$ vrednosti veće od 0,5 su smatrane značajnim (tabela 3) i na odgovarajućim dijagramima obeležene crvenom bojom.



Slika 17. a) VIP grafik, b) S – grafik OPLS modela frakcija *A. autariatus ssp. autariatus* zasnovanog na IC podacima i IC_{50} vrednostima citotoksične aktivnosti na ćelije HeLa c) VIP grafik, d) S – grafik OPLS modela frakcija *A. autariatus ssp. autariatus* zasnovanog na IC podacima i IC_{50} vrednostima citotoksične aktivnosti na ćelije A549



Slika 18. Dijagram doprinosa OPLS modela frakcija *A. autariatus* ssp. *autariatus* zasnovanih na IC podacima i IC₅₀ vrednostima citotoksične aktivnosti na a) ćelije HeLa i b) ćelije A549.

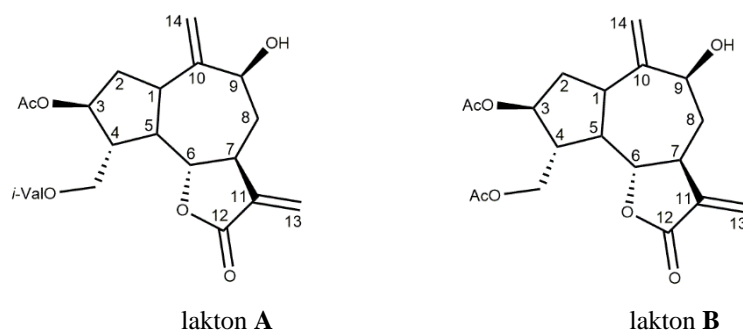
Tabela 3. Značajne varijable OPLS modela zasnovanih na IC podacima

Talasni broj (cm ⁻¹)	HeLa ćelije		A549 ćelije	
	VIP vrednosti	P(corr) vrednosti	VIP vrednosti	P(corr) vrednosti
1782	1,55	-0,88	1,55	-0,92
1774	2,36	-0,93	2,33	-0,95
1767	2,83	-0,94	2,77	-0,96
1759	2,75	-0,94	2,66	-0,95
1751	2,66	-0,97	2,55	-0,97
1743	2,98	-0,94	2,87	-0,95
1736	3,42	-0,93	3,33	-0,94
1728	3,47	-0,93	3,37	-0,94
1720	3,23	-0,95	3,11	-0,96
1713	2,87	-0,96	2,73	-0,95
1705	2,47	-0,93	2,32	-0,92
1697	1,98	-0,88	1,86	-0,86
1689	1,60	-0,85	-	-
1273	1,80	-0,96	1,73	-0,96
1265	2,24	-0,96	2,15	-0,96
1257	2,73	-0,96	2,64	-0,96
1250	3,30	-0,92	3,23	-0,94
1242	3,59	-0,87	3,54	-0,90
1234	3,49	-0,85	3,45	-0,88
1227	3,08	-0,85	3,04	-0,87
1219	2,52	-0,86	2,48	-0,88
1211	2,12	-0,88	2,09	-0,90
1203	1,83	-0,86	1,82	-0,89
1196	1,59	-0,80	1,61	-0,84
1188	1,53	-0,71	1,58	-0,77
1157	1,80	-0,83	1,76	-0,85
1149	2,04	-0,92	2,00	-0,94
1142	2,04	-0,90	2,04	-0,94
1134	1,83	-0,92	1,80	-0,93
949	1,67	-0,82	1,64	-0,83
941	1,57	-0,79	1,60	-0,83
933	1,55	-0,81	1,56	-0,85
918	1,60	-0,79	1,64	-0,84
910	1,97	-0,85	1,98	-0,89
903	1,82	-0,84	1,83	-0,87

Na osnovu grafika doprinosa (slika 18) multivarijantne analize ispitivanih frakcija prepoznate su trake u infracrvenom spektru komponenti odgovornih za biološku aktivnost. Na dijagramu su crvenom bojom označeni spektralni podaci koji potiču od jedinjenja koja su pokazala bioaktivnost.

Kao ključne trake na dijagramima doprinosa se izdvajaju trake na talasnim brojevima 1767, 1728, 1242 i 1142 cm^{-1} . Traka na 1767 cm^{-1} potiče od vibracije karbonilne grupe koja je karakteristična za konjugovane γ -laktone. Druga traka bliska ovoj vrednosti na 1728 cm^{-1} asignirana je kao valencionna vibracija karbonilne grupe estera. Traka na 1242 cm^{-1} pripisana je valencionoj vibraciji C—O veze iz estera. Ova vrednost karakteristična je za acetatne estere. Druga traka u oblasti valencionih vibracija C—O veza se nalazi na 1142 cm^{-1} , prema literaturnim podacima^{96,97,101,104} je karakteristična za valencionu vibraciju C—O veze u γ -laktonima. Dobijeni rezultati ukazuju da najveću aktivnost imaju komponente sa γ -laktonskom strukturom. Ove trake se nalaze na istim frekvencijama kao i u spektrima standarda – laktona **A** i **B** (strukture prikazane na slici 19).

Na osnovu ovih traka je utvrđeno da su za razdvajanje u dijagramu skorova ključne frakcije koje sadrže seskviterpenske laktone i to laktone **A** i **B**. Ispostavilo se da ove frakcije pokazuju najveću biološku aktivnost. IC podaci laktone **A** i **B** su prikazani u tabeli 4.

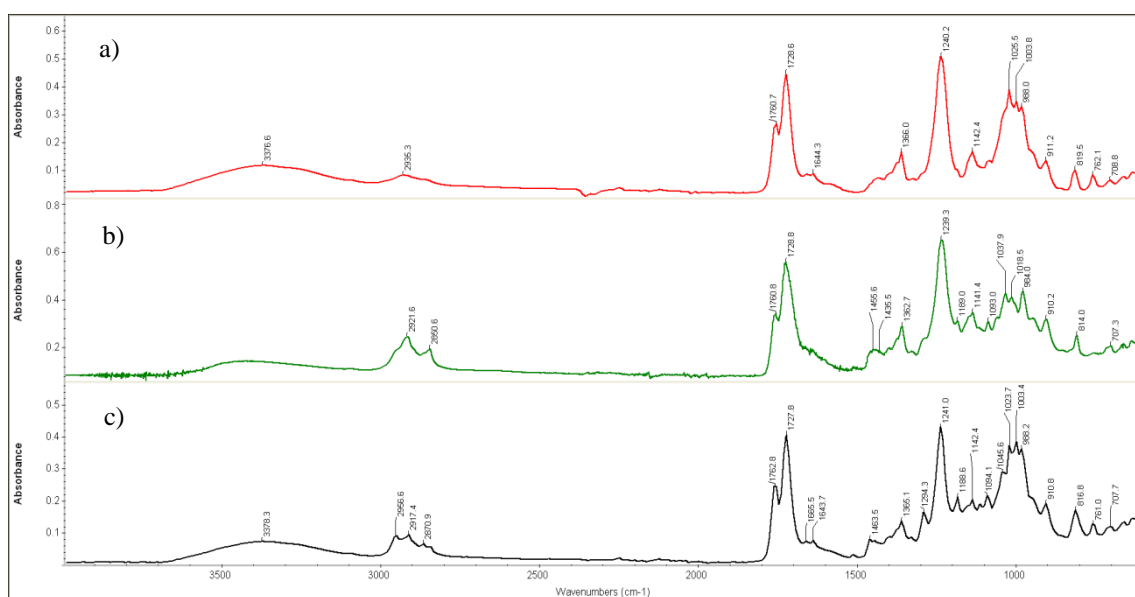


Slika 19. Strukture bioaktivnih seskviterpenskih laktone identifikovanih u najaktivnijim frakcijama

Tabela 4. Karakteristične trake u IC spektrima standarda, cm⁻¹ (asignacija)

Identifikovano jedinjenje	Lakton A	Lakton B
	3378 (-OH st)	3376 (-OH st)
	1762 (C=O st γ -laktona)	1760 (C=O st γ -laktona)
	1727 (C=O st estra)	1728 (C=O st estra)
	1665; 1643 (C=C st)	1664; 1644 (C=C st)
	1241 (C-O st as estra –acetata)	1240 (C-O st as estra –acetata)
	1188 (C-O st γ -laktona)	1142 (C-O st γ -laktona)
	1023 (C-O st sy estra)	1025 C-O (st sy estra)

Na slici 20 prikazan je uporedni prikaz infracrnevog spektra laktona **A**, laktona **B** i frakcije **35**, bogate seskviterpenskim laktonima.



Slika 20. Uporedni prikaz IC spektra a) laktona A, b) laktona B i c) frakcije 35

2.2.2. Metabolomičko određivanje aktivnih komponenti ekstrakata *Amphoricapos autariatus* ssp. *autariatus* primenom NMR spektroskopije

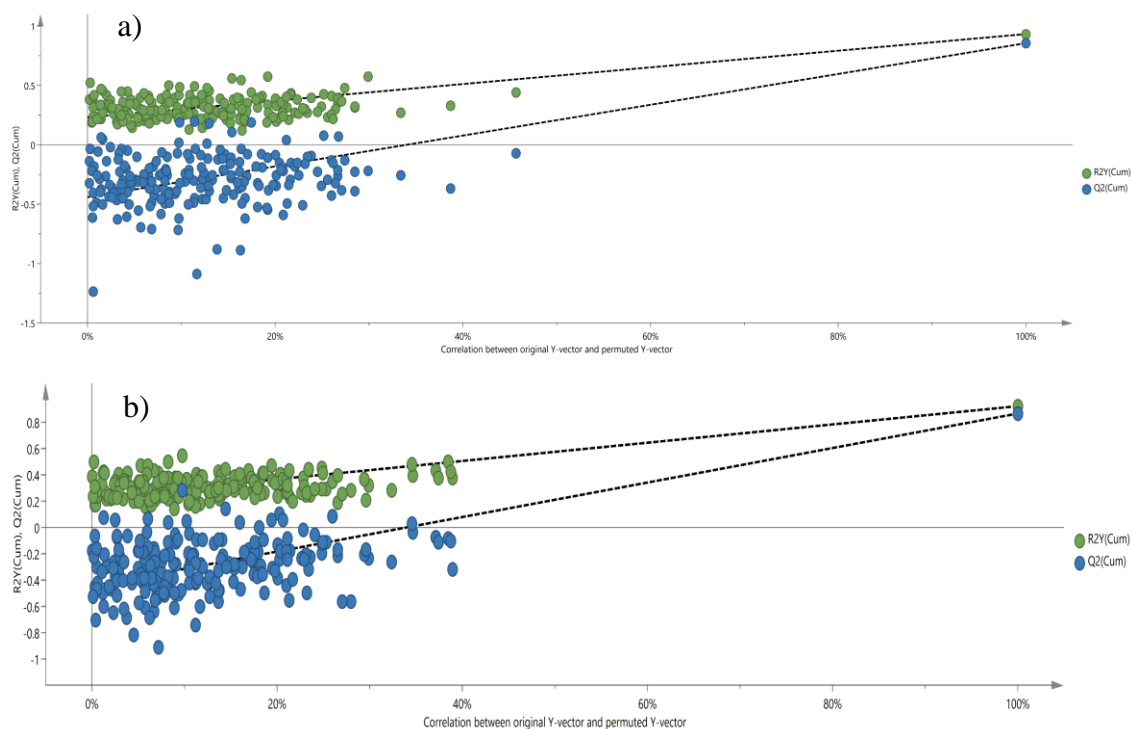
Identifikacija metabolita se uspešno postiže primenom nuklearne magnetne rezonantne spektroskopije (NMR).¹⁰⁵ NMR, u metabolomici biljaka, ima širok spektar primene i često se koristi za kvantifikaciju biljnih metabolita u smešama biljnih ekstrakata.¹⁰⁶ To je robustna i pouzdana tehnika koja zahteva minimalnu pripremu uzoraka, a pogodna je i za *in vivo* analize.¹⁰⁷ Jednodimenzionalna (1D) ¹H NMR spektroskopija je najčešće korišćen pristup u metabolomici zbog odlične reproduktivnosti, kao i zbog dostupnosti sve brojnijih baza podataka.¹⁰⁵ Dalju analizu obezbeđuju dvodimenzionalne (2D) NMR metode, koje pružaju mogućnost razdvajanja signala i razjašnjavanja struktura poznatih ili nepoznatih jedinjenja u kompleksnoj smeši biljnih ekstrakata.¹⁰⁷ Pogodnost primene NMR spektroskopije u metabolomici biljaka jeste to što je nedestruktivna tehnika i omogućava dalju analizu uzoraka.

Za utvrđivanje komponenti frakcija odgovornih za citotoksičnu aktivnost, primenjena je ortogonalna parcijalna regresija najmanjih kvadrata (OPLS) korišćenjem obrađenih ¹H NMR podataka (X varijable) i IC₅₀ vrednosti citotoksične aktivnosti (Y varijable).

Dobijene vrednosti parametara R² i Q² (tabela 5) su bliske jedinici za oba OPLS modela zasnovanih na NMR podacima i IC₅₀ vrednostima citotoksične aktivnosti na ćelije HeLa, odnosno ćelije A549. Validacijom CV-ANOVA testom, prema p vrednostima utvrđeno je da su primenjeni modeli značajni (tabela 5), što je potvrđeno i permutacionim testom sa 200 permutacija. Grafici permutacionih testova prikazani su na slici 21.

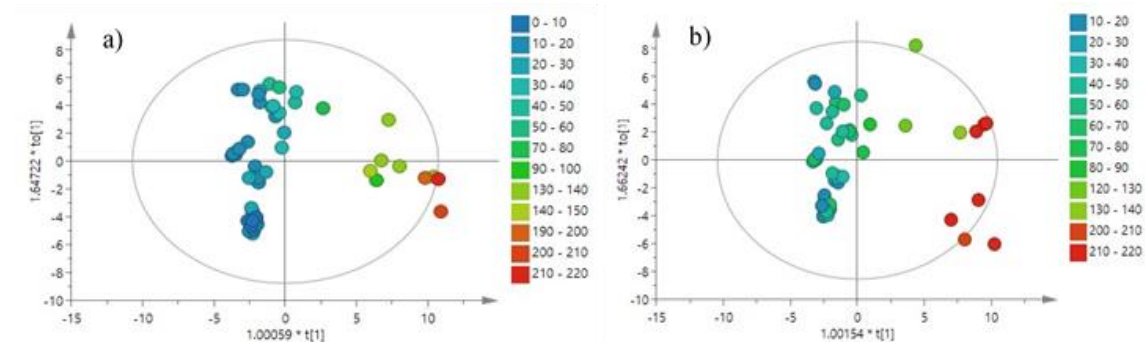
Tabela 5. Statistički podaci OPLS modela

Ćelijska linija	Komponente (prediktivne + ortogonalne)	R ²	Q ²	p (CV-ANOVA)
HeLa	1 + 3	0,932	0,855	3,01×10 ⁻¹⁵
A549	1 + 3	0,922	0,866	6,00×10 ⁻¹⁶



Slika 21. Dijagrami permutacionih testova OPLS modela frakcija *A. autariatus* ssp. *autariatus* zasnovanih na NMR podacima i IC₅₀ vrednostima citotoksične aktivnosti na (a) ćelije HeLa i (b) ćelije A549 (zelenom bojom su označene R² vrednosti permutovanih Y vektora, a plavom Q² vrednosti permutovanih Y vektora)

Razdvojenost frakcija koje pokazuju citotoksičnu aktivnost od frakcija kod kojih je aktivnost izostala se uočava na dijagramu skorova (slika 22)

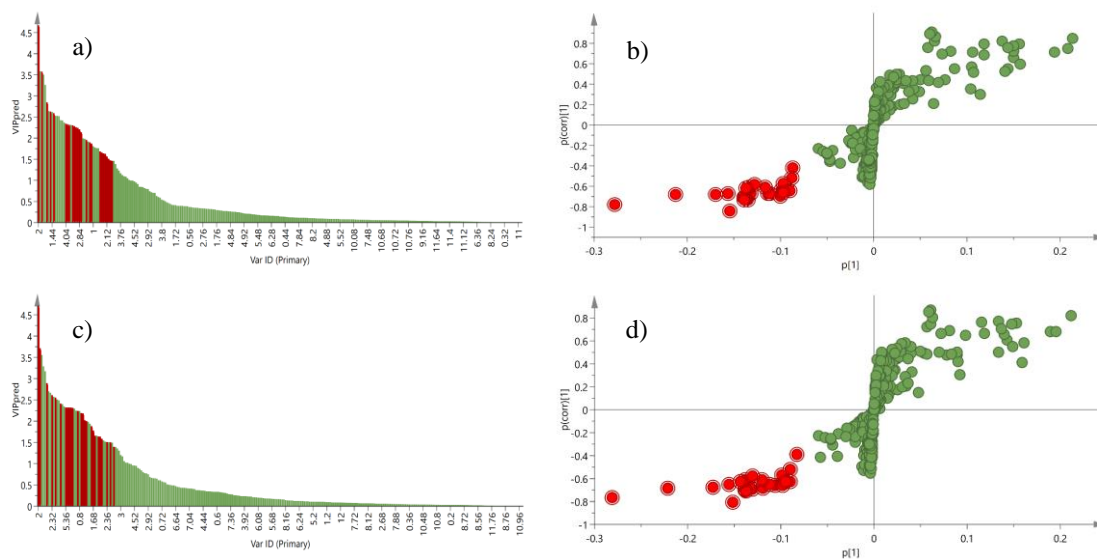


Slika 22. Grafik skorova OPLS modela frakcija *A. autariatus* ssp. *autariatus* zasnovanih na NMR podacima i IC₅₀ vrednostima citotoksične aktivnosti na a) ćelije HeLa i b) ćelije A549.

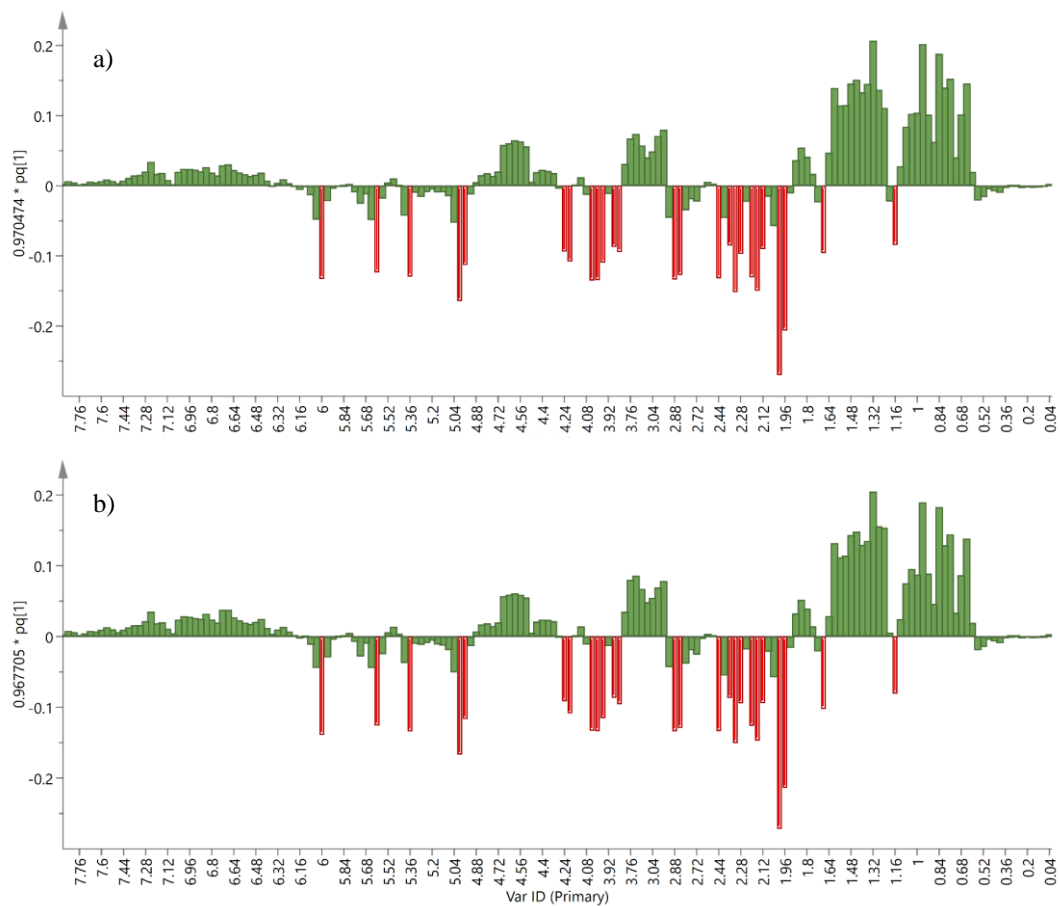
Na prikazanim dijagramima OPLS modela frakcije su svrstane u kategorije, prema IC₅₀ vrednostima, koje su obeležene različitim bojama – najtamnije plavom označene su frakcije koje su pokazale najveću citotoksičnu aktivnost, a sa opadanjem

citotoksične aktivnosti kategorije menjaju boju ka svetlijim nijansama plave, preko zelene, žute i narandžaste do crvene kojom su obeležene najneaktivnije frakcije.

Prema VIP vrednostima, većim od 1,5, i $|p(\text{corr})|$ vrednostima, većim od 0,5 (sl. 23), kao i pomoću dijagrama doprinosa (sl. 24) za oba OPLS modela, određene su varijable od značaja za biološku aktivnost, koje su prikazane su u tabeli 6, a na prikazanim dijagramima obeležene crveno.



**Slika 23. a) VIP grafik, b) S – grafik OPLS modela frakcija *A. autariatus* ssp. *autariatus* zasnovanog na NMR podacima i IC₅₀ vrednostima citotoksične aktivnosti na ćelije HeLa
c) VIP grafik, d) S – grafik OPLS modela frakcija *A. autariatus* ssp. *autariatus* zasnovanog na NMR podacima i IC₅₀ vrednostima citotoksične aktivnosti na ćelije A549**



Slika 24. Dijagram doprinosa OPLS modela frakcija *A. autariatus* ssp. *autariatus* zasnovanih na NMR podacima i IC_{50} vrednostima citotoksične aktivnosti na a) ćelije HeLa i b) ćelije A549.

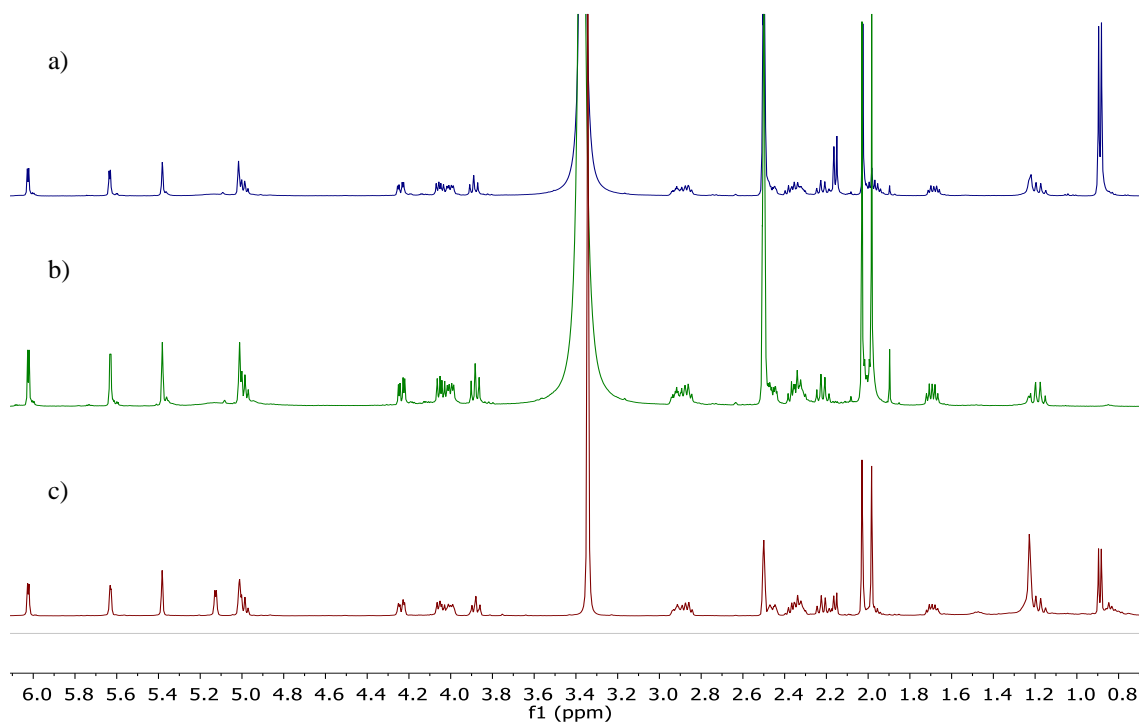
Tabela 6. Značajne varijable OPLS modela zasnovanih na NMR podacima

Hemijsko pomeranje (δ)	HeLa ćelije		A549 ćelije	
	VIP vrednosti	P(corr) vrednosti	VIP vrednosti	P(corr) vrednosti
2,00	4,7	-0,78	4,7	-0,77
1,96	3,6	-0,68	3,7	-0,69
5,00	2,8	-0,68	2,9	-0,68
2,32	2,6	-0,67	2,6	-0,65
2,16	2,6	-0,84	2,6	-0,81
4,04	2,3	-0,73	2,3	-0,77
4,00	2,3	-0,71	2,3	-0,69
2,88	2,3	-0,71	2,3	-0,69
6,00	2,3	-0,62	2,4	-0,63
2,44	2,3	-0,71	2,3	-0,77
2,20	2,3	-0,74	2,2	-0,69
5,36	2,2	-0,61	2,3	-0,61
2,84	2,2	-0,67	2,2	-0,67
5,60	2,1	-0,58	2,2	-0,58
4,96	2,0	-0,61	2,0	-0,61
3,96	1,9	-0,67	2,0	-0,68
4,20	1,9	-0,67	1,9	-0,65
2,28	1,7	-0,70	1,6	-0,66
1,68	1,7	-0,63	1,8	-0,66
3,84	1,6	-0,57	1,7	-0,57
4,24	1,6	-0,66	1,6	-0,63
2,12	1,6	-0,62	1,6	-0,64
3,88	1,5	-0,64	1,5	-0,62
2,36	1,5	-0,52	1,5	-0,52

Dijagramima doprinosa multivarijantne analize frakcija *A. autariatus* određeni su u ^1H NMR spektru signali komponenti odgovornih za biološku aktivnost. Crvenom bojom na dijagramu doprinosa su označeni spektralni podaci jedinjenja koja su pokazala biološku aktivnost. Analiziranjem dobijenih rezultata multivarijantnom analizom i NMR spektrima utvrđeno je da su za citotoksičnu aktivnost odgovorni seskviterpenski laktoni. 1D i 2D NMR spektrima identifikovani su najzastupljeniji laktoni u aktivnim frakcijama *A. autariatus* ssp. *autariatus*. Preklopljeni signali su identifikovani na osnovu COSY, NOESY, HSQC i HMBC spektara, dok su konstante sprežanja određene iz 2D J spektara. (Spektri dati u prilogu 13-19).

Analizom ^1H NMR spektara frakcija koje su pokazale biološku aktivnost utvrđeno je da su dva laktona dominantna u ovim frakcijama. Na osnovu NMR spektara zaključeno je da su to laktoni **A** i **B**, slika 19.

Kako bi se nedvosmisleno dokazalo prisustvo navedenih laktona u frakcijama, snimljeni su ^1H NMR spektri prečišćenih uzoraka ovih laktona, koji su korišćeni kao standardi. Poređenjem spektara standarda i spektara frakcija utvrđeno je da su najaktivnije frakcije koje sadrže ova dva laktona. NMR podaci identifikovanih laktona su dati u tabeli 7. Na slici 25 predstavljen je uporedni prikaz ^1H NMR spektara laktona **A**, laktona **B** i (aktivne) frakcije **35**.



Slika 25. Uporedni prikaz ^1H NMR spektara a) laktona **A**, b) laktona **B** i c) frakcije **35**

Tabela 7. NMR podaci laktonea identifikovanih u najaktivnijim frakcijama

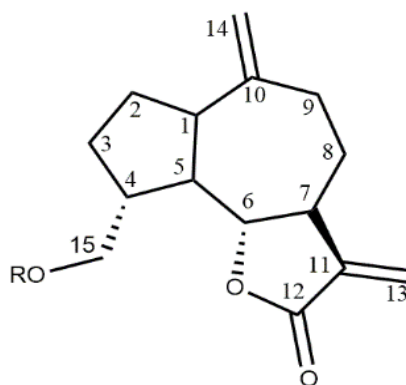
Identifikovani laktonei	Hemijsko pomeranje, (δ), multipliciteti i konstante kuplovanja (Hz)
Lakton A	δ 6,02 (d, $J=3,5$) (H-13); 5,63 (d, $J=3,1$) (H-13'); 5,38 (s) (H-14); 5,02 (s) (H-14'); 4,99 (br q, $J=7,5$) (H-3); 4,24 (dd, $J=3,7;11,3$) (H-15); 4,05 (dd, $J=6,4;11,3$) (H-9); 4,00 (dd, $J=4,6;10,4$) (H-15'); 3,89 (dd, $J=8,8;10,2$) (H-6); 2,92 (m) (H-7); 2,87 (br q, $J=7,7$); 2,46 (m) (H-8 α); 2,37 (m) (H-4 + H-2 α); 2,33 (m) (H-2 α + H-4); 2,22 (br q, $J=10,2$) (H-5); 2,16 (d, $J=6,8$) (i-Val); 2,03 (s) (OAc); 1,98 (n, $J=6,7$) (i-Val); 1,69 (dt, $J=6,6;13,6$) (H-2 β); 1,18 (br q, $J=12,5$) (H-8 β); 0,99 (d, $J=6,7$) (i-Val)
Lakton B	δ 6,03 (d, $J=3,4$) (H-13); 5,63 (d, $J=3,1$) (H-13'); 5,38 (s) (H-14); 5,04 (s) (H-14'); 4,99 (br q, $J=7,4$) (H-3); 4,05 (dd, $J=6,7;11,3$) (H-9); 4,04 (dd, $J=4,5;11,2$) (H-15'); 3,88 (dd, $J=8,9;10,2$) (H-6); 2,92 (m) (H-7+H-1); 2,87 (br q, $J=7,9$) (H-1); 2,45 (m) (H-8 α); 2,35 (m) (H-4+H-2 α); 2,32 (m) (H-2 α +H-4); 2,22 (q, $J=10,1$) (H-5); 2,03 (s) (OAc); 1,98 (s) (OAc'); 1,69 (td, $J=6,8;13,6$) (H-2 β); 1,19 (br q, $J=12,3$) (H-8 β)

Navedeni rezultati su potpuno u skladu sa ranije utvrđenom činjenicom da konjugovani laktonski prstenovi pokazuju izrazite citotoksične aktivnosti (videti odeljak 1.6.1.1.).

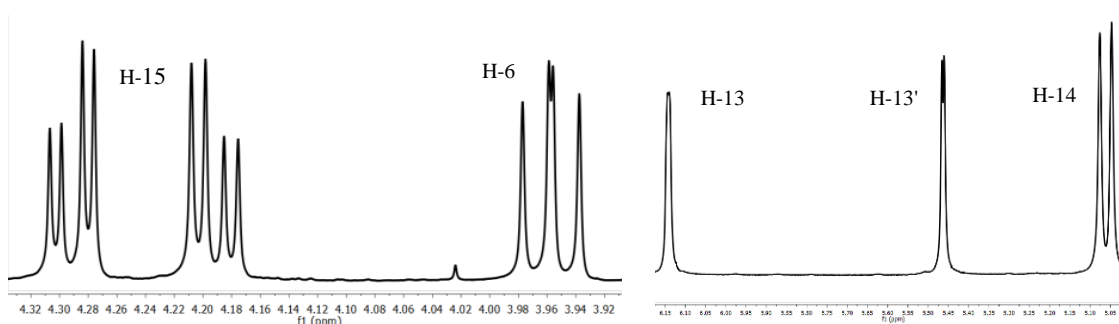
2.3. Izolovanje i karakterizacija seskviterpenskikh laktona iz vrsta roda *Amphoricapos*

Na osnovu infracrvenih (IC), masenih spektara (MS) i spektara nuklearne magnetne rezonancije (1D i 2D NMR) određena je struktura izolovanih laktona. Utvrđeno je da svi izolovani imaju karakterističan gvajan-12,6 α -olidni skelet sa kiseoničnom funkcijom na C-15, što je tipično za takozvane amforikarpolide koji su ranije izolovani iz ovog roda^{96,97}, slika 26.

Za ovaj skelet je karakterističan dublet dubleta na $\delta \sim 4$, u ^1H NMR spektru, koji potiče od protona H-6. Vodonik H-6 ima β -orijentaciju. Druga karakteristika ovog skeleta su dva dvostruka dubleta na $\delta \sim 4,5$ i $\delta \sim 3,9$ koji potiču od diasterotopnih vodonikovih atoma u položaju 15. Položaj 15 je oksigenovan kod svih do sada izolovanih amforikarpolida, zbog čega signali ovih protona imaju visoko hemijsko pomeranje. Signali protona H-15 prikazani su na slici 27. Takođe, C(15)H₂OR grupa kod svih amforikarpolida se nalazi u α -orijentaciji.



Slika 26. Struktura seskviterpenskog laktona gvajanolidnog tipa (R=H, Acil)



Slika 27. Prikaz signala vodonika H-15, H-6, H-13 i H-14

Protoni (H₂-13) sa egzometilenske grupe daju karakteristične dublete na hemijskim pomeranjima $\delta \sim 6,2$ i $\delta \sim 5,5$, dok protoni iz druge egzometilenske grupe (H₂-14) daju najčešće proširene singlete ili uzane dublete na nešto nižim hemijskim pomeranjima ($\delta \sim 5,0$). Izgled signala H-13 i H-14 je prikazan na slici 27. Signal protona H-1 u ^1H NMR spektrima najčešće ima oblik proširenog kvarteta na $\delta \sim 2,8$

amforikarpolida koji nisu supstituisani na C-2, dok H-7 daje multiplet na hemijskom pomeranju $\delta \sim 2,6$. Oba ova vodonika zauzimaju α -orijentaciju, kao i H-5, što je još jedna karakteristika ovog seskviterpenskog skeleta. Najveće varijacije amforikarpolida jesu u R-ostaku vezanom u položaju 15, kao u supstituentima u položajima C-2, C-3 i C-9, što će dalje u tekstu biti prikazano.

2.3.1. Seskviterpenski laktoni vrste *Amphoricarpos autariatus* ssp. *autariatus* sa lokaliteta kanjon Tare

Prikupljane biljnog materijala biljne vrste *A. autariatus* ssp. *autariatus*, postupak ekstrakcije, frakcionisanja ekstrakta kao i izolovanje jedinjenja detaljno je opisano u eksperimentalnom delu u odeljku 3.4.2. Iz ove biljne vrste izolovano je sedam seskviterpenskih laktona sa karakterističnim gvajanolidnim skeletom. U tabeli 8 su prikazane strukture izolovanih laktona iz ove biljne vrste.

Tabela 8. Prikaz izolovanih laktona iz vrste *A. autariatus* ssp. *autariatus*

Lakton	R	R ₁	R ₂	R ₃
1	Ac	AcO	H	H
2	Ac	AcO	AcO	H
3	i-Val	AcO	H	β -OH
4	Ac	AcO	H	β -OH
5	Ac	AcO	H	α -OH
6	Sen	AcO	H	β -OH
7	Ac	OH	H	β -OH

Sen:

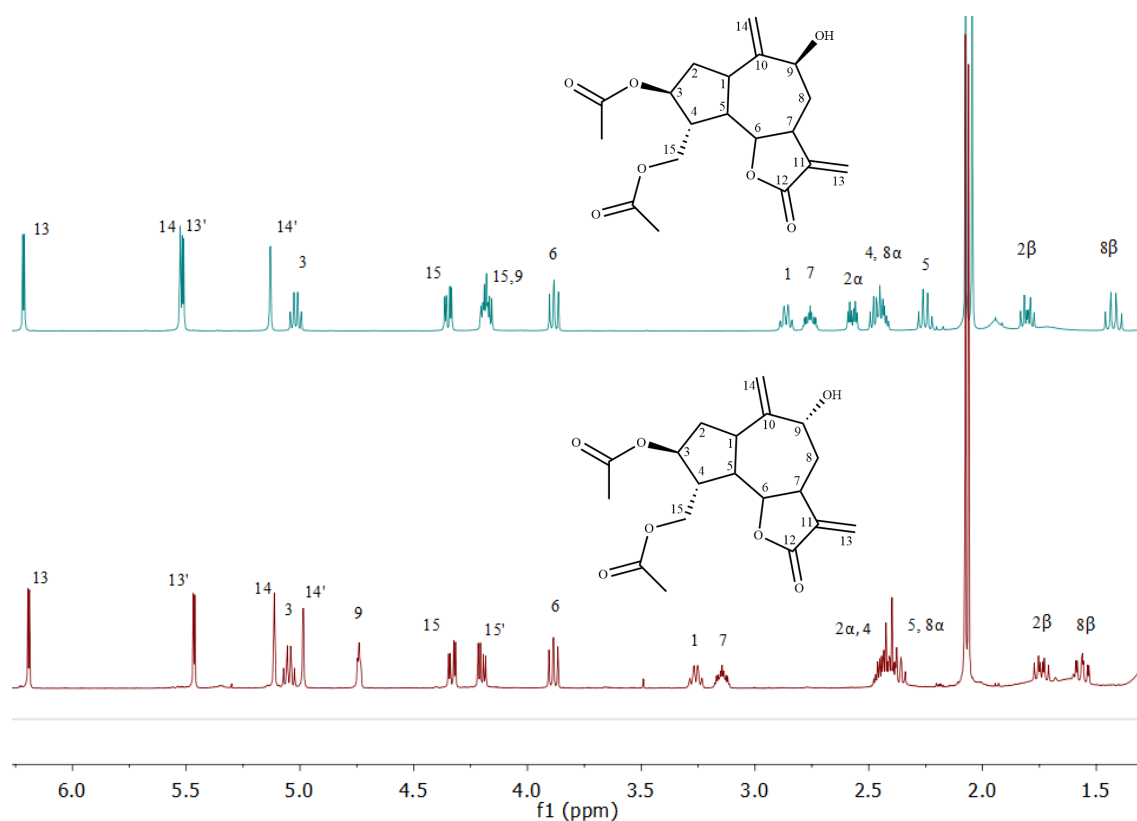
i-Val:

Strukture izolovanih laktona **1-5** su već poznate i identifikacija je izvršena na osnovu literaturnih podataka.^{96,97} Za lakton **5** (3,15-di-*O*-acetil-9 α -hidroksiamforikarpolid) kao i lakton **6** (3-*O*-acetil-9 β -hidroksi-15-*O*-senecioilamforikarpolid) nije bilo literaturnih podataka, te se smatra da su po prvi put izolovani. Za ova dva amforikarpolida biće prikazano detaljno određivanje strukture.

2.3.1.1. Karakterizacija 3,15-di-*O*-acetil-9 α -hidroksiamforikarpolida

Lakton **5** (3,15-di-*O*-acetil-9 α -hidroksiamforikarpolid), $[\alpha]_D^{20}$ -18,0, izolovan je semi-preparativnom tečnom hromatografijom iz frakcije eluirane smešom dietil-etar:methanol (90:10) sa suve kolone silika gela.

U ESI masenom spektru ovog jedinjenja snimljenom u pozitivnom modu uočavaju se joni na m/z 382,1862 $[M+NH_4]^+$, 387,1416 $[M+Na]^+$, 403,1154 $[M+K]^+$, koji upućuju na molekulsku formulu $C_{19}H_{24}O_7$. Dobijeni joni, kao i molekulska formula su isti kao kod 3,15-*O*-diacetil-9 β -hidroksiamforikarpolida (lakton **4**). Uporedni prikaz 1H NMR spektara laktona **4** i **5** prikazan je na slici 28. Na osnovu poređenja ovih spektara, kao i na osnovu 2D NMR (prilog 20-25) spektara određena je struktura laktona **5**, što je u daljem tekstu detaljno opisano.



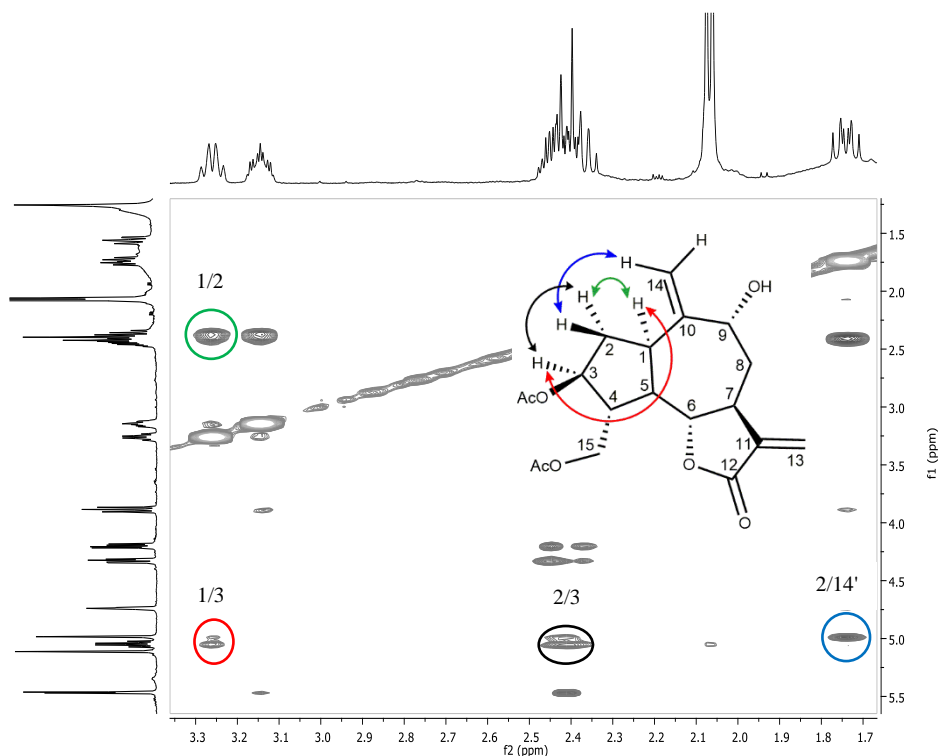
Slika 28. Uporedni prokaz 1H NMR spektara laktona **4** i laktona **5**

Dva singleta na hemijskim pomeranjima δ 2,08 i δ 2,06 mogu se pripisati metil grupama acetata i njihova hemijska pomeranja su ista kao i kod laktona **4**. U

infracrvenom spektru uočava se traka na talasnom broju 1736 cm^{-1} što dokazuje prisustvo karbonilne (estarske) grupe.

Diastereotopni protoni H₂-15 daju uobičajena dva dvostruka dubleta na hemijskim pomeranjima δ 4,33 (H-15) i δ 4,20 (H-15'). Sprežu se međusobno ($J_{15,15'}=11,4\text{ Hz}$) kao i sa susednim H-4 uz konstante sprežanja $J_{15,4}=3,8\text{ Hz}$ i $J_{15',4}=4,9\text{ Hz}$. Korelacija ovih protona u HSQC uočava se sa signalom C-15 na δ 63.7 za koji vezana jedna acetatna grupa.

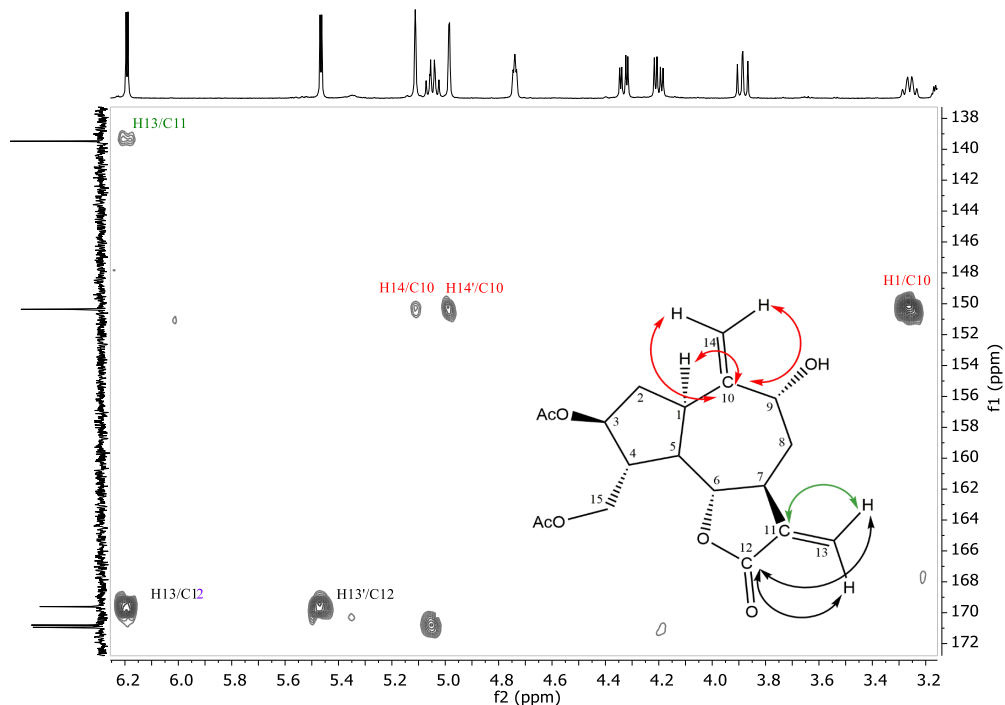
Signal H-3 ima izgled dubleta dubleta dubleta ($J_1=7,0\text{ Hz}$; $J_2=8,6\text{ Hz}$ i $J_3=8,6\text{ Hz}$) na hemijskom pomeranju δ 5,05. U COSY spektru uočavaju se korelacije ovog protona sa susednim protonima – H₂-2 i H-4. Korelacije signala H-3 sa signalima H-1 i H-2 α u NOESY spektru ukazuju da je H-3 α -orjentisan, dok je estarska grupa u β -položaju, slika 29.



Slika 29. Deo NOESY spektra laktone 5 sa korelacijama protona H-2 i H-3

Ugljenik C-3 asigniran je na osnovu direktne korelacije H-3 i njegovog signala na δ 75,0 u HSQC spektru. U HMBC spektru signal na δ 170,8 pokazuje korelaciju sa H-3 što dodatno potvrđuje da je položaj 3 izolovanog laktone esterifikovan. Drugi C-13

signal na višem hemijskom pomeranju pripisan je karbonilnom ugljeniku acetata sa C-15. Deo HMBC spektra sa ključnim korelacijama je prikazan na slici 30, dok je ceo spektar dat u prilogu.



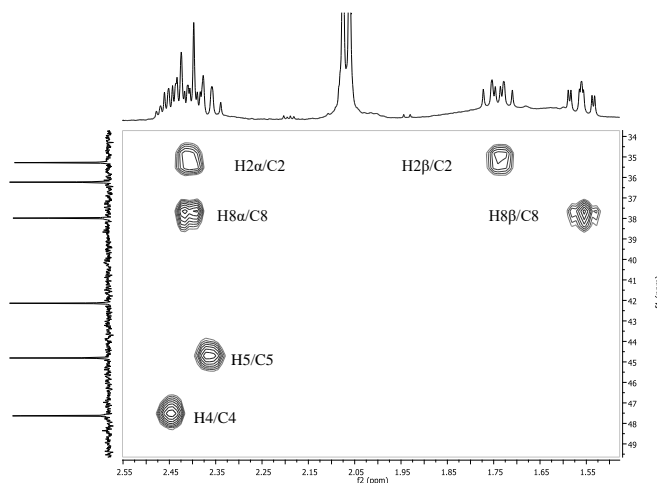
Slika 30. Deo HMBC spektra laktone 5 sa ključnim korelacijama

Protoni egzometilenske grupe H₂-13 se kupuju sa H-7 i daju dva dubleta na hemijskim pomeranjima δ 6,20, (H-13, $J_{13,7}=3,5$ Hz) i δ 5,47, (H-13', $J_{13',7}=3,2$ Hz). U HSQC spektru pokazuju korelaciju sa signalom na hemijskom pomeranju δ 119,9, koji je pripisan ugljeniku C-13. Signali H₂-14 druge egzociklične dvostruke veze daju jedan prošireni singlet na hemijskom pomeranju δ 5,11 (H-14) i jedan dublet na δ 4,99 (H-14', $J=1,5$ Hz), što je niže hemijsko pomeranje u odnosu na signale laktone 4. Na osnovu njihove korelacije u HSQC spektru utvrđeno je da su vezani za ugljenik koji daje signal na δ 113,1 (C-14). Prisustvo traka na 1651 cm^{-1} u infracrvenom spektru je dokaz za dvostruku vezu.

Karakterističan dublet dubleta protona H-6 se nalazi na hemijskom pomeranju δ 3,98. Ovaj proton se kupuje sa H-5 i H-7 i to konstantama sprezanja $J_{6,7}=9,3$ Hz i $J_{6,5}=10,3$ Hz. Korelacija ovog protona u HSQC spektru uočava se sa ugljenikom na hemijskom pomeranju δ 85,2 (C-6). Signali H-1 i H-7 su na višem hemijskom pomeranju u odnosu na odgovarajuće signale laktone 4, što ukazuje na izvesnu razliku u

strukturi. Prošireni kvartet na hemijskom pomeranju δ 3,26 potiče od H-1 i koreliše se sa ugljenikom čiji signal se nalazi na δ 36,2 u HSQC spektru (C-1). Signal H-7 u ^1H NMR spektru ima oblik multipleta na hemijskom pomeranju δ 3,14. U HSQC spektru pokazuje korelaciju sa signalom ugljenika na δ 42,1, koji je pripisan ugljeniku C-7.

Multiplet na hemijskom pomeranju δ 2,36-2,45 čine preklopljeni signali četiri protona, što je potvrđeno HSQC spektrom, slika 31. Na osnovu HSQC spektra su određena tačna hemijska pomeranja ovih vodonikovih atoma. Signal na najnižem hemijskom pomeranju δ 2,37, koji ima korelaciju sa ugljenikom čiji je signal na δ

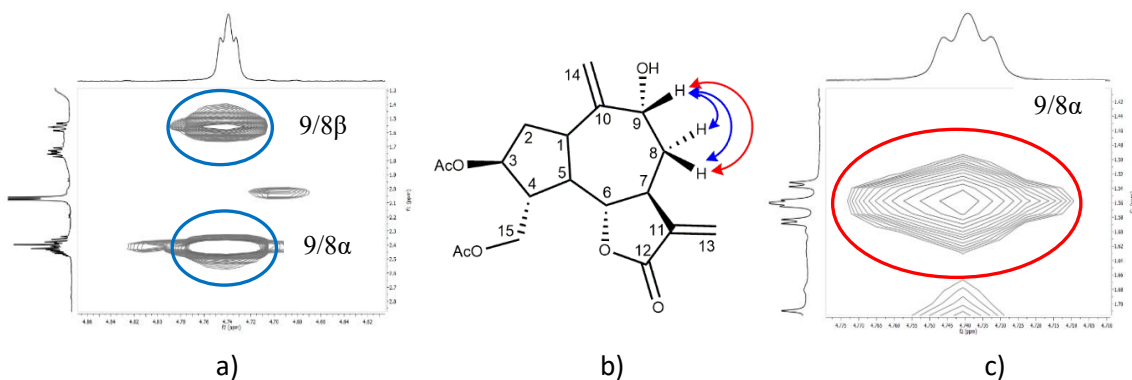


Slika 31. Deo HSQC spektra laktone 5

44,8, pripisan je protonu H-5. U COSY spektru uočava se korelacija ovog signala sa signalom H-6, dok u NOESY spektru daje korelacije sa signalima koji potiču od H-7 i H-1. Ovo je bio dovoljan dokaz da signal na δ 2,34 potiče od H-5 i da se on nalazi ispod ravni prstena (u α -položaju), što je karakteristično za laktone gvajanolidnog tipa izolovane iz familije Asteraceae. Signal na δ 2,46 korelisan sa signalom ugljenika na hemijskom pomeranju δ 47,6 (C-4) asigniran je kao H-4. Dokaz za ovakvu asignaciju su bile korelacije H-4 sa H-5 u COSY spektru, kao i korelacija sa H-6 u NOESY spektru, koja je ukazala da je H-4 u β -položaju to jest, sa iste strane prstena kao i H-6. Signal trećeg protona iz ovog multipleta je na hemijskom pomeranju δ 2,40. U HSQC spektru uočavaju se korelacije ovog signala, kao i dubleta dubleta dubleta na δ 1,56, sa ugljenikom na hemijskom pomeranju δ 38,0. U COSY spektru oba signala imaju korelaciju sa H-7. Na osnovu ove korelacije utvrđeno je da signali na δ 2,40 i δ 1,56 potiču od metilenske grupe vezane za C-8. U NOESY spektru uočava se korelacija signala na δ 1,56 (ddd) sa H-6 što ukazuje da je vodonik H-8 na nižem hemijskom pomeranju u β -položaju (*cis* u odnosu na H-6). ^1H -Signal na hemijskom pomeranju δ 2,41, kao i dublet dubleta dubleta na δ 1,74, imaju korelaciju sa istim ugljenikom čiji je signal na δ 35,3 u HSQC spektru. Na osnovu korelacije u COSY spektru sa signalom H-

1, ovi protoni su asignirani kao H₂-2. Signal ove metilenske grupe koji je na nižem hemijskom pomeranju, u NOESY spektru pokazuje korelaciju sa H-14 te je stoga identifikovan kao H-2β. Geminalna konstanta kuplovanja ovih protona iznosi $J_{2\alpha,2\beta} = 12,8$ Hz, dok konstante kuplovanja sa H-1 i H-3 imaju vrednosti $J_{2\beta,1} = 9,2$ Hz i $J_{2\beta,3} = 9,2$ Hz. Drugi vodonik sa ugljenika C-2 u NOESY spektru pokazuje korelacije sa H-1 i H-3.

Prošireni triplet na hemijskom pomeranju δ 4,74 potiče od H-9. Visoko hemijsko pomeranje ukazuje da je za ugljenik na kom se nalazi H-9 vezana i hidroksilna grupa. Prisustvo hidroksilne grupe utvrđeno je i pomoću infracrvenog spektra u kom se uočava široka traka na 3458 cm^{-1} . HSQC spektar pokazuje korelaciju sa signalom na δ 73,5 tako da je on asigniran kao C-9. Proton H-9, u COSY spektru, pokazuje korelacije sa oba susedna protona (H₂-8) sa vicinalnom konstantom kuplovanja od 3,0 Hz, dok u NOESY spektru pokazuje korelaciju sa H-8β, na osnovu čega je utvrđeno da je H-9 u β-položaju što odgovara 9α-OH konfiguraciji. Ovo je glavna razlika u odnosu na lakton **4**, gde je hidroksilna grupa β-orijentisana. Navedene korelacije su prikazane na slici 32.



Slika 32. Delovi COSY i NOESY spektara laktona **5**: a) COSY korelacije H-9, označeno polavom bojom b) struktura sa obeleženim korelacijama c) NOE korelacija H-9 i protona H-8β, označeno crvenom bojom

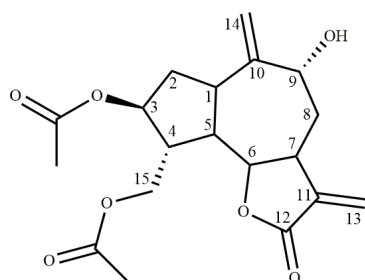
Pored toga, hemijsko pomeranje H-9 koje je veće za $\sim 0,5$ ppm u odnosu na pomeranje istog protona kod laktona **4**, kao i vrednosti vicinalnih sprezanja ($J_{9,8\alpha} \sim J_{9,8\beta} = 3,0$ Hz) u saglasnosti su sa H-9β konfiguracijom.

Na osnovu HMBC korelacija potvrđena je struktura jedinjenja i asignirani su kvaternerni ugljenikovi atomi. Korelacijom H-14 i H-1 sa signalom ugljenika na hemijskom pomeranju δ 150,4 je utvrđeno da ovaj signal pripada ugljeniku C-10. Signal kvaternernog ugljenika C-11 (δ 139,5) iz druge egzometilenske grupe asigniran je

njegovom korelacijom sa signalima H-13. Egzometilenski protoni H₂-13 imaju jaku korelaciju sa signalom u karbonylnoj oblasti na hemijskom pomeranju δ 169,6 zbog čega je on pripisan karbonylnom ugljeniku iz γ -laktonskog prstena, slika 30. U tabeli 9 dati su NMR spektralni podaci laktonea 5.

Tabela 9. Hemijska pomeranja ugljenikovih i vodonikovih atoma 3,15-di-O-acetil-9 α -hidroksiamforikarpolida (5)

	Položaj	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
	1	3,26 (br. q, $J=8,9$)	36,2
	2 α	2,36–2,45 (m)	35,3
	2 β	1,74 (ddd, $J=9,2; 9,2; 12,8$)	
	3 α	5,05 (ddd, $J=7,0; 8,6; 8,6$)	75,0
	4	2,42–2,48 (m)	47,6
	5	2,34–2,40 (m)	44,8
	6	3,89 (dd, $J = 9,3; 10,3$)	85,2
	7	3,11–3,12 (m)	42,1
	8 α	2,36–2,45 (m)	38,0
	8 β	1,56 (ddd, $J=2,9; 12,0; 4,6$)	
	9 β	4,7 (br. t, $J=3,0$)	73,5
	10	-	150,4
	11	-	139,5
	12	-	169,6
	13'	5,47 (d, $J = 3,2$)	119,9
	13	6,20 (d, $J = 3,5$)	
	14'	5,11 (br. s)	113,1
	14	4,99 (d, $J = 1,5$)	
	15'	4,20 (dd, $J=4,9; 11,4$)	63,7
	15	4,33 (dd, $J=3,8; 11,4$)	
	Ac ₁₅	2,08 (s)	21,0; 170,9
	Ac ₃	2,06 (s)	21,1; 170,8

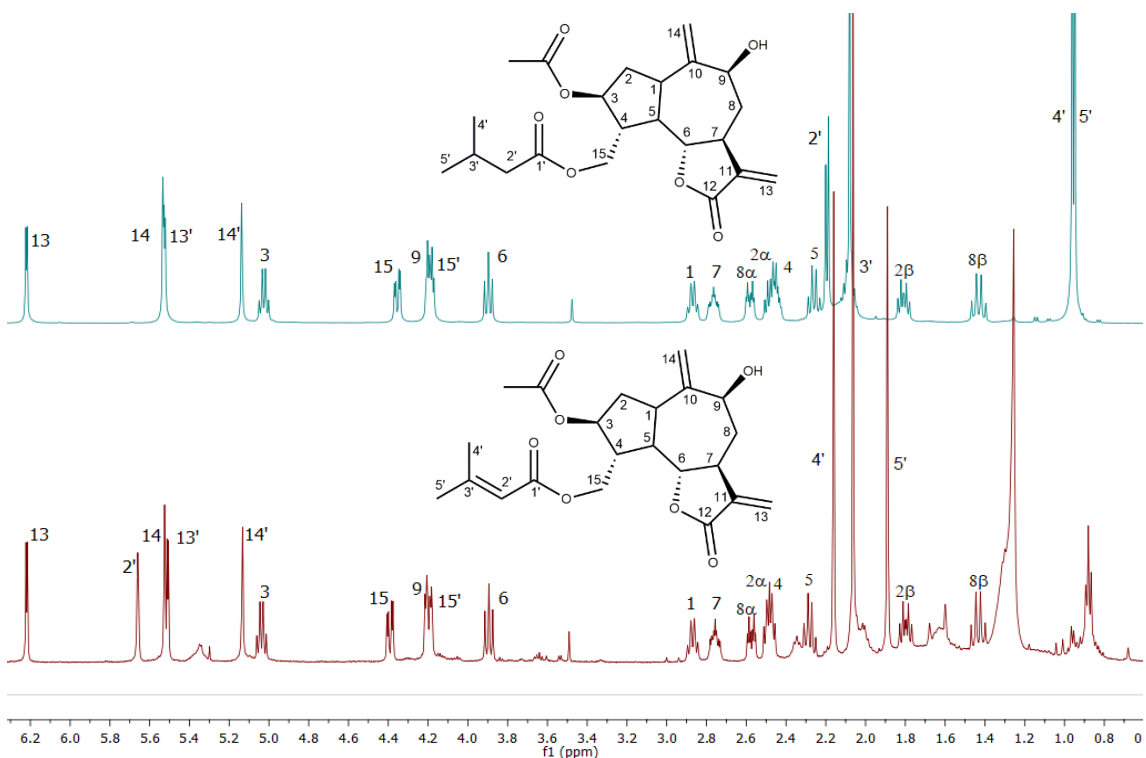


2.3.1.2. Karakterizacija 3-*O*-acetil-15-*O*-senecioil-9 β -hidroksiamforikarpolida

Lakton **6** (3-*O*-acetil-15-*O*-senecioil-9 β -hidroksiamforikarpolid), $[\alpha]_D^{20}$ -18.0, izolovan je semi-preparativnom tečnom hromatografijom iz frakcije eluirane smešom dietil-etar:metanol (90:10), na način opisan u odeljku 3.4.2.1.

U infracrvenom spektru laktone **6** uočavaju se sve trake karakteristične za α,β -nezasićeni γ -laktonski prsten (1767, 1647 i 1148 cm^{-1}), a detektovane su i trake karakteristične za u estarske grupe: 1735 i 1246 cm^{-1} .

U ESI masenom spektru ovog jedinjenja snimljenom u pozitivnom modu uočavaju se joni na vrednosti m/z 405,1910 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 422,2175 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 427,1729 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 443,1467 $[\text{M}+\text{K}]^+$, koji upućuju na molekulsku formulu $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_7$.



Slika 33. Uporedni prikaz ^1H NMR spektara laktone **3** i laktone **6**

^1H NMR spektar je veoma sličan ^1H NMR spektru 15-*O*-izovaleroil-3-*O*-acetil-9 β -hidroksiamforikarpolida (lakton **3**) sa skoro identičnim hemijskim pomeranjima i konstantama kuplovanja. Na slici 33 dat je uporedni prikaz ^1H NMR spektara laktone **6** i laktone **3**.

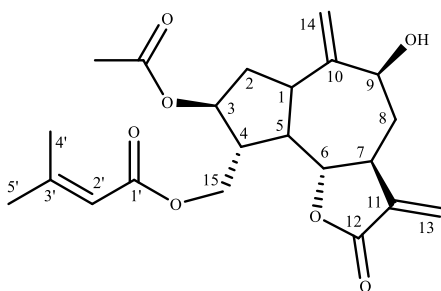
Na osnovu poređenja ovih spektara, kao i na osnovu 2D NMR spektara određena je struktura laktona **6**. Široka traka na 3438 cm^{-1} u infracrvenom spektru potvrđuje prisustvo hidroksilne grupe. Na osnovu 1D i 2D NMR spektara nađeno je da se ona nalazi u položaju C-9 i da je β -orijentisana kao i kod laktona **3**. Glavna razlika u spektrima laktona **6** i **3** jeste u signalima kiselinskih ostataka estara. Umesto signala za izovaleroil-grupu koji se javljaju u spektru laktona **3**, u ^1H NMR spektru laktona **6** postoji prošireni singlet od jednog protona (H-2') u olefinskom delu spektra na hemijskom pomeranju δ 5,66, i dva uzana dubleta od po tri protona na δ 2,16 (H₃-4') i δ 1,89 (H₃-5'), koji su, na osnovu COSY korelacija u vezi sa ovim olefinskim protonom (alilno kuplovanje). Ovakav raspored i oblik signala tipičan je za senecioil-grupu koja je po prvi put detektovana u amforikarpolidima. ^{13}C signali na δ_{C} 115,7 (C-2'), 20,3 (C-4') i 27,4 (C-5'), identifikovani na osnovu HSQC korelacija i karakterističnih hemijskih pomeranja, takođe potvrđuju prisustvo senecioil-grupe. Molekulska masa laktona **6**, manja za dva Daltona od mase laktona **3** takođe potvrđuje da lakton **6** sadrži senecioil umesto izo-valeroil-grupe koja se javlja kod laktona **3**.

Korelacijama u HMBC spektru određena su hemijska pomeranja kvaternenih ugljenihovih atoma u senecioil grupi. Metil-grupe senecionata pokazuju korelaciju sa signalima na hemijskim pomeranjima δ 115,7 i δ 157,1. Kako je već nadjeno da signal na δ 115,7 pripada ugljeniku C-2' (na osnovu HSQC), signal na hemijskom pomeranju, δ 157,1 je pripisan ugljeniku C-3'. Signal na višem hemijskom pomeranju (δ 166,3) je asigniran kao karbonilni ugljenik senecionata.

Singlet na hemijskom pomeranju δ 2,06 pripisan je protonima metil-grupe acetata, a na osnovu njegove HMBC korelacije sa signalom na hemijskom pomeranju δ 170,8 utvrđeno je i hemijsko pomeranje karbonilnog ugljenika acetata. Ovaj karbonilni ugljenik ima korelaciju i sa vodonikom H-3, što ukazuje da je acetatna grupa vezana za C-3, a samim tim, senecioiloksi grupa se nalazi na C-15. ^{13}C NMR signali laktonskog karbonila (δ 169,2) i olefinskog ugljenika C-10 (δ 152,9) identifikovani su na osnovu HMBC korelacija sa H₂-13, odnosno H₂-14 (sl. 2.42). Hemijska pomeranja i konstante kuplovanja prikazani su tabeli 10, a 1D i 2D NMR spektri su prikazani u prilogu 26-31.

**Tabela 10. Hemijska pomeranja ugljenikovih i vodonikovih atoma
3-O-acetil-15-O-senecioil-9 β -hidroksiamforikarpolida (6)**

	Položaj	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
	1	2,86 (br. q, $J = 8,7$)	40,9
	2 α	2,46–2,52 (m)	35,7
	2 β	1,80 (ddd, $J = 8,2; 8,2; 13,5$)	
	3 α	5,04 (q, $J = 8,0$)	75,0
	4	2,46–2,52 (m)	47,8
	5	2,28 (q, $J = 9,8$)	45,0
	6	3,92 (t, $J = 9,9$)	84,9
	7	2,73–2,78 (m)	44,0
	8 α	2,57 (ddd, $J = 3,9; 3,9; 2,5$)	38,7
	8 β	1,43 (br. q, $J = 11,8$)	
	9 α	4,18–4,22 (m)	74,0
	10	-	152,9
	11	-	138,6
	12	-	169,2
	13'	5,51 (d, $J = 3,5$)	120,5
	13	6,22 (d, $J = 3,5$)	
	14'	5,13 (d, $J = 1,2$),	110,8
	14	5,53 (s)	
	15'	4,18–4,22 (m)	62,3
	15	4,39 (dd, $J = 3,4; 11,6$)	
	Ac ₃	2,06 (s)	21,1; 170,8
	1'	-	166,3
	2'	5,66 (br. s)	115,7
	3'	-	157,1
	4'	2,16 (d, $J = 1,0$, Me(4'))	20,3
	5'	1,89 (d, $J = 1,0$, Me(5'))	27,4



2.3.2. Seskviterpenski laktoni vrste *Amphoricarpos autariatus* ssp. *bertisceus* sa lokaliteta planine Zeletin

Prikupljane biljnog materijala *A. autariatus* ssp. *bertisceus*, postupak ekstrakcije, frakcionisanja ekstrakta kao i izolovanje jedinjenja detaljno je opisano u eksperimentalnom delu u odeljku 3.4.3. Iz ove biljne vrste izolovano je dvanaest amforikarpolida, (tabela 11).

Tabela 11. Prikaz izolovanih laktona iz vrste *A. autariatus* ssp. *bertisceus*

Lakton	R	R ₁	R ₂	R ₃
1	Ac	AcO	H	H
3	i-Val	AcO	H	β-OH
4	Ac	AcO	H	β-OH
8	i-Val	AcO	H	H
9	H	OH	H	H
10	H	H	H	H

11	Ac	OH	OH
12	Ac	H	OH
13	H	OH	OH

14	R: H
15	R: Ac
16	R: H

Za lakton **8** (3-*O*-acetyl-15-*O*-izovaleroilamforikarpolid) kao i za lakton **12** (3-*O*-acetyl-9 β -hidroksi-15-*O*-senecioilamforikarpolid) nije bilo literaturnih podataka, što znači da su oni po prvi put izolovani. Određivanje strukture ova dva amforikarpolida je detaljno prikazano u daljem tekstu. Ostale strukture laktone izolovanih u ovom radu su već poznate i identifikacija je izvršena na osnovu poređenja sa literaturnim podacima.^{96,97}

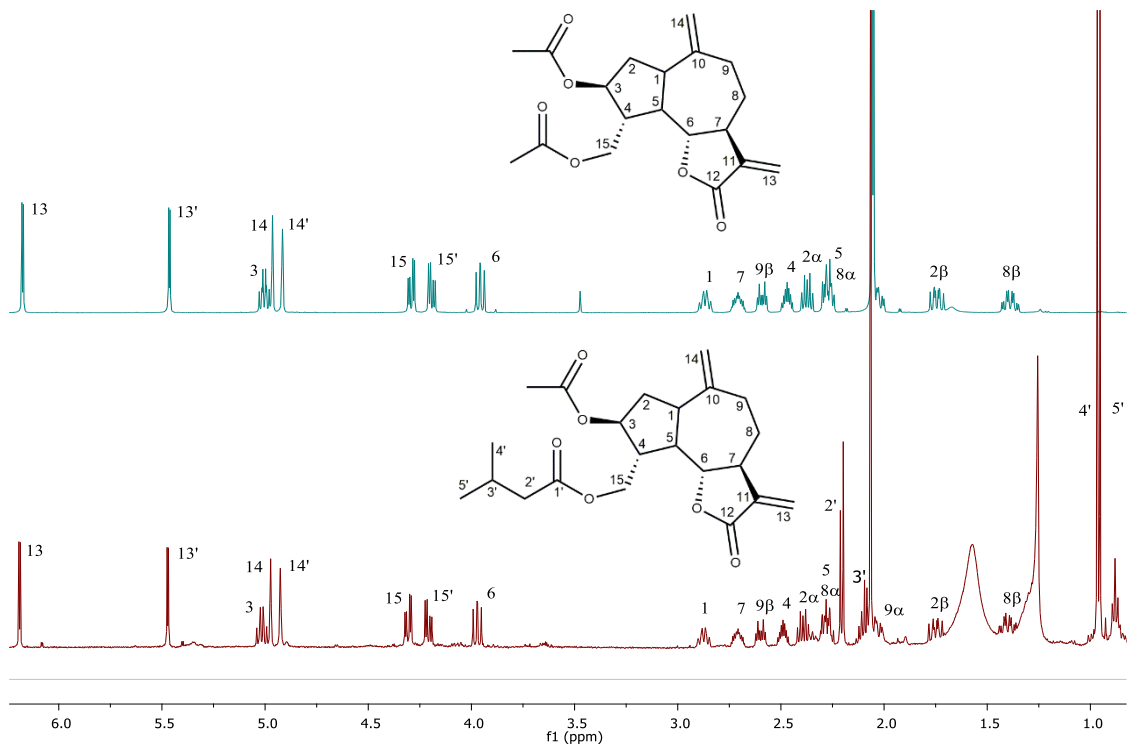
2.3.2.1. Karakterizacija 3-*O*-acetil-15-*O*-izovaleroilamforikarpolida

Lakton **8** (3-*O*-acetil-15-*O*-izovaleroilamforikarpolid), $[\alpha]_D^{20}$ -9.0, izolovan je semi-preparativnom tečnom hromatografijom iz frakcije eluirane sa suve kolone silika gela smešom etilacetat:heksan (40:60).

Infracrveni spektar izolovanog jedinjenja potvrđuje prisustvo γ -laktonskog prstena kao i prisustvo estarske grupe. Trake od značaja su na 1771, 1738, 1244 i 1560 cm^{-1} . U ESI masenom spektru ovog jedinjenja snimljenom u pozitivnom modu uočavaju se joni m/z 408,2381 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 429,1661 $[\text{M}+\text{K}]^+$, koji upućuju na molekulsku formulu $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_6$.

^1H NMR spektar laktona **8** skoro je isti kao i ^1H NMR spektar 3,15-di-*O*-acetilamforikarpolida (lakton **1**), što ukazuje na istu 3,15-diestarsku strukturu. Razlika, u odnosu na diacetatni lakton **1**, je ta što ovaj lakton sadrži različite estarske grupe. Umesto dva singleta na δ 2,07 i δ 2,08, pojavljuje se samo jedan singlet na δ 2,07, od metil grupe acetata. ^{13}C signal acetatnog karbonila (δ 170,8) identifikovan je na osnovu HMBC korelacije sa signalom protona ovog metila. Za određivanje položaja acetatne grupe ključna je HMBC korelacija acetanog karbonila sa H-3.

Preostala estarska grupa je identifikovana je kao izovaleratna na osnovu karakterističnih signala koji se uočavaju u NMR spektrima. Multiplet na δ 2,07 u ^1H NMR spektru potiče od CH-grupe (H-3') izovalerata i preklopljen je sa signalima protona H-9 α imetil-grupe acetata, što je utvrđeno 2D NMR spektrima. U COSY spektru H-3' pokazuje korelacije sa dubletima metil-grupa izovalerata (H₃-4' i H₃-5', $J=6,6$ Hz) na δ 0,96, kao i korelaciju sa dubletom CH₂-grupe (H₂-2', $J=7,0$ Hz) na δ 2,20. ^{13}C Signali izovaleratne grupe identifikovani su na osnovu HSQC spektra (C-2': δ 43,4; C-3': δ 25,6; C-4'/C-5': δ 22,4). Položaj signala karbonilnog ugljenika izovalerata određen je na osnovu HMBC korelacije signala H-2' sa signalom na δ 173,0 (C-1'). Uporedni prikaz ^1H NMR spektara laktona **8** i **1** dat je na slici 34.

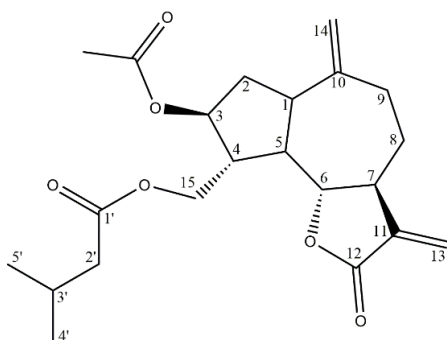


Slika 34. Uporeni prikaz ^1H NMR spektara laktone 1 i laktone 8

U tabeli 12 prikazani su NMR podaci, kao i struktura ovog jedinjenja, dok su 1D i 2D NMR spektri dati u prilogu 32-37.

**Tabela 12. Hemijska pomeranja ugljenikovih i vodonikovih atoma
3-O-acetil-15-O-izovaleroilamforikarpolida (8)**

	Položaj	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
	1	2,87 (br. q, $J=9,7$)	43,4
	2 α	2,40 (ddd, $J=6,9; 6,9; 12,9$)	35,8
	2 β	1,75 (ddd, $J=8,8; 10,5; 2,5$)	
	3 α	5,01 (ddd, $J=6,8; 8,7; 8,7$)	74,9
	4	2,46–2,51 (m)	47,6
	5	2,30 (m)	45,6
	6	3,97 (dd, $J=9,2; 10,6$)	84,9
	7	2,67–2,74 (m)	48,1
	8 α	2,30 (m)	
	8 β	1,41 (dddd, $J=4,2; 11,5; 11,5; 13,0$)	30,8
	9 α	2,04–2,10 (m)	35,4
	9 β	2,60 (ddd, $J=4,6; 4,6; 13,2$)	
	10	-	148,0
	11	-	139,6
	12	-	170,1
	13'	5,47 (d, $J= 3,1$)	120,1
	13	6,19 (d, $J= 3,5$)	
	14'	4,93 (br. s),	114,0
	14	4,97 (br. s)	
	15'	4,21 (dd, $J=4,8; 11,4$)	63,5
	15	4,31 (dd, $J=3,8; 11,4$)	
	Ac ₃	2,07 (s)	21,1; 170,8
	1'	-	173,0
	2'	2,20 (d, $J= 7,0$)	43,4
	3'	2,05–2,14 (m)	25,6
	4' i 5'	0,96 (d, $J=6,6$)	22,4



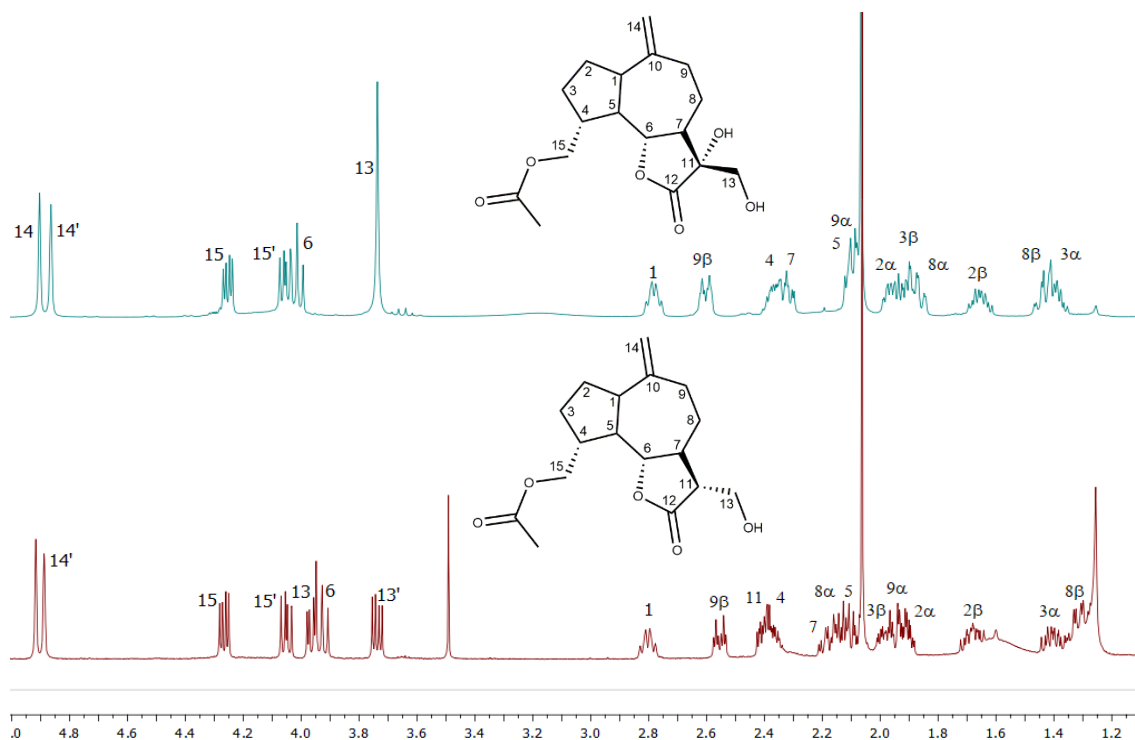
2.3.2.2. Karakterizacija 15-*O*-acetil-3-deoksi-11 β ,13-dihidro-13-hidroksiamforikarpolida

Lakton **12** (15-*O*-acetil-3-deoksi-11 β ,13-dihidro-13-hidroksiamforikarpolid), $[\alpha]_D^{20}$ -15.0, izolovan je iz frakcije eluirane smešom etilacetat:heksan (70:30) (postupak opisan u odeljku 3.4.3.1.) semi-preparativnom tečnom hromatografijom.

U ESI masenom spektru laktone **12** snimljenom u pozitivnom modu javljaju se joni m/z 309,170 $[M+H]^+$, 326,1966 $[M+NH_4]^+$, 331,1521 $[M+Na]^+$, 347,12529 $[M+K]^+$, koji ukazuju na molekulsku formulu $C_{22}H_{30}O_6$.

U infracrvenom spektru uočavaju se sve karakteristične trake za esterifikovane laktone (1764, 1741, 1647 i 1246 cm^{-1}), kao i široka traka na 3455 cm^{-1} karakteristična za hidroksilnu grupu.

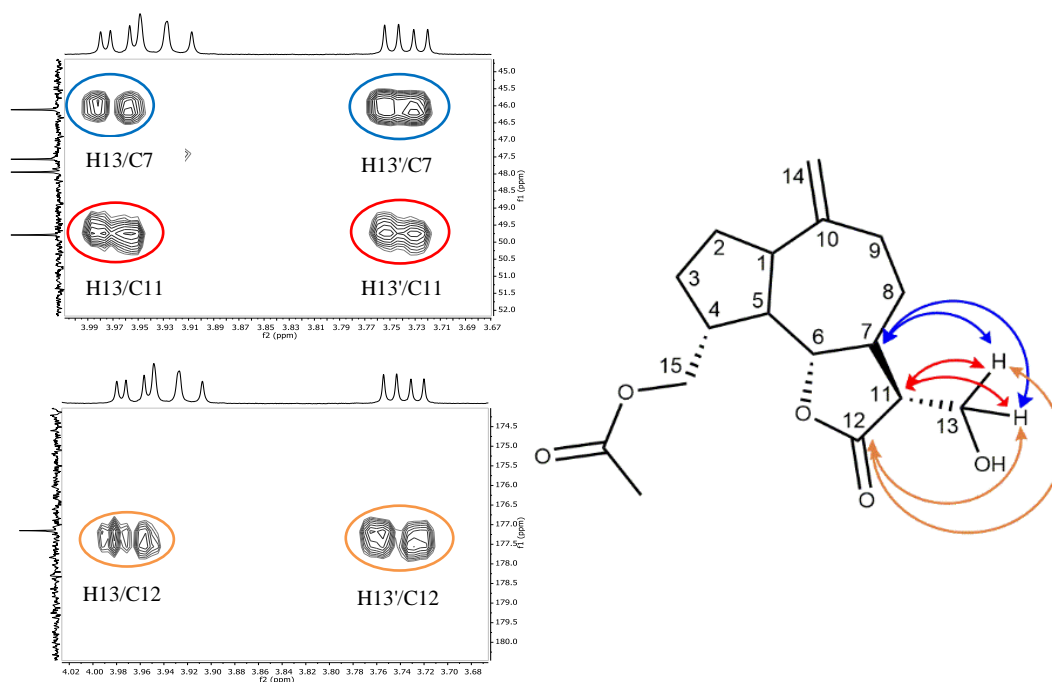
1H NMR spektar laktone **12** sličan je 1H NMR spektru 3-deoksi-15-*O*-acetil-11,13-dihidroksiamforikarpolida (lakton **11**). Njegova struktura određena je na osnovu 1D i 2D NMR spektara, prikazanih u prilogu 38-43.



Slika 35. Uporedni prikaz 1H NMR spektara laktone **11** i laktone **12**

U olefinskom delu spektra laktone **12** izostaju karakteristični dubleti H₂-13 egzometilenske grupe. Umesto njih dektektovana su dva dvostruka dubleta na hemijskim pomeranjima δ 3,96 i δ 3,74, tipična za diastereotopnu metilensku grupu: –CH-CH₂OH. U HSQC spektru imaju korelaciju sa ugljenikom na δ 67,5 (C-13). Sve ovo ukazuje da je hidroksilna grupa vezana za C-13. Diastereotopni protoni na C-13 se kupuju geminalno konstantom $J_{13,13}=11,6$ Hz i vicinalno sa protonom H-11 konstantama sprežanja $J_{13,11}=3,9$ Hz i $J_{13',11}=5,5$ Hz. Signal jednog od protona H₂-13 koji je na višem hemijskom pomeranju delimično je preklopljen tripletom laktorskog protona H-6 (δ 3,93).

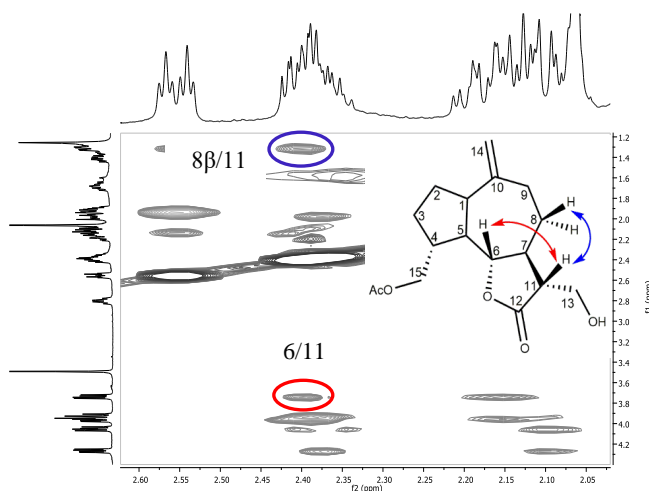
U HMBCspektru protoni H₂-13 pokazuju korelaciju sa karbonilnim ugljenikom γ -laktorskog prstena na δ 177,2, a uočene su i korelacije ove metilenske grupe sa ugljenikom C-11, kao i sa C-7 (sl. 36), što predstavlja dodatni dokaz 13-OH strukture.



Slika 36. Deo HMBC spektra laktone **12** sa ključnim korelacijama

Glavna razlika između laktona **12** i **11** je odustvo OH grupe u položaju C-11 kod laktona **12**. Signal protona H-11 se preklapa sa signalom H-4 u oblasti δ 2,35-2,42. Na osnovu korelacije H-4 sa diasteretopnim protonima H₂-15 u COSY spektru, zaključeno je da proton H-4 ima niže hemijsko pomeranje $\delta \sim 2,37$ u odnosu na H-11. U HSQC spektru H-11 ima korelaciju sa ugljenikom na hemijskom pomeranju δ 49,8 (C-11), dok u NOESY spektru H-11 pokazuje jake korelacije sa laktonskim protonom H-6, kao i sa H-8 β , što ukazuje da je i H-11 β -orijentisan, dok grupa -C(13)H₂OH, vezana za C-11, zauzima α -položaj (slika 37)

Singlet na hemijskom pomeranju δ 2,06 potiče od metil-grupe acetata. U HMBC spektru uočava se korelacija ovog singleta sa ugljenikom na hemijskom pomeranju δ 171,2, na osnovu čega je zaključeno da ovaj ¹³C signal potiče od karbonilnog ugljenika acetatne grupe. I protoni H₂-15 pokazuju korelaciju sa ovim ugljenikom što je dodatna potvrda da je acetatna grupa u položaju C-15. U tabeli 13 su prikazana hemijska pomeranja laktona **12**.



Slika 37. Deo NOESY spektra sa korelacijama vodonika H-11

**Tabela 13. Hemijska pomeranja ugljenikovih i vodonikovih atoma
15-O-acetil-3-deoksi-11 β ,13-dihidro-13-hidroksiamforikarpolida (12)**

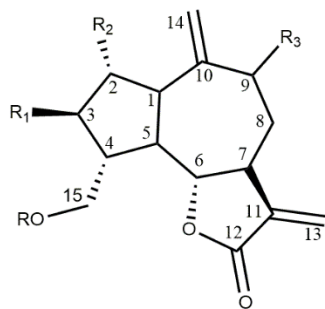
	Položaj	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
	1	2,81 (br. q, $J = 8,8$)	47,6
	2 α	1,88–1,94 (m)	30,4
	2 β	1,64–1,72 (m)	
	3 α	1,36–1,44 (m)	29,8
	3 β	1,95–2,01 (m)	
	4	2,32–2,42 (m)	43,9
	5	2,06–2,14 (m)	47,9
	6	3,93 (t, $J = 10$)	86,0
	7	2,14–2,22 (m)	46,1
	8 α	2,09–2,15 (m)	32,6
	8 β	1,27–1,35 (m)	
	9 α	1,89–1,98 (m)	36,5
	9 β	2,56 (ddd, $J = 4,0; 4,0; 13,0$)	
	10	-	149,6
	11	2,35–2,47 (m)	49,8
	12	-	177,2
	13'	3,74 (dd, $J = 5,5; 11,6$)	59,5
	13	3,96 (dd, $J = 3,9; 11,6$)	
	14'	4,89 (br. s)	112,6
	14	4,92 (br. s)	
15'	4,05 (dd, $J = 7,4; 10,8$)	67,5	
15	4,26 (dd, $J = 4,8; 10,8$)		
Ac ₁₅	2,06 (s)	21,0; 171,2	

2.3.3. Seskviterpenski laktoni vrste *Amphoricarpos neumayeri* sa lokaliteta planine Lovćen

Prikupljane biljnog materijala *A. neumayeri*, postupak ekstrakcije, frakcionisanja ekstrakta kao i izolovanje jedinjenja detaljno je opisano u eksperimentalnom delu. Iz ove vrste izolovano je šesnaest seskviterpenskih laktona gvajanolidnog tipa, čije su strukture prikazane u tabeli 14.

Tabela 14. Prikaz izolovanih laktona iz vrste *A. neumayeri*

	Lakton	R	R ₁	R ₂	R ₃
	1	Ac	AcO	H	H
	3	i-Val	AcO	H	β-OH
	4	Ac	AcO	H	β-OH
	7	Ac	OH	H	β-OH
	8	i-Val	AcO	H	H
	9	H	OH	H	H
	17	Sen	AcO	H	H
	18	Ac	AcO	OH	H
	19	Ac	OH	H	H
	20	H	AcO	H	H
	21	i-Val	AcO	OH	H
	22*	Ac	OH	H	H
	23	i-Val	OH	H	β-OH
	24	Ac	OH	OH	H
	25	H	OH	H	OH
	26	H	OH	OH	H



* 10(14) epoksi

Za laktone **17** (3-*O*-acetil-15-*O*-senecioilamforikarpolid), **20** (3-*O*-acetilhidroksiamforikarpolid), **25** (9β-hidroksiamforikarpolid) i **26** (2α-hidroksiamforikarpolid) nije bilo literaturnih podataka, te se smatra da su po prvi put izolovani. U daljem tekstu, za ova četiri amforikarpolida prikazano je detaljno

određivanje strukture. Strukture ostalih izolovanih laktona su već poznate i identifikacija je izvršena na osnovu literaturnih podataka.^{96,97}

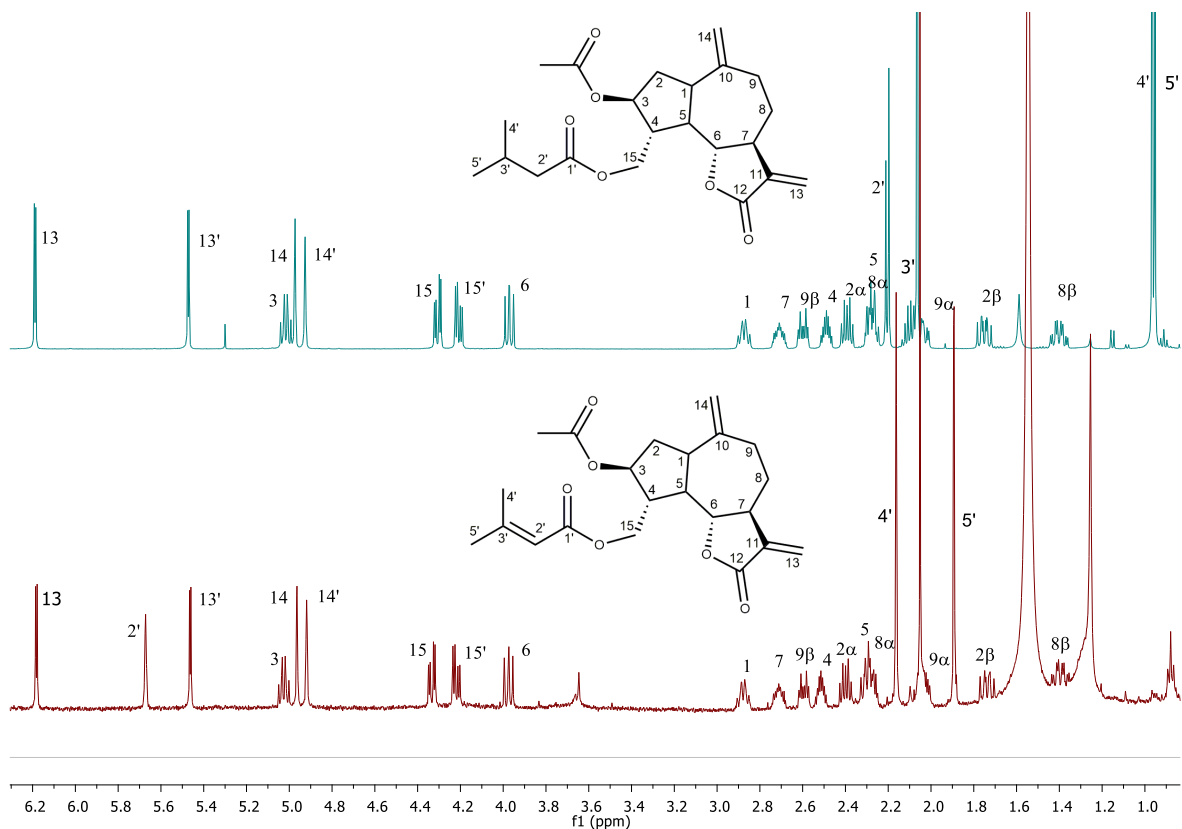
2.3.3.1. Karakterizacija 3 β -*O*-acetil-15-*O*-senecioilamforikarpolida

Lakton **17** (3 β -*O*-acetil-15-*O*-senecioilamforikarpolida), $[\alpha]_D^{20}$ -39.0, izolovan je semi-preparativnom tečnom hromatografijom iz frakcije eluirane smešom metilenhlorid:metanol (95:5) sa gravitacione kolone silika gela.

Masenom spektrometrijom određena je molekulska formula laktona **17**. U ESI masenom spektru snimljenom u pozitivnom modu uočavaju se joni m/z 389,1959 $[M+H]^+$, 406,2224 $[M+NH_4]^+$, 411,1778 $[M+Na]^+$, koji ukazuju na molekulska formulu C₂₂H₂₈O₆. U infracrvenom spektru izolovanog jedinjenja javljaju se trake na 1736, 1637 i 1243 cm⁻¹.

¹H NMR spektar laktona **17** skoro je identičan ¹H NMR spektru laktona **8**. Razilka u molekularnoj masi ovih laktona je 2 Da što ukazuje da lakton **17** ima dva vodonika manje u odnosu na lakton **8**. U ¹H NMR spektru laktona **17** uočava se izostanak signala izovaleroil-grupe čiji signali postoje u ¹H NMR spektru laktona **8**.

Umesto njih u spektru se javljaju signali tipični za senecioil-grupu (videti karakterizaciju laktona **6**, Odeljak 2.3.1.2.). Proširen singlet na hemijskom pomeranju δ 5.67 je asigniran kao H-2' iz senecioil-grupe. U COSY spektru pokazuje korelacije sa uzanim dubletima metil grupa na δ 2,16 (δ_C 20,3) i δ 1,89 (δ_C 27,4). Na osnovu NOESY korelacije H-2' i metil grupe na nižem hemijskom pomeranju, utvrđeno je da se ova metil-grupa (H₃-5') nalazi u *cis* položaju u odnosu na proton sa dvostruke veze (H-2'). Metil-grupe se alilno kupluju sa vodonikom H-2', $J_{4',2'}=0,9$ Hz i $J_{5',2'}=1,0$ Hz.

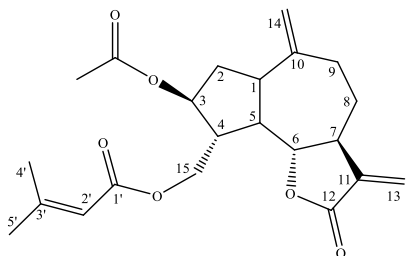


Slika 38. Uporedni prikaz ^1H NMR spektara laktone 8 i laktone 17

Signal (ddd) na δ 5,03 je pripisan protonu na C-3 (δ 75,0) za koji je vezana acetatna grupa. Karbonilni ugljenik iz acetata ima hemijsko pomeranje na δ 171,7, koje je određeno na osnovu HMBC korelacije sa signalom metil grupe na δ 2,06, što potvrđuje da je senecioli grupa vezana za C-15. U tabeli 15 data su hemijska pomeranja vodonikovih i ugljenikovih atoma za ovo jedinjenje, a 1D i 2D spektru su prikazani u prilogu 44-48.

**Tabela 15. Hemijska pomeranja ugljenikovih i vodonikovih atoma
3 β -O-acetil-15-O-senecioilamforikarpolida (17)**

	Položaj	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
	1	2,88 (br q, $J = 9,9$)	43,4
	2 α	2,41 (ddd, $J = 6,9; 6,9; 12,8$)	35,8
	2 β	1,71 (ddd, $J = 9,0; 10,5; 12,7$)	
	3 α	5,03 (ddd, $J = 6,8; 8,6; 8,6$)	75,1
	4	2,51 (m)	47,6
	5	2,29 (m)	45,5
	6	3,98 (dd, $J = 9,2, 10,6$)	84,7
	7	2,73 (m)	48,1
	8 α	2,26 (m)	
	8 β	1,39 (dddd, $J = 4,1; 11,5; 11,5; 13,2$)	30,8
	9 α	2,01 (m)	
	9 β	2,59 (ddd, $J = 4,5; 4,5; 13,0$)	35,4
	13	6,18 (d, $J = 3,5$)	119,9
	13'	5,46 (d, $J = 3,1$)	
	14	4,96 (s)	113,9
	14'	4,92 (s)	
	15	4,33 (dd, $J = 3,7; 11,4$)	62,8
	15'	4,22 (dd, $J = 4,8; 11,4$)	
	Ac ₃	2,06 (s)	21,1
		-	171,7
	2'	5,67 (s)	115,8
	3'	-	157,4
	4'	2,15 (d, $J = 0,9$ Hz)	20,2
	5'	1,89 (d, $J = 1$ Hz)	27,4



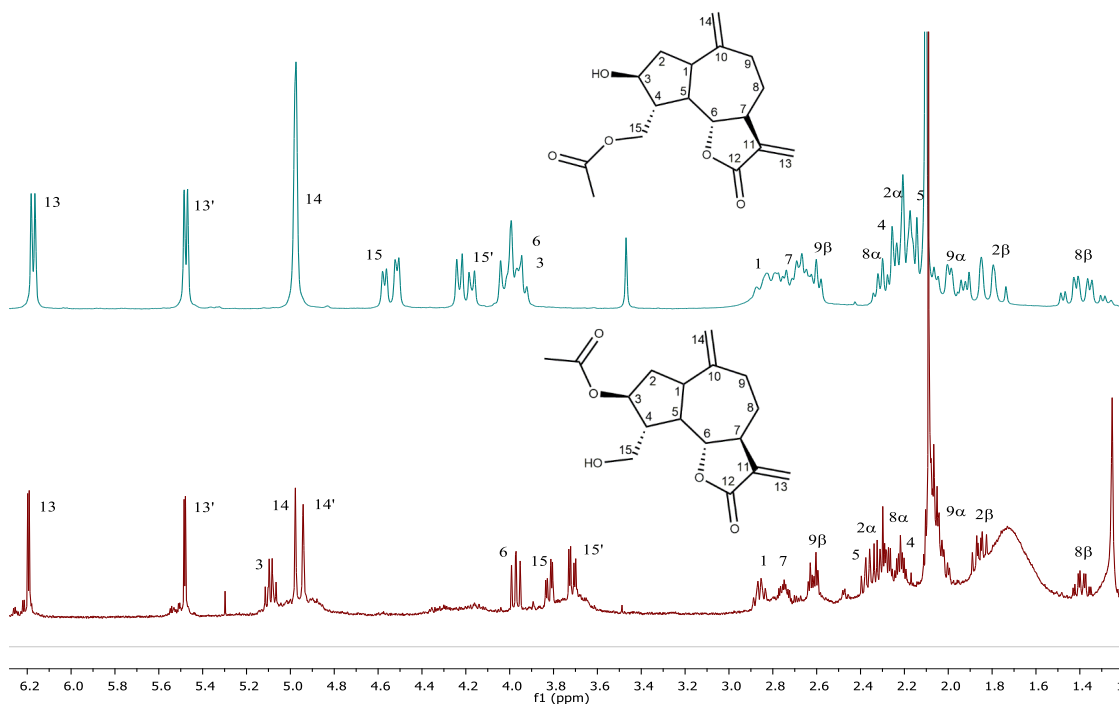
2.3.3.2. Karakterizacija 3 β -*O*-acetilamforikarpolida

Lakton **20** (3 β -*O*-acetilamforikarpolid), $[\alpha]_D^{20} +19$, izolovan je semi-preparativnom tečnom hromatografijom iz frakcije eluirane sa gravitacione kolone silika gela smešom metilenhlorid:metanol (95:5).

U infracrvenom spektru ovog jedinjenja uočene su uobičajene trake na 1763, 1734, 1664 i 1249 cm^{-1} , kao i široka traka na 3451 cm^{-1} koja ukazuje na prisustvo hidroksilne grupe.

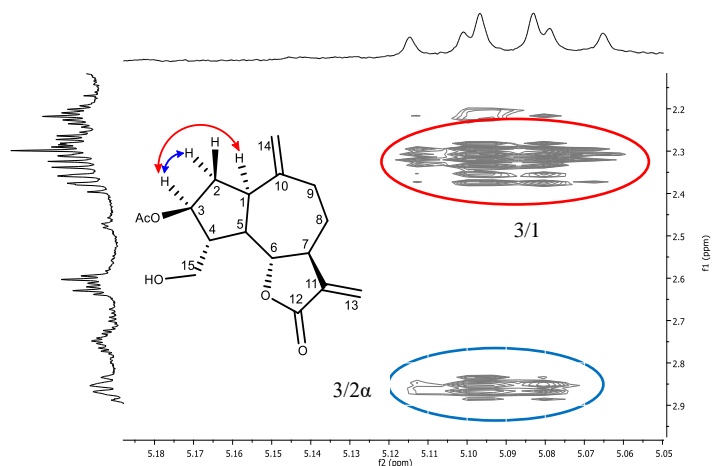
U ESI masenom spektru laktone **20** snimljenom u pozitivnom modu uočavaju se joni m/z 324,1796 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 329,1374 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 345,1122 $[\text{M}+\text{K}]^+$ joni koji ukazuju na molekulska formulu $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_5$. Ova molekulska formula identična je molekulskej formuli laktone **19** (15-*O*-acetilamforikarpolid).

Poređenjem ^1H NMR spektara ova dva laktone uočavaju se izvesne razlike, dok je veći deo spektra identičan (slika 39). Prva razlika uočava se kod signala egzometilenske grupe H_2 -14. Kod laktone **19** daju jedan singlet na δ 4,98, dok se u ^1H NMR spektru javljaju dva singleta na δ 4,98 (H-14) i δ 4,95 (H-14') i korelišu se sa ugljenikom C-14 na hemijskom pomeranju δ 113,6.



Slika 39. Uporedni prikaz ^1H NMR spektara laktone **19** i laktone **20**

Diastereotopni protoni H₂-15 daju dva dvostruka dubleta na δ 3,82 (H-15) i na δ 3,72 (H-15'). Na osnovu korelacije u HSQC spektru određeno je hemijsko pomeranje ugljenika C-15 (δ 61,55). ¹H i ¹³C Hemijska pomeranja CH₂-15 grupe su niža u odnosu na hemijska pomeranja odgovarajuće grupe laktona **19**, što ukazuje da C-15 nije esterifikovan već da se u tom položaju nalazi hidroksilna grupa.



Dublet dubleta
dubleta u spektru laktone **20**
na δ 5,09 potiče od H-3. Ovo

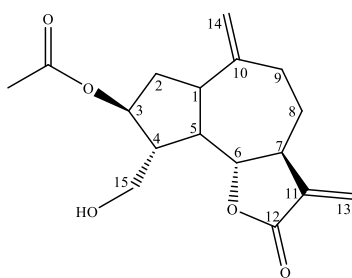
Slika 40. Deo NOESY spektra laktone 20 sa korelacijama vodonika H-3

hemijsko pomeranje ukazuje da je on u susedstvu acetoksi-grupe o čemu govori i hemijsko pomeranje ugljenika C-3 (δ 74,2) sa kojim on ima HSQC korelaciju. U NOESY spektru (sl. 40) H-3 pokazuje korelacije sa H-1 i H-2 α , što ukazuje na njegovu α -orijentaciju, to jest 3 β -položaj OAc grupe.

1D i 2D NMR spektri su prikazani u prilogu 49-53, a u tabeli 16 su prikazana hemijska pomeranja protona i ugljenika ovog jedinjenja.

Tabela 16. Hemijska pomeranja ugljenikovih i vodonikovih atoma
3 β -O-acetilamforikarpolida (20)

	Položaj	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
	1	2,86 (br q, $J = 9,8$)	42,9
	2 α	2,31 (m)	35,5
	2 β	1,86 (ddd, $J = 9,0; 9,8; 12,8$)	35,5
	3 α	5,09 (ddd, $J = 6,9; 9,0; 9,0$)	74,2
	4	2,22 (m)	51,1
	5	2,36 (ddd, $J = 8,5; 9,4; 9,4$)	45,2
	6	3,97 (dd, $J = 9,2; 10,5$)	85,4
	7	2,75 (m)	48,0
	8 α	2,27 (m)	30,9
	8 β	1,39 (dddd, $J = 4,2; 11,6; 11,6; 13,1$)	30,9
	9 α	2,03 (m)	36,0
	9 β	2,62 (ddd, $J = 4,7; 4,7; 13,1$)	36,0
	10	-	148,3
	11	-	139,5
	12	-	169,6
	13	6,19 (d, $J = 3,5$)	120,2
	13'	5,48 (d, $J = 3,2$)	120,2
	14	4,98 (s)	113,6
	14'	4,95 (s)	113,6
	15	3,82 (dd, $J = 3,7; 11,7$)	61,6
	15'	3,72 (dd, $J = 4,1; 11,6$)	61,6
	Ac ₃	-	171,6
		2,09 (s)	21,1

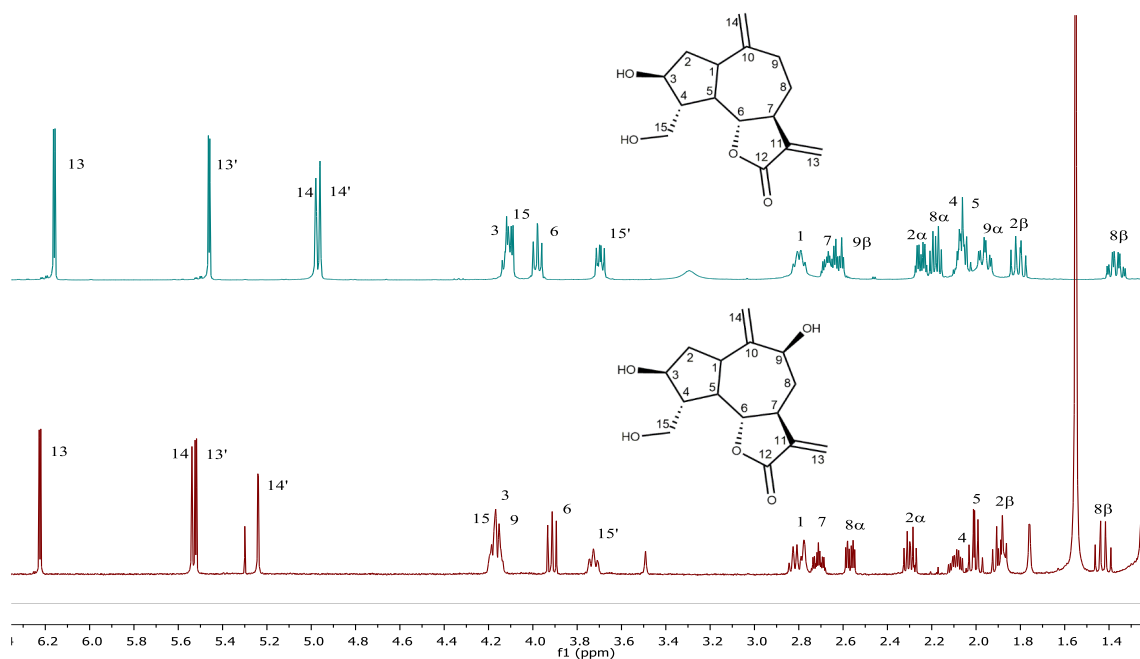


2.3.3.3. Karakterizacija 9β-hidroksiamforikarpolida

Lakton **25** (9β-hidroksiamforikarpolid), $[\alpha]_D^{20}$ -12, izolovan je iz frakcije eluirane smešom metilenhlorid:metanol (90:10) (opisano u odeljku 3.4.4.1.) semi-preparativnom tečnom hromatografijom

U infracrvenom spektru uočena je široka traka na 3368 cm^{-1} i trake na 1752 , 1667 i 1011 cm^{-1} .

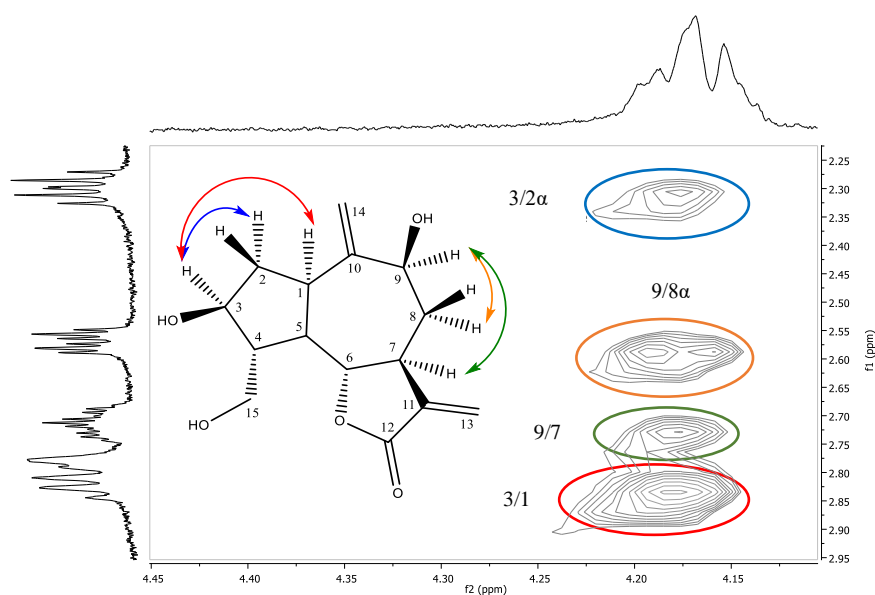
U ESI masenom spektru laktona **25** snimljenom u pozitivnom modu uočavaju se joni m/z 281,1384 $[M+H]^+$, 298,1652 $[M+NH_4]^+$, 303,1201 $[M+Na]^+$, 319,0957 $[M+K]^+$, koji ukazuju na molekulsku formulu $C_{15}H_{20}O_5$. Na osnovu ove molekulske formule zaključuje se da izolovano jedinjenje ne sadrži estarske grupe, već da je osnovna seskviterpenska srtuktura hidroksilovana.



Slika 41. Uporedni prikaz ^1H NMR spektara laktona **9** i laktona **25**

Poređenjem ^1H NMR spektara laktona **25** i **9** utvrđeno je da su spektri skoro identični (slika 41). Lakton **25** ima samo jedan kiseonik manje u odnosu na lakton **9** (amforikarpolid).

Diastereotopni protoni H₂-15 imaju hemijska pomeranja δ 4,20 (H-15) i δ 3,73 (H-15'), što odgovara 15-OH supstituciji. Signal H-15' ima oblik proširenog tripleta, usled kuplovanja sa protonima H-15 i H-4 ($J \sim 9,3$ Hz). Signal drugog protona sa C-15 (δ 65,5) je preklopljen sa signalima još dva protona što se jasno uočava u HSQC spektru. Na osnovu ovih korelacija utvrđeno je da se jedan od ovih signala nalazi na δ 4,16 i da je taj proton vezan za ugljenik čija je rezonancija na δ 76,2, dok je drugi koji je na neznatno nižem hemijskom pomeranju (δ 4,16), vezan za ugljenik sa hemijskim pomeranjem δ 74,6. Na osnovu COSY spektra određeno je da signal na hemijskom pomeranju δ 4,16 pripada protonu H-3, na šta su ukazale njegove korelacije sa signalima H-4 i H-2. Na osnovu NOESY korelacije sa vodonikom H-2 α , kao i H-1 zaključeno je da je H-3 α -orijentisan, što odgovara 3 β -OH konfiguraciji, slika 42. Treći signal iz ovog preklopljenog multiplleta koji na osnovu hemijskog pomeranja (δ 4,15) ima u susedstvu OH grupu, potiče od H-9. Na ovakvu asignaciju su ukazale njegove COSY korelacije sa susednim H₂-8 protonima. Na osnovu NOESY korelacije H-9 sa protonima H-8 α i H-7 određena mu je α -orijentacija, što odgovara 9 β -OH konfiguraciji. NOESY korelacije vodonika H-9 su prikazane na slici 42. ¹H NMR spektri laktone **25** i **9** se razlikuju u položaju signala H₂-14. Kod laktone **9** signali ove egzometilenske grupe se javljaju kao dva singleta na δ 4,96 i 4,98, dok kod laktone **25** daju jedan dublet na δ 5,24 i jedan singlet na δ 5,54 što je karakteristično za 9-susputisane amforikarpolide.

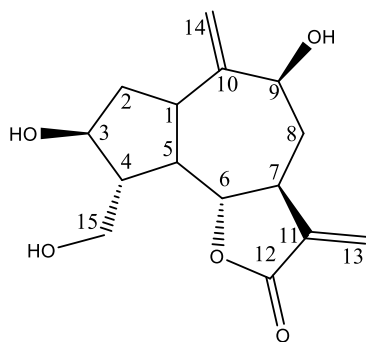


Slika 42. Deo NOESY spektra laktone **25** sa korelacijama vodonikovih atoma H-3 i H-9

U tabeli 17 data su hemijska pomeranja vodonikovih i ugljenikovih atoma za izolovani lakton **25**. 1D i 2D NMR spektri prikazani su u prilogu 54-58.

Tabela 17. Hemijska pomeranja vodonikovih i ugljenikovih atoma 9 β -hidroksiamforikarpolida (25)

	Položaj	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
	1	2,82 (br.q, $J=9,1$)	40,3
	2 α	2,30 (ddd, $J = 7,3; 7,3; 13,0$)	37,8
	2 β	1,90 (m)	
	3 α	4,19 (m)	76,2
	4	2,09 (m)	52,1
	5	2,00 (m)	46,1
	6	3,92 (dd, $J = 9,3; 10,2$)	85,3
	7	2,71 (m)	44,0
	8 α	2,57 (ddd, $J = 3,8; 3,8; 12,4$)	38,8
	8 β	1,43 (ddd, $J = 10,9; 12,4; 13,2$)	
	9 α	4,18 (m)	74,6
	10	-	153,1
	11	-	138,7
	12	-	169,6
	13	6,23 (d, $J = 3,4$)	120,8
	13'	5,52 (d, $J = 3,2$)	
	14	5,54 (s)	110,9
	14'	5,24 (d, $J = 1,4$)	
	15	4,20 (m)	65,5
	15'	3,73 (br t, $J = 9,3$)	

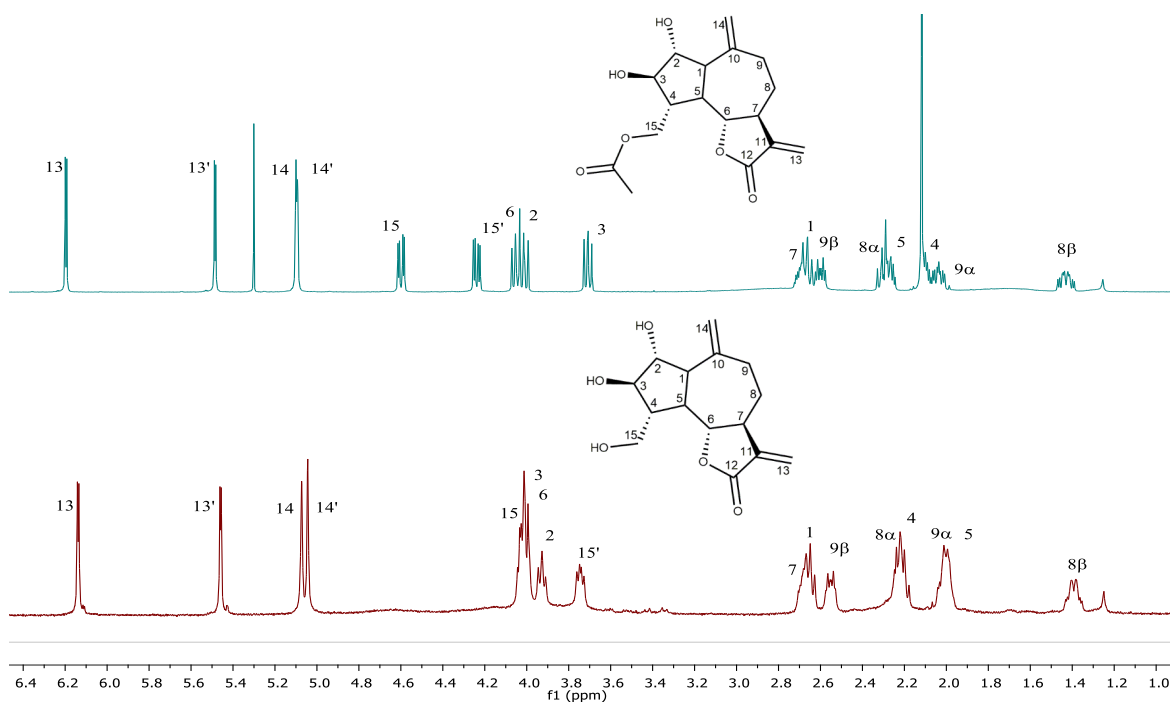


2.3.3.4. Karakterizacija 2 α -hidroksiamforikarpolida

Lakton **26** (2 α -hidroksiamforikarpolid), $[\alpha]_D^{20}$ -16, izolovan je semi-preparativnom tečnom hromatografijom iz iste frakcije kao i lakton **25**, na način prikazan u odeljku 3.4.4.1.

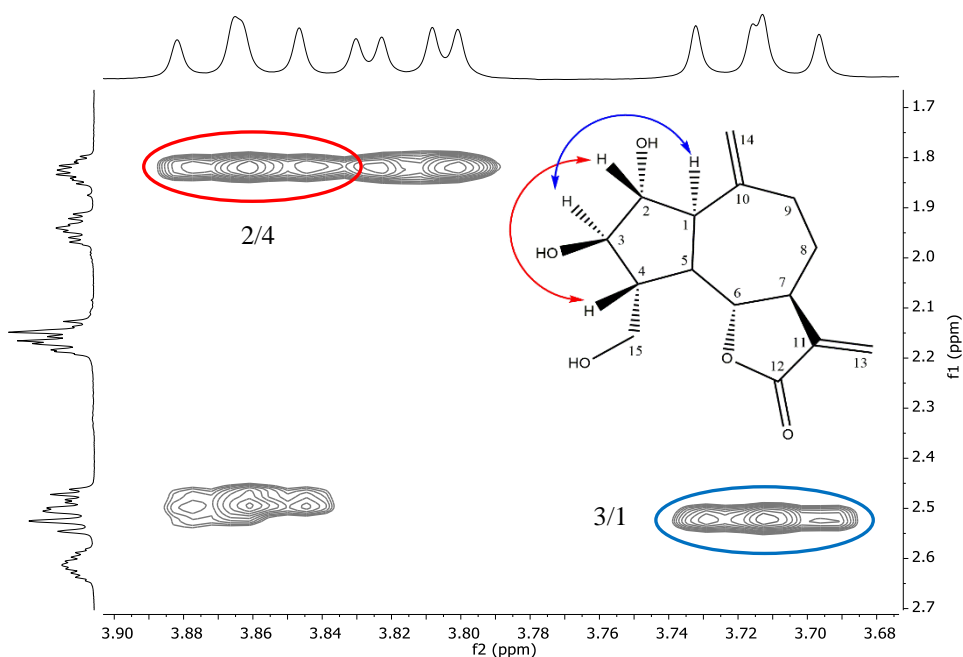
U infracrvenom spektru uočavaju se trake na 3386, 1753, 1147, 1639 i 1028 cm^{-1} .

Molekulska formula $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_5$ određena je na osnovu jona na m/z vrednosti 298,1640 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 303,1202 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 319,0943 $[\text{M}+\text{K}]^+$, dobijenih u ESI masenom spektru snimljenom u pozitivnom modu. Dobijeni joni kao i molekulska formula su isti kao kod laktone **25**, što ukazuje da ni ovaj lakton nije esterifikovan. Poređenjem i ^1H NMR spektara ova dva laktone uočene su sličnosti (slika 43). Sličnost ^1H NMR spektara laktone **26** uočena je i sa ^1H NMR spektrom laktone **24** (15-*O*-acetil-2 α -hidroksiamforikarpolid).



Slika 43. Uporedni prikaz ^1H NMR spektara laktone **24** i laktone **26**

Glavna razlika između laktona **26** i laktona **24** je izostanak acetatne grupe u položaju C-15 kod laktona **26**. Ovo potvrđuju signali H₂-15 koji se nalaze na δ 4,00 (H-15) i δ 3,74 (H-15'), što je znatno niže hemijsko pomeranje nego kod laktona **24**. U H₂QC spektru H₂-15 pokazuju korelaciju sa ugljenikom na δ 63,6 (C-15), što dodatno potvrđuje da je položaj C-15 hidroksilovan. Signal H-15 preklopljen sa signalima još dva protona. Na osnovu HSQC spektra utvrđeno je da jedan od ovih protona ima hemijsko pomeranje δ 4,01 i da je u korelaciji sa ugljenikom na δ 85,5, kao i COSY korelaciju sa signalom H-7, što je ukazalo da on potiče od laktonskog protona H-6. Drugi preklopljeni signal se nalazi na hemijskom pomeranju δ 4,02 i ima korelaciju sa ugljenikom na hemijskom pomeranju δ 77,9. Signal na δ 4,02 u COSY spektru pokazuje korelaciju sa signalom H-1, zbog čega je označen kao H-2. NOESY korelacija sa H-4 ukazuje da je on β -orijentisan (sl. 44). NOESY spektri su snimljeni uz dodatak deuterometanola u CDCl₃, što je dovelo do bolje spektralne rezolucije i razdvajanja preklopljenih signala. Na ovaj način znatno je olakšano određivanje konfiguracije. Signal protona H-3 (δ 3,39) identifikovan je na osnovu korelacija u COSY spektru sa H-2 i H-4.



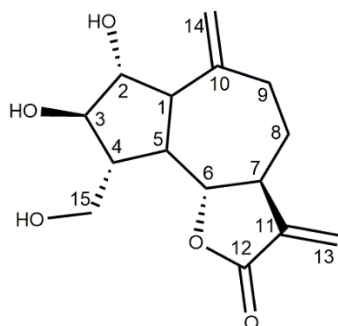
Slika 44. Deo NOESY spektra laktona **26** sa korelacijama vodonika H-2 i H-3

NOESY korelacijom sa H-1 je utvrđeno da je i on β -orijentisan (sl. 44), dok je HSQC korelacijom utvrđeno da je vezan za ugljenik na hemijskom pomeranju δ 78,8 (C-3). Na osnovu hemijskih pomeranja za vodonike H-2 i H-3, zaključeno je da se oni

nalaze pored OH koje su različito orijentisane, čime je dokazana i $2\alpha,3\beta$ -dihidroksi struktura. U tabeli 18 data su hemijska pomeranja vodonikovih i ugljenikovih atoma za izolovani 2α -hidroksiamforikarpolid, dok su njegoci 1D i 2D NMR spektri prikazani u prilogu 59-63.

Tabela 18. Hemijska pomeranja vodonikovih i ugljenikovih atoma 2α -hidroksiamforikarpolida (26)

	Položaj	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
	1	2,64 (m)	49,1
	2 β	4,02 (dd, $J = 8,6; 9,2$)	77,9
	3 β	3,39 (dd, $J = 8,3; 9,6$)	78,8
	4	1,98 (m)	47,5
	5	2,19 (m)	42,3
	6	4,01 (dd, $J = 9,1; 10,8$)	85,5
	7	2,69 (m)	47,6
	8 α	2,22 (m)	30,6
	8 β	1,39 (dddd, $J = 4,6; 11,0; 11,4; 13,0$)	30,6
	9 α	2,01 (ddd, $J = 4,6; 10,2; \sim 13$)	34,8
	9 β	2,55 (ddd, $J = 5,4; 5,4; 10,2$)	34,8
	10	-	145,7
	11	-	139,8
	12	-	170,2
	13	6,13 (d, $J = 3,4$)	120,6
	13'	5,46 (d, $J = 3,0$)	120,6
	14	5,08 14 (s)	115,0
	14'	5,05 (s)	115,0
	15	4,00 (dd, $J = 3,7; 11,0$)	63,6
	15'	3,74 (dd, $J = 5,7; 11,0$)	63,6



2.4. Određivanje bioloških aktivnosti

2.4.1. Citotoksična aktivnost ekstrakata *Amphoricarpos autariarius* ssp. *autariatus in vitro*

Citotoksična aktivnost frakcija *A. autariatus* ssp. *autariatus* ispitana je na humanim malignim ćelijskim linijama: HeLa (adenokarcinom cerviksa) i A549 (adenokarcinom pluća), *in vitro*. Postupak frakcionisanja i pripremanja frakcija za analizu opisan je detaljno u odeljaku 3.3., a postupak ispitivanja citotoksične aktivnosti prikazan u odeljku 3.5.1.

Analizirane frakcije pokazale su različitu citotoksičnu aktivnost na odabranim malignim ćelijskim linijama nakon 72 h inkubacije. Osetljivijim su se pokazale ćelije adenokarcinoma cerviksa (HeLa), dok su manje osetljive bile ćelije adenokarcinoma pluća (A 549).

Dobijeni rezultati IC₅₀ vrednosti (tabela 19), u okviru jedne ćelijske linije, ukazuju da ispitivane frakcije pokazuju različitu aktivnost. Naime, IC₅₀ vrednosti ukazuju da nepolarne frakcije (**15** i **52**), kao i najpolarnije (**26** i **27**) ne pokazuju citotoksičnu aktivnost za HeLa ćelijsku liniju. Slična pravilnost uočena i za ćelijske linije adenokarcinoma pluća. Najmanje aktivne frakcije su eluranje sa 100 % metilen-hlorida (**14**, **15** i **52**), kao frakcije (**13**, **25**, **26**, **27** i **42**) i sa sistemom metilen-hloroh:metanol 8:2 (v/v). Najveću aktivnost su pokazale frakcije koje su eluranje smešom rastvarača metilen-hlorid:metanol u odnosu 96:4, v/v. Najveću citotoksičnu aktivnost prema HeLa ćelijama ispoljile su frakcije **5**, **32**, **35**, **39**, **44**, **47** i **48**. IC₅₀ vrednosti ovih frakcija se nalazi u opsegu 8,34-9,55 µg/mL. Frakcije **34** i **36**, sa IC₅₀ vrednostima 14,46 µg/mL i 15,57 µg/mL, su pokazale najveću aktivnost prema ćelijama adenokarcinoma pluća. Prema kriterijumima Američkog nacionalnog instituta za kancer, 30 µg/mL je gornja IC₅₀ vrednost koja se smatra značajnom i obećavajućom za prečišćavanje ekstrakata.^{108,109} Za veći broj ispitivanih frakcija IC₅₀ vrednosti su ispod navedene granične vrednosti. Na osnovu dobijenih rezultata zaključuje se da frakcije biljne vrste *A. autariatus* imaju dobru do umerenu citotoksičnu aktivnost na obe testirane ćelijske linije karcinoma i da prirodni proizvodi izolovani iz ove biljne vrste imaju potencijal za dalja istraživanja.

Tabela 89. Koncentracije ekstrakata koje su za 50% inhibirale preživljavanje ćelija nakon 72 h tretmana

IC₅₀ (µg/ml)*

Br.	Šifra frakcije	HeLA	A459	Br.	Šifra frakcije	HeLA	A459	Br.	Šifra frakcije	HeLA	A459
1	2KT16-18_2	11.49±4.08	50.16±4.58	19	4KT16-16_3	14.82±0.44	18.42±5.07	37	2KT16-17_1	26.63±6.09	17.42±5.09
2	2KT16-26	47.13±3.20	69.91±3.44	20	4KT16-16_4	13.2±3.47	22.05±0.16	38	2KT16-17_2	19.1±6.36	17.02±3.34
3	KT16-29	50.4±4.96	69.84±9.78	21	4KT16-17	20.95±2.64	32.14±6.13	39	2KT16-18_1	8.94±0.09	62.61±10.76
4	3KT16-13	30.63±3.82	79.44±1.46	22	4KT16-18	32.46±1.92	61.46±1.75	40	2KT16-19	24.32±5.90	24.93±5.07
5	3KT16-16_1	8.95±1.69	22.35±0.58	23	4KT16-23	72.13±9.33	121.62±2.98	41	2KT16-21	19.25±4.70	44.55±3.45
6	3KT16-16_2	13.01±0.86	21.5±2.26	24	4KT16-29	34.7±6.90	52.98±10.40	42	2KT16-32	134.32±10.27	210±/
7	3KT16-16_3	23.4±0.20	27.23±4.15	25	4KT16-31	146.71±3.34	210±/	43	2KT16-8	137.35±2.50	128.9±1.37
8	3KT16-16_4	15.68±3.58	71.46±1.87	26	4KT16-34	200±/	220±/	44	KT16-15_1	9.15±0.65	24.16±3.77
9	3KT16-16_5	10.84±3.93	28.45±8.32	27	4KT16-37	380±/	380±/	45	KT16-15_2	14.93±6.09	16.32±3.71
10	3KT16-17	19.27±5.19	22.36±3.34	28	2KT16-10	130.8±3.87	137.59±4.79	46	KT16-15_3	20.94±1.00	47.26±2.93
11	3KT16-18	19.62±1.45	41.8±5.11	29	2KT16-15_1	23.75±4.74	19.66±2.69	47	KT16-15_4	8.91±0.55	58.22±8.93
12	3KT16-23	40.03±2.08	84.36±8.64	30	2KT16-15_2	21.92±1.55	43.55±1.10	48	KT16-15_5	8.34±0.99	18.13±4.69
13	3KT16-31	96.79±9.87	200±/	31	2KT16-15_3	13.15±2.69	21.17±2.28	49	KT16-20	27.55±5.8	43.64±3.02
14	3KT16-8	134.03±9.65	220±/	32	2KT16-15_4	9.55±1.50	46.96±4.81	50	KT16-22	16.95±6.52	42.63±6.12
15	4KT16-10	220±/	220±/	33	2KT16-15_5	21.36±0.27	16.4±5.25	51	KT16-25	38.72±1.65	41.26±1.11
16	4KT16-15	14.98±1.99	29.2±6.43	34	2KT16-16_1	21.25±6.21	14.46±5.15	52	KT16-8_1	194.33±8.03	220±/
17	4KT16-16_1	22.03±6.39	21.09±2.94	35	2KT16-16_2	8.49±0.87	34.77±10.28				
18	4KT16-16_2	22.11±8.01	38.5±10.97	36	2KT16-16_3	10.77±1.32	15.57±3.43				

* IC₅₀ vrednost je predstavljena kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD) tri nezavisna eksperimenta

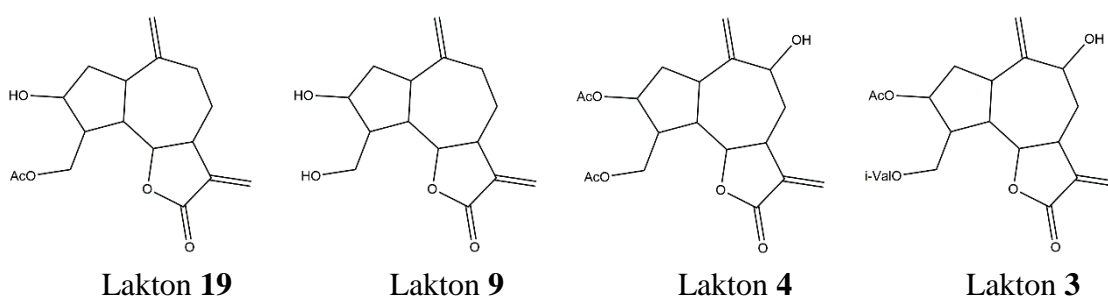
2.4.2. Protektivni efekat seskviterpenskih laktona gvajanolidnog tipa na DNK humanih limfocita

Mikronukleusi (MN) su mala jedra odvojena od glavnog ćelijskog jedra i sadrže hromosome ili njihove fragmente. Nastaju kao posledica disfunkcije deobnog vretena usled oštećenja hromozoma fizičkim ili hemijskim putem. Praćenje učestalosti mikronukleusa se često koristi kao citogenetski biomarker. Ekspresija mikronukleusa u limfocitima periferne krvi je pouzdana metoda za praćenje oštećenja hromozoma ljudi.

Kantriman i Hedl su prvi uveli test merenja oštećenja hromozoma limfocita¹¹⁰, da bi se kasnije ovaj metod unapredio metodom eksperesije mikronukleusa blokiranjem citokineze (CBMN).¹¹¹

Poslednjih decenija veliki deo istraživanja je okrenut ka identifikovanju sastojaka hrane koji mogu da zaštite DNK od oštećenja uzrokovanih kancerogenim agensima sredine. Biljni ekstrakti sadrže različite sastojke sa biološkom aktivnošću koja imaju veliki potencijal terapijskih efekata.

Ispitana su četiri seskviterpenska laktona gvajanolidnog tipa (laktoni **3**, **4**, **9** i **19**) izolovana iz *Amphoricarpos neumayeri*, sakupljene na Lovćenu. Postupak izolovanja ispitivanih amforikrpolda opisan je detaljno u eksperimentalnom delu u odeljku 3.4.4. Protektivni efekat laktona na DNK humanih limfocita određen je modifikovanom CBMN metodom (postupak opisan u odeljku 3.5.2.). Strukture ispitanih laktona su prikazane na slici 45.



Slika 45. Prikaz struktura ispitivanih laktona

Ćelijske kulture limfocita tretirane su prikazanim jedinjenjima u koncentracijama od 1, 2 i 4 $\mu\text{g/mL}$. Kao pozitivna kontrola korišćena je jedna kultura limfocita u koju je dodat amifostin koncentracije 1,0 $\mu\text{g/mL}$. U drugu kulturu je dodat mitomicin C u koncentraciji od 0,2 $\mu\text{g/mL}$ i ova kultura je korišćena kao negativna proba. Kultura ćelija bez dodatih reagenasa je služila kao kontrola. Amifostin (S-2[3-

aminopropilamino]-etilfosfotionska kiselina) je korišćen kao pozitivna kontrola. Amifostin (etiol; ranije poznat kao WR-2721) je derivat fosforilovanog cisteamina, razvijen na američkom vojnom institutu US Army Walter Reed (Washington, DC) kao radioprotektant. To je prolek koji metaboliše enzim alkalna fosfataza do aktivnog sulfhidrilnog jedinjenja sposobnog za uklanjanje slobodnih radikala generisanih zračenjem i na taj način sprečavanje oštećenja ćelija.¹¹²

Testom je određen potencijal izolovanih jedinjenja za sprečavanje nastanka mikronukleusa. Ovi mikronukleusi nisu nastali nekim posebnim tretmanom, već su posmatrani samo mikronukleusi koji nastaju zbog prisustva različitih štetnih agenasa u životnoj sredini pod datim eksperimentalnim uslovima.

Ćelijska kultura tretirana amifostinom pokazala je za 18,0 % manju učestalost mikronukleusa u odnosu na kontrolu. Kod kulture tretirane mitomicinom C došlo je do porasta broja mikronukleusa za 26,7 % u odnosu na kontrolne ćelije.

Ispitivana jedinjenja su pokazala pozitivan uticaj na smanjenje mikronukleusa. Rezultati ispitivanja su prikazani u tabeli 20. Najmanju aktivnost pri koncentraciji 1 $\mu\text{g/mL}$ pokazao je lakton **9**, koji je smanjio broj mikronukleusa za 5,5 %. Pri koncentraciji od 2 $\mu\text{g/mL}$ smanjuje broj mikronukleusa za 19,1 %, a pri koncentraciji od 4 $\mu\text{g/mL}$ za 24,9 %. Lakton **19** pokazuje nešto veći procenat smanjenja broja mikronukleusa. Pri koncentraciji 1 $\mu\text{g/mL}$ procenat smanjenja iznosi 12,4 %, dok je za koncentraciju 2 $\mu\text{g/mL}$ dobijeno 25,3 %, odnosno za 4 $\mu\text{g/mL}$ 30,0 %. Veću aktivnost postigao je lakton **3**, koji pri koncentraciji od 1 $\mu\text{g/mL}$ smanjuje broj mikronukleusa za 17,6 %. Procenat smanjenja pri koncentraciji 2 $\mu\text{g/mL}$ iznosi 27,5 %, a za 4 $\mu\text{g/mL}$ 31,9 %. Najveći procenat smanjenja pokazao je lakton **4**. Pri koncentraciji od 1 $\mu\text{g/mL}$ lakton **4** izaziva smanjenje broja mikronukleusa za 20,9 %, dok je pri većim koncentracijama i procenat smanjenja veći, za koncentraciju 2 $\mu\text{g/mL}$ iznosi 36,3 % a za koncentraciju 4 $\mu\text{g/mL}$ je 39,9%.

Tabela 20. Rezultati CBMN testa na humane limfocite

Uzorak	Koncentracija µg/ml	MN/1000 Bn ćelija	% Bn ćelija sa MN	MN/Bn ćelija	CBPI	Učestalost MN (%)
Kontrola	-	27.3 ± 0,7	2.3 ± 0.13	1.2 ± 0.05	1.7 ± 0.05	100
Amifostin	1	22.4 ± 0,6 ^a	1.8 ± 0.09	1.3 ± 0.07	1.7 ± 0.04	82.0 (18.0)
MMC	0.2	34.6 ± 0,9 ^{a,b}	3.1 ± 0.17	1.1 ± 0.03	1.7 ± 0.05	126.7 (-26.7)
	1	23.9 ± 0,5 ^{a,c}	1.2 ± 0,14	1.3 ± 0,10	1.6 ± 0,02	87.6 (12.4)
	2	20.4 ± 0,9 ^{a,c}	1.6 ± 0.13	1.2 ± 0.04	1.7 ± 0.05	74.7 (25.3)
19	4	19.1 ± 0,6 ^{a,b,c}	1.5 ± 0.08	1.2 ± 0.07	1.6 ± 0.01	70.0 (30.0)
	1	25.8 ± 0,6 ^{b,c}	2.1 ± 0.12	1.2 ± 0.06	1.6 ± 0.01	94.5 (5.5)
	2	22.1 ± 0,9 ^{a,c}	1.8 ± 0.06	1.2 ± 0.04	1.6 ± 0.02	80.9 (19.1)
9	4	20.5 ± 1,1 ^{a,c}	1.7 ± 0.13	1.2 ± 0.10	1.6 ± 0.03	75.1 (24.9)
	1	21.6 ± 0,5 ^{a,c}	1.7 ± 0,12	1.2 ± 0,06	1.6 ± 0,02	79.1 (20.9)
	2	17.4 ± 0,4 ^{a,b,c}	1.5 ± 0.04	1.2 ± 0.03	1.6 ± 0.02	63.7 (36.3)
4	4	16.4 ± 0,9 ^{a,b,c}	1.4 ± 0.14	1.2 ± 0.09	1.6 ± 0.02	60.1 (39.9)
	1	22.5 ± 0,4 ^{a,c}	1.7 ± 0.04	1.3 ± 0.06	1.7 ± 0.04	82.4 (17.6)
	2	19.8 ± 0,8 ^{a,b*,c}	1.7 ± 0.07	1.1 ± 0.05	1.6 ± 0.03	72.5 (27)
3	4	18.6 ± 1,2 ^{a,b*,c}	1.6 ± 0.10	1.1 ± 0.09	1.6 ± 0.02	68.1 (31.9)

MN/Bn cells – učestalost mikronukleusa po binuklearnoj ćeliji

CBPI – poliferacioni indeks blokiranosti citokineze

% BN ćelija sa mikronukleusima

MN/1000 Bn ćelija - učestalost mikronukleusa u 1000 binuklearnih ćelija

Učestalost MN – učestalost mikronukleusa u ćelijskim kulturama limfocita tretiranih različitim koncentracijama ispitivanih jedinjenja. Izražena je kao procenat u odnosu na kontrolnu grupu.

Razlika je smatrana statistički značajnom između podataka parova i izvedena je analizom varijanse (One-way ANOVA) za kojom je sledio Turkey test. Statistička razlika smatrana je značajnom za $p < 0,01$.

^a U poređenju sa kontrolnom grupom, statistički značajna razlika $p < 0,01$.

^{a*} U poređenju sa kontrolnom grupom, statistička značajna razlika $p < 0,05$.

^b U poređenju sa amifostinom, statistički značajna razlika $p < 0,01$.

^{b*} U poređenju sa amifostinom, statistički značajna razlika $p < 0,05$.

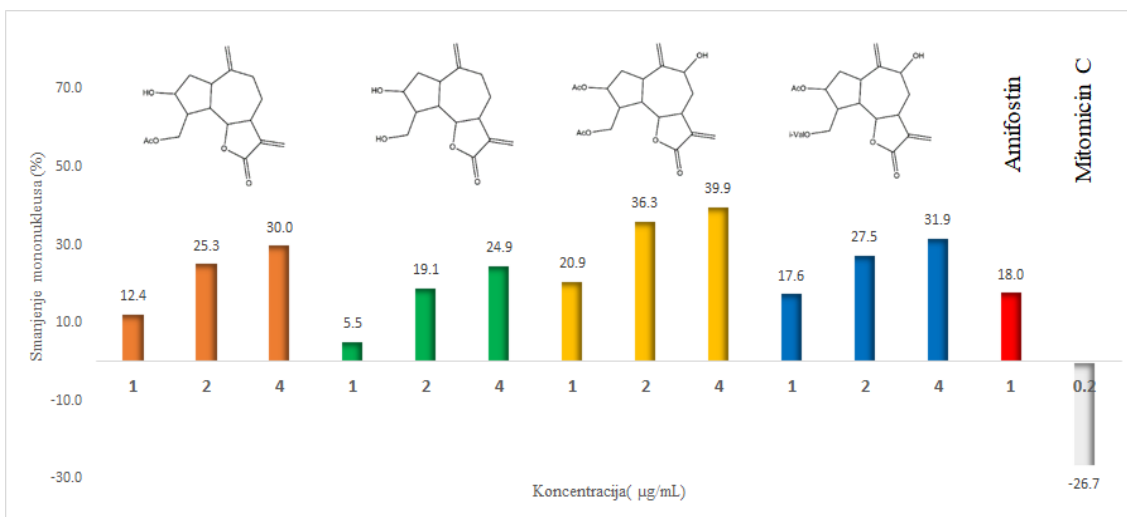
^c U poređenju sa mitomicinom C, statistički značajna razlika $p < 0,01$.

^{c*} U poređenju sa mitomicinom C, statistički značajna razlika $p < 0,05$.

Poređenjem aktivnosti izolovanih jedinjenja sa protektivnom aktivnošću amifostina zaključuje se da bolju aktivnost ispoljavaju laktoni kod kojih je oksigenovan položaj devet. Laktoni **3** i **4** pokazali su aktivnost blisku amifostinu (pri istoj koncentraciji), čak lakton **4** dovodi do većeg procenta smanjenja broja mikronukleusa od amifostina. Preostali par testiranih laktona, takođe, je pokazao zaštitnu aktivnost, ali u manjoj meri nego amifostin. Pri većim koncentracijama (2 µg/mL) pokazuju aktivnost

blisku vrednosti dobijenu za amifostin. Dobijeni rezultat ukazuje da hidroksilna grupa u položaju devet dovodi do pojačane protektivne aktivnosti.

Uočen je i trend porasta aktivnosti sa porastom koncentracije ispitivanih jedinjenja kojom se delovalo na limfocite, slika 46. U CBMN testu sa povećanim koncentracijama (od 1,0 do 4,0 $\mu\text{g/mL}$) nivo mikronukleusa u humanim limfocitima je smanjen, što je omogućilo bolju zaštitu od hromozomskih oštećenja.



Slika 46. Grafički prikaz zavisnosti smanjenja % mononukleusa od koncentracije

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Aparati i rastvarači

- Specifična rotacija $[\alpha]_D^{20}$ izolovanih jedinjenja je određena na polarimetru *Rudolph Research Analytical AUTOPOL® IV* (ćelija, odnosno optički put dužine 1 dm, kao rastvarač je korišćen metanol).
- IC spektri su snimljeni na IC spektrometru *Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR*, tehnikama tečnog filma ili ATR.
- NMR spektri su snimljeni na spektrometrima *Varian Gemini 2000* (200 MHz za ^1H i 50 MHz za ^{13}C) i *Bruker Avance III 500* (500 MHz za ^1H i 125 MHz za ^{13}C). Hemijska pomeranja su izražena u δ jedinicama, a konstante kuplovanja (J) u Hz. Od rastvarača su korišćeni CDCl_3 , D_2O , CD_3OD i TMS kao standard.
- Maseni spektri visoke rezolucije snimljeni su na LC/MS sistemu *HPLC 1200 Series (Agilent Technologies)-6210 Time-of-Flight LC/MS (Agilent Technologies)* u uslovima elektrosprej jonizacije. Za sakupljanje i obradu podataka korišćen je MassHunter Workstation software.
- Za razdvajanje komponenti rastvorljivih u metanolu korišćena je semi-preparativna tečna hromatografija na HPLC sistemu *1000 Series Agilent Technologies*, opremljen DAD detektorom i autosemplerom.
- Za dry-column flash hromatografiju korišćen je silika gel veličine čestica ispod 0,08 mm, (Merck). Hromatografija na koloni (CC) izvršena je na silika gelu veličine čestica 0,063–0,200 mm, (Merck). Eluiranje je postignuto pogodnim sistemom rastvarača. Analitička tankoslojna hromatografija (TLC) izvršena je na aluminijumskim pločama debljine 0,25 mm (AL TLC silica gel 60 F₂₅₄, Merck).

Za ekstrakcije i frakcionisanje ekstrakata su korišćeni metanol, etilacetat, dietil-etar, metilen-hlorid i heksan koji su pre upotrebe prečišćeni destilacijom, a za prečišćavanje komponenti visoko efikasnom tečnom hromatografijom korišćeni su metanol i acetonitril HPLC čistoće i dejonizovana voda.

3.2. Priprema uzoraka za metabolomičku analizu vrsta roda *Amphoricarpos*

3.2.1. Biljni materijal

Biljni materijal je prikupljan u fazi cvetanja u julu 2014, u Crnoj Gori na sedam različitih lokaliteta. U kanjonu reke Tare je sakupljeno šesnaest uzoraka, na lokalitetu Vratlo, na Planinici i na Visitoru prikupljeno je po četiri uzorka, na planinama Orjen četrnaest, Lovćenu jedanaest i na Sinjajevini pet uzoraka.

Identifikacija je izvršena, prema Blečiću i Mayeru,¹ u Botaničkoj bašti „Jevremovac”, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, gde su zavedeni herbarijumski primerci. U tabeli 21 su prikazane identifikovani taksoni, njihovi vaučeri, kao i lokaliteti na kom su prikupljeni uzorci.

Tabela 21. Prikaz biljnih vrsta *Amphoricarpos* i lokaliteta na kom su sakupljene

Broj vaučera	Takson	Lokalitet
17114	<i>A. autariatus</i> ssp. <i>bertisceus</i> (Blečić et Mayer)	Sinjajevina
17115	<i>A. neumayeri</i> (Blečić et Mayer)	Lovćen
17116	<i>A. autariatus</i> ssp. <i>autariatus</i> (Blečić et Mayer)	Kanjon Tare
17117	<i>A. autariatus</i> ssp. <i>bertisceus</i> (Blečić et Mayer)	Planinica
17118	<i>A. autariatus</i> ssp. <i>bertisceus</i> (Blečić et Mayer)	Vratlo
17119	<i>A. autariatus</i> ssp. <i>bertisceus</i> (Blečić et Mayer)	Visitor
17120	<i>A. neumayeri</i> (Blečić et Mayer)	Orjen

3.2.2. Priprema uzoraka

Prilikom prikupljanja biljnog materijala, sveži listovi su odmah smeštani u hermetički zatvorene plastične kesice sa anhidrovanim silika gelom. Na svaka 24 h silika gel je zamenjivan i na taj način su sušeni i čuvani uzorci do analize. Suvi listovi su samleveni u mikromlinu sa dodatkom tečnog azota. Odmeravano je po 40 mg samlevenog uzorka u ependorf epruvete od 2 ml. Ekstrakcija je izvršena sa 400 μ L pufera (90 mM KH_2PO_4 u D_2O) i 400 μ L deuterio-metanola. Smeša je 30 sekundi mešana na vorteksu i ekstrahovana na ultrazvučnom kupatilu pet minuta. Nakon

ekstrakcije, uzorci su centrifugirani pet minuta na 13.400 RPM na sobnoj temperaturi. Supernatant je koji je odvojen od taloga bio pripremljen za dalju NMR analizu.

3.2.3. Snimanje spektara i obrada podataka

Svi NMR spektri snimljeni su na *Bruker Avance III 500 NMR* spektrometru, radne frekvencije 500,26 MHz za ^1H jezgro. Za potrebe snimanja ^1H NMR spektara, prikupljeno je 32k tačaka pulsnim programom presaturacije “zgpr” sa 96 skanova, sa spektralnom širinom 6009,6 Hz i vremenom relaksacije od 1,5 s. 2D NMR spektri su snimljeni standardnim pulsnim sekvencama. 1D i 2D spektri su obrađeni u programu TopSpin, a zatim izvršeno manuelno podešavanje faze, korekcija bazne linije i binning u MestReNova programu.

Spektri, pripremljeni na ovakav način, su dalje podvrgnuti statističkoj multivarijantnoj analizi, za koju je korišćen program SIMCA. Spektralni podaci su normalizovani na ukupnu površinu, izvršeno je centriranje (engl. mean centering), kao i pareto skaliranje. Oblasti δ 3,30-3,32 i δ 4,97-4,87 su isključene iz analize zbog prisustva signala metanola i vode. Primenjena je analiza glavnih komponenti (PCA) kao i metoda diskriminantne ortogonalne parcijalne regresije najmanjih kvadrata (OPLS-DA). Dobijeni rezultati su prikazani u 2.1.

3.3. Priprema uzoraka za metabolomičko određivanje biološki aktivnih komponenti ekstrakta *Amphoricarpos autariatus* ssp. *autariatus*

3.3.1. Biljni materijal

Biljni materijal je prikupljen u Crnoj Gori, u Kanjonu Tare, u junu 2016 godine u fazi cvetanja. Identifikacija je izvršena, prema Blečiću i Mayeru,¹ u Botaničkoj bašti „Jevremovac”, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu. Herbarijumski primerak je zaveden pod brojem 17116. Sakupljen materijal pripada biljnoj vrsti *A. autariatus* ssp. *autariatus*.

3.3.2. Priprema uzorka

Nadzemni deo biljke (osušen na vazduhu) je samleven (m=79,00 g) i ekstrahovan sa 1 L smeše MeOH:CH₂Cl₂ (1:1, v/v). Ekstrakcija je vršena 15 minuta na ultrazvučnom kupatilu. Ekstrakt je proceden kroz nabrani filter papir i uparen do suva na rotacionom vakuum uparivaču. Biljni material je reekstrahovan još dva puta na isti način na koji je vršena ekstrakcija. Dobijeni ekstrakti su spojeni i ukupna masa dobijenog ekstrakta iznosila je 4,5603 g. Ovako pripremljen ekstrakt je dalje frakcionisan dry-column flash hromatografijom.

3.3.2.1. Frakcionisanje ekstrakta brzom hromatografijom na suvoj koloni (dry-column flash chromatography)

Pripremljeni ekstrakt *A. autariatus* ssp. *autariatus* frakcionisan je na koloni formiranoj od silika gela (80,00 g), visine stuba 22,00 cm i prečnika 3,20 cm. Kolona je ekvilibrisana četiri puta sa po 50 ml CH₂Cl₂. Na pripremljenu kolonu nanešen je ekstrakt (1,00 g) suspendovan na 4,00 g silika gela. Eluiranje je vršeno gradijentno, pri čemu je eluiranje započeto sa 100 % CH₂Cl₂, a zatim je polarnost postepeno povećavana sa metanolom do 20 %. Zapremina sakupljenih frakcija iznosila je 100 ml. Tok frakcionisanja je prikazan u tabeli 22. Isti postupak frakcionisanja ponovljen je još tri puta.

Tabela 22. Tok frakcionisanja ekstrakta *A. autariatus* ssp. *autariatus*

CH ₂ Cl ₂ (%)	MeOH (%)	CH ₂ Cl ₂ (%)	MeOH (%)	CH ₂ Cl ₂ (%)	MeOH (%)	CH ₂ Cl ₂ (%)	MeOH (%)
100	0	98	2	96	4	85	15
100	0	98	2	95	5	85	15
100	0	98	2	95	5	80	20
100	0	97	3	95	5	80	20
99	1	97	3	95	5	80	20
99	1	96	4	93	7	80	20
99	1	96	4	93	7	80	20
99	1	96	4	90	10	80	20
98	2	96	4	90	10	80	20

Dobijene frakcije su analizirane tankoslojnom hromatografijom. Vizuelizacija je izvršena pomoću UV lampe i izazivanjem TLC pločice koncentrovanom sumpornom kiselinom, a potom zagrevanjem. Nakon TLC analize slične frakcije su spojene i selektovane za dalje analize. Dalje su analizirane 52 frakcije dobijene nakon sva četiri frakcionisanja ekstrakta na suvoj koloni.

3.3.3. Snimanje spektara i obrada podataka

Frakcije su rastvorene u deuterio-dimetilsulfoksidu u ependorf epruvetama od 2 ml. Koncentracija svih rastvora je iznosila 60 mg/mL. Rastvori si izmešani na vorteksu u toku 30 sekundi, a zatim je 15 minuta vršena ultrazvučna ekstrakcija. Nakon ekstrakcije rastvori su centrifugirani pet minuta na 13.400 RPM na sobnoj temperaturi. Supernatant je odvojen od taloga i dalje je analiziran. Snimljeni su NMR spektri frakcija, a zatim je određena citotoksična aktivnost na ćelijske linije adenokarcinoma cerviksa (HeLa) i adenokarcinoma pluća (A549). Nakon snimanja NMR spektara i određivanja citotoksične aktivnosti, snimljeni su infracrveni spektri frakcija. Pre snimanja ovih spektara bilo je potrebno ukloniti DMSO, što je postignuto liofilizacijom.

NMR spektri snimljeni su na *Bruker Avance III 500 NMR* spektrometru, radne frekvencije 500,26 MHz za ¹H jezgro. Za potrebe snimanja ¹H NMR spektara, prikupljeno je 32k tačaka pulsnim programom presaturacije “zgpr” sa 64 skanova, sa spektralnom širinom 9014.4 Hz i vremenom relaksacije od 1.5 s. Signal DMSO-*d*₅ je korišćen kao referentni. 2D NMR spektri su snimljeni standradnim pulsnim

sekvencama. NMR spektri su obrađeni u programu TopSpin, a zatim je izvršeno manualno podešavanje faze, korekcija bazne linije i binning u MestReNova programu.

Spektri su dalje podvrgnuti statističkoj multivarijantnoj analizi, za koju je korišćen program SIMCA. Spektralni podaci su normalizovani na ukupnu površinu, izvršeno je centriranje (engl. mean centering), kao i pareto skaliranje. Oblasti δ 2,48-2,56 i δ 3,12-3,64 su isključene iz analize zbog prisustva signala DMSO- d_5 i vode. Za korelaciju spektralnih podataka i citotoksične aktivnosti primenjena je metoda ortogonalne parcijalne regresije najmanjih kvadrata (OPLS), čiji su rezultati prikazani u odeljku 2.2.2.

Infracrveni spektri liofilizata su snimljeni ATR tehnikom na spektrometru *Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR*. Spektri su snimljeni u opsegu 4000-600 cm^{-1} , u rezoluciji 2 cm^{-1} . Spektar pozadine je sniman pre svakog uzorka sa 32 skana, dok su uzorci snimani sa 64 skana. Nakon snimanja spektri su obrađeni u program Omnic 7.0.. Izvršena je automatska korekcija bazne linije, smutovanje (smooth na 8 cm^{-1}), kao i binning na 8.0. Obradeni spektri su dalje korišćeni za multivarijantnu analizu, za koju je korišćen program SIMCA. Spektralni podaci su normalizovani metodom SNV (engl. Standard Normal Variate) metodom i pareto skalirani. Za korelaciju spektralnih podataka i citotoksične aktivnosti primenjena je metoda ortogonalne parcijalne regresije najmanjih kvadrata (OPLS), čiji su rezultati prikazani u odeljku 2.2.1.

3.4. Izolovanje seskviterpenskih laktona iz vrsta roda *Amphoricarpos*

3.4.1. Biljni materijal

Biljni materijal je sakupljan u Crnoj Gori u junu 2011. godine u fazi cvetanja, na dva različita lokaliteta. Na planini Zeletin, iznad Andrijevice sakupljen je, prema Blečiću i Mayeru,¹ *A. autariatus* ssp. *bertisceus*. Identifikacija je izvršena u Prirodnjačkom muzeju Crne Gore u Podgorici, a herbarijumski primerak je zaveden pod brojem No. 2502. U kanjonu Tare sakupljen je *A. autariatus* ssp. *autariatus* (Blečić i Mayer),¹ koji je identifikovan u Botaničkoj bašti „Jevremovac”, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu. Herbarijumski primerak je zaveden pod brojem BEOU 16631.

Na planini Lovćen u avgustu 2014. godine u fazi cvetanja sakupljen je *A. neumayerii*, prema Blečiću i Mayeru.¹ Identifikacija je izvršena u Botaničkoj bašti „Jevremovac”, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu. Herbarijumski primerak je deponovan pod brojem BEOU 17115.

3.4.2. Izolovanje seskviterpenskih laktona iz vrste *Amphoricarpos autariatus* ssp. *autariatus* sa lokaliteta kanjona Tare

3.4.2.1. Ekstrakcija i frakcionisanje ekstrakta

Nadzemni deo biljke (listovi, stablo, cvetovi) osušen na vazduhu mase 100,08 g je ekstrahovan sa 1 L metilen-hlorida. Ekstrakcija je vršena 10 minuta na ultrazvučnom kupatilu. Ekstrakt je proceden kroz nabrani filter-papir, potom je rastvarač u potpunosti uklonjen uparavanjem na rotacionom vakuum-uparivaču. Preostali suvi ostatak, mase 2,759 g, je rastvoren u 200 mL smeše metanol-heksan (1:1, V/V). Nakon tečno-tečne ekstrakcije metanolni sloj je odvojen od heksanskog, a zatim je heksanski sloj reekstrahovan sa još 100 mL metanola. Metanolni slojevi su spojeni i metanol je u potpunosti uklonjen na rotacionom vakuum-uparivaču. Dobijeno je 0,513 g metanolog ekstrakta.

Metanolni ekstrakt je dalje frakcionisan dry-column flash hromatografijom na koloni silika gela dimenzija 127×16 mm. Eluiranje je započeto sa 100% heksana, da bi

se udeo heksana gradijentno smanjivao dietil-etrom, do 100% dietil-etra. Polarnost je dalje povećavana gradijentno sve do 30% metanola. Tok frakcionisanja je prikazan u tabeli 23. Zapremina sakupljenih frakcija je iznosila 100 mL pri čemu je dobijeno 16 frakcija.

Dobijene frakcije su analizirane tankoslojnom hromatografijom uz UV detekciju na 254 nm i izazivanjem koncentrovanom sumpornom kiselinom, a zatim i zagrevanjem. Slične frakcije su spojene i dalje prečišćavane gravitacionom kolonskom hromatografijom i semi-preparativnom hromatografijom.

Tabela 23. Tok dry-column flash hromatografije

Eluent	Procentni sadržaj	Oznaka frakcije
Heksan – dietiletar	10:0	KT – 1
Heksan – dietiletar	90:10	KT – 2
Heksan – dietiletar	80:20	KT – 3
Heksan – dietiletar	70:30	KT – 4
Heksan – dietiletar	60:40	KT – 5
Heksan – dietiletar	50:50	KT – 6
Heksan – dietiletar	40:60	KT – 7
Heksan – dietiletar	30:70	KT – 8
Heksan – dietiletar	20:80	KT – 9
Heksan – dietiletar	10:90	KT – 10
Heksan – dietiletar	0:100	KT – 11
Dietiletar – metanol	95:5	KT – 12
Dietiletar – metanol	90:10	KT – 13
Dietiletar – metanol	90:10	KT – 14
Dietiletar – metanol	90:10	KT – 15
Dietiletar – metanol	70:30	KT – 16

Frakcije **KT-9**, **KT-10**, **KT-12** i **KT-14** su razdvajane gravitacionom kolonskom hromatografijom na isti način. Frakcionisanje je izvršeno na stubu silika gela dimenzija 1,2×30,0 cm. Eluiranje je vršeno gradijentno metilen-hloridom i metanolom. Početni elucioni sistem je bio 100% metilen-hlorida, a zatim je polarnost povećavana udelom metanola do 6%. Tok hromatografije prikazan je u tabeli 24.

Tabela 24. Tok gravitacione hromatografije frakcija KT-9, KT-10, KT-12 i KT-14

CH₂Cl₂ (%)	Metanol (%)	Zapremina eluenta (mL)
100	0	100
99	1	100
98	2	100
97	3	100
96	4	100
95	5	100
94	6	100

Zapremina svake elucione smeše je iznosila 100 mL, a sakupljane su frakcije od po 5 mL. Sakupljeno po 120 frakcija, koje su analizirane tankoslojnom hromatografijom uz UV detekciju na 254 nm i izazivanjem koncentrovanom sumpornom kiselinom i zagrevanjem, na osnovu koje su slične frakcije su spojene. Dalje su semi-preparativnom hromatografijom prečišćavane frakcije **KT-9/39**, **KT-10/45**, **KT-14/42** eluirane sa 98% CH₂Cl₂, kao i frakcije **KT-14/64** i **KT-12/43** eluirane sa 97% CH₂Cl₂.

3.4.2.2. Izolovanje laktone semi-preparativnom tečnom hromatografijom

Komponente svih frakcija su razdvajane semi-preparativnom reverzno-faznom tečnom hromatografijom. Za razdvajanje komponenti korišćena je HPLC sistem *1000 Series Agilent Technologies*, opremljen DAD detektorom i autosemplerom. Sve frakcije su rastvarane u metanolu HPLC čistoće. Razdvajanje komponenti metanolnih rastvora je postignuto primenom kolone Zorbax Eclipse C-18 (250×9,4 mm; 5 μm) na 20 °C pri konstantnom protoku od 4 mL/min. Detekcija je vršena na 210 nm, UV spektri su snimani u opsegu od 190 do 450 nm.

Frakcije **KT-9/39**, **KT-10/45**, **KT-12/43**, **KT-13**, **KT-14/42** i **KT-14/64** su razdvajane pod istim uslovima. Za prečišćavanje nevedenih frakcija pripremljeni su metanolni rastvori koncentracije C=10 mg/mL. Kao mobilna faza korišćena je smeša vode (A) i acetonitrila (B) po programu prikazanom u tabeli 25.

Tabela 25. HPLC program za razdvajanje frakcija KT-9/39, KT-10/45, KT-12/43, KT-13, KT-14/42 i KT-14/64

t (min)	A (H ₂ O), %	B (MeCN), %
0	90	10
5	90	10
20	65	35
30	65	35
40	50	50
60	50	50
61	90	10

Prečišćavano je 6,3 mg frakcije **KT-9/39** i izolovano jedno jedinjenje u čistom stanju. Jedinjenje je eluirano na retencionom vremenu 45,2 min. i dobijeno je 0,5 mg ovog laktona. Poređenjem ¹H NMR spektra ovog jedinjenja sa literaturnim podacima^{96,97} utvrđeno je da je izolovani lakton **1** (3,15-*O*-diacetilamforikarpolid) poznat. ¹H NMR spektar laktona **1** prikazan je na slici 34.

Prečišćavano je 8,4 mg frakcije **KT-10/45**. Jedinjenje, eluirano na retencionom vremenu 41,8 min., izolovano je u čistom stanju. Izolovano je 2,9 mg laktona **2**, 3,15-*O*-diacetil-2 α -acetoksiamforikarpolida. Poređenjem ¹H NMR spektra ovog jedinjenja sa literaturnim podacima^{96,97} utvrđeno je da je izolovani lakton poznat. ¹H NMR spektar laktona **2** dat je u prilogu 64.

Razdvajanjem 1,8 mg frakcije **KT-12/43** izolovan je lakton (**3**)15-*O*-izovaleroil-3-*O*-acetil-9 β -hidroksiamforikarpolid u čistom stanju, na retencionom vremenu 40,0 min. Izolovano je 0,3 mg. Poređenjem ¹H NMR spektra ovog jedinjenja sa literaturnim podacima^{96,97} utvrđeno je da je izolovani lakton **3** poznat. Na slici 33 prikazan je ¹H NMR spektar laktona **3**.

Frakcionisano je 157,7 mg **KT-13**. Izolovana su četiri jedinjenja. Jedinjenja, sakupljana na retencionim vremenima 23,8 min. (lakton **4**, 3,15-*O*-diacetil-9 β -hidroksiamforikarpolid) i 40,2 min. (lakton **3**), su izolovana u čistom stanju i prema literaturnim podacima^{96,97} do sada su izolovana. ¹H NMR spektar laktona **3** prikazan je na slici 33, a laktona **4** na slici 28. Izolovano je 48,8 mg laktona **3** i 73,4 mg laktona **4**. Za jedinjenje čije je retenciono vreme 27,2 min., se ispostavilo da nema literaturnih podataka i da je po prvi put izolovan seskviterpenski lakton **5** (3,15-di-*O*-acetil-9 α -hidroksiamforikarpolid), kao i za jedinjenje na retencionom vremenu 38,4 minuta (lakton **6**, 3-*O*-acetil-9 β -hidroksi-15-*O*-senecioilamforikarpolid). Oba jedinjenja su

izolovana u veoma čistom stanju. Izolovano je 1,7 mg laktona **5** i 1,6 mg laktona **6**. Za jedinjenja koja su izolovana prvi put snimljeni su IC, ^1H , ^{13}C i 2D NMR spektri, kao i maseni spektri jedinjenja. Izmerena je i njihova specifična rotacija.

Prečišćavanjem 17,8 mg frakcije **KT-14/42** sakupljeno je samo jedno jedinjenje na retencionom vremenu 23,8 min. Jedinjenje je izolovano je u čistom stanju (lakton **4**) i dobijeno je 11,6 mg. Poređenjem ^1H NMR spektra (sl. 28) sa literaturnim podacima^{96,97} određena je struktura i potvrđeno da je jedinjenje poznato.

Razdvajano je 18,5 mg frakcije **KT-14/64** i izolovan je lakton **7** (15-*O*-acetil-9 β -hidroksiamforikarpolid) u čistom stanju. Eluiran je na retencionom vremenu 16,1 min. i izolovano je 9,9 mg. Na osnovu literaturnih podataka^{96,97} utvrđeno je da je izolovani lakton poznat. ^1H NMR spektar laktona **7** dat je u prilogu 65.

3.4.3. Izolovanje seskviterpenskih laktona iz vrste *Amphoricarpos autariatus* ssp. *bertisceus* sa lokaliteta planine Zeletin

3.4.3.1. Ekstrakcija i frakcionisanje ekstrakta

Nadzemni deo biljke mase 22,31 g pripremljen je na isti način kao što je opisano u odeljku 3.4.2.1. Dobijeno je 0,5943 g metanolnog ekstrakta koji je dalje frakcionisan dry-column flash hromatografijom na koloni silika gela dimenzija 145 × 17,5 mm. Eluiranje je započeto sa 100% heksana, da bi se udeo heksana gradijentno smanjivao etil-acetatom do 100% etil-acetata, a zatim je polarnost povećavana gradijentno sve do 10% metanola. Tok frakcionisanja je prikazan u tabeli 26. Zapremina sakupljenih frakcija je iznosila 15 mL, koje su analizirane tankoslojnom hromatografijom uz UV detekciju na 254 nm i izazivanjem koncentrovanom sumpornom kiselinom i zagrevanjem. Slične frakcije su spojene, pri čemu je dobijeno 14 frakcija koje su dalje prečišćavane semi-preparativnom hromatografijom.

Tabela 26. Tok dry-column flash hromatografije

Eluent	Procentni sadržaj	Oznaka frakcije
Heksan – etil-acetat	10:0	Z – 1
Heksan – etil-acetat	90:10	Z – 2
Heksan – etil-acetat	80:20	Z – 3
Heksan – etil-acetat	70:30	Z – 4
Heksan – etil-acetat	60:40	Z – 5
Heksan – etil-acetat	50:50	Z – 6
Heksan – etil-acetat	40:60	Z – 7
Heksan – etil-acetat	30:70	Z – 8
Heksan – etil-acetat	20:80	Z – 9
Heksan – etil-acetat	10:90	Z – 10
Heksan – etil-acetat	0:100	Z – 11
Etil-acetat – metanol	95:5	Z – 12
Etil-acetat – metanol	90:10	Z – 13
Etil-acetat – metanol	90:10	Z – 14

3.4.3.2. Izolovanje laktona semi-preparativnom tečnom hromatografijom

Komponente svih frakcija su razdvajane semi-preparativnom reverzno-faznom tečnom hromatografijom. Za razdvajanje komponenti korišćen je HPLC sistem *1000 Series Agilent Technologies*, opremljen DAD detektorom i autosemplerom. Sve frakcije su rastvarane u metanolu HPLC čistoće. Razdvajanje komponenti metanolnih rastvora je postignuto primenom kolone Zorbax Eclipse C-18 (250×9,4 mm; 5 μm) na 20 °C pri konstantnom protoku od 4 mL/min. Detekcija je vršena na 210 nm, UV spektri su snimani u opsegu od 190 do 450 nm. Frakcije **Z-5**, **Z-6**, **Z-7**, **Z-8**, **Z-9**, **Z-10** i **Z-11** su razdvajane pod istim uslovima. Za prečišćavanje navedenih frakcija pripremljeni su metanolni rastvori koncentracije C=10 mg/mL. Kao mobilna faza korišćena je smeša vode (A) i acetonitrila (B) po programu prikazanom u tabeli 27.

Tabela 27. HPLC program razdvajanja frakcija **Z-5**, **Z-6**, **Z-7**, **Z-8**, **Z-9**, **Z-10**, **Z-11**

t (min)	A (H ₂ O), %	B (MeCN), %
0	90	10
5	90	10
20	65	35
30	65	35
40	50	50
50	50	50
51	90	10

Prečišćavano je 59,2 mg frakcije **Z-5**. Sakupljane su tri frakcije na retencionom vremenu 46,2 min.; 49,9 min. i 54,9 min. Snimljeni su ¹H NMR spektri izolovanih jedinjenja i upoređeni sa literaturnim podacima. Struktura jedinjenja eluiranih na retencionim vremenima 46,2 min. (lakton **15**, 3-*O*-deoksi-15-*O*-acetil-11α,13-epoksiamforikarpolid) i 54,9 min. (lakton **9**, amforikarpolid) određena je na osnovu literaturnih podataka^{96,97} i utvrđeno je da su jedinjenja poznata. Laktoni su izolovani u čistom stanju, a dobijene mase iznose 13,3 mg laktona **15**, odnosno 10,2 mg laktona **9**. ¹H NMR spektar laktona **9** prikazan je na slici 41, a laktona **15** dat je u prilogu 69. Za jedinjenje, eluirano na retencionom vremenu 49,9 min., nije bilo literaturnih podataka i ispostavilo se da je prvi put izolovan seskviterpenski lakton **8** (3-*O*-acetil-15-*O*-izovaleroilamforikarpolid) u veoma čistom stanju, mase 0,7 mg. Za ovo jedinjenja u

daljoj analizi snimljeni su IC, ^{13}C i 2D NMR spektri, maseni spektar i izmerena je njegova specifična rotacija.

Razdvajano je 31,4 mg frakcije **Z-6**. Izolovana su dva jedinjenja. Jedinjenja, eluirana na retencionom vremenu 45,4 min. i 46,7 min., izolovana su u čistom stanju. Poređenjem ^1H NMR spektara laktona **1** (sl. 34) i laktona **15** (prilog 69) sa literaturnim podacima^{96,97} utvrđeno je da su izolovani laktoni poznati. Izolovano je 2,7 mg laktona **1** i 9,5 mg laktona **15**.

Prečišćavano je 45,2 mg frakcije **Z-7**. Sakupljene su dve frakcije na retencionim vremenima 27,5 min. i 35,5 min. Jedinjenje, eluirano na retencionom vremenu 27,5 min., izolovano je u čistom stanju i dobijeno je 4,4 mg. Poređenjem ^1H NMR spektra ovog jedinjenja (prilog 68) sa literaturnim podacima^{96,97} utvrđeno je da je izolovani lakton (**14**), 3-deoksi-11 α ,13-epoksiamforikarpolid, poznat.

Frakcija eluirana na retencionom vremenu 35,5 min. (**Z-7/2**) je dodatno prečišćena. Uslovi prečišćavanja su bili isti kao za sve druge frakcije, osim mobilne faze. Ova frakcija je dalje razdvajana po programu prikazanom u tabeli 28.

Tabela 28. HPLC program razdvajanja frakcije K-7/2

t (min)	A (H ₂ O), %	B (MeCN), %
0	65	35
5	65	35
20	55	45

Prečišćavanjem ove frakcije izolovan je 3-deoksiamforikarpolid (lakton **10**) u čistom stanju (9,3 mg), eluiran na retencionom vremenu 15,8 min. Na osnovu literaturnih podataka^{96,97} utvrđeno je da je izolovani lakton poznat. ^1H NMR spektar laktona **10** dat je u prilogu 66.

Razdvajano je 56,8 mg frakcije **Z-8**. Izolovana su dva laktona u čistom stanju. Na retencionom vremenu 27,6 min. eluiran je lakton **14** (m = 3,2 mg). Struktura je potvrđena poređenjem ^1H NMR spektra (Prilog 68) sa literaturnim podacima.^{96,97} Od većeg interesa bilo je jedinjenje koje je eluirano na retencionom vremenu 38,1 minuta. Za ovo jedinjenje nije bilo literaturnih podataka, što ukazuje da lakton **12** (3-*O*-acetil-9 β -hidroksi-15-*O*-senecioilamforikarpolid), po prvi put izolovan. Za lakton **12** daljoj

analizi snimljeni su i IC, ^{13}C i 2D NMR spektri, kao i maseni spektar, a izmerena je i njegova specifična rotacija. Izolovano je 4,0 mg ovog laktona.

Pikovi na retencionom vremenu 28,5 min. i 29,9 min. sakupljeni kao jedna frakcija (**Z-8/5**) koja je dalje prečišćavana. Uslovi prečišćavanja su bili isti kao za sve druge frakcije, osim mobilne faze koja je razdvajana po programu prikazanom u tabeli 29.

Tabela 29. HPLC program razdvajanja frakcije Z-8/5

t (min)	A (H ₂ O), %	B (MeCN), %
0	70	30
10	70	30
20	65	35
30	65	35

Na ovaj način izolovano je jedno jedinjenje u čistom stanju, eluirano na retencionom vremenu 20,2 min. Poređenjem ^1H NMR spektra ovog jedinjenja (sl. 35) sa literaturnim podacima^{96,97} utvrđeno je da je izolovani lakton **11**, 3-deoksi-15-*O*-acetil-11,13-dihidroksiamforikarpolid, poznat. Izolovano je 15,9 mg laktona **11**.

Semi-preparativnom tečnom hromatografijom razdvajano je i 44,0 mg frakcije **Z-9** i izolovana su tri laktone. Snimljeni su ^1H NMR spektri izolovanih jedinjenja i upoređeni sa literaturnim podacima^{96,97} na osnovu kojih je određena je struktura jedinjenja eluiranih na retencionim vremenima 20,7 min. (lakton **16**, 3-deoksi-10 α ,14-epoksiamdorikarpolid) i 40,2 min. (lakton **3**) i utvrđeno je da su jedinjenja poznata. Laktoni su izolovani u čistom stanju, a dobijene mase iznose 3,4 mg laktone **16**, odnosno 8,7 mg laktone **3**. ^1H NMR spektar laktone **16** su dat u prilogu 70, a laktone **3** na slici 33.

Prečišćavanjem 47,5 mg frakcije **Z-10** izolovana su dva jedinjenja. Jedinjenja, eluirana na retencionom vremenu 19,3 min. i 23,9 min., su izolovana u čistom stanju. Poređenjem ^1H NMR spektara izolovanih jedinjenja sa literaturnim podacima^{96,97} utvrđeno je da su izolovani laktoni **13** (3-deoksi-11,13-dihidroksiamforikarpolid) i **4**, koji su poznati. ^1H NMR spektar laktone **4** je prikazan na slici 28, a laktone **13** u prilogu 67. Izolovano je 11,9 mg laktone **13** i 2,4 mg laktone **4**.

Razdvajano je 45,5 mg frakcije **Z-11** i izolovani su laktoni **13** (19,0 min.) i **4** (23,7 min.) u čistom stanju. ¹H NMR spektri laktona **4** (sl. 28) i laktona **13** (prilog 67) upoređeni su sa literaturnim podacima^{96,97} na osnovu kojih je utvrđeno da su laktoni poznati. Iz ove frakcije izolovano je 8,9 mg laktona **13** i 3,0 mg laktona **4**.

3.4.4. Izolovanje laktone iz vrste *Amphoricarpos autariatus* ssp. *neumayeri* sa lokaliteta planine Lovćen

3.4.4.1. Ekstrakcija i frakcionisanje ekstrakta

Metanolni ekstrakt mase 1,0767 g dobijen je iz osušenog nedzemnog dela biljnog materijala mase 39,00 g po postupku opisanom u odeljku 3.4.2.1. Dalje je za frakcionisanje metanolnog ekstrakta korišćena stubna hromatografija na koloni silika-gela. Frakcionisanje je izvršeno na koloni silika gela visine 38 cm i prečnika 3.2 cm izokratno smešom metilen-hlorid:metanol (95:5). Zapremina sakupljenih frakcija iznosila je 10 mL. Tok gravitacione kolone praćen je tankoslojnom hromatografijom, na osnovu koje su slične frakcije spojene u finalnih deset. Nakon povećanja polarosti na 90:10 metilen-hlorid:metanol, dobijena je još jedna finalna frakcija. Vizualizacija je izvršena UV detekciju na 254 nm i izazivanjem sa koncentrovanom sumpornom kiselinom, a potom zagrevanjem. Tok gravitacione kolone prikazan je u tabeli 30.

Tabela 30. Tok gravitacione hromatografije

Eluent	Procentni sadržaj	Oznaka frakcije	Masa frakcije (mg)
metilen-hlorid:metanol	95:5	L-1	34,8
metilen-hlorid:metanol	95:5	L-11	14,3
metilen-hlorid:metanol	95:5	L-14	42,1
metilen-hlorid:metanol	95:5	L-19	220,1
metilen-hlorid:metanol	95:5	L-22	187,0
metilen-hlorid:metanol	95:5	L-29	62,5
metilen-hlorid:metanol	95:5	L-45	69,8
metilen-hlorid:metanol	95:5	L-48	207,4
metilen-hlorid:metanol	95:5	L-65	23,1
metilen-hlorid:metanol	95:5	L-91	6,6
metilen-hlorid:metanol	90:10	L-138	29,7

Rastvarači su uklonjeni na rotacionom vakuum-uparivaču. Dalje su frakcije prečišćavane semi-preparativnom tečnom hromatografijom.

3.4.4.2. Izolovanje laktona semi-preparativnom tečnom hromatografijom

Komponente svih frakcija su razdvajane semi-preparativnom reverzno-faznom tečnom hromatografijom. Za razdvajanje komponenti korišćena je HPLC sistem *1000 Series Agilent Technologies*, opremljen DAD detektorom i autosemplerom. Sve frakcije su rastvarane u metanolu HPLC čistoće. Razdvajanje komponenti metanolnih rastvora je postignuto primenom kolone Zorbax Eclipse C-18 (250 × 9,4 mm; 5 µm) na 20 °C pri konstantnom protoku od 4 mL/min. Detekcija je vršena na 210 nm, UV spektri su snimani u opsegu od 190 do 450 nm. Sve frakcije su razdvajane pod istim uslovima osim mobilne faze, koja je podešavana posebno za svaku frakciju. U tabeli 31 su prikazani programi po kojima su frakcije razdvajane. Kao mobilna faza korišćena je smeša vode (A) i acetonitrila (B). Za razdvajanje pripremljeni su metanolni rastvori koncentracija 10 mg/mL (**L-14**, **L-45** i **L-138**), 20 mg/mL (**L-11** i **L-65**) i 30 mg/mL (**L-19**, **L-22**, **L-29** i **L-48**).

Tabela 31. HPLC programi razdvajanja frakcija ekstrakta *A. autariatus* ssp. *neumayeri* nakon stubne hromatografije

Frakcija	Mobilna faza
L-11	40 – 0% A (0 – 20 min), 0 – 40% A (20 – 21 min)
L-14	70 – 65% A (0 – 5 min), 65 – 50% A (5 – 10 min), 50% A (10 – 20 min), 50 – 70% A (20 – 21 min)
L-19	80 – 65% A (0 – 5 min), 65% A (5 – 15 min), 65 – 50% A (15 – 20 min), 50% A (20 – 28 min), 50 – 80% A (28 – 29 min)
L-22	70 – 65% A (0 – 3 min), 65% A (3 – 13 min), 65 – 50% A (13 – 17 min), 50 – 40% A (17 – 22 min), 40 – 70% A (22 – 23 min)
L-29	80 – 70% A (0 – 15 min), 70 – 65% A (15 – 25 min), 65 – 50% A (25 – 27 min), 50% A (27 – 30 min), 50 – 80% A (30 – 32 min)
L-45	90% A (0 – 5 min), 90 – 65% A (5 – 20 min), 65% A (20 – 30 min), 65 – 90% A (30 – 31 min)
L-48	80 – 75% A (0 – 5 min), 75% A (5 – 10 min), 75 – 65% A (10 – 14 min), 65 – 50% A (14 – 17 min), 50% A (17 – 19 min), 50 – 80% A (19 – 20 min)
L-65	90% A (0 – 5 min), 90 – 65% A (5 – 20 min), 65% A (20 – 30 min), 65 – 90% A (30 – 31 min)
L-138	90% A (0 – 5 min), 90 – 65% A (5 – 20 min), 65 – 90% A (20 – 21 min)

Iz frakcije **L-11** izolovana su dva laktona, koja su eluirana na retencionim vremenima 9,9 min. i 10,6 min. Snimljeni su ^1H NMR spektri izolovanih jedinjenja i upoređeni sa literaturnim podacima.^{96,97} Na osnovu literaturnih podataka određena je struktura jedinjenja eluiranog na retencionom vremenu 10,6 min. (lakton **8**). ^1H NMR spektar ovog laktona prikazan je na slici 38, dok su ostali 1D i 2D spektri prikazani u prilogima 32-37. Za jedinjenje čije je retenciono vreme 9,9 min., ispostavilo se da je po prvi put izolovan lakton **17** (3-*O*-acetil-15-*O*-senecioilamforikarpolid). U daljoj analizi snimljeni su i IC, ^{13}C i 2D NMR spektri, maseni spektar i izmerena je njegova specifična rotacija. Oba laktona su izolovana u čistom stanju i dobijeno je 0,2 mg laktona **17** i 3,2 mg laktona **8**.

Iz frakcije **L-14** izolovan je jedan lakton eluiran na retencionom vremenu 17,5 min. Poređenjem ^1H NMR spektra izolovanih jedinjenja sa literaturnim podacima^{96,97} utvrđeno je da je jedinjenje poznato i da je to lakton **1**. ^1H NMR spektar je prikazan na slici 34. Izolovano je 11,0 mg u čistom stanju.

Iz frakcije **L-19** izolovano je šest laktona u čistom stanju. Snimljeni su ¹H NMR spektri frakcija i upoređeni sa literaturnim podacima^{96,97} i utvrđeno je da su ova jedinjenja do sada izolovana i poznata. Na retencionom vremenu 9,9 min. eluiran je lakton **4** (8,0 mg), na retencionom vremenu 11,4 min. izolovan je 3,15-*O*-diacetil-2 α -hidroksiamforikarpolid (lakton **18**, m = 2,5 mg). Lakton **19** (15-*O*-acetilamforikarpolid) eluiran je na retencionom vremenu 13,4 min. (67,5 mg), na 22,1 min. izolovano je 19,0 mg laktone **3**, a na 23,9 min. izolovano je 8,9 mg laktone **21** (15-*O*-izovaleroil-3-*O*-acetil-2 α -hidroksiamforikarpolid). ¹H NMR spektar laktone **18** dat je u prilogu 71, laktone **21** u prilogu 72, laktone **3** na slici 33, laktone **4** na slici 28 i laktone **19** na slici 39. Za jedinjenje **20** (3-*O*-acetilhidroksiamforikarpolid) eluirano na retencionom vremenu 17,3 min. nije bilo literaturnih podataka, te je ovaj lakton po prvi put izolovan. Dobijeno je 2,1 mg ovog laktone. Za lakton **20** u daljoj analizi snimljeni su i IC, ¹³C i 2D NMR spektri, kao i maseni spektar. Izmerena je i njegova specifična rotacija.

Razdvajanjem frakcije **L-22** dobijeno je pet laktone u čistom stanju. Na retencionom vremenu 6,0 min. izolovano je 7,0 mg laktone **22** (15-*O*-acetil-10 α ,14-epoksiamforikarpolid), na 8,1 min. izolovan je lakton **4** (22,8 mg), na 9,8 min. izolovano je 8,7 mg laktone **18**. Lakton **19** izolovan je na retencionom vremenu 12,0 min. i dobijeno je 67,7 mg, dok je 16,7 mg laktone **3** izolovano na 20,2 min.. Poređenjem ¹H NMR spektara ovih laktone sa literaturnim podacima^{96,97} utvrđeno je da su jedinjenja poznata. ¹H NMR spektri su dati u prilogu 71 (lakton **18**), prilogu 73 (lakton **22**) i na slici 33 (lakton **3**), slici 28 (lakton **4**) i slici 39 (lakton **19**).

Iz frakcije **L-29** izolovana su dva laktone eluirana na retencionim vremenima 13,4 min. i 17,3 min.. Poređenjem ¹H NMR spektara izolovanih jedinjenja sa literaturnim^{96,97} podacima utvrđeno je da su laktone poznati. Na retencionom vremenu 13,4 min. izolovan je lakton **9** (18,1 mg, ¹H NMR spektar prikazan na slici 41) i na 17,3 min. lakton **23**, 15-*O*-izovaleroil-9 β -hidroksiamforikarpolid, (0,2 mg, ¹H NMR spektar dat u prilogu 74) u veoma čistom stanju.

Prečišćavanjem frakcije **L-45** dobijena su dva laktone u čistom stanju. Na retencionom vremenu 19,4 min. izolovano je 8,1 mg laktone **24** (15-*O*-acetil-2 α -hidroksiamforikarpolid), a na 21,0 min. izolovano je 17,0 mg laktone **9**. Poređenjem ¹H NMR spektara ovih laktone sa literaturnim podacima utvrđeno je da su jedinjenja poznata. ¹H NMR spektar laktone **9** prikazan je na slici 41, a laktone 24 na slici 43.

I iz frakcije **L-48** izolovani su laktoni **9** i **24** u čistom stanju i većoj količini. Izolovano je 82,0 mg laktona **24** koji je eluiran na retencionom vremenu 9,9 min. i 26,0 mg laktona **9**, eluiran na 12,2 min..

Razdvajanjem frakcije **L-65** dobijeni su poznati laktoni **7**, **9** i **24** u čistom stanju. Lakton **7** eluiran je na 15,9 min. (2,9 mg), lakton **24** na 19,5 min. (3,2 mg) i lakton **9** (1,6 mg) na 21,1 min. ¹H NMR spektri izolovanih laktona dati u prilogu 65 (lakton **7**) i na slici 41 (lakton **9**), odnosno na slici 43 (lakton **24**).

Frakcionisanjem **L-138** sakupljene su dve frakcije, na retencionim vremenima 11,3 minuta i 15,4 minuta. Za oba jedinjenja se ispostavilo da se po prvi put izolovani lakton **25** ($t_r=11,3$ min.) i lakton **26** ($t_r=15,4$ min.) u veoma čistom stanju. Dobijeno je 0,9 mg laktona **25** (9 β -hidroksiamforikarpolid) i 4,3 mg laktona **26** (2 α -hidroksiamforikarpolid). Za ove laktone snimljeni su IC, ¹H, ¹³C i 2D NMR spektri, kao i maseni spektri, a izmerena je i njihova specifična rotacija.

3.5. Određivanje bioloških aktivnosti

3.5.1. Ispitivanje citotoksične aktivnosti *Amphoricarpos autariatus* ssp. *autariatus in vitro*

3.5.1.1. Čelijske linije

Citotoksični efekat frakcija biljne vrste *A. autariatus* ssp. *autariatus* ispitan je na dve humane maligne čelijske linije: HeLa (adenokarcinom cerviksa) i A549 (adenokarcinom pluća).

Sve čelijske linije održavane su u kulturi u hranljivom medijumu u vidu monosloja. U kompletni hranljivi medijum (RPMI 1640, pH 7.2) dodati su: 10% serum fetalnog govečeta (FBS, engl. *fetal bovine serum*) termički inaktivisan (30 minuta, 56°C), L-28 glutamin (3mM), streptomycin (100 µg/ml), penicilin (100 IU/ml) i HEPES (25 mM). Sve čelijske linije su gajene u inkubatoru na 37°C, u atmosferi vazduha koji je obogaćen sa 5% CO₂ i zasićen vodenom parom.

Korišćene čelijske linije su nabavljene od kompanije American Type Culture Collection (ATCC) (Manasas, VA, Sjedinjene Američke Države). Reagensi upotrebljeni za gajenje čelijskih kultura su proizvodi kompanije Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Sjedinjene Američke Države), dok su antibiotici dodati u medijum nabavljeni od proizvođača Galenika A.D. (Beograd, Srbija) i Hemofarm A.D. (Vršac, Srbija).

3.5.1.2. Ispitivanje citotoksične aktivnosti frakcija *Amphoricarpos autariatus* ssp. *autariatus*

Čelijske suspenzije pripremane su u kompletnom hranljivom medijumu sa 10% FBS-om. Sve ćelije su zasejavane u mikrotitarskim pločama sa 96 bunara. HeLa (2000 ćelija/100 µl po bunaru) i A549 (5000 ćelija/100 µl po bunaru) nakon inkubacije od 24 h, tokom koje dolazi do adhezije ćelija, ćelije su tretirane sa po 50 µl rastvora ispitivanih frakcija *A. autariatus* ssp. *autariatus* u pet različitih koncentracija. Postupak frakcionisanja opisan je u odeljku 3.3. U kontroli, ćelije su rasle samo uz dodavanje hranljivog medijuma u zapremini od 50 µl.

Pet različitih koncentracija ispitivanih frakcija (12.5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml i 200 µg/ml) pripremane su u hranljivom medijumu sa 10% FBS-om iz štokova rastvora koncentracije 50 mg/ml u dimetil-sulfoksidu (DMSO).

Inkubacija HeLa i A549 ćelija je trajala 72 h.

3.5.1.3. Određivanje preživljavanja ćelija

Preživljavanje ćelija procenjavano je pomoću MTT kolorimetrijskog testa, na osnovu količine redukovanog kolorimetrijskog reagensa u ćelijama koje su metabolički aktivne. MTT kolorimetrijski test razvio je Mosmann (Mosmann, 1983), a metodu su modifikovali Ohno i Abe (Ohno i Abe, 1991). Tetrazolijumska so, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid (MTT) je žute boje i u živim, metabolički aktivnim ćelijama se redukuje do nerastvornog kristala formazana, koji je ljubičaste boje. Rastvor MTT reagensa je napravljen u PBS-u (engl. *phosphate buffered saline*) u koncentraciji od 5 mg/ml. Dodavanjem deterdženta SDS-a (engl. *sodium dodecyl sulphate*) rastvara se formazan i dobija ljubičasto obojeni rastvor koji ima maksimum apsorpcije na 570 nm. Količina rastvorenog formazana smatra se da je direktno proporcionalna broju metabolički aktivnih ćelija.

Nakon inkubacije tretiranih ćelija u sve bunare mikrotitar ploča dodato je po 10 µl MTT reagensa. Nakon 4 h na 37°C u bunare je dodato po 100 µl 10% natrijum dodecil sulfata SDS-a. Ploče su inkubirane tokom noći, a zatim je očitana apsorbanca na talasnoj dužini od 570 nm na čitaču Multiskan EX Thermo LabSystems (Waltham, MA, Sjedinjene Američke Države). Od očitanih apsorbanca odgovarajućih ćelijskih uzoraka oduzete su očitane vrednosti apsorbanca blankova.

Ćelijsko preživljavanje određeno je na osnovu formule:

$$S[\%] = (Au/Ak) \times 100$$

S[%] - % preživljavanja ćelija u kulturi

Au - apsorbanca uzorka ćelija u prisustvu tretmana

Ak - apsorbanca kontrolnog uzorka ćelija

IC₅₀ vrednost je mera citotoksične aktivnosti agensa, i definiše se kao koncentracija agensa koja inhibira preživljavanje ciljnih ćelija za 50%. Urađena su 3 nezavisna eksperimenta, pri čemu je svaki eksperiment urađen u triplikatu. MTT i SDS su nabavljeni od kompanije Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Sjedinjene Američke Države).

3.5.2. Određivanje protektivnog efekta laktona izolovanih iz *Amphoricarpos neumayeri* na DNK humanih limfocita

Uzorci venske krvi su dobijeni od šest volontera, zdravih muških osoba, koji su nepušači i nisu bili izloženi hemikalijama, drogama ili drugim supstancama. Od svake osobe je dobijeno po dva alikvota od 5 mL. Krv je uzorkovana u zdravstvenoj ustanovi u skladu sa tekućim zdravstvenim i etičkim propisima u Srbiji.

Za pripremu mikronukleusa (MN) korišćena je metoda blokirane citokineze sa određenim modifikacijama. Kulture limfocita su tretirane rastvorima izolovanih jedinjenja. Ispitivana jedinjenja su rastvarana u DMSO-u u različitim koncentracijama (1, 2 i 4 mg/mL). Ispitivani su laktoni **3**, **4**, **9** i **19** izolovani iz *Amphoricarpos neumayeri* (videti odeljak 3.4.4.).

Jedna ćelijska kultura bez dodatka izolovanih jedinjenja je služila kao kontrola. Pozitivna proba je pripremljena tako što je amifostin (S-2[3-aminopropilamino]-etilfosfontionska kiselina (98%); Marligen-Biosciences, USA) dodat je u jednu kulturu ćelija u koncentraciji od 1 µg/mL. Kao negativna proba korišćen je mitomicin C (MMC) u fosfatnom puferu, koncentracije 0.2 µg/mL.

Sve ćelijske kulture su inkubirane na 37 °C. Zatim su dodate kulturama koje su 24 h stimulisane fitohemaglutinom (PHA; Invitrogen Gibco-BRL). Tretman ispitivanim jedinjenjima je trajao 19 h, nakon čega su sve kulture ispirane čistim medijumom, prebačene u 5 mL svežeg RPMI 1640 (RPMI 1640 Medium + GlutaMAX + 25 mM HEPES; Invitrogen- Gibco-BRL) i inkubirane dodatnih 72 h.

Približno 2×10^6 limfocita iz krvi je prebačeno u 5 mL medijuma RPMI 1640 obogaćenim sa 15% goveđeg seruma i 2,4 µg/mL fitohemaglutinina. Jedan sat nakon ćelijske stimulacije dodati su rastvori ispitivanih jedinjenja u različitim koncentracijama.

Za pripremu mikronukleusa korišćena je metoda blokirane citokineze sa izvesnim modifikacijama. Citohalasin B (Invitrogen Gibco-BRL) finalne koncentracije 6 µg/mL je dodat u uzorke i kulture limfocita su inkubiranje još 24 h. Nakon inkubacije ćelije su isprane sa 0,9% rastvorom NaCl (Merck, Sharp, & Dohme GMBH), sakupljene centrifugiranjem i tretirane hipotoničnim rastvorom na 37 °C. Hipotonični rastvor sadrži 0,56 % KCl i 0,9 % NaCl koji su pomešani u istim zapreminama. Ćelijske suspenzije su fiksirane smešom metanol/sirćetna kiselina (3:1), zatim isprane tri puta fiksatorom i nanešene na čist slajd. Slajdovi su osušeni na vazdihu i bojeni alkalnim Giemsa (2%,

Sigma-Aldrich). Najmanje 1000 binuklearnih ćelija (BN) po uzorku je pregledano i pojava mikronukleusa je beležena po kriterijumima Countryman and Heddle (1976) i Fenech and Morley (1993). Ekspresija mikronukleusa zavisi od proliferacije ćelija, potrebno je izvršiti kvantifikaciju ćelijske proliferacije i ćelijske smrti da bi se dobila procena ćelijske kinetike i frekvencija mikronukleusa. Određivan je efekat izolovanih laktona na poliferaciju ćelija određivanjem indeksa poliferacije bloka citokineze (CBPI).

Indeks poliferacije bloka citokineze (CBPI) je izračunat prema Surralles (1995):

$$CBPI = \frac{M_1 + 2 * M_2 + 3 * (M_3 + M_4)}{N}$$

M_1 – mononuklearne ćelije

M_2 - binuklearne ćelije

M_3 – ćelije sa tri nukleusa

M_4 – ćelije sa četiri nukleusa

N – ukupan broj posmatranih ćelija

U analizu mikronukleusa uračunate su samo binuklearne ćelije sa dobro očuvanom citoplazmom (posmatrane pod svetlosnim mikroskopom sa 40×10 uvećanjem). Beležen je broj binuklearnih ćelija sa jednim, dva, tri ili više mikronukleusa. Podaci za svaki uzorak su izraženi kao učestalost mikronukleusa na 1000 ćelija.

Ispitivanja su vršena u triplikatu. Statistička analiza je izvršena pomoću softverskog paketa OriginPro 8.0. Statistički značaj razlike između parova je određen analizom varijanse (One-way ANOVA) za kojom je sledio Turkey test. Statističke razlike su smatrane značajnim pri $p < 0.01$ i $p < 0.05$.

Literatura

1. Blečić V., Mayer E., Die europäischen Sippen der Gattung *Amphoricarpos* Visiani, *Phyton*, 12 (1967) 150–158.
2. Webb, D. A., *Amphoricarpos* Vis., In T. G. Tutin, V. H. Heywood, N. A. Burges, D. M. Moore, D. H. Valentine, S. M. Walters, & D. A. Webb (Eds.), *Flora Europaea*, vol. 4, Plantaginaceae to Compositae (and Rubiaceae). Cambridge: Cambridge University Press (1976).
3. Greuter W., Brummitt R. K., Farr E., Kilian N., Kirk P.M., Silva P. C., Names in current use for extant plant genera, *Regnum Vegetabile*, 129 (1993) 48.
4. Shulaev V., Metabolomics technology and bioinformatics, *Briefings in bioinformatics*, 7 (2006), 128 -139.
5. N. D. Yuliana, A. Khatib, R. Verpoorte, Y. H. Choi, Comprehensive extraction method integrated with NMR metabolomics: A new bioactivity screening method for plants, adenosine A1 receptor binding compounds in *Orthosiphon stamineus* benth, *Analytical Chemistry*, 83 (2011), 6902-6906.
6. Ernst M., Metabolomics in plant taxonomy: The Arnica model, Master's thesis, *Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo*, (2013).
7. Shyr L., Yang N., Metabolomics for phytomedicine research and drug development, *Current Opinion in Chemical Biology*, 12 (2008) 66–71
8. Brennan L., NMR-based metabolomics: From sample preparation to applications in nutrition research, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 83 (2014) 42-49.
9. Isomaa K., Chemometric methods in plant metabolomics, Master's thesis, *University of Helsinki*, (2013).
10. Kim H. K., Verpoorte R., Sample preparation for plant metabolomics, *Phytochemical Analysis*, 21 (2010) 4-13.
11. Roessner U., Pettolino F., The importance of anatomy and physiology in plant metabolomics. In: Nielsen J., Jewett M. C. (Eds), *Metabolomics a powerful tool in systems biology*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, (2007) 253-278.

12. Villas-Boas S. G., Koulman A., Lane G. A., Analytical methods from the perspective of method standardization. In: Nielsen J., Jewett M. C. (Eds), *Metabolomics a powerful tool in systems biology*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, (2007) 11-52.
13. Moritz T.; Johansson A. I., Plant metabolomics. In: Griffiths W. J. (Eds) *Metabolomics, Metabonomics and Metabolite Profiling*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, (2007) 254-272.
14. Verpoorte R., Choi Y.H., Mustafa N. R., Kim H. K., *Metabolomics: back to basics*, *Phytochemistry Reviews*, 7 (2008) 525-537.
15. Morgenthal K., Wienkoop S., Wolschin F., Weckwerth W., Integrative Profiling of Metabolites and Proteins. In: Weckwerth W. (eds) *Metabolomics. Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa (2007) 57-75.
16. Sticher O., Natural product isolation, *Natural Product Reports*, 25 (2008) 517–554.
17. Oldiges M., Lutz S., Pflug S., Schroer K., Stein N., Wiendahl C., *Metabolomics: current state and evolving methodologies and tools*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76 (2007) 495-511.
18. Bucar F., Wubea A., Schmidb M., Natural product isolation – how to get from biological material to pure compounds, *Natural Product Reports*, 30 (2013) 525–545.
19. Sumnera L. W., Mendesb P., Dixona R. A., Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era, *Phytochemistry* 62 (2003) 817–836.
20. Happyana N., Muntendam R., Kayser O., *Metabolomics as a bioanalytical tool for characterization of medicinal plants and their phytochemical preparations*, In: O. Kayser, H. Warzecha (Eds), *Pharmaceutical Biotechnology*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Groningen (2012) 527-552.
21. Wheelock A. M., Wheelock C. E., Trials and tribulations of ‘omics data analysis: assessing quality of SIMCA-based multivariate models using examples from pulmonary medicine, *Molecular BioSystems*, 9 (2013) 2589-2596.
22. Worley B., Powers R., *Multivariate Analysis in Metabolomics*, *Current Metabolomics*, 1 (2013) 92–107.
23. Goodacre R., Broadhurst D., Smilde A. K., Kristal B. S., Baker J. D., Beger R., Bessant C., Connor S., Capuani G., Craig A., Ebbels T., Kell D. B., Manetti C., Newton

- J., Paternostro G., Somorjai R., Sjoström M., Trygg J., Wulfert F., Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics, *Metabolomics* 3 (2007) 231–241.
24. Kovačić Z. J., Multivarijaciona analiza, *Ekonomski fakultet, Univerzitet u Beogradu*, Beograd (1994).
25. Triba M. N., Le Moyec L., Amathieu R., Goossens C., Bouchemal N., Nahon P., Rutledge D. N., Savarina P., PLS/OPLS models in metabolomics: the impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters, *Molecular BioSystems*, 11 (2015) 13-19.
26. Eriksson L., Trygg J., Wold S., CV-ANOVA for significance testing of PLS and OPLS models, *Journal of Chemometrics*, 22 (2008) 594–600.
27. Eriksson L., Johansson E., Kettaneh-Wold N., Trygg J., Wikström C., Wold S., Multivariate and Megavariate Data Analysis, Part I: Basic Principles and Applications (2nd revised and enlarged edition), *Umetrics Academy*, Umea, Sweden, 2006.
28. Galindo-Prieto B., Eriksson L., Trygg J., Variable influence on projection (VIP) for orthogonal projections to latent structures (OPLS), *Journal of Chemometrics*, 28 (2014) 623–632.
29. Liu K., Abdullah A. A., Huang M., Nishioka T., Altaf-UI-Amin M., Kanaya S., Novel Approach to Classify Plants Based on Metabolite-Content Similarity, *BioMed Research International*, (2017) 1-12.
30. Lee S., Oh D., Lee S., Kim G. R., Lee J. S., Son Y. K., Bae C., Yeo J., Lee C. H., Chemotaxonomic Metabolite Profiling of 62 Indigenous Plant Species and Its Correlation with Bioactivities, *Molecules*, 20 (2015) 19719–19734.
31. Kim Y. M., Lee J., Park S. H., Lee C., Lee J. W., Lee D., Kim N., Lee D., Kim H. Y., Lee C. H., LC-MS-based chemotaxonomic classification of wild-type *Lespedeza* sp. and its correlation with genotype, *Plant Cell Reports*, 31 (2012) 2085–2097.
32. Singh R., Chemotaxonomy: A Tool for Plant Classification, *Journal of Medicinal Plants Studies*, 4 (2016) 90-93.
33. Wink M., Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective, *Phytochemistry*, 64 (2003) 3–19.
34. Hagel J. M., Mandal R., Han B., Han J., Dinsmore D. R., Borchers C. H., Wishart D. S., Facchini P. J., Metabolome analysis of 20 taxonomically related benzyloquinoline alkaloid-producing plants, *BMC Plant Biology* 220 (2015) 1-17.

35. Seaman F. C., Funk V. A., Cladistic analysis of complex natural products: developing transformation series from sesquiterpene lactone data, *Taxon*, 32 (1983) 1-27.
36. Seaman F. C., Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae, *The botanical review*, 48 (1982) 121-595.
37. Fishedick J. T., Hazekamp A., Erkelens T., Choi Y. H., Verpoorte R., Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes, *Phytochemistry*, 71 (2010) 2058–2073.
38. Kim H. K., Saifullah, Khan S., Wilson E. G., Kricun S. D. P., Meissner A., Goral S., Deelder A. M., Choi Y. H., Verpoorte R., Metabolic classification of South American *Ilex* species by NMR-based metabolomics, *Phytochemistry*, 71 (2010) 773–784.
39. Martucci M. E. P., De Vos R. C. H., Carollo C. A., Gobbo-Neto L., Metabolomics as a potential chemotaxonomical tool: Application in the genus *Vernonia* Schreb, *PLOS ONE*, 9 (2014) 1-8.
40. Kim H. K., Choi Y. H., Erkelens C., Lefeber A. W. M., Verpoorte R., Metabolic Fingerprinting of *Ephedra* Species Using ¹H-NMR Spectroscopy and Principal Component Analysis, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53 (2005) 105-109.
41. Brown P. N., Murch S. J., Shipley P., Phytochemical diversity of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) cultivars by anthocyanin determination and metabolomic profiling with chemometric analysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (2012) 261–271.
42. Xiong A., Yang L., Ji L., Wang Z., Yang X., Chen Y., Wang X. Wang C., Wang Z., UPLC-MS based metabolomics study on *Senecio scandens* and *S. vulgaris*: an approach for the differentiation of two *Senecio* herbs with similar morphology but different toxicity, *Metabolomics*, 8 (2012) 614–623.
43. Yuliana N. D., Khatib A., Choi Y. H., Verpoorte R., Metabolomics for bioactivity assessment of natural products, *Phytotherapy Research*, 25 (2011) 157-169.
44. Sumner L. W., Recent advances in plant metabolomics and greener pastures, *F1000Biology Reports*, 2:7 (2010) 1-5.

45. Jahangir M., Kim H. K., Choi Y. H., Verpoorte R., Metabolomic response of *Brassica rapa* submitted to pre-harvest bacterial contamination, *Food Chemistry* 107 (2008) 362-368.
46. Wang M., Lamers R-JAN, Korthout H. A. A. J., van Nesselrooij J. H. J., Witkamp F. R., van der Heijden R., Voshol J. P., Havekes M. L., Verpoorte R., van der Greef J., Metabolomics in the context of systems biology: bridging traditional Chinese medicine and molecular pharmacology, *Phytotherapy Research*, 19 (2005) 173-182.
47. Li P., Qi L-W., Liu E-H., Zhou J-L., Wen X-D., Analysis of Chinese herbal medicines with holistic approaches and integrated evaluation models, *Trends in Analytical Chemistry*, 27 (2008) 66-77.
48. Ulrich-Merzenich G., Zeitler H., Jobst D., Panek D., Vetter H., Wagner H., Application of the "-Omic-"technologies in phytomedicine, *Phytomedicine*, 14 (2007) 70-82.
49. Bindseil K.U., Jakupovic J., Wolf D., Lavayre J., Leboul J., van der Pyl D., Pure compound libraries; a new perspective for natural product based drug discovery, *Drug Discovery Today*, 6 (2001) 840-847.
50. Koehn F. E., Carter G.T., The evolving role of natural products in drug discovery, *Nature Reviews Drug Discovery*, 4 (2005) 206-220.
51. McChesney J. D., Venkataraman S. K., Henri J. T., Plant natural products: Back to the future or into extinction?, *Phytochemistry*, 68 (2007) 2015-2022.
52. Ortholand J-Y., Ganesan A., Natural products and combinatorial chemistry: back to the future, *Current Opinion in Chemical Biology*, 8 (2004) 271-280.
53. Tugizimana F., Piater L., Dubery I., Plant metabolomics: A new frontier in phytochemical analysis, *Plant metabolomics*, 109 (2013) 1-11.
54. Jiang H., Xie Z., Koo H. J., McLaughlin S. P., Timmermann B. N., Gang D. R., Metabolic profiling and phylogenetic analysis of medicinal *Zingiber* species: tools for authentication of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.), *Phytochemistry*, 67 (2006) 1673–1685.
55. Cheng X-L., Liu Q., Peng Y-B., Qi L-W., Li P., Steamed ginger (*Zingiber officinale*): changed chemical profile and increased anticancer potential, *Food Chemistry*, 129 (2011) 1785–1792.

56. Hillwig M. L., Hammer K. D. P., Birt D. F., Wurtele E. S., Characterizing the metabolic fingerprint and anti-inflammatory activity of *Hypericum gentianoides*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (2008) 4359–4366.
57. Choi M-Y., Chai C., Park J. H., Lim J., Lee J., Kwon S. W., Effects of storage period and heat treatment on phenolic compound composition in dried *Citrus* peels (Chenpi) and discrimination of Chenpi with different storage periods through targeted metabolomic study using HPLC–DAD analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54 (2011) 638–645.
58. Ryan E. P., Heuberger A. L., Weir T. L., Barnett B., Broeckling C. D., Prenni J. E., (2011) Rice bran fermented with *Saccharomyces boulardii* generates novel metabolite profiles with bioactivity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (2011) 1862–1870.
59. Cardoso-Taketa A. T., Pereda-Miranda R., Choi Y. H., Verpoorte R., Villarreal M. L., Metabolic profiling of the Mexican anxiolytic and sedative plant *Galphimia glauca* using Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy and Multivariate Data Analysis, *Planta Medica*, 74 (2008) 1295–1301.
60. Yuliana N. D., Jahangir M., Verpoorte R., Choi Y. H., Metabolomics for the rapid dereplication of bioactive compounds from natural sources, *Phytochemistry Reviews*, 12 (2013) 293–304.
61. Caković D., Stešević D., Schönswetter P., Frajman B., How many taxa? Spatiotemporal evolution and taxonomy of *Amphoricarpos* (Asteraceae, Carduoideae) on the Balkan Peninsula, *Organisms diversity & evolution*, 15 (2015) 429–445.
62. Schwarz O., Eine bemerkenswerte neue *Amphoricarpos*-Art aus Südwest-Anatolien, *Phyton*, 14 (1970) 125–133.
63. Ayasligil Y., New taxa and records from southwestern Turkey, *Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh*, 42 (1984) 69–76.
64. Barres L., Sanmartín I., Anderson C. L., Susanna A., Buerki S., Galbany-Casals M., Vilatersana R., Reconstructing the evolution and biogeographic history of tribe Cardueae (Compositae), *American Journal of Botany*, 100 (2013) 867–882.
65. Visiani R., *Flora Dalmatica*, Vol. I. Lipsiae (1842).
66. Murbeck S., Beiträge zur Kenntnis der Flora von Südbosnien und der Hercegovina, *Acta Universitatis Lundensis*, 27 (1891) 1–182.

67. Beck G., V. Gruppe. In I. Dörfler (Eds), Jahreskatalog des Wiener botanischen Tauschvereines, Wien (1894) 20.
68. Bošnjak K., Iz hercegovačke flore, *Glasnik Hrvatskog Prirodoslovnoga Društva*, (1936) 62–63.
69. Fukarek P., Rasprostranjenost i ekološke karakteristike krčagovine *Amphoricarpus neumayeri* Vis., *Glasnik Zemaljskog Muzeja Sarajevo*, (1965) 159–180.
70. Farr E. R., Leussink J. A., Stafleu F. A., Index nominum genericorum (plantarum), 1 (Aa-Epochnium). *Regnum Vegetabile*, 100 (1979) 74.
71. Gajić, M., In Josifović, M. (eds), Flora SR Srbije, VII tom, SANU, Beograd (1975) 179.
72. Gajić, M., In: Josifović, M. (eds), Flora SR Srbije, IX tom, SANU, Beograd (1975) 192.
73. Lakušić R., Planinske biljke, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva Sarajevo, zavod za udžbenike i nastavna sredstva Beograd, 1988.
74. Gavrilović M., Soković M., Stanković M., Marin P., Stevanović Dajić Z., Janačković P., Antimicrobial and antioxidative activity of various leaf extracts of *Amphoricarpus* Vis. (Asteraceae) taxa, *Archives of Biological Sciences*, 68 (2016) 803–810.
75. Jadranin M., Djordjević I., Tešević V., Vajs V., Menković N., Soković M., Glamočlija J., Milosavljević S., Sesquiterpene Lactones of *Amphoricarpus autariatus* ssp. *autariatus* from Montenegro - Antifungal Leaf - Surface Constituents. *Records of Natural Products* 7 (2013) 234–238.
76. Atrog B. A. A., Natić M., Tosti T., Opsenica Milojković D., Djordjević I., Tešević V., Jadranin M., Milosavljević S., Lazić M., Radulović S., Tešić Z., Lipophilicity of some guaianolides isolated from two endemic subspecies of *Amphoricarpus neumayeri* (Asteraceae) from Montenegro, *Biomedical Chromatography*, 23 (2008) 250–256.
77. Babaei G., Aliarab A., Abroon S., Rasmi Y., Gholizadeh-Ghaleh Aziz S., Application of sesquiterpene lactone: A new promising way for cancer therapy based on anticancer activity, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106 (2018) 239–246.

78. Chadwick M., Trewin H., Gawthrop F., Wagstaff C., Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people, *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (2013) 12780-12805.
79. Chaturvedi D., Sesquiterpene lactones: structural diversity and their biological activities, *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*, 10 (2011) 313-334.
80. Janačković P., Tešević V., Milosavljević S., Vuković G., *Centaurea* species - potentially source of sesquiterpene lactone cnicin, *Lekovite sirovine*, 23 (2003) 5-14.
81. Rodriguez E., Towers G. H. N., Mitchell J. C., Biological activities of sesquiterpene lactones, *Phytochemistry*, 15 (1976) 1573-1580.
82. Lone S. H., Bhat K. A., Khuroo M. A., Arglabin: from isolation to antitumor evaluation, *Chemico-Biological Interactions*, 240 (2015) 180-198.
83. Macías F. A., Galindo J. G., Massanet G. M., Potential alleopathic activity of several sesquiterpene lactone models, *Phytochemistry*, 13 (1992) 1669-1977.
84. Picman A. K., Biological activities of sesquiterpene lactones, *Biochemical Systematics and Ecology*, 14 (1986) 255-281.
85. Scotti M. T., Fernandes N. B., Ferreira M. J. P., Emerenciano V. P., Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones with cytotoxic activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15 (2007) 2927-2934.
86. Ghantous A., Gali-Muhtasib H., Vuorela H., Saliba N. A., Darwiche N., What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials?, *Drug Discovery Today*, 15 (2010) 668-678.
87. Lee K., Huang E., Piantadosi C., Pagano J. S., Geissman T. A., Cytotoxicity of sesquiterpene lactones, *Cancer Research*, 31 (1971) 1649-1654.
88. Kupchan S. M., Eakin M. A., Thomas A. M., Tumor inhibitors. Structure-cytotoxicity relationship among the sesquiterpene lactones, *Journal of Medicinal Chemistry*, 14 (1971) 1147-1152.
89. Beekman A. C., Woerdenbag H. J., van Uden W., Pras N., Konings A. W. T., Wikström H. V., Schmidt T. J., Structure-cytotoxicity relationships of some Helenanolide type sesquiterpene lactones, *Journal of Natural Products*, 60 (1997) 252-257.

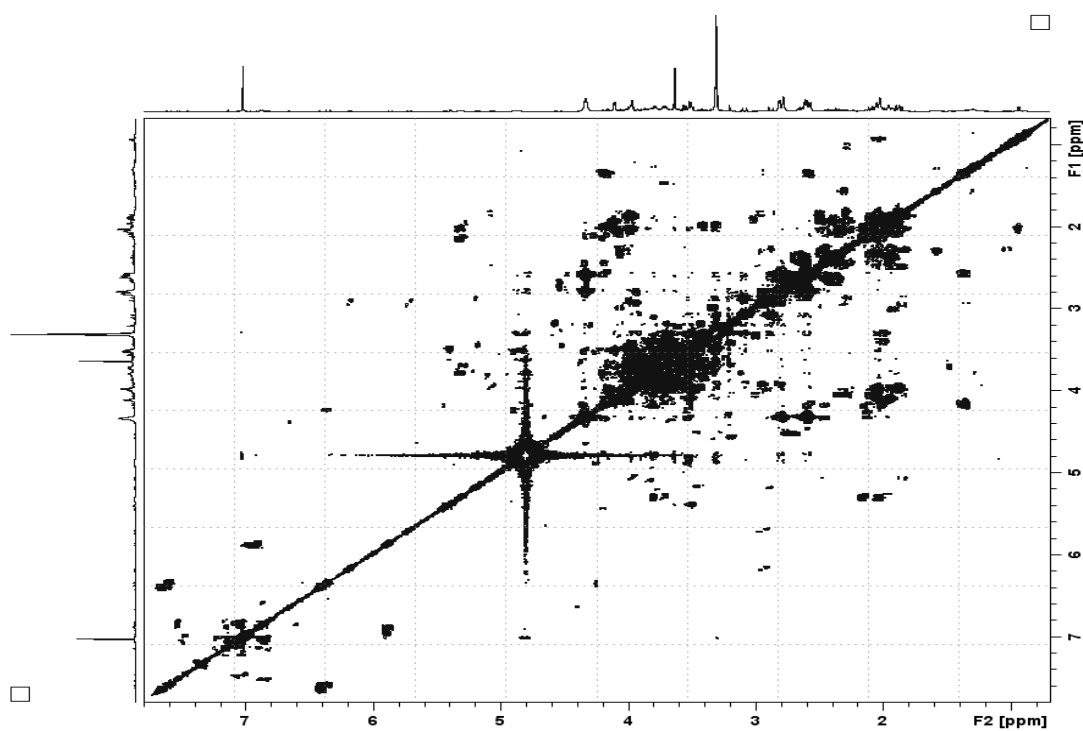
90. Ren Y., Acuña U. M., Jiménez F., García R., Mejía M., Chai H., Gallucci J. C., Farnsworth N. R., Soejarto D. D., Carcache de Blanco E. J., Douglas Kinghorn A., Cytotoxic and NF- κ B inhibitory sesquiterpene lactones from *Piptocoma rufescens*, *Tetrahedron*, 68 (2013) 2671-2678.
91. Wedge D. E., Galindo J. C. G., Macías F. A., Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactones analogs, *Phytochemistry*, 53 (2000) 747-757.
92. Picman A. K., Antifungal activity of sesquiterpene lactones, *Biochemical Systematics and Ecology*, 12 (1984) 13-18.
93. Gavrilović M., Tešević V., Đorđević I., Rajčević N., Bakhia A., Garcia Jacas N, Susanna A., Marin P. D., Janačković P., Leaf micromorphology, antioxidative activity and a new record of 3-deoxyamphoricarpolide of relict and limestone endemic *Amphoricarpos elegans* Albov (Compositae) from Georgia, *Archives of Biological Sciences*, 70 (2018) 613-620.
94. Picman A. K., Rodriguez E., Towers G. H. N., Formation of adducts of Parthenin and related sesquiterpene lactones with cysteine and glutathione, *Chemico-Biological Interactions*, 28 (1979) 83-89.
95. Kim H. K., Choi Y. H., Verpoorte R., NMR-based metabolomic analysis of plants, *Nature Protocols*, 5 (2010) 536–549.
96. Djordjević I., Vajs V., Bulatović V., Menković N., Tešević V., Macura S., Janačković P., Milosavljević S., Guaianolides from two subspecies of *Amphoricarpos neumayeri* from Montenegro, *Phytochemistry*, 65 (2004) 2337–2345.
97. Djordjević I., Jadranin M., Vajs V., Menković N., Tešević V., Macura S., Milosavljević S., Further guaianolides from *Amphoricarpos neumayeri* ssp *murbeckii* from Montenegro, *Zeitschrift für Naturforschung B A Journal of Chemical Sciences*, 61 (2006) 1437–1442.
98. Wiklund S., Johansson E., Sjöstrom L., Mellerowicz E. J., Edlund U., Shockor J. P., Gottfries J., Moritz T., Trygg J., Visualization of GC/TOF-MS-Based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models, *Analytical Chemistry*, 80 (2008) 115–122.
99. Leiss K., Maltese F., Choi Y. H., Verpoorte R., Klinkhamer P. G., Identification of chlorogenic acid as a resistance factor for thrips in chrysanthemum, *Plant Physiology*, 150 (2009) 1567–1575.

100. Clé C., Hill L. M., Niggeweg R., Martin C. R., Guisez Y., Prinsen E., Jansen M. A., Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*: consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance, *Phytochemistry*, 69 (2008) 2149–2156.
101. Easmin S., Sarker Z. I., Ghafoor K., Ferdosh S., Jaffri J., Ali E., Mirhosseini H., Al-Juhaimi F. Y., Perumal V., Khatib A., Rapid investigation of α -glucosidase inhibitory activity of *Phaleria macrocarpa* extracts using FTIR-ATR based fingerprinting, *Journal of Food and Drug Analysis*, 25 (2017) 306-315.
102. Westworth S., Ashwath N., Cozzolino D., Application of FTIR-ATR spectroscopy to detect salinity response in Beauty Leaf Tree (*Calopyllum inophyllum* L), *Energy Procedia*, 160 (2019) 761-768.
103. Nicolaou N., Xu Y., Goodacre R., Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species, *Journal of Dairy Science*, 93 (2010) 5651-5660.
104. Pretsch E., Buhlmann P., Badertscher M., Structure Determination of Organic Compounds, Tables of Spectral Data, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2009).
105. Markley J. L., Bruschiweiler R., Edison A. S., Eghbalnia H. R., Powers R., Raftery D., Wishart D. S., The future of NMR-based metabolomics, *Current Opinion in Biotechnology*, 43 (2017) 34-40.
106. Leiss K. A., Choi Y. H., Verpoorte R., Klinkhamer P. G. L., An overview of NMR-based metabolomics to identify secondary plant compounds involved in host plant resistance, *Phytochemistry Reviews*, 10 (2011) 205-216.
107. Tawfike F. A., Viegelmann C., Edrada-Ebel R., Metabolomics and dereplication strategies in natural products, In: Roessner U., Dias D. (eds) *Metabolomics Tools for Natural Product Discovery. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Humana Press, Totowa (2013) 227-244.
108. Mothana R. A., Lindequist U., Gruenert R., Bednarski P. J., Studies of the in vitro anticancer, antimicrobial and antioxidant potentials of selected Yemeni medicinal plants from the island Soqatra, *BMC Complementary and Alternative Medocone*, 25 (2009) 1-11.

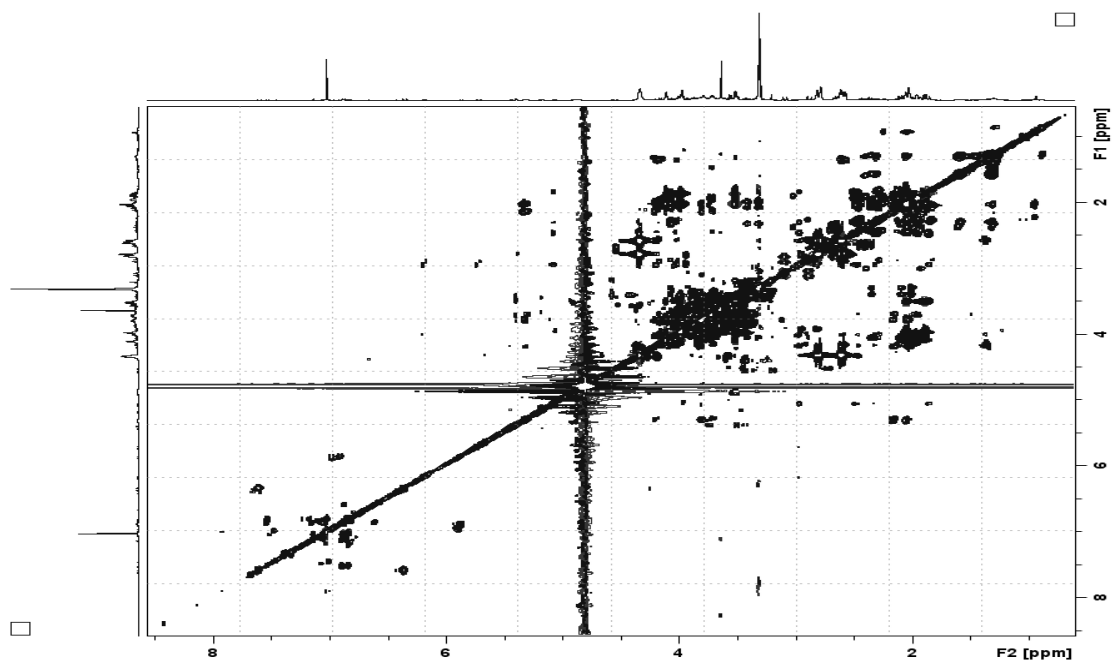
109. Suffness M., Pezzuto J. M., Assays related to cancer drug discovery, In: Hostettmann K. (Eds) *Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity*, Academic Press, London (1990) 71-133.
110. Countryman P. I., Heddle J. A., The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes, *Mutation research*, 41 (1976) 321-332.
111. Fenech M., The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human population, *Mutation research, Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis* 285 (1993) 35-44.
112. Grochova D., Šmardova J., The antimutagenic and cytoprotective effects of amifostine: the role of p53, *Journal of Applied Biomedicine*, 5 (2007) 171-178.

Prilog

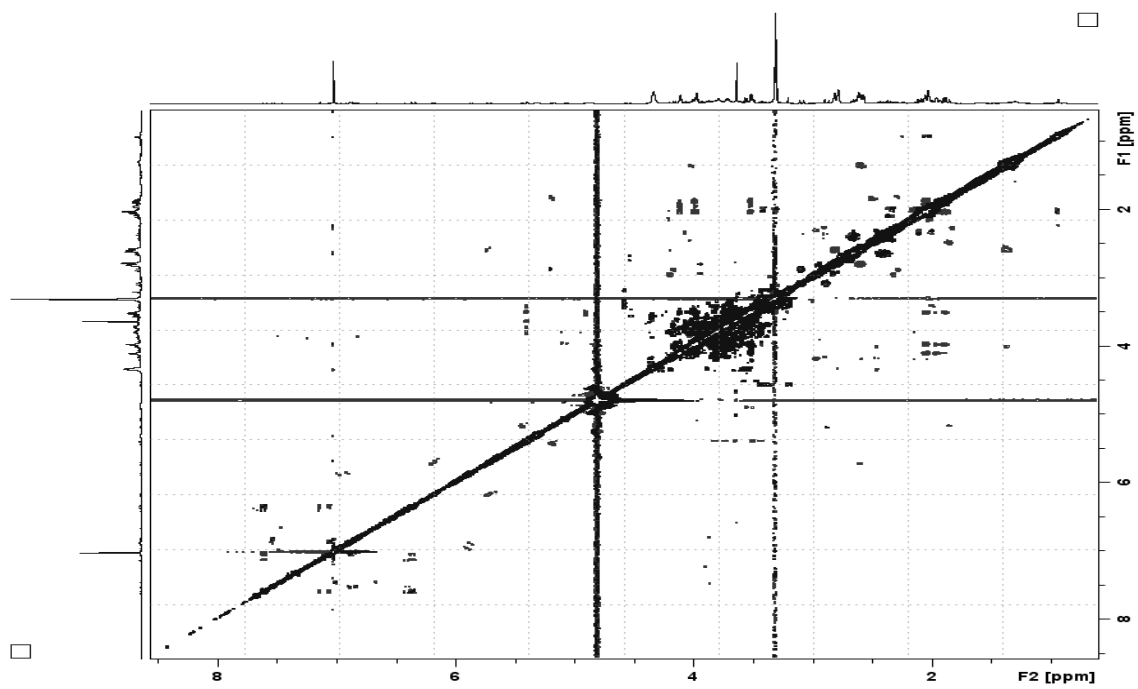
1. COSY spektar ekstrakta *A. autariatus* ssp. *Autariatus*



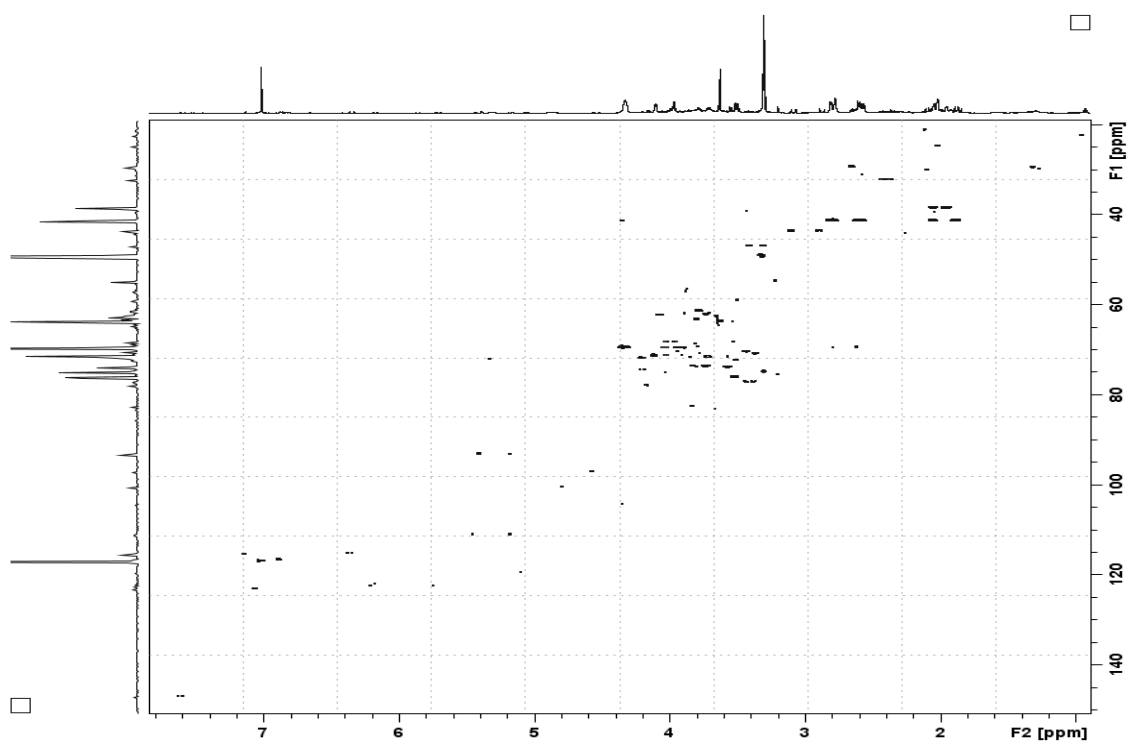
2. TOCSY spektar ekstrakta *A. autariatus* ssp. *autariatus*



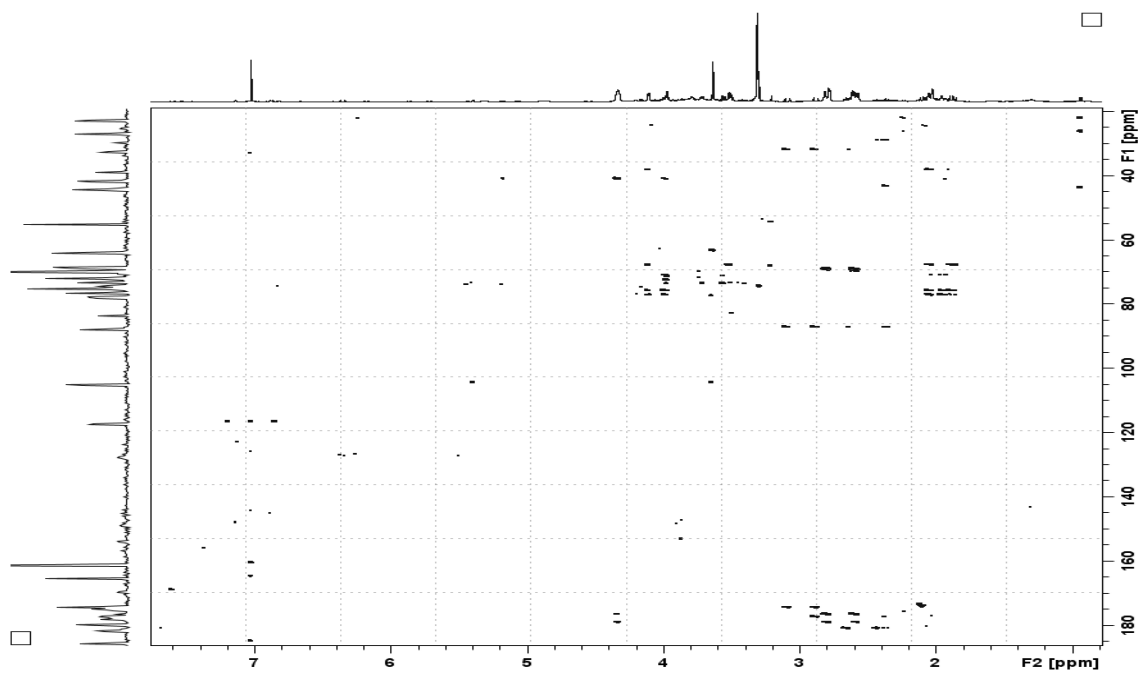
3. ROESY spektar ekstrakta *A. autariatus* ssp. *autariatus*



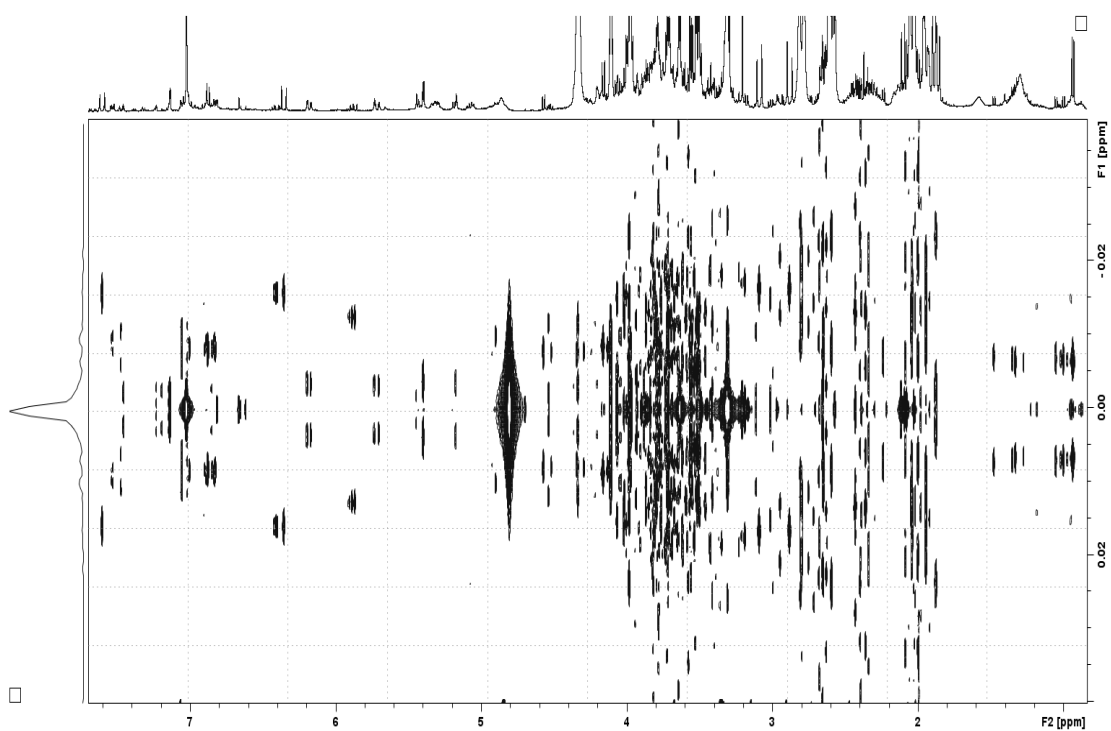
4. HSQC spektar *A. autariatus* ssp. *autariatus*



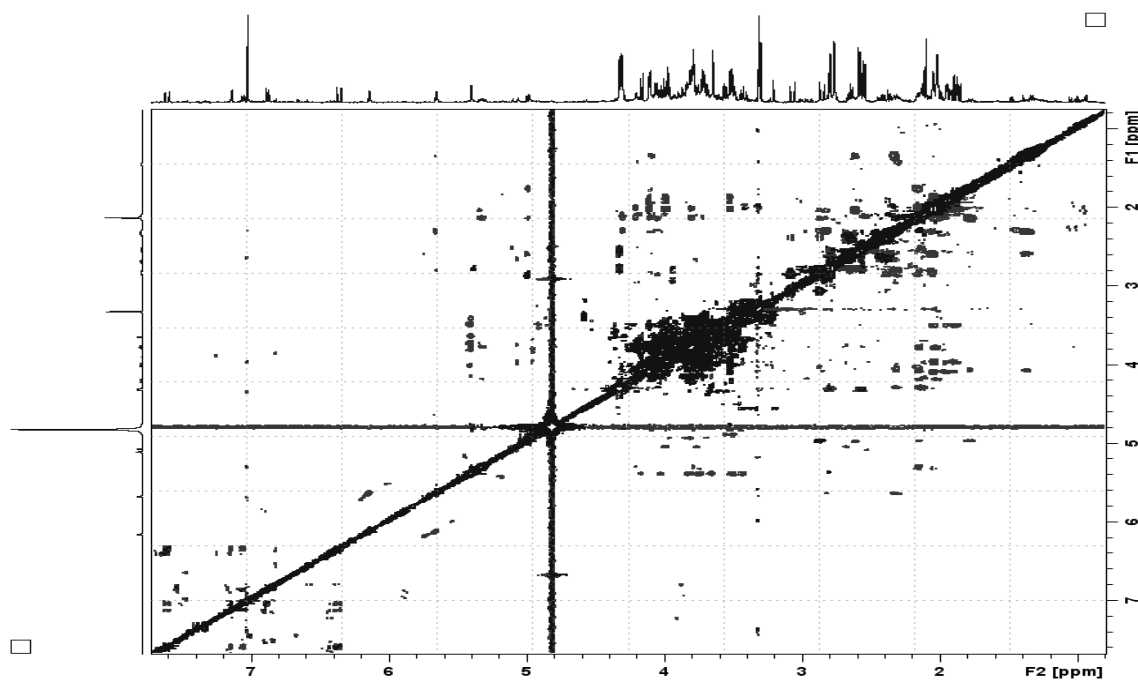
5. HMBC spektar *A. autariatus* ssp. *autariatus*



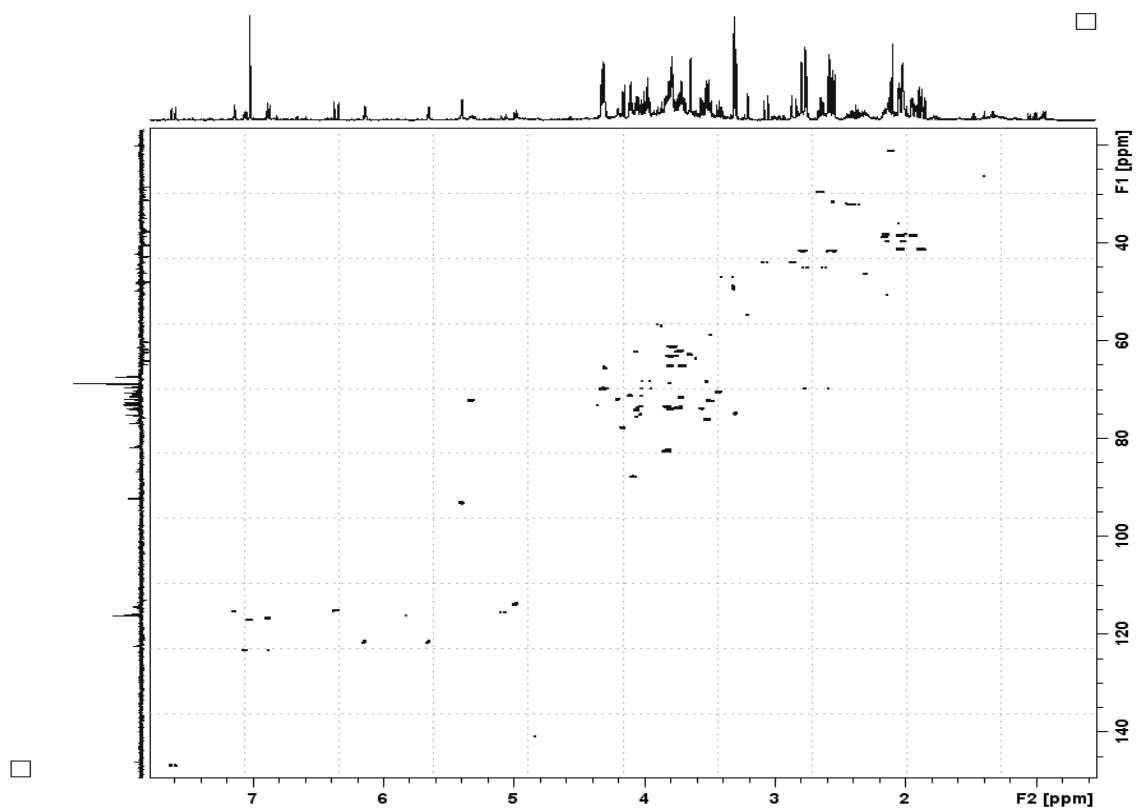
6. C,H J-spektar *A. autariatus* ssp. *autariatus*



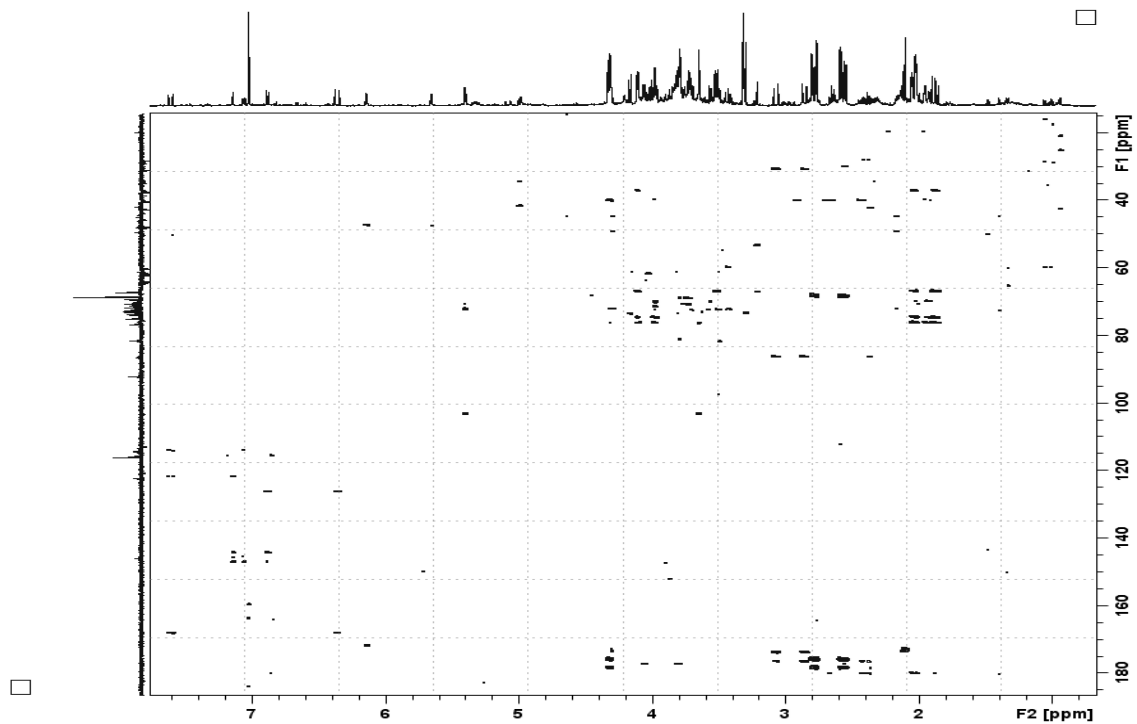
9. ROESY spektar *A. neumayeri*



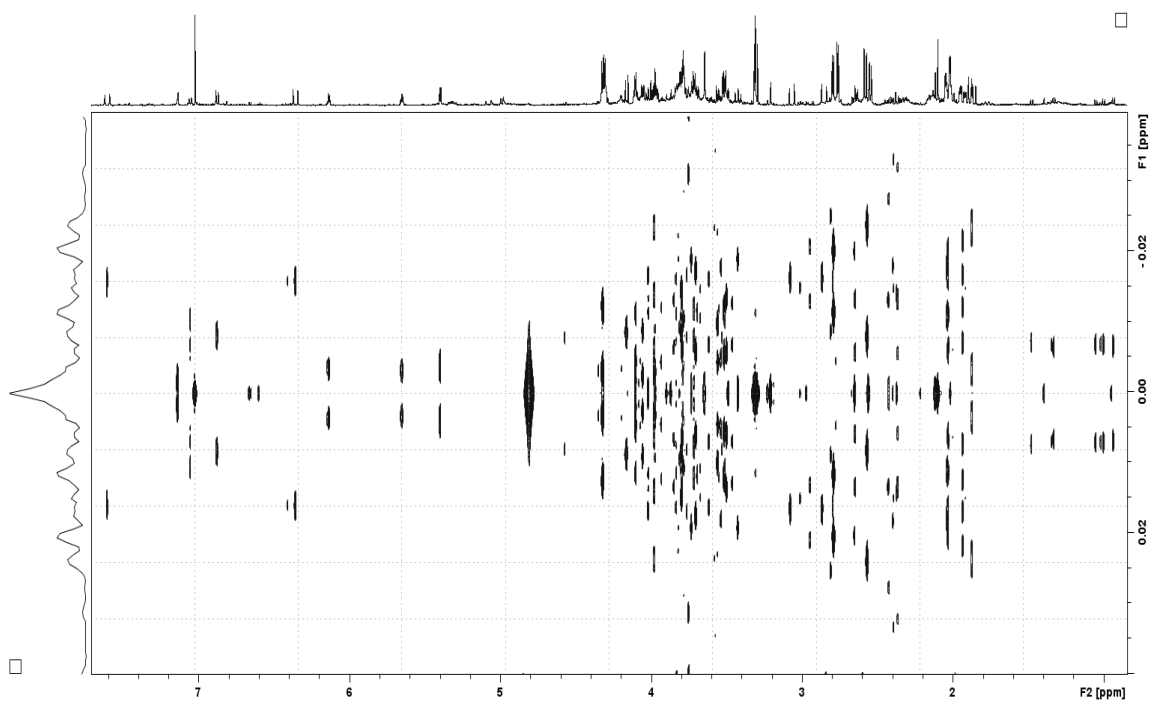
10. HSQC spektar *A. neumayeri*



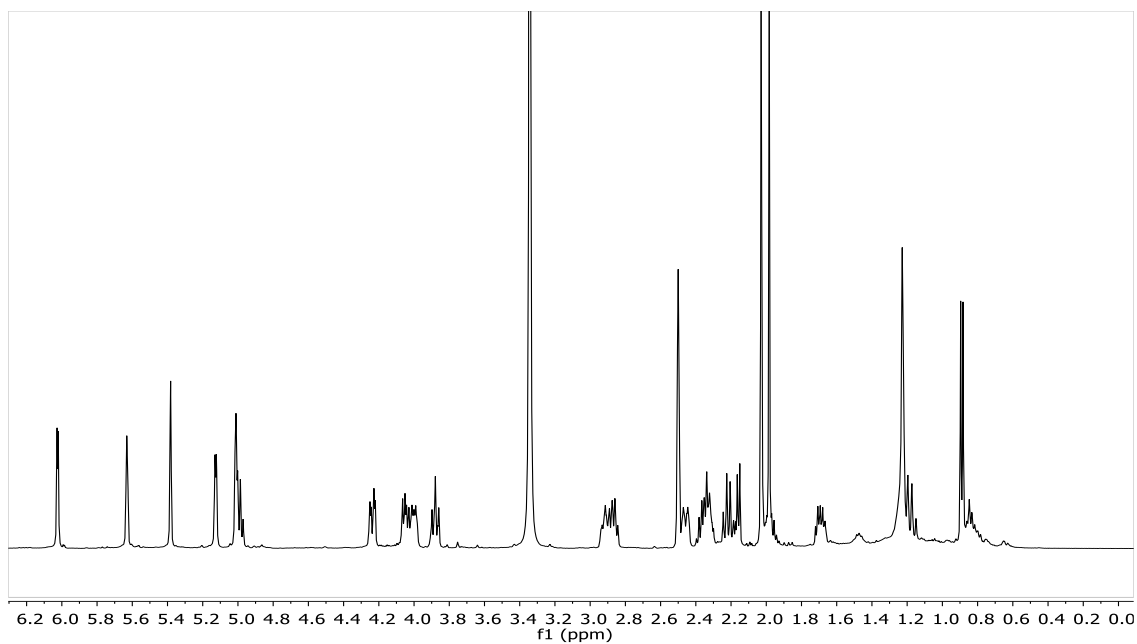
11. HMBC spektr *A. neumayeri*



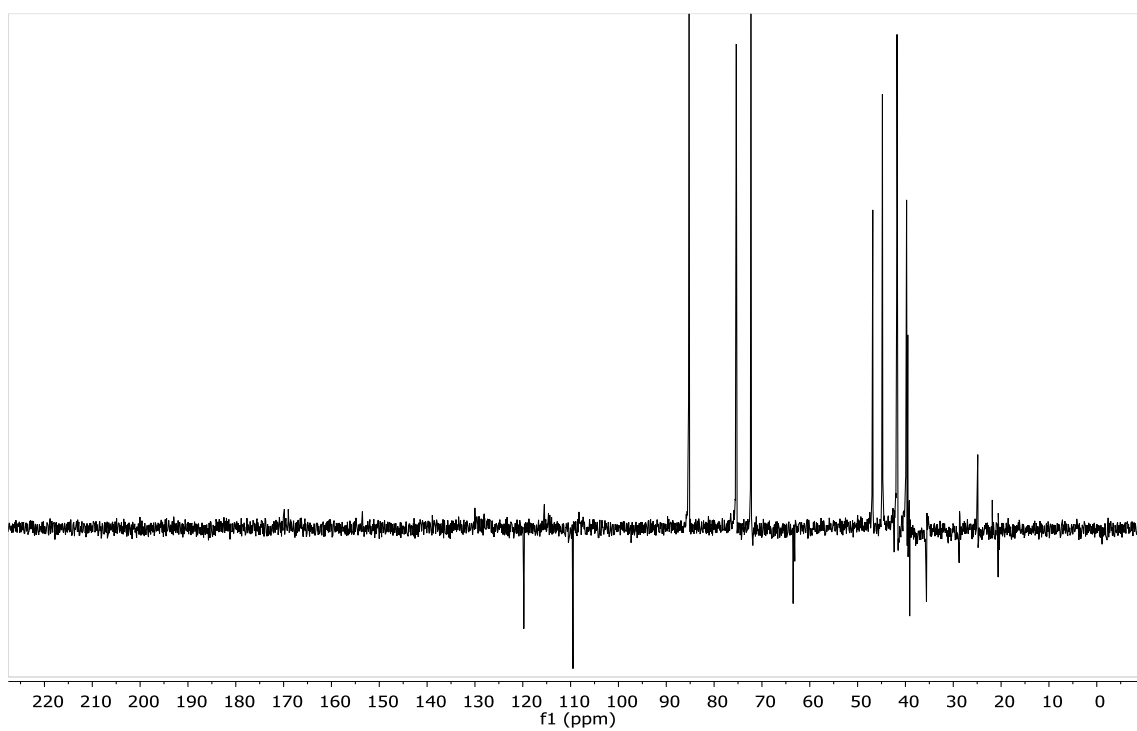
12. C,H J-spektar *A. neumayeri*



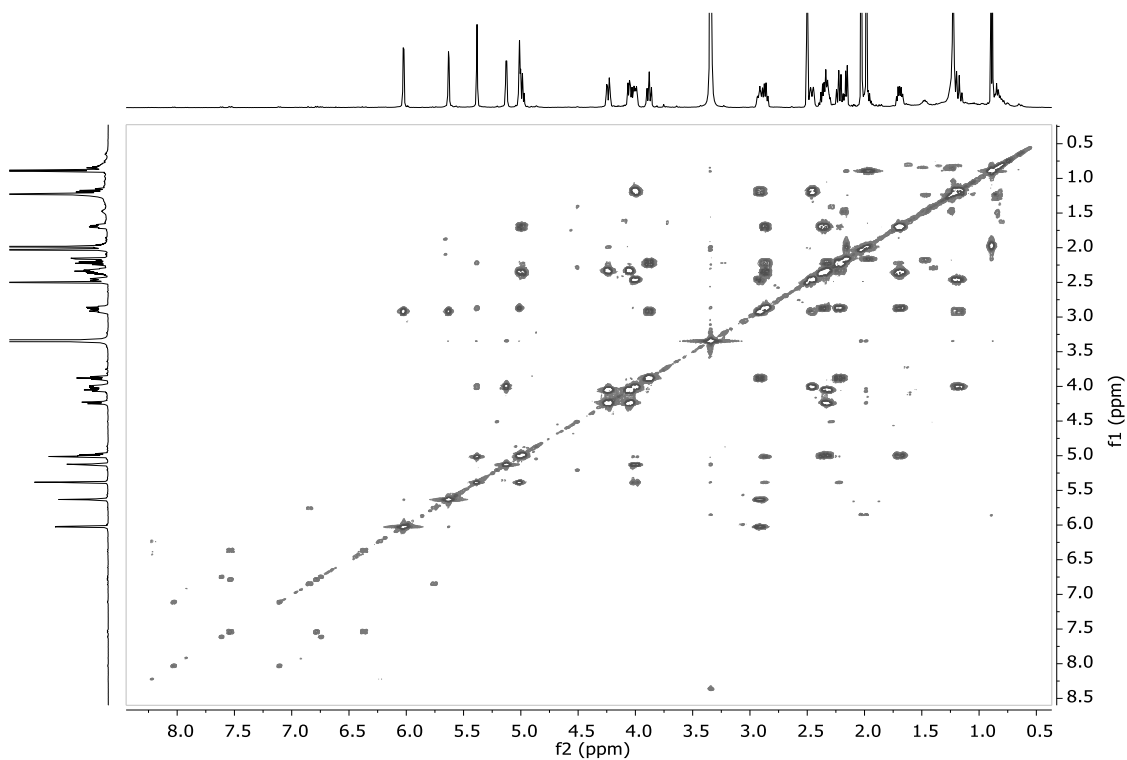
13. ^1H NMR spektar frakcije **35** *A. autariatus* ssp. *autariatus*



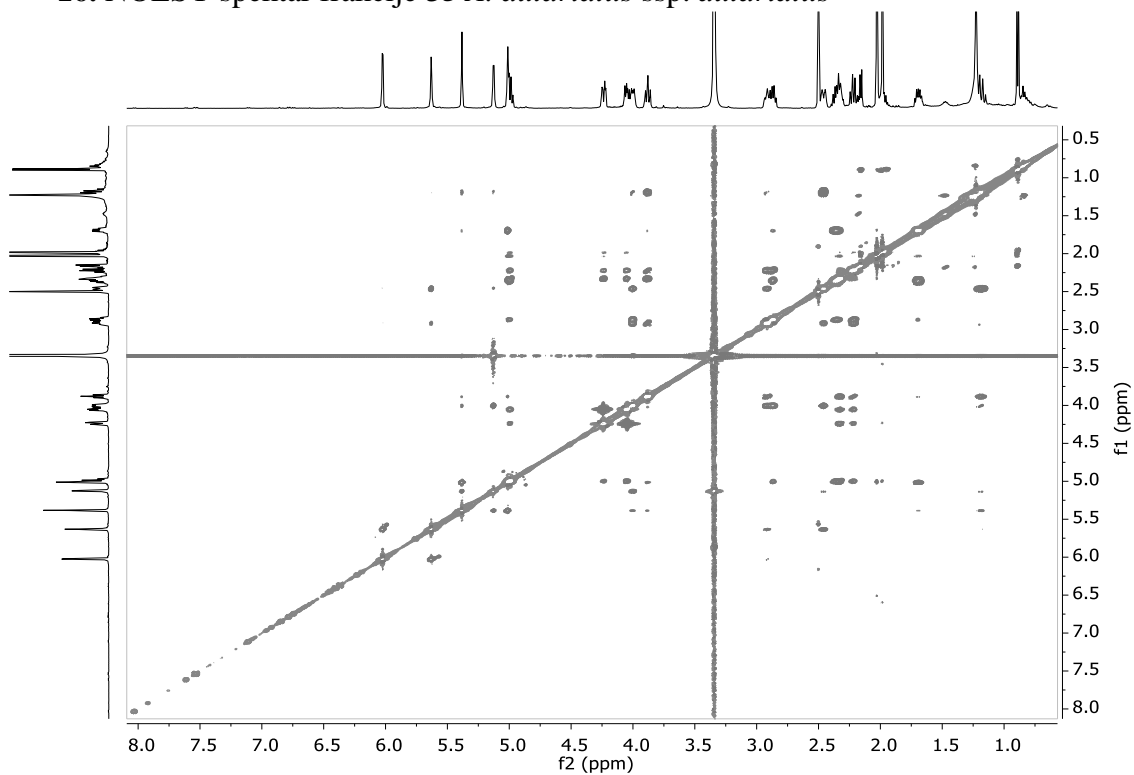
14. DEPT spektar frakcije **35** *A. autariatus* ssp. *autariatus*



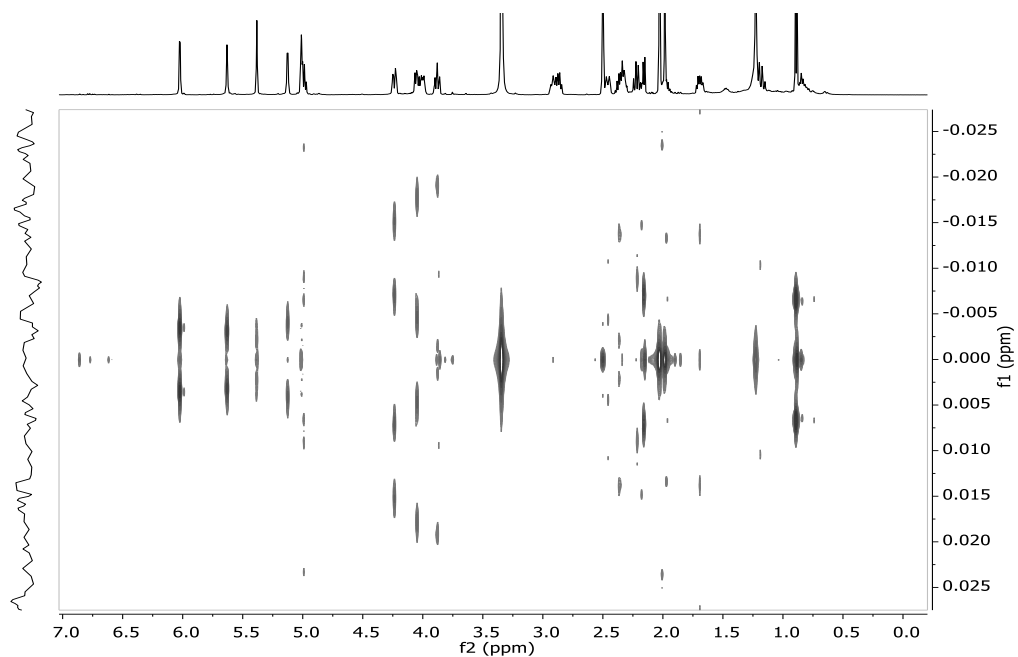
15. COSY spektar frakcije 35 *A. autariatus* ssp. *autariatus*



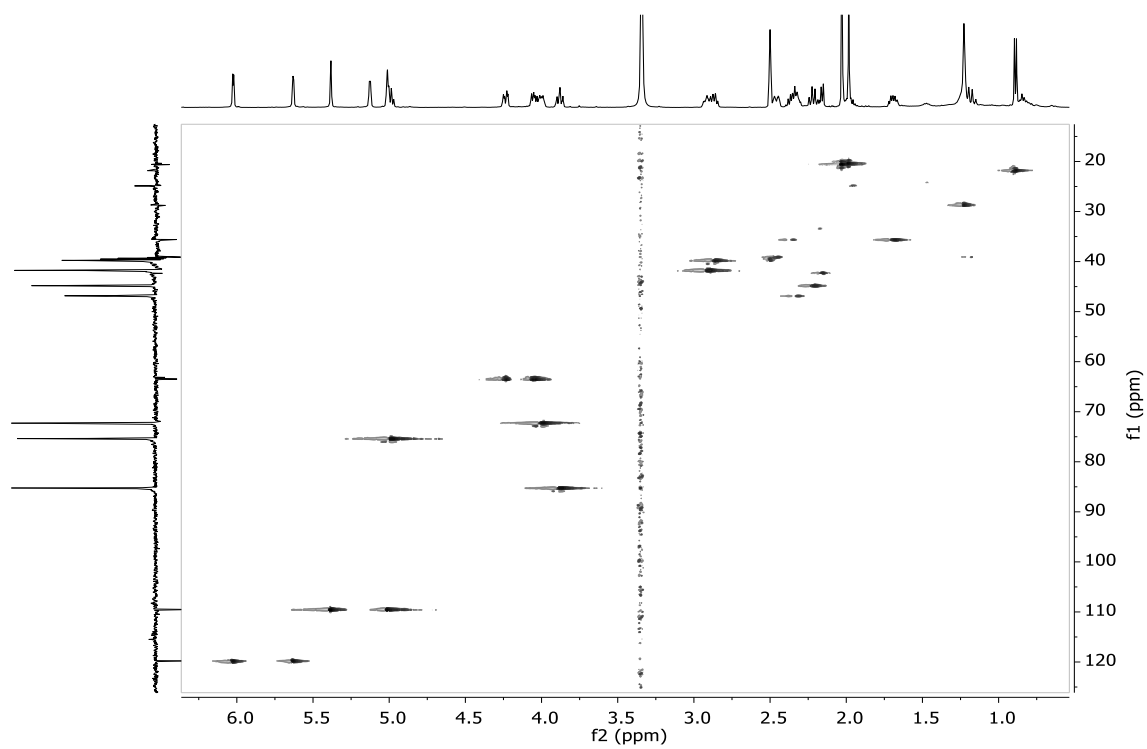
16. NOESY spektar frakcije 35 *A. autariatus* ssp. *autariatus*



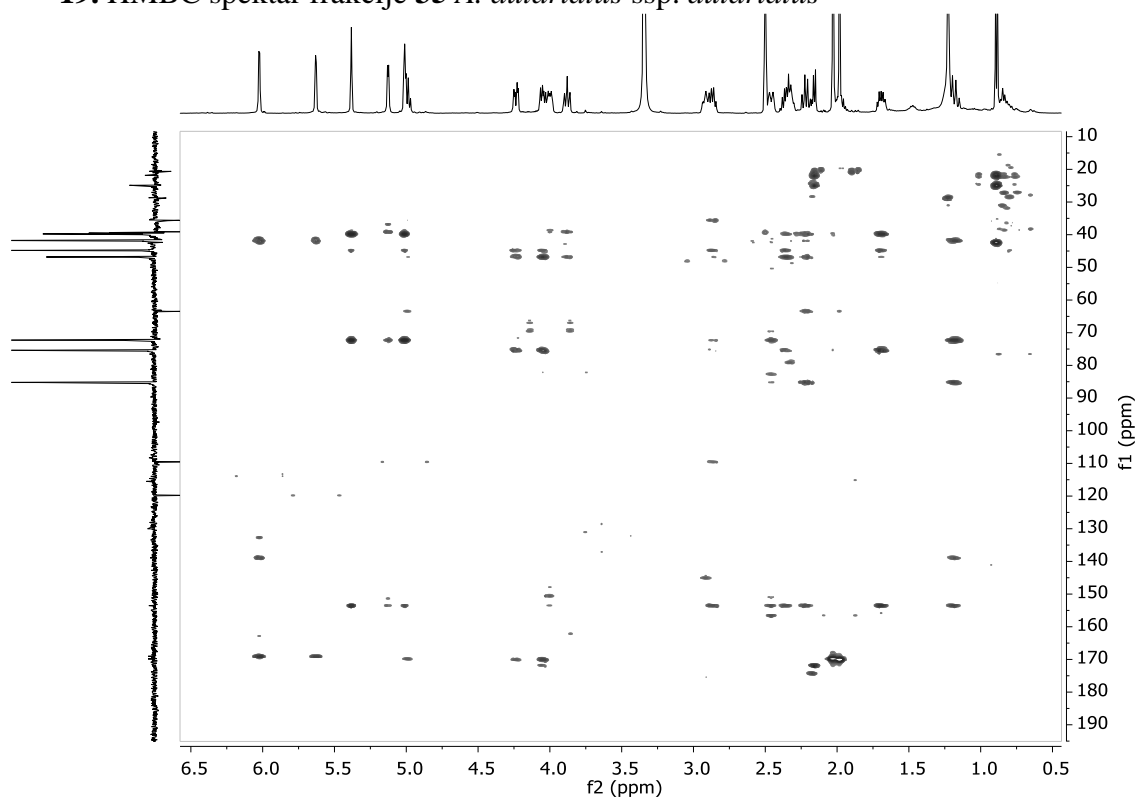
17. H,H J- spektar frakcije 35 *A. autariatus* ssp. *autariatus*



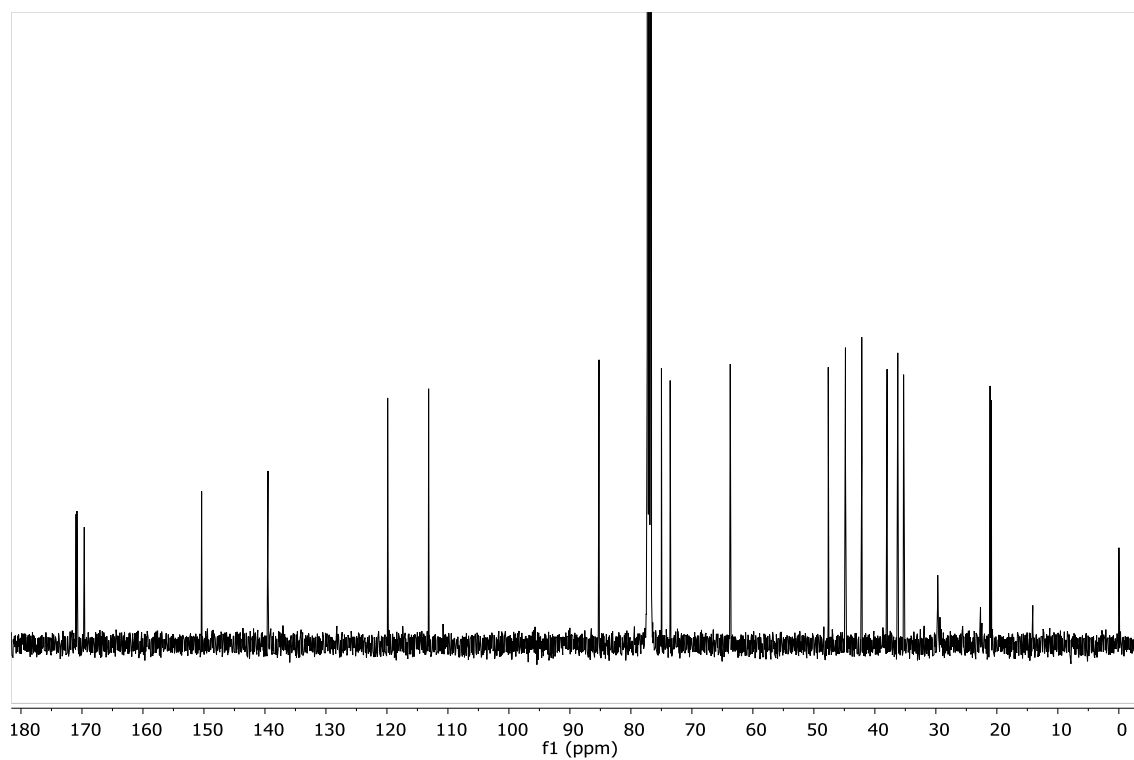
18. HSQC spektar frakcije 35 *A. autariatus* ssp. *autariatus*



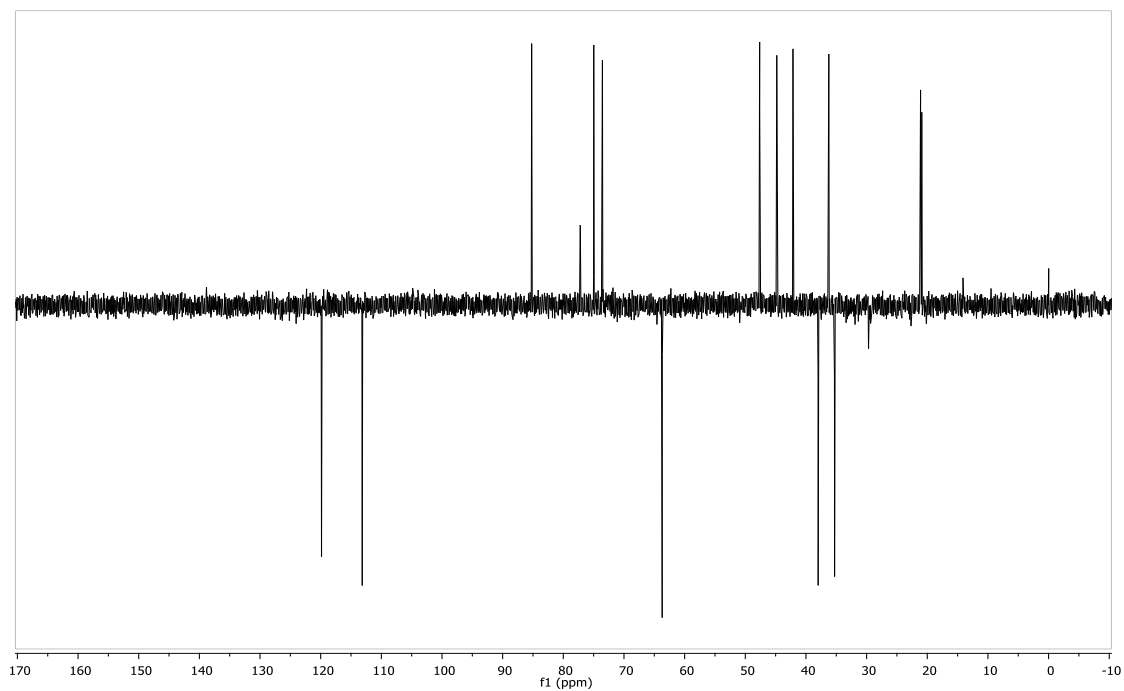
19. HMBC spektar frakcije **35** *A. autariatus* ssp. *autariatus*



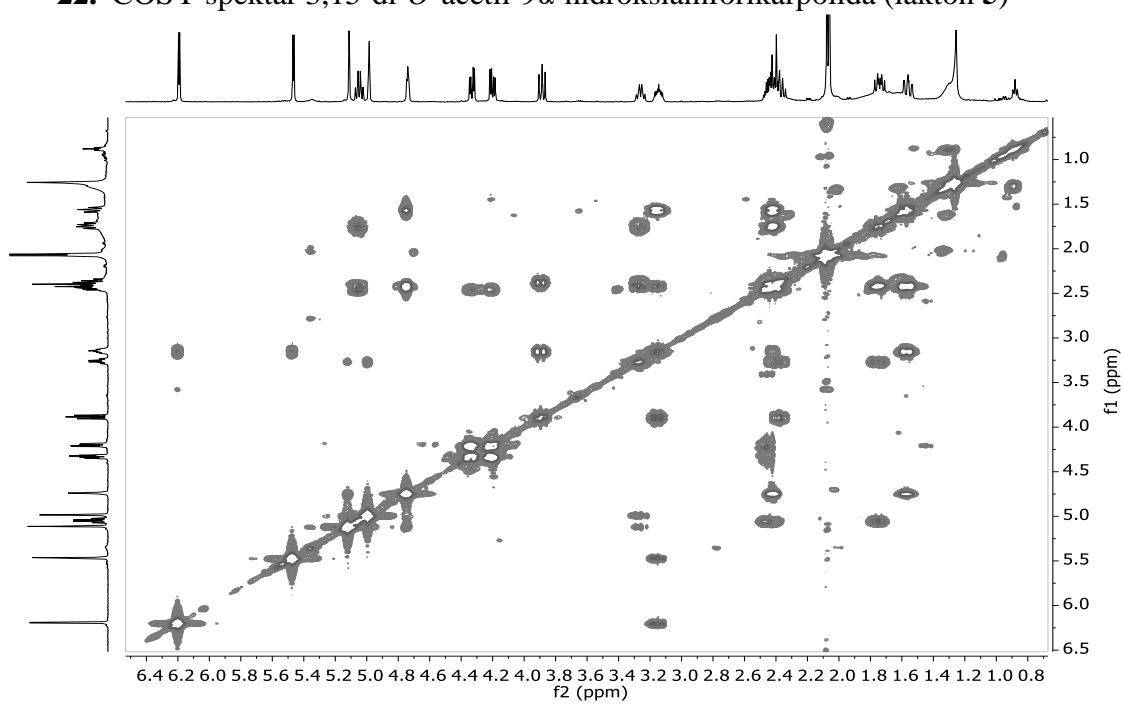
20. ¹³C NMR spektar 3,15-di-*O*-acetil-9 α -hidroksiamforikarpolida (lakton **5**)



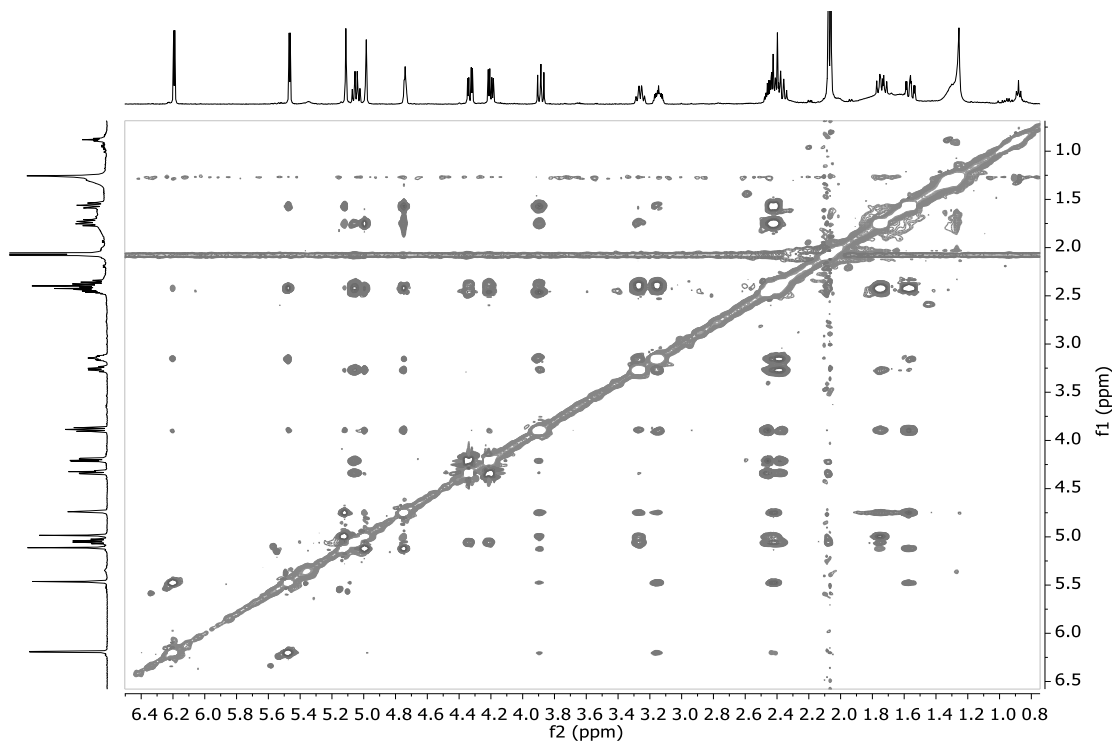
21. ^{13}C DEPT spektar 3,15-di-*O*-acetil-9 α -hidroksiamforikarpolida (lakton 5)



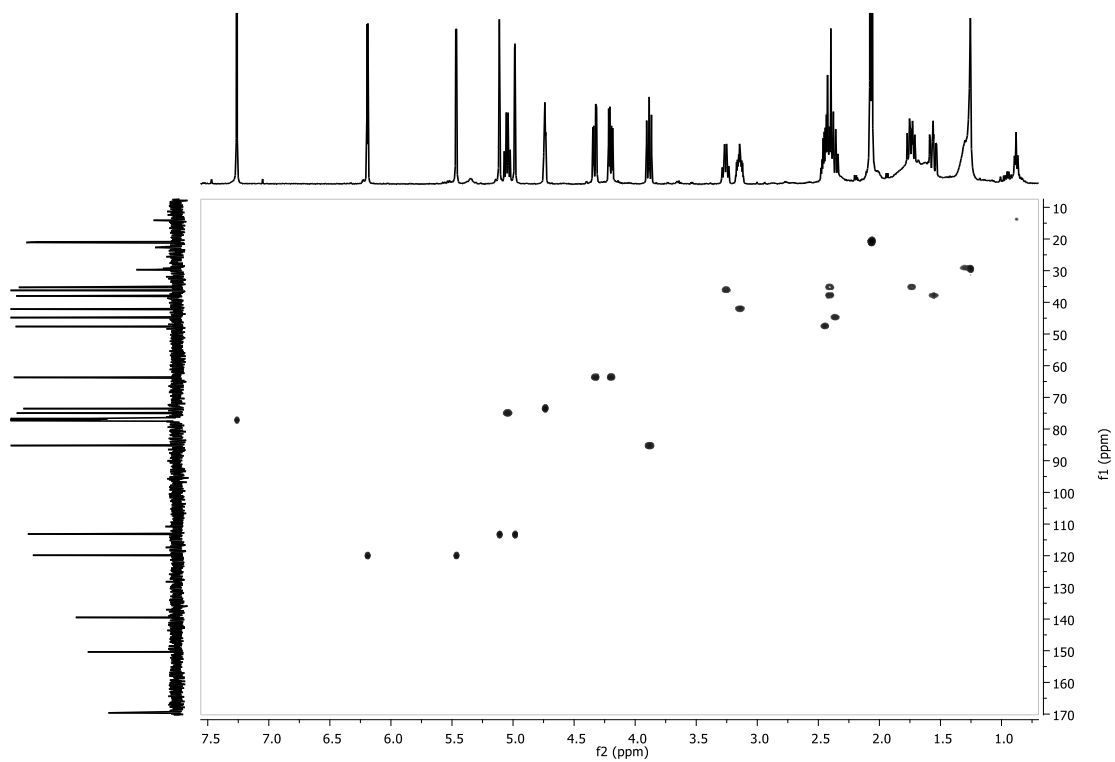
22. COSY spektar 3,15-di-*O*-acetil-9 α -hidroksiamforikarpolida (lakton 5)



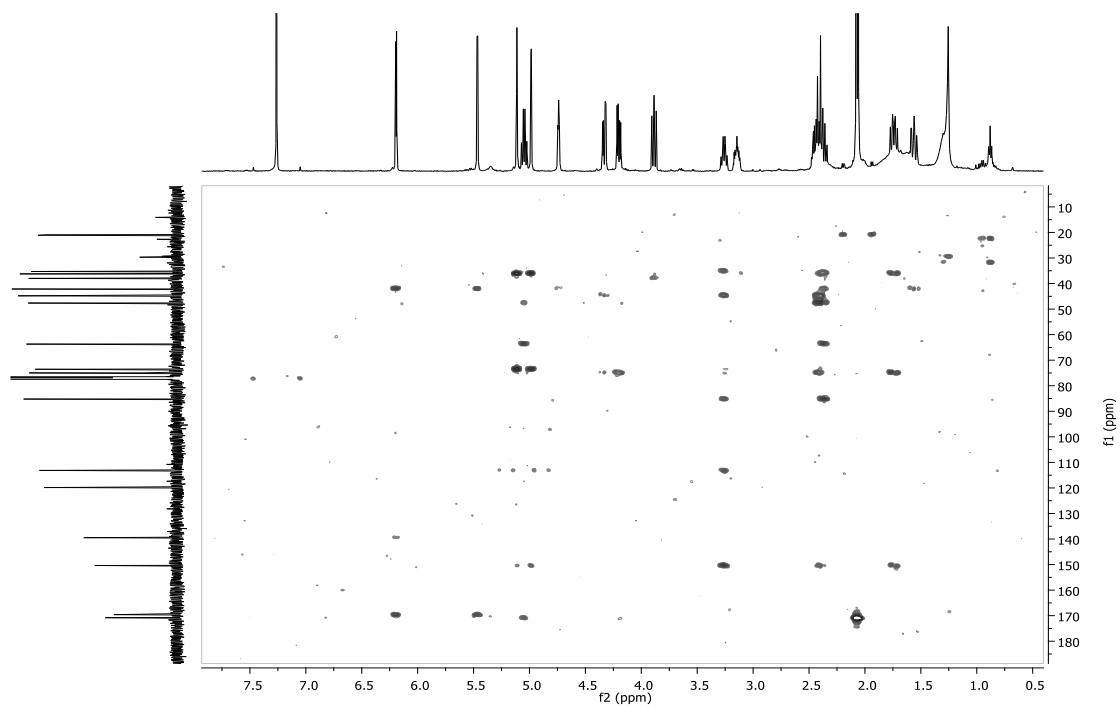
23. NOESY spektar 3,15-di-*O*-acetil-9 α -hidroksiamforikarpolida (lakton 5)



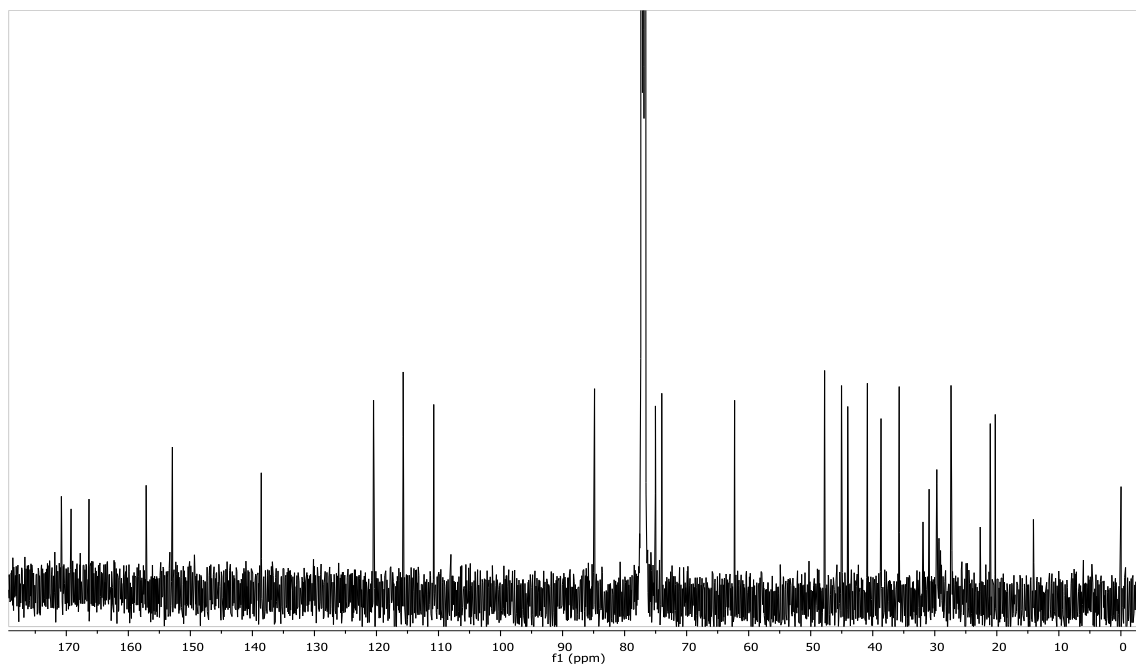
24. HSQC spektar 3,15-di-*O*-acetil-9 α -hidroksiamforikarpolida (lakton 5)



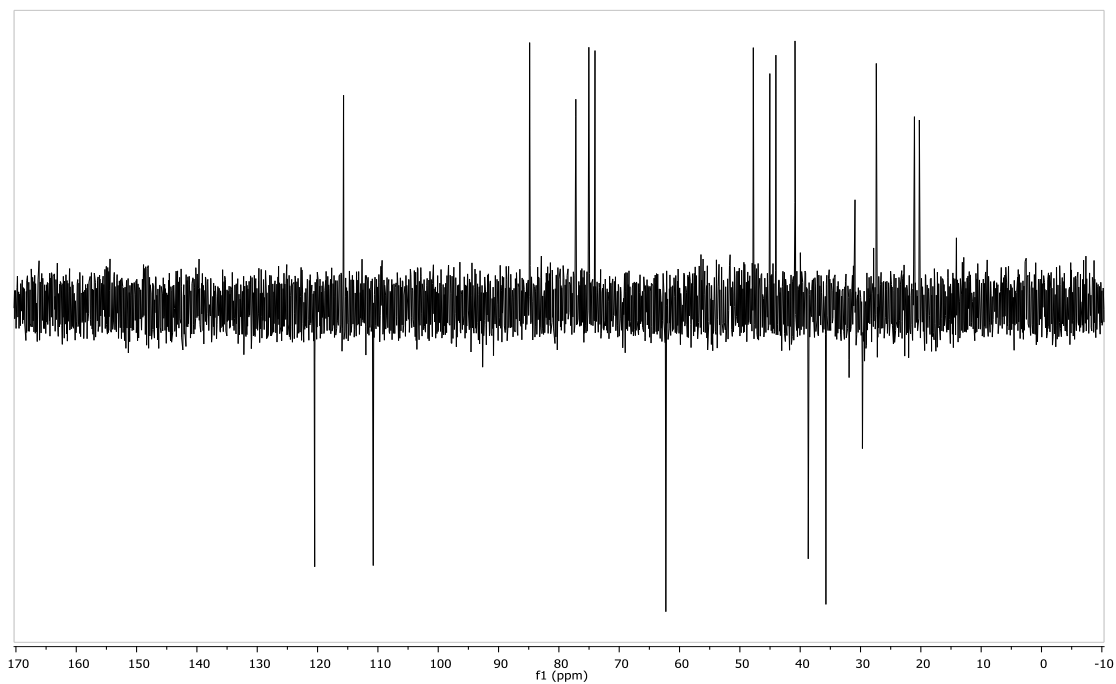
25. HMBC spektar 3,15-di-*O*-acetil-9 α -hidroksiamforikarpolida (lakton 5)



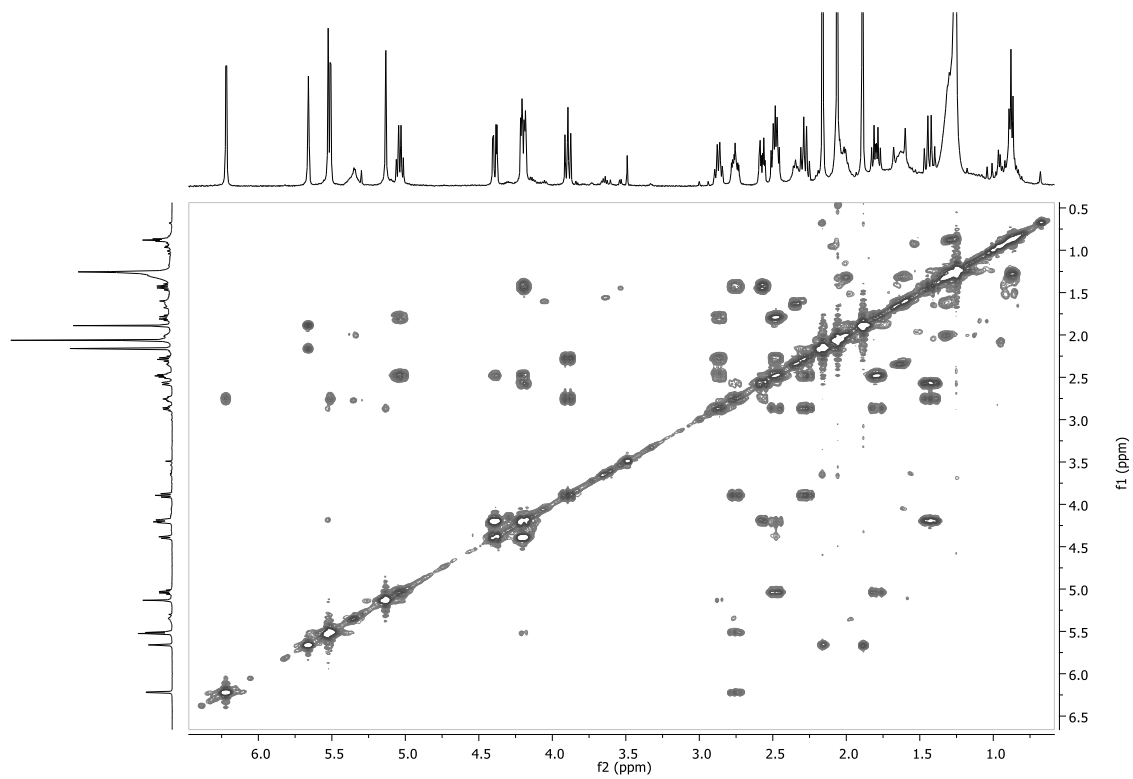
26. ^{13}C NMR spektar 3-*O*-acetil-15-*O*-senecioil-9 β -hidroksi-amforikarpolida (lakton 6)



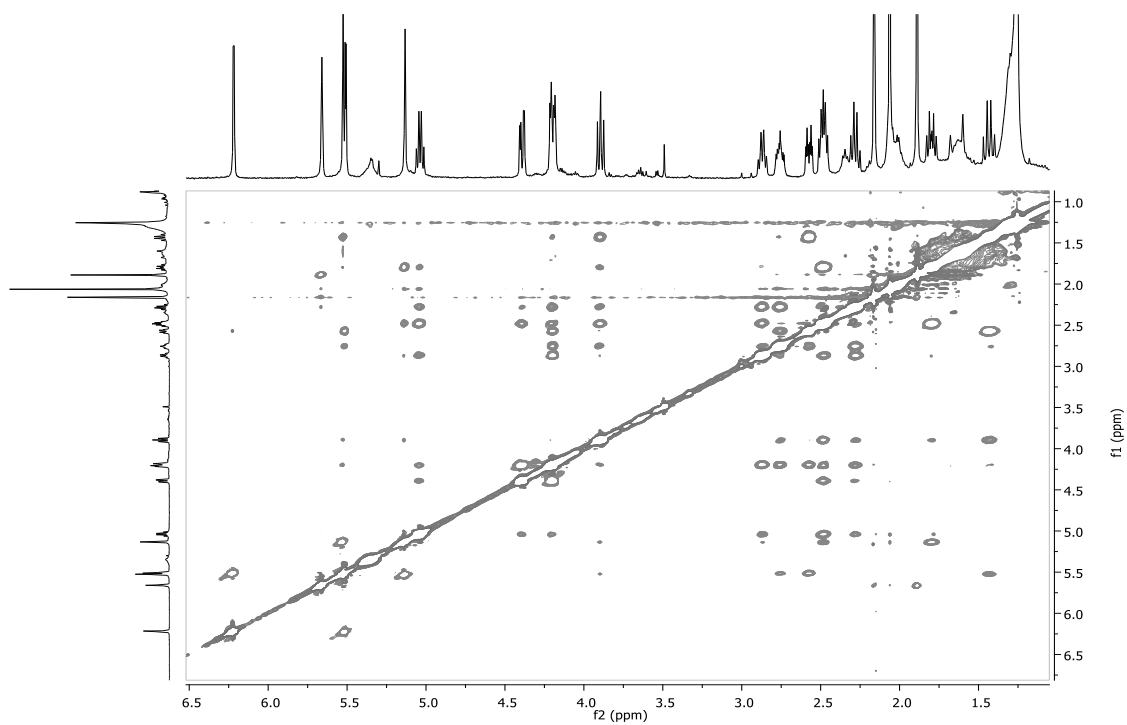
27. ^{13}C DEPT spektr 3-*O*-acetil-15-*O*-senecioil-9 β -hidroksiamforikarpolida (lakton **6**)



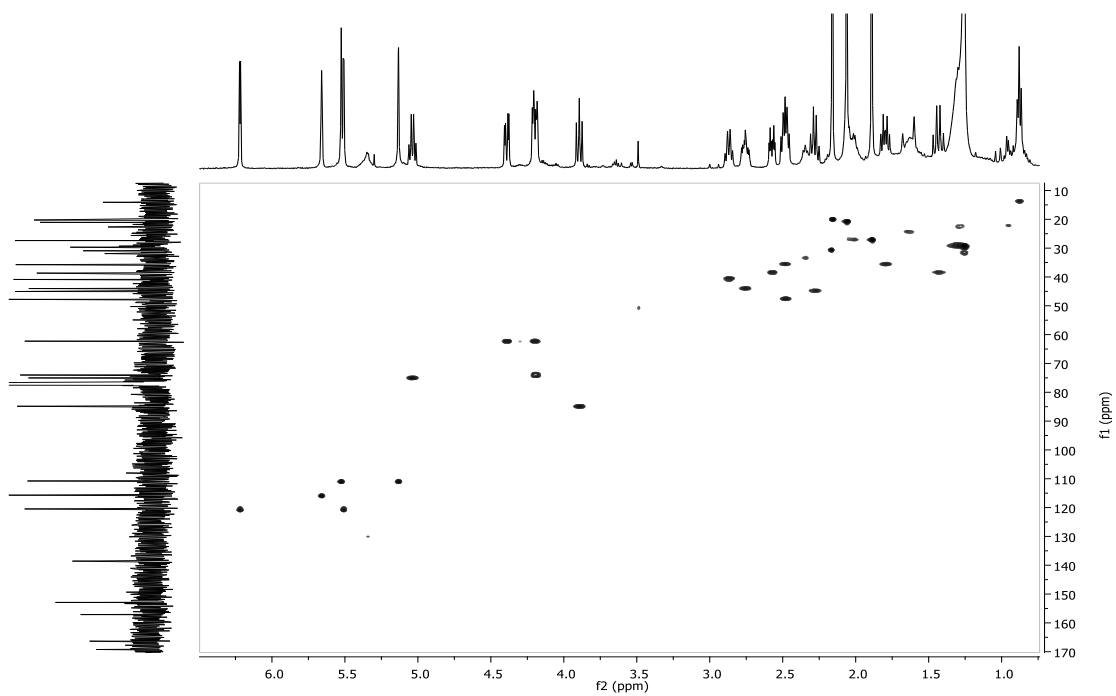
28. COSY spektr 3-*O*-acetil-15-*O*-senecioil-9 β -hidroksiamforikarpolida (lakton **6**)



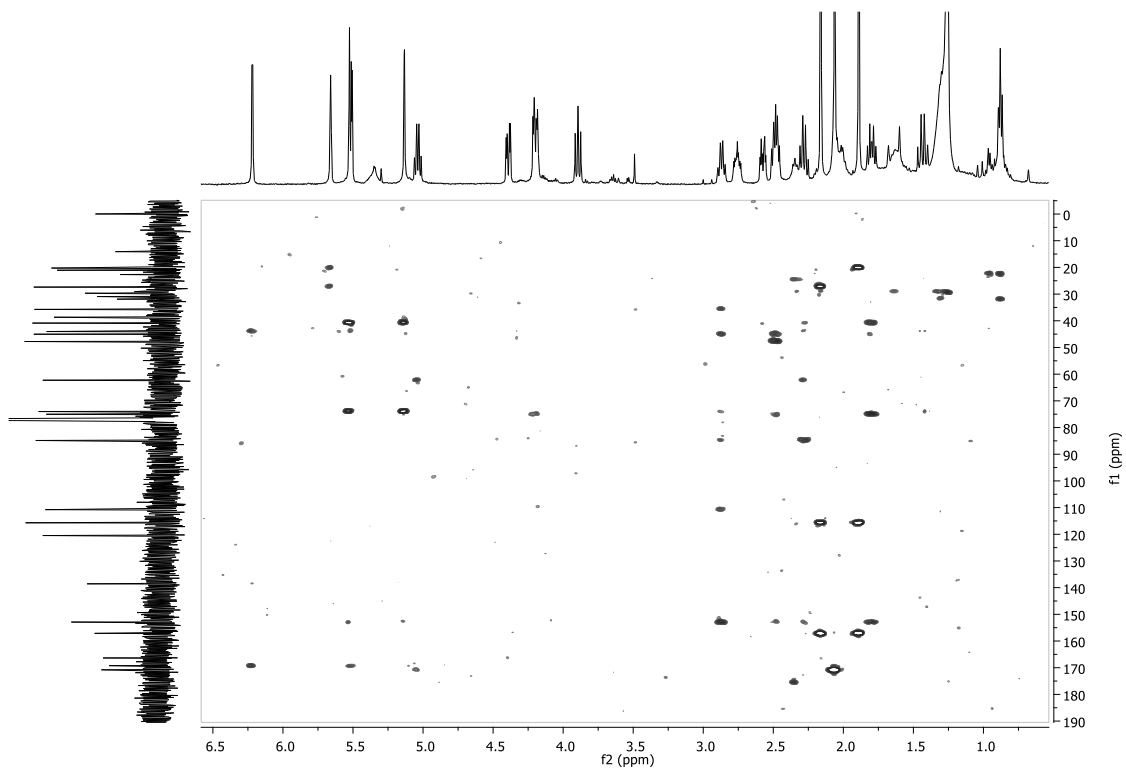
29. NOESY spektar 3-*O*-acetil-15-*O*-seneciooil-9 β -hidroksiamforikarpolida (lakton **6**)



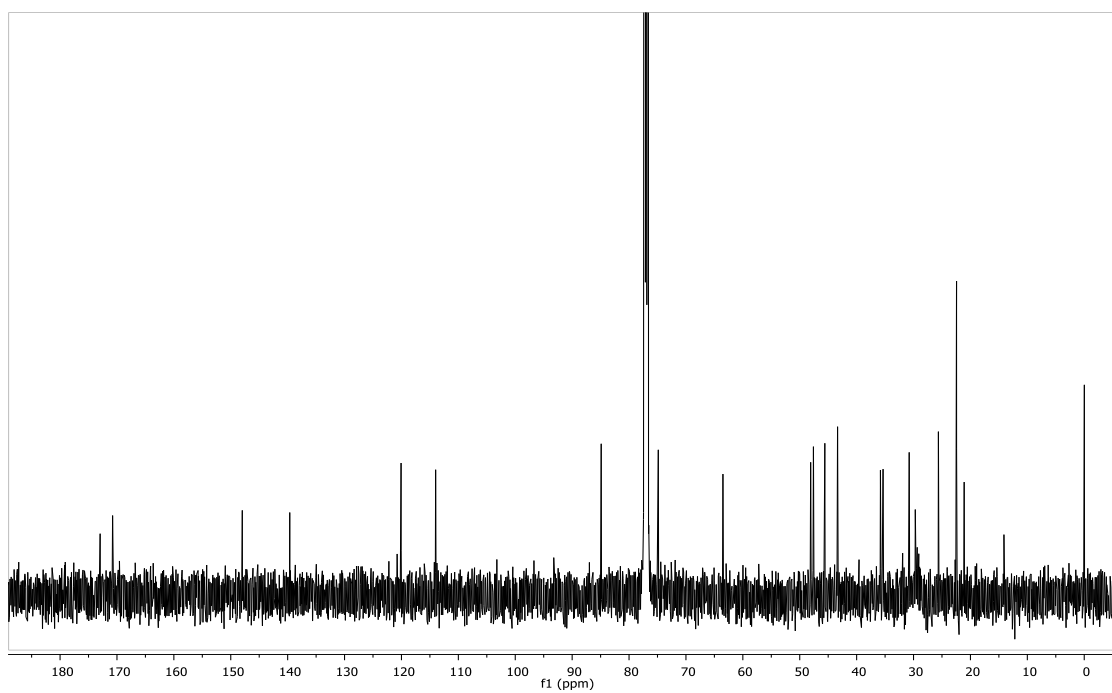
30. HSQC spektar 3-*O*-acetil-15-*O*-seneciooil-9 β -hidroksiamforikarpolida (lakton **6**)



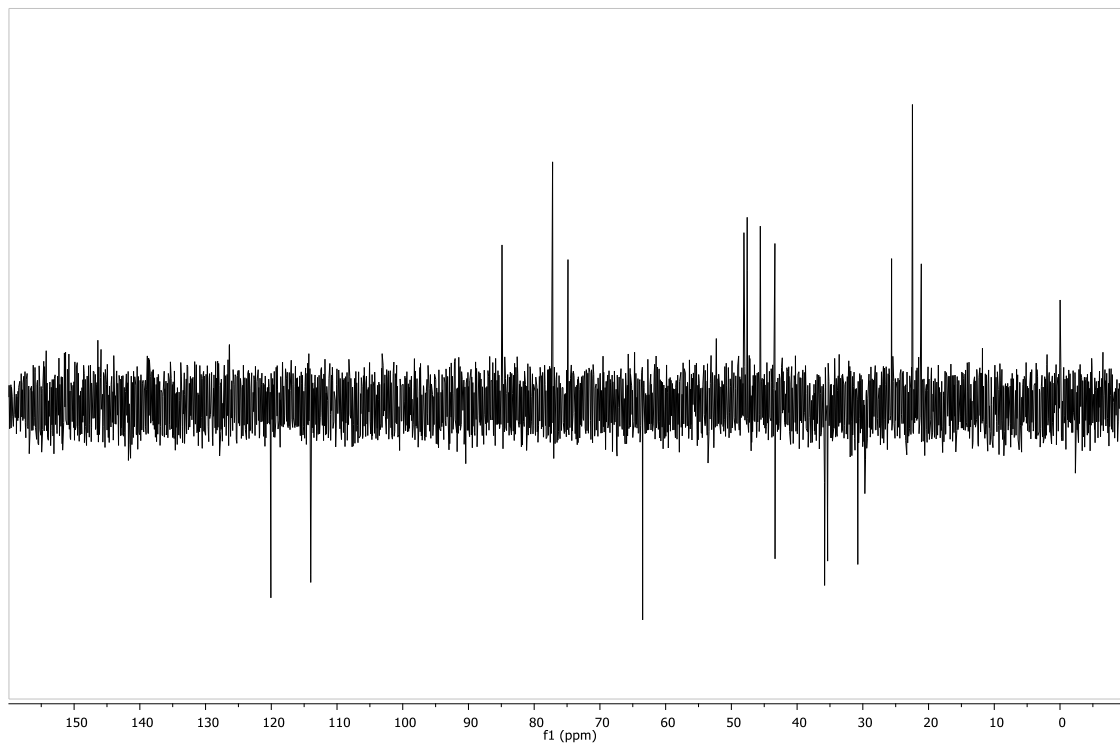
31. HMBC spektar 3-*O*-acetil-15-*O*-senecioil-9 β -hidroksi-amforikarpolida (lakton **6**)



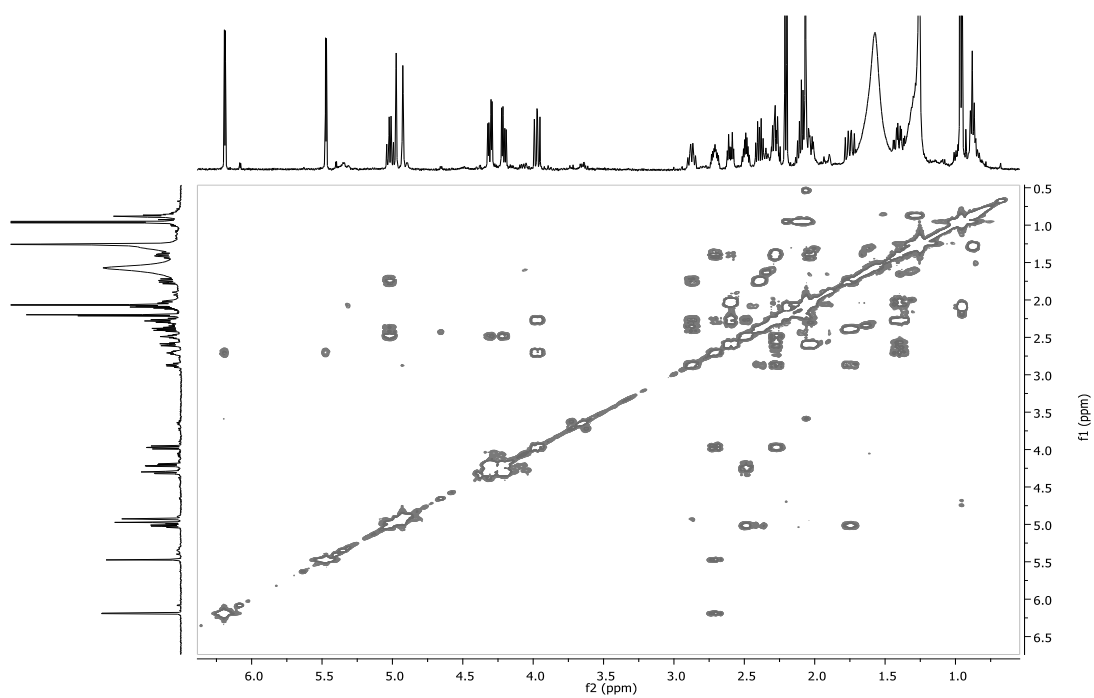
32. ¹³C NMR spektar 3-*O*-acetil-15-*O*-izovaleroilamforikarpolida (lakton **8**)



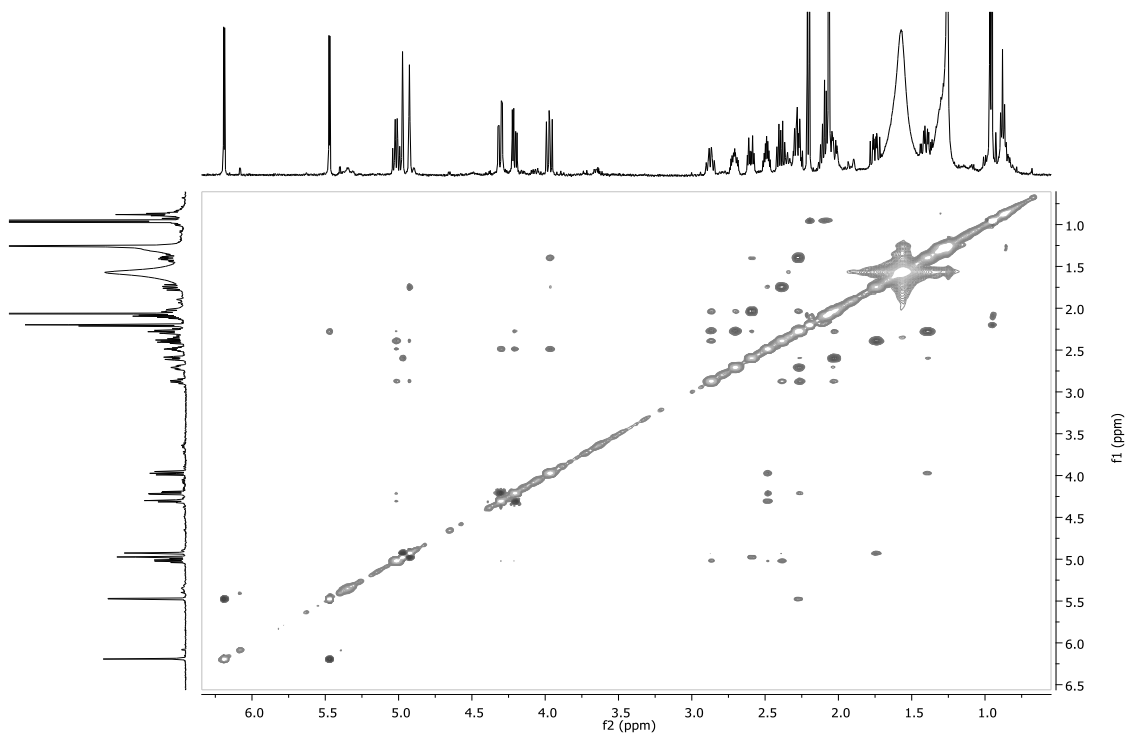
33. ^{13}C DEPT spektar 3-*O*-acetil-15-*O*-izovaleroilamforikarpolida (lakton **8**)



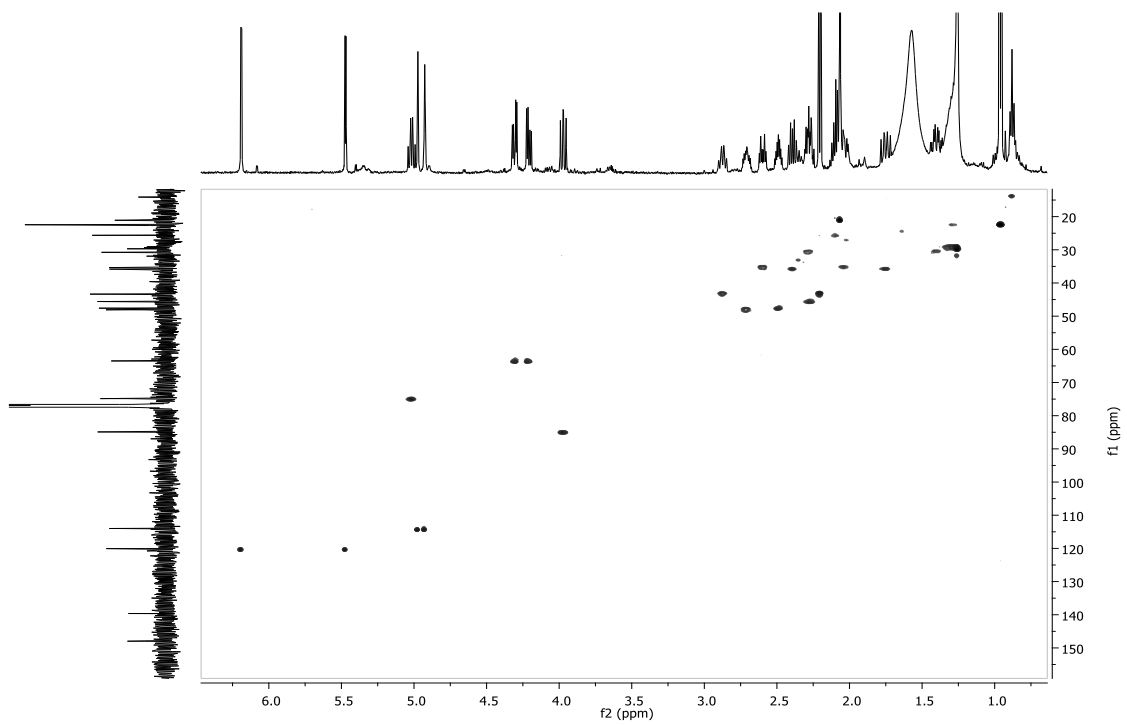
34. COSY spektar 3-*O*-acetil-15-*O*-izovaleroilamforikarpolida (lakton **8**)



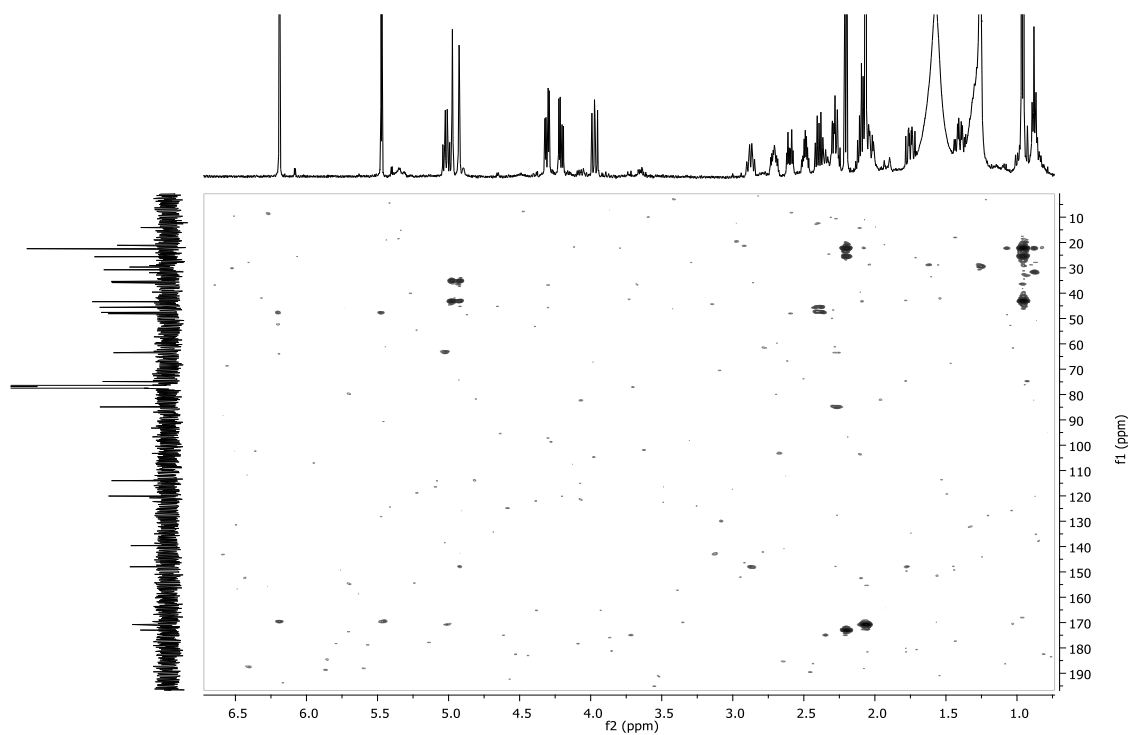
35. NOESY spektar 3-*O*-acetil-15-*O*-izovaleroilamforikarpolida (lakton **8**)



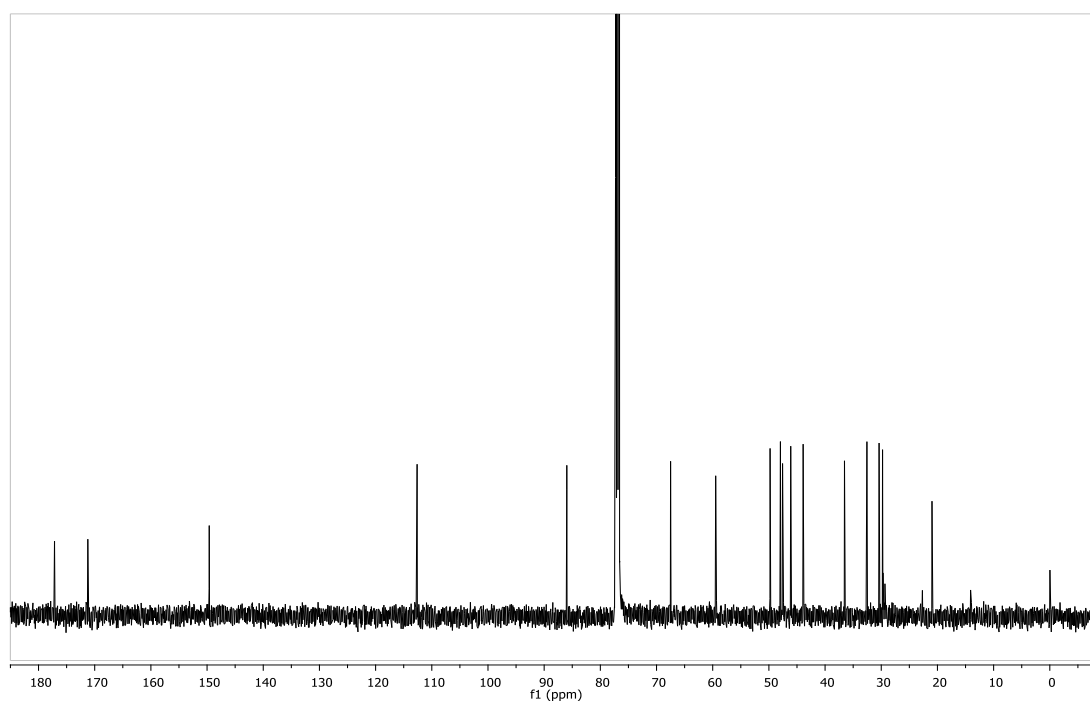
36. HSQC spektar 3-*O*-acetil-15-*O*-izovaleroilamforikarpolida (lakton **8**)



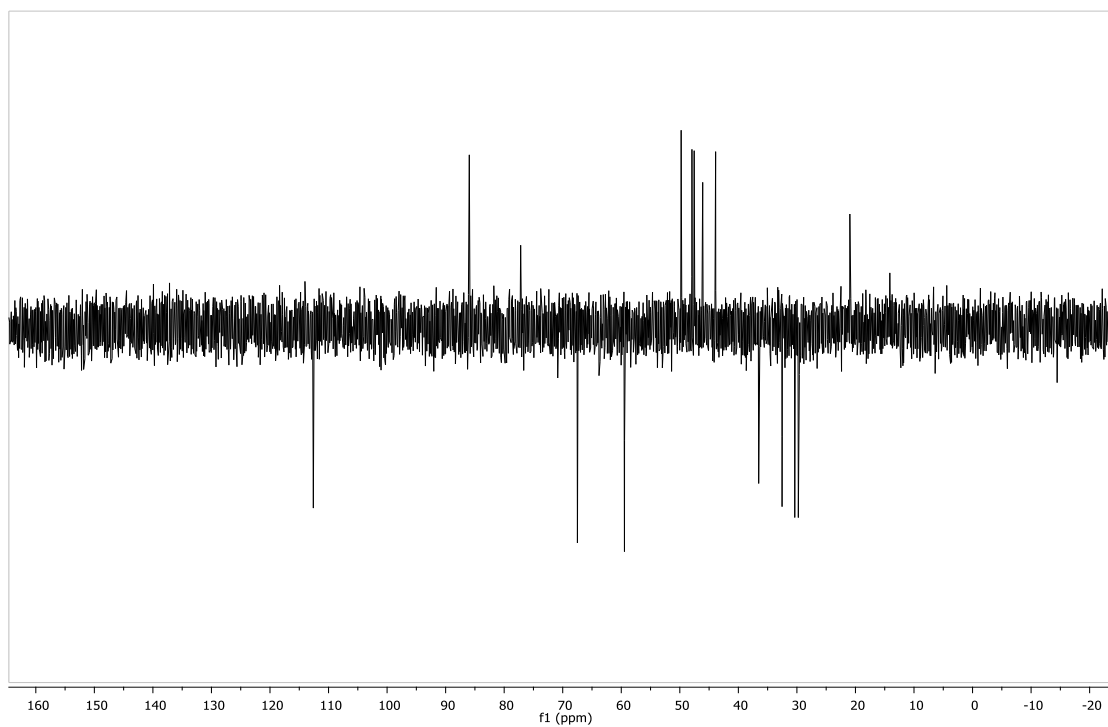
37. HMBC spektar 3-*O*-acetil-15-*O*-izovaleroilamforikarpolida (lakton **8**)



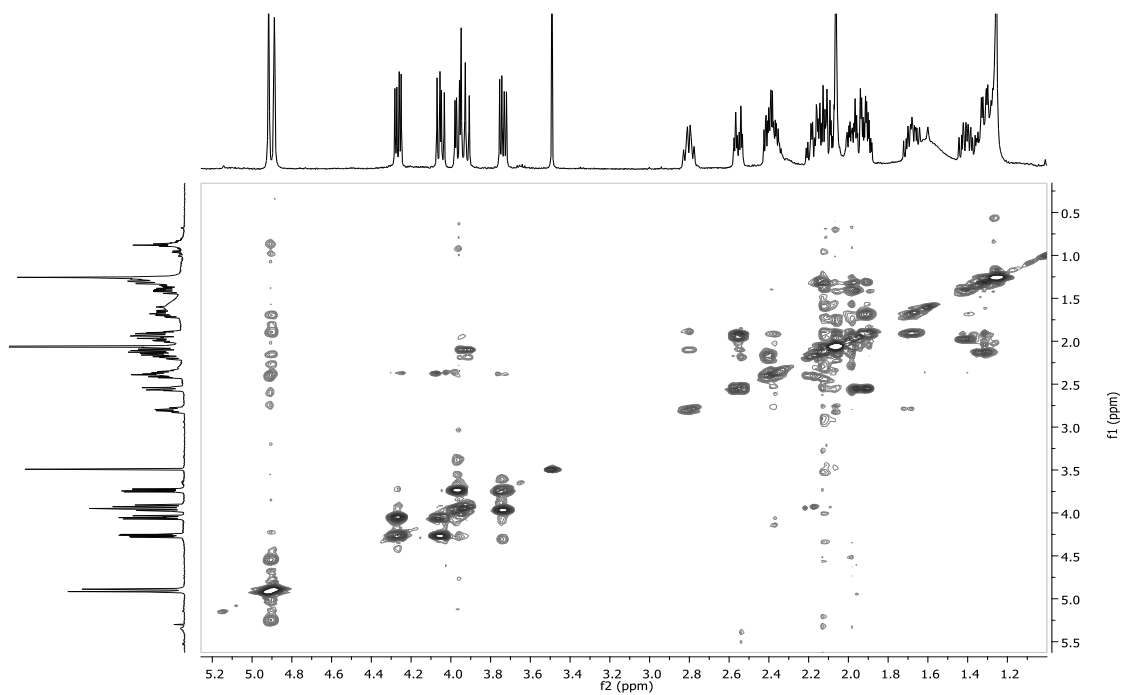
38. ¹³C NMR spektar 15-*O*-acetil-3-deoksi-11 β ,13-dihidro-13-hidroksiamforikarpolida (lakton **12**)



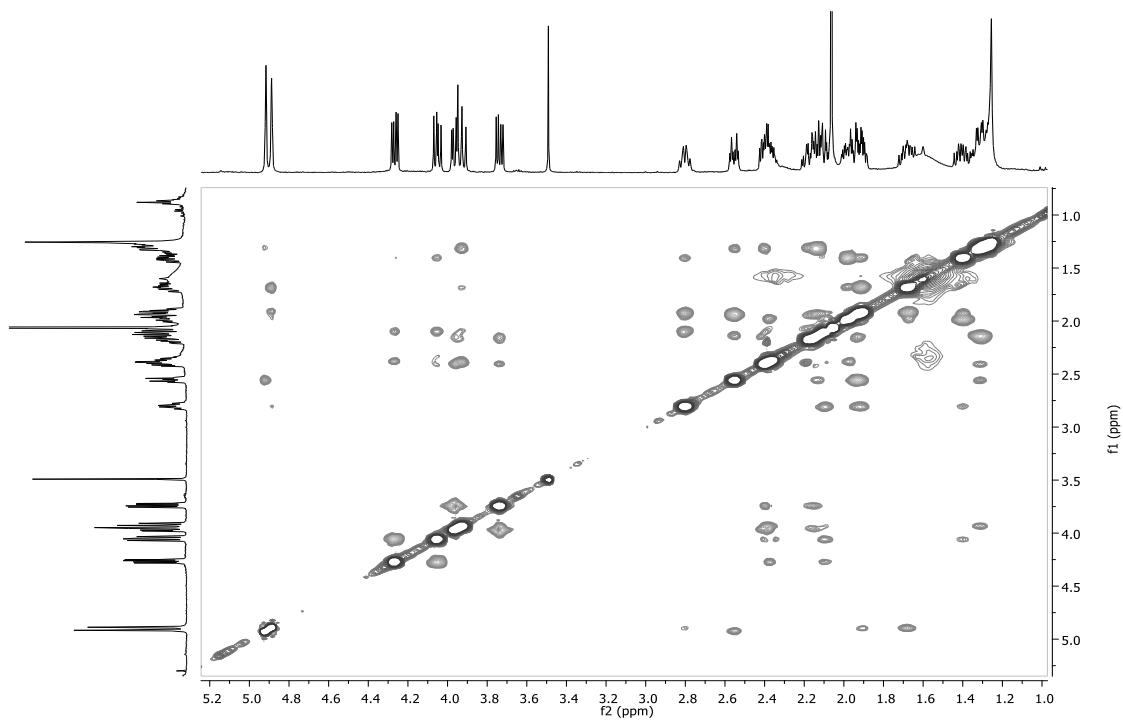
39. ^{13}C DEPT spektar 15-*O*-acetil-3-deoksi-11 β ,13-dihidro-13-hidroksiamforikarpolida (lakton **12**)



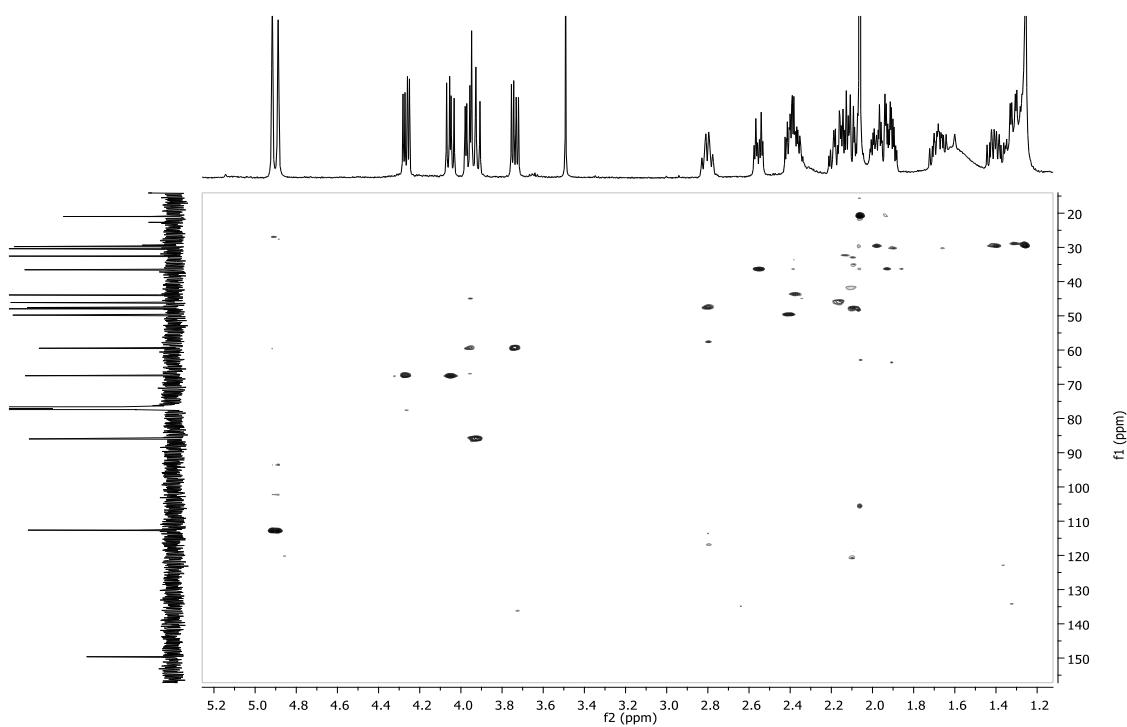
40. COSY spektar 15-*O*-acetil-3-deoksi-11 β ,13-dihidro-13-hidroksiamforikarpolida (lakton **12**)



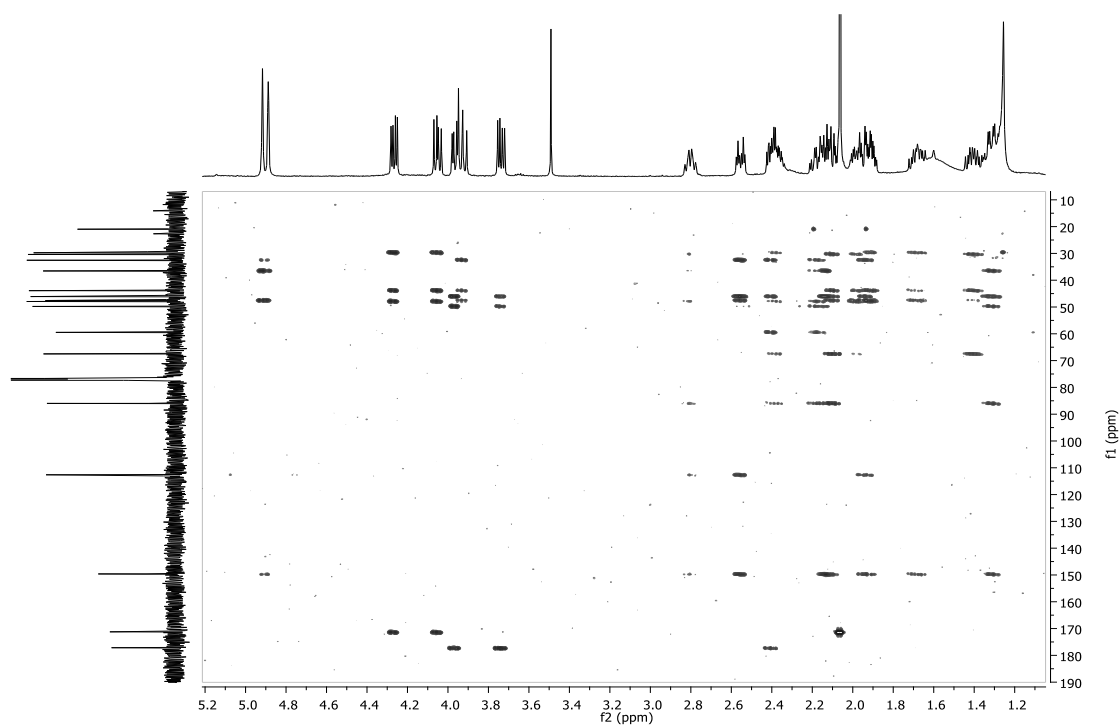
41. NOESY spektr 15-*O*-acetil-3-deoksi-11 β ,13-dihidro-13-hidroksiamforikarpolida (lakton **12**)



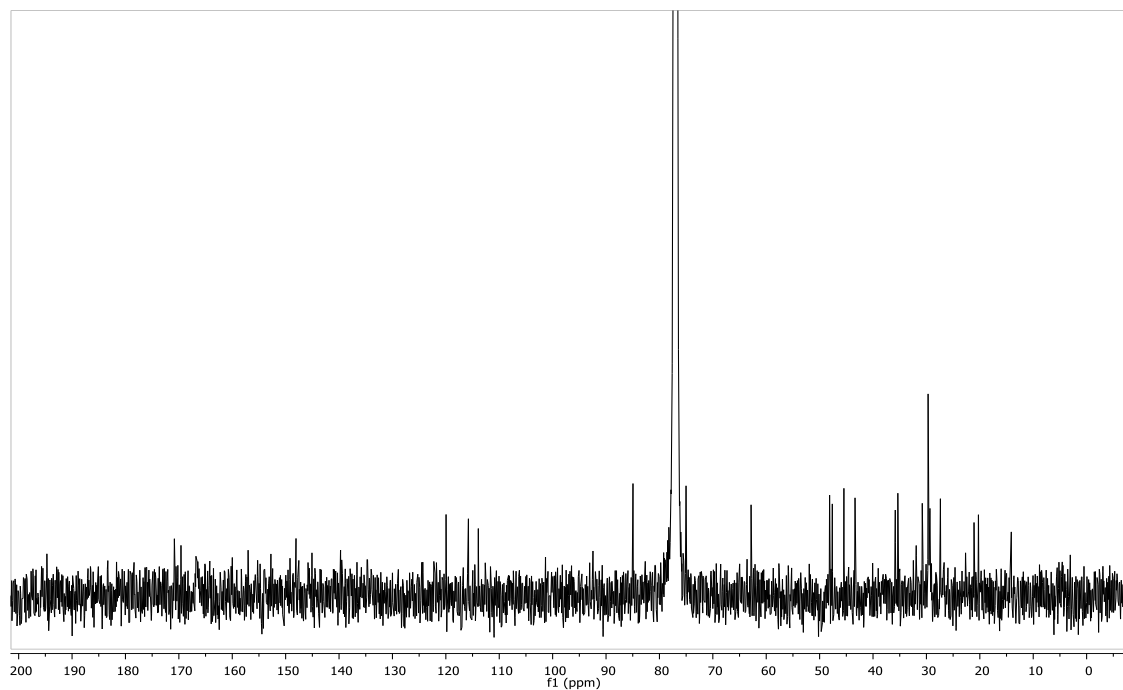
42. HSQC spektr 15-*O*-acetil-3-deoksi-11 β ,13-dihidro-13-hidroksiamforikarpolida (lakton **12**)



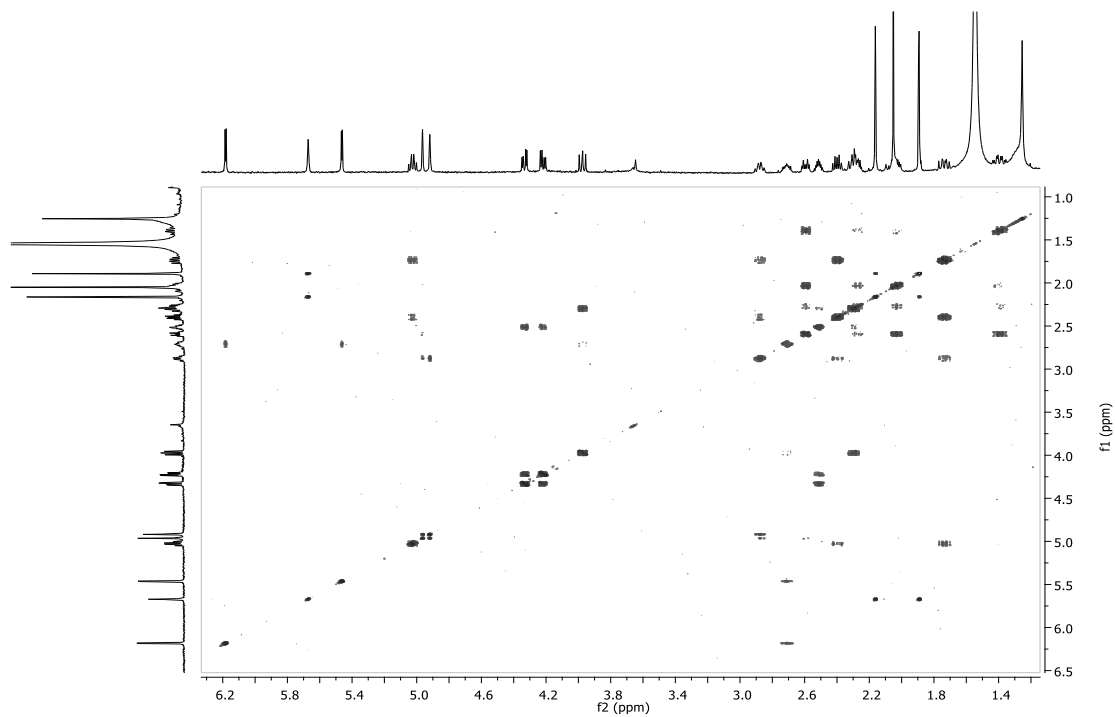
43. HMBC spektar 15-*O*-acetil-3-deoksi-11 β ,13-dihidro-13-hidroksiamforikarpolida (lakton 12)



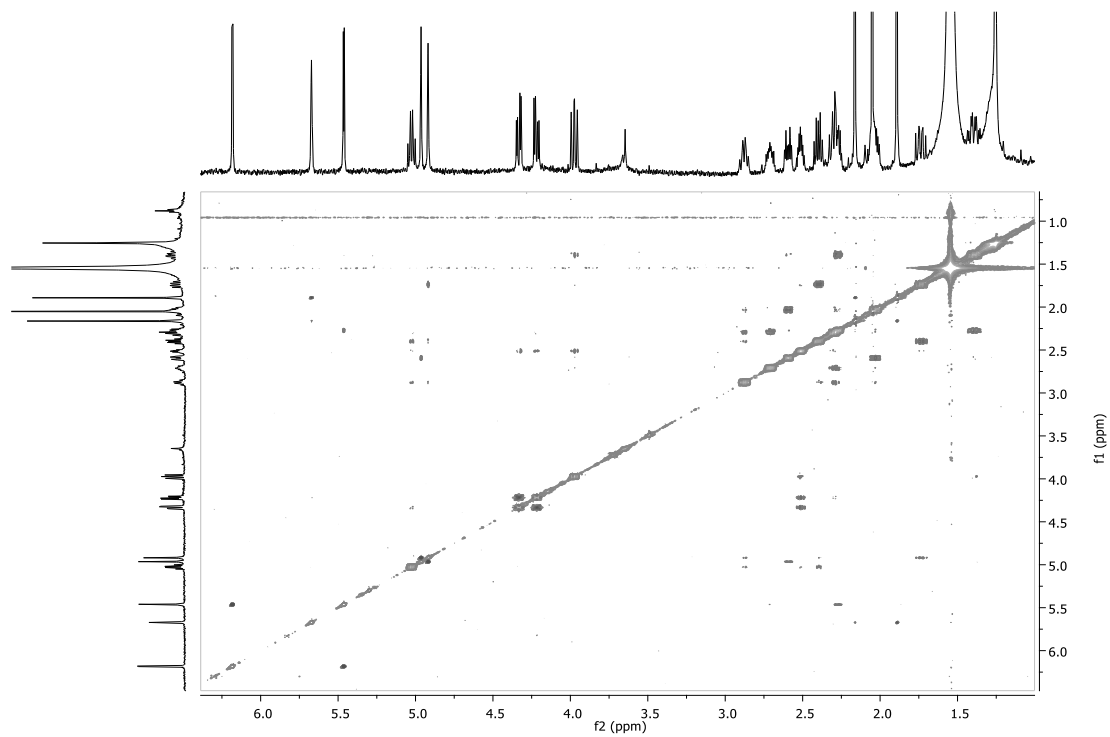
44. ^{13}C NMR spektar 3 β -*O*-acetil-15-*O*-senecioilamforikarpolida (lakton 17)



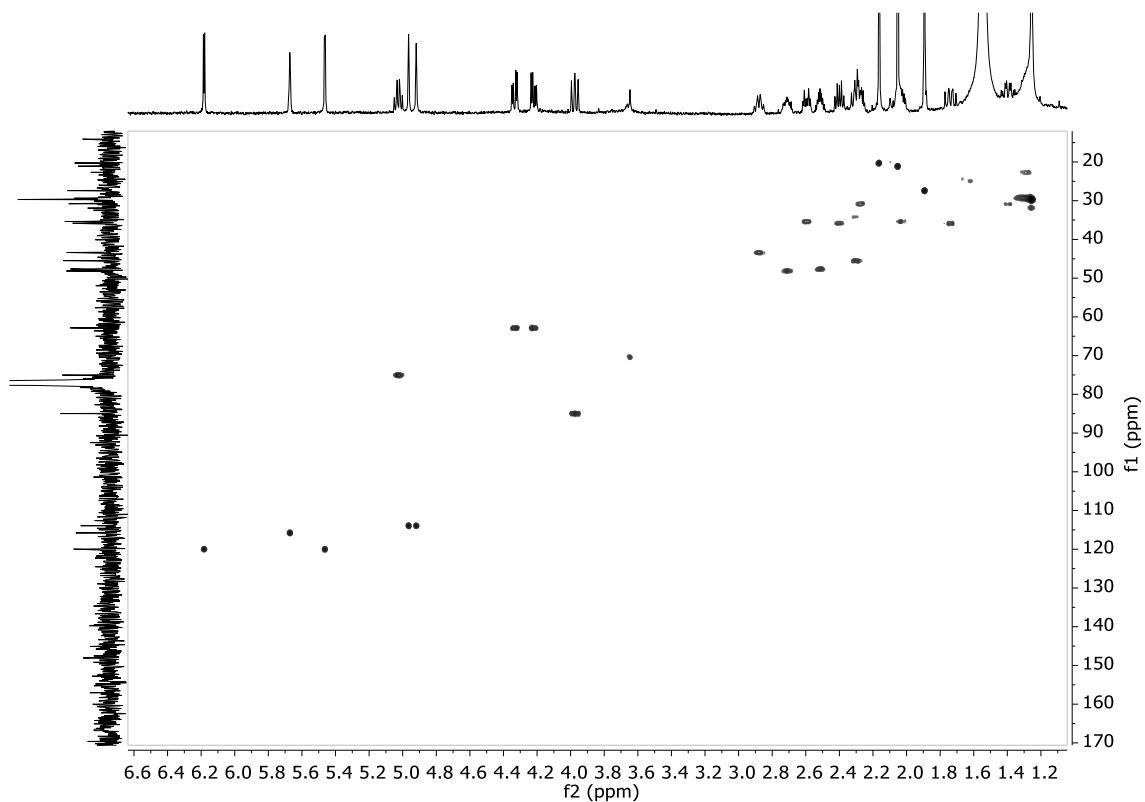
45. COSY spektr 3 β -*O*-acetil-15-*O*-senecioilamforikarpolida (lakton 17)



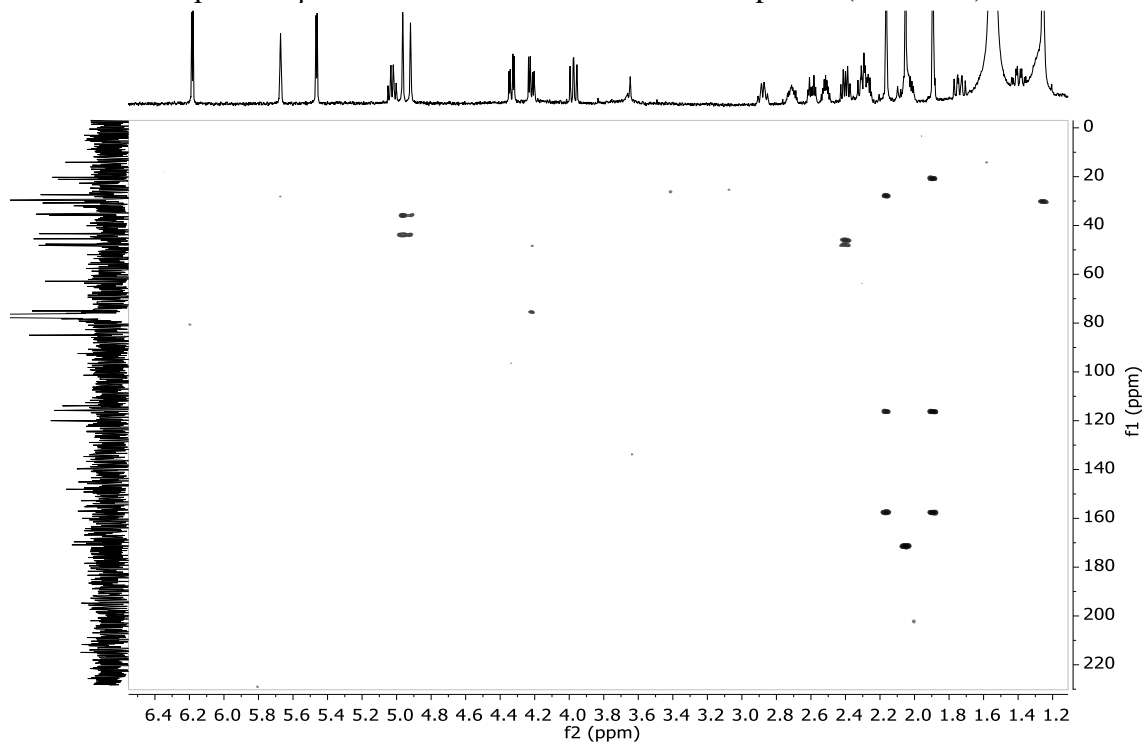
46. NOESY spektr 3 β -*O*-acetil-15-*O*-senecioilamforikarpolida (lakton 17)



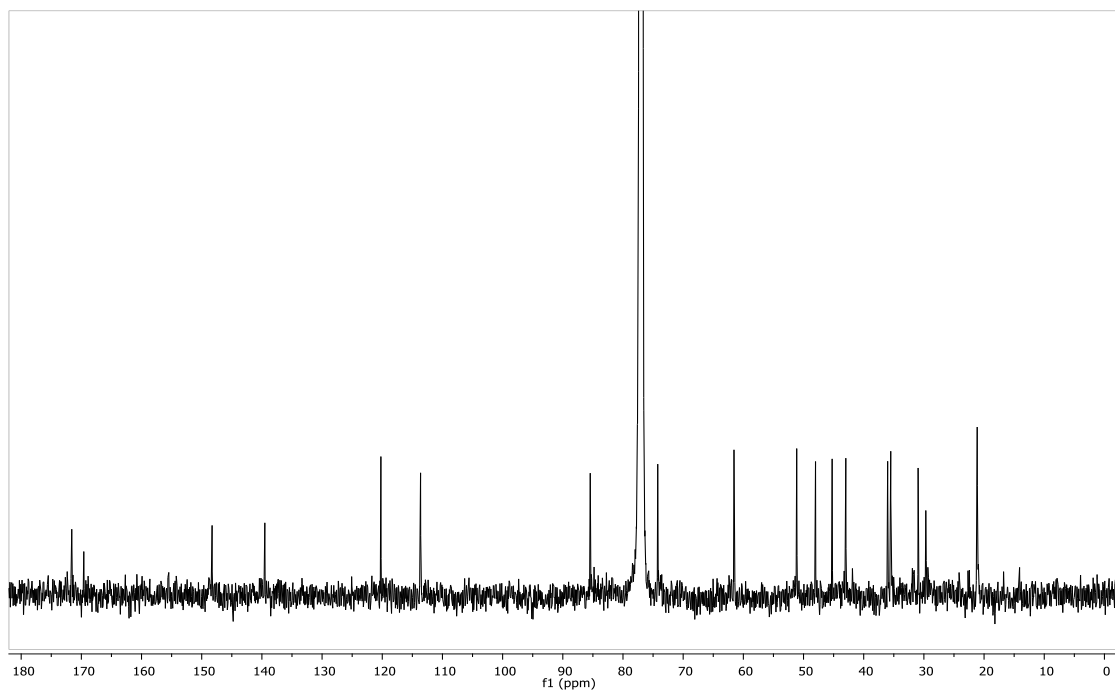
47. HSQC spektr 3 β -*O*-acetyl-15-*O*-senecioilamforikarpolida (lakton **17**)



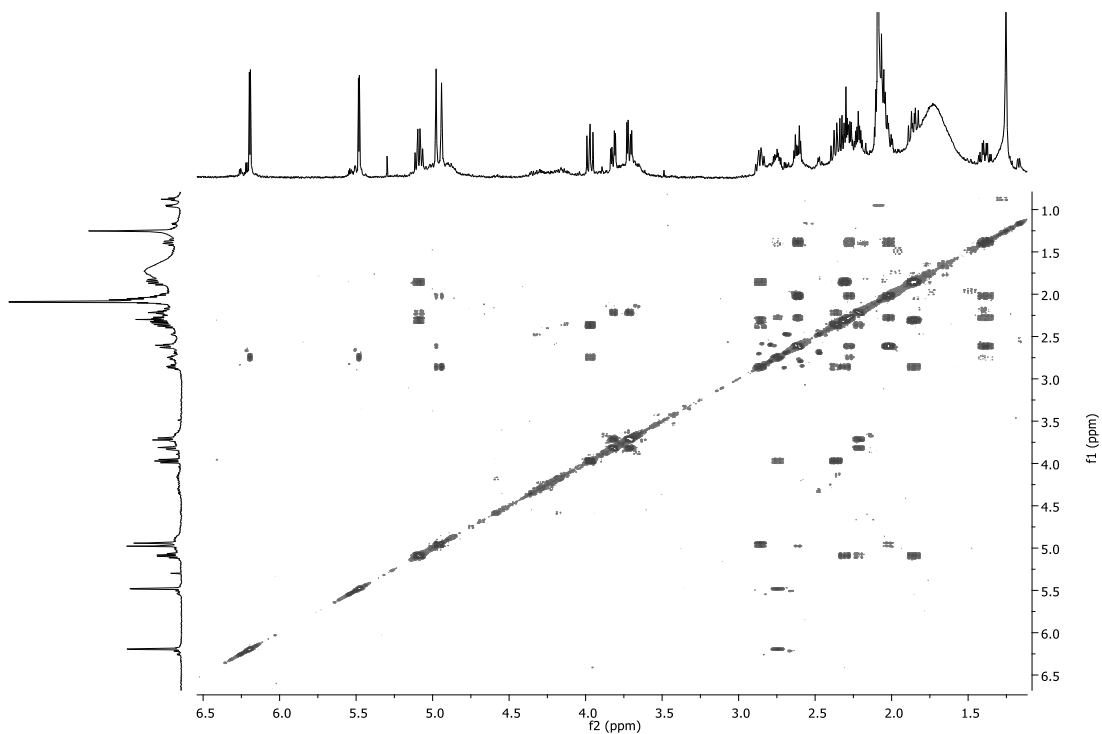
48. HMBC spektr 3 β -*O*-acetyl-15-*O*-senecioilamforikarpolida (lakton **17**)



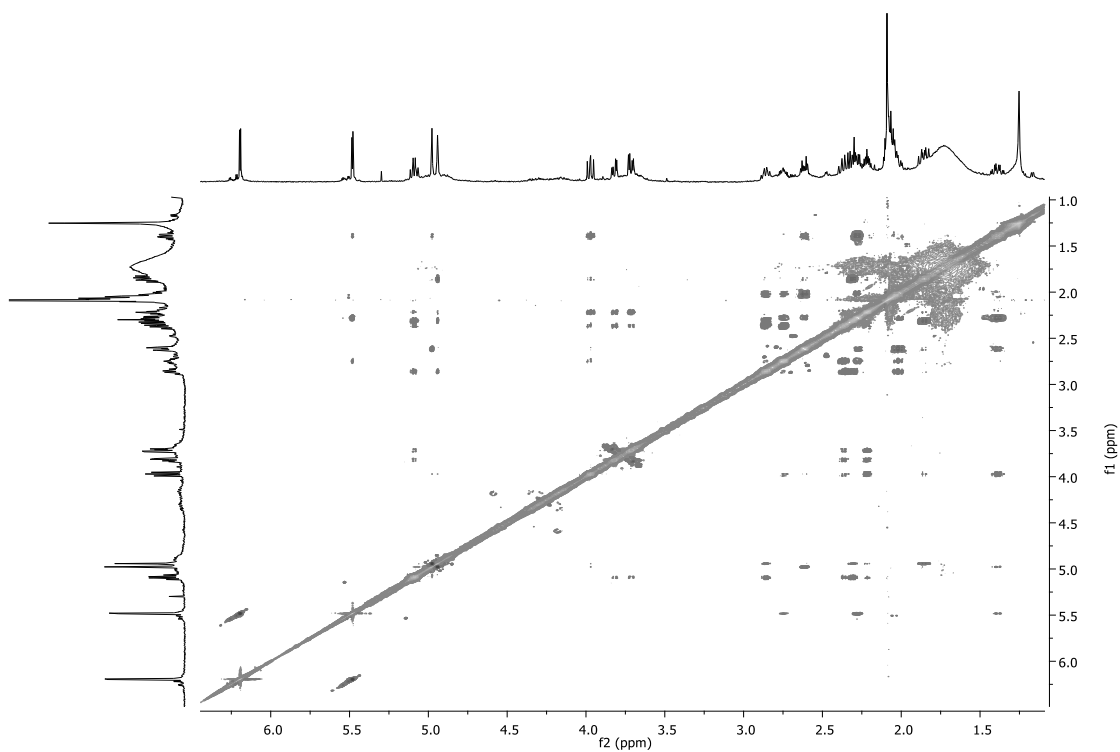
49. ^{13}C NMR spektar $3\beta\text{-O-acetilamforikarpolida}$ (lakton **20**)



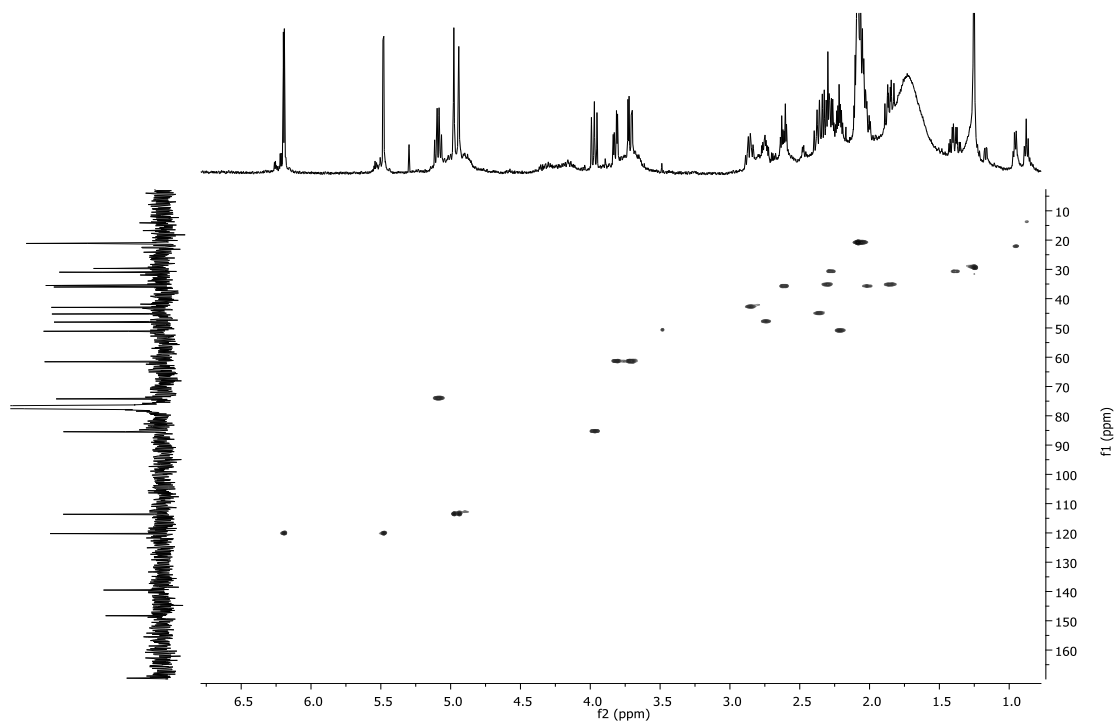
50. COSY spektar $3\beta\text{-O-acetilamforikarpolida}$ (lakton **20**)



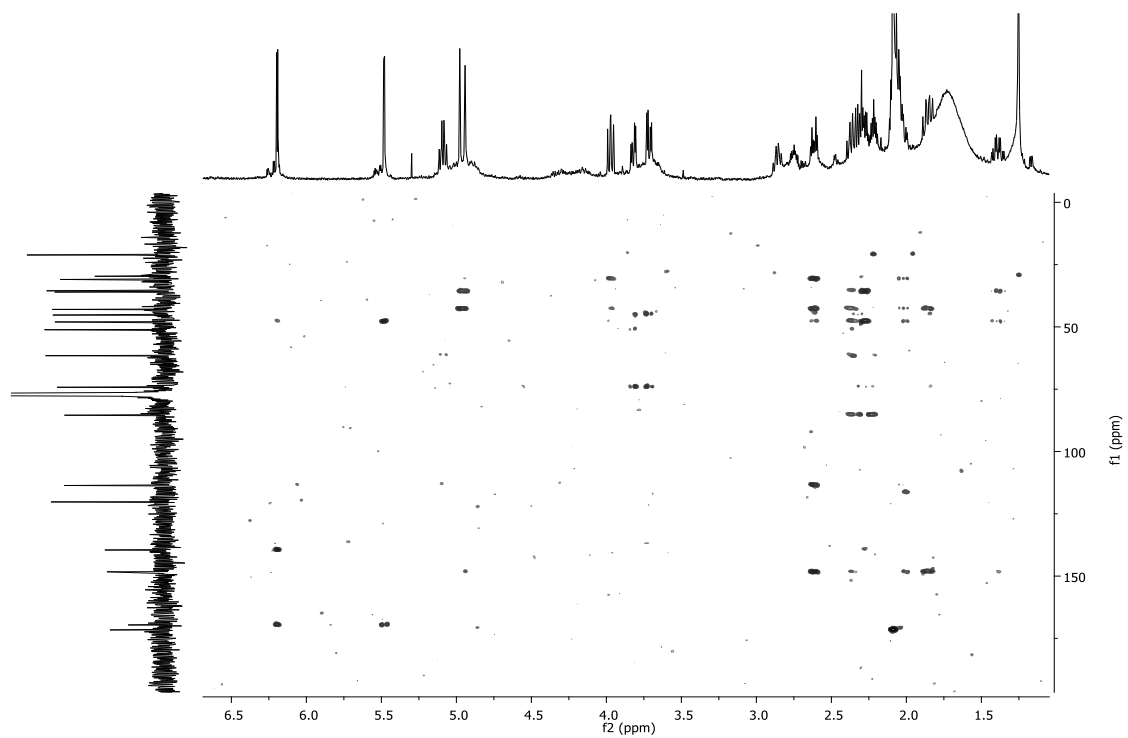
51. NOESY spektar 3 β -*O*-acetilamforikarpolida (lakton **20**)



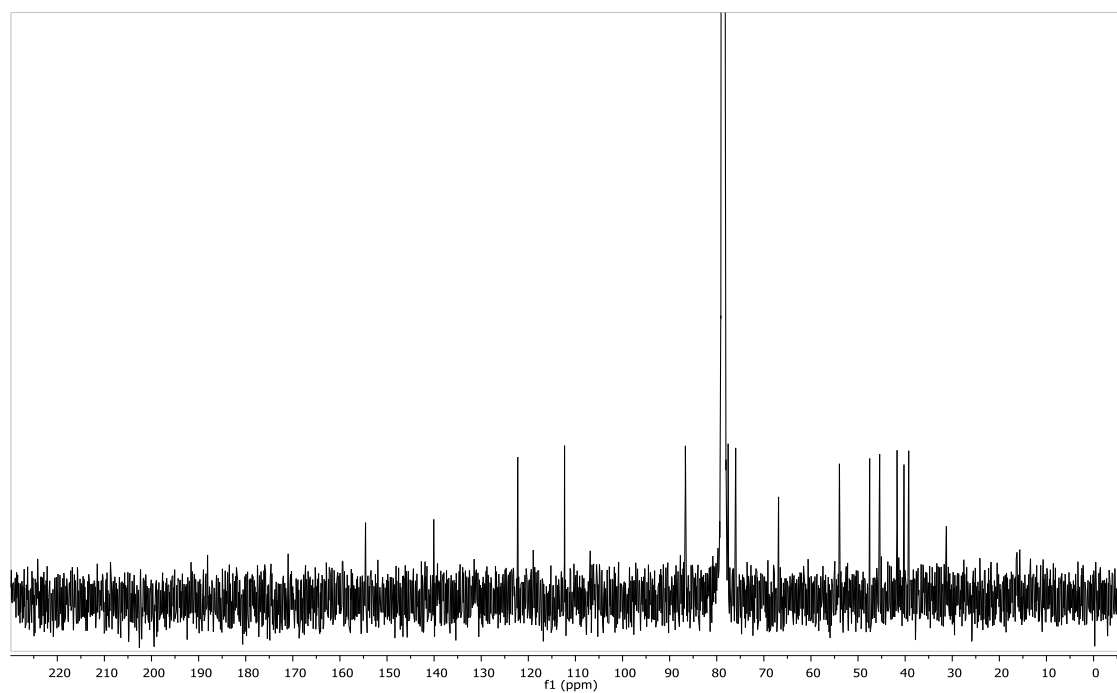
52. HSQC spektar 3 β -*O*-acetilamforikarpolida (lakton **20**)



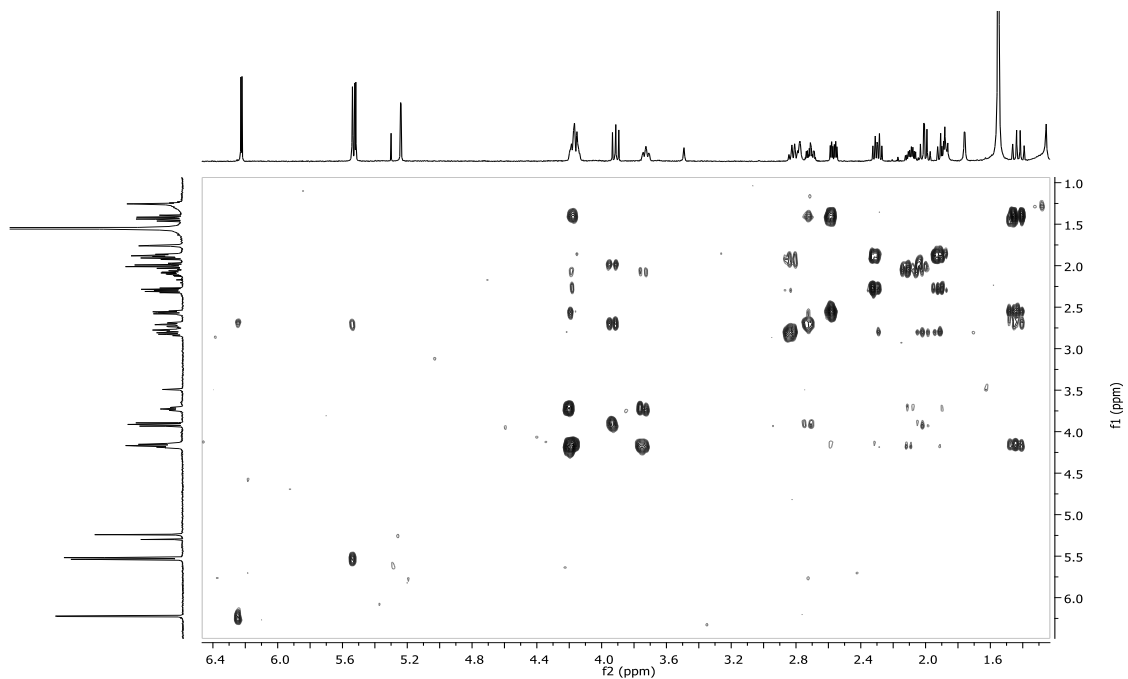
53. HMBC spektar 3 β -*O*-acetilamforikarpolida (lakton 20)



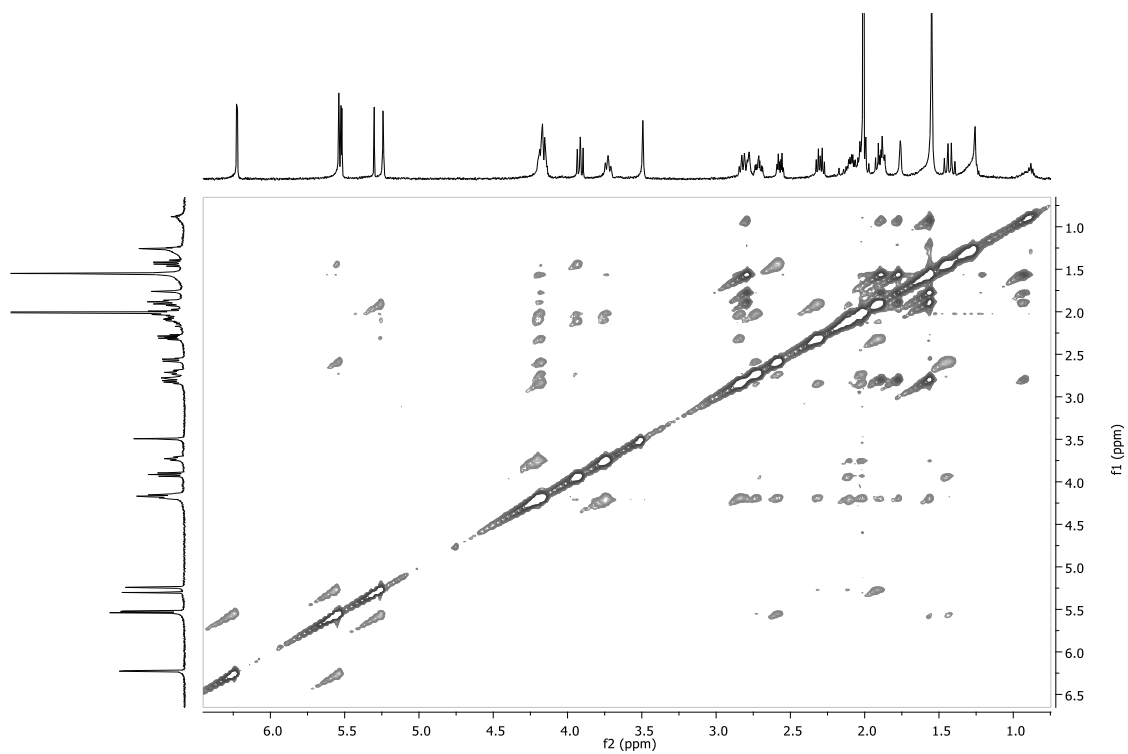
54. ¹³C NMR spektar 9 β -hidroksiamforikarpolida (lakton 25)



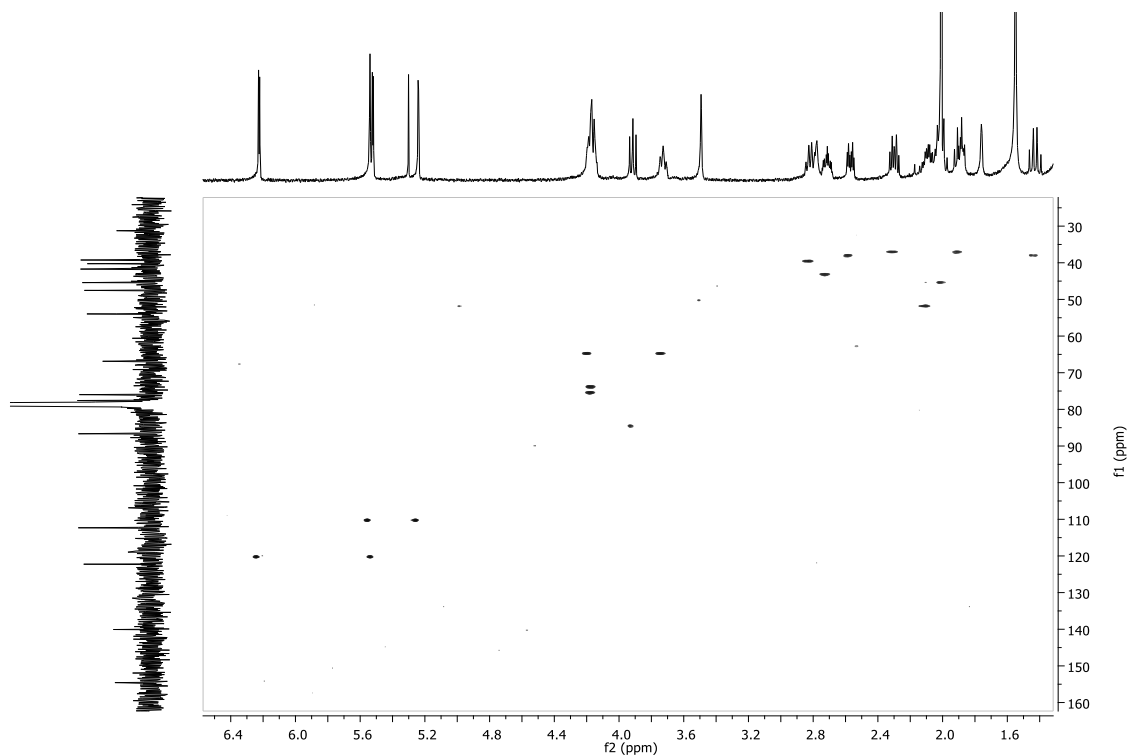
55. COSY spektar 9 β -hidroksiamforikarpolida (lakton 25)



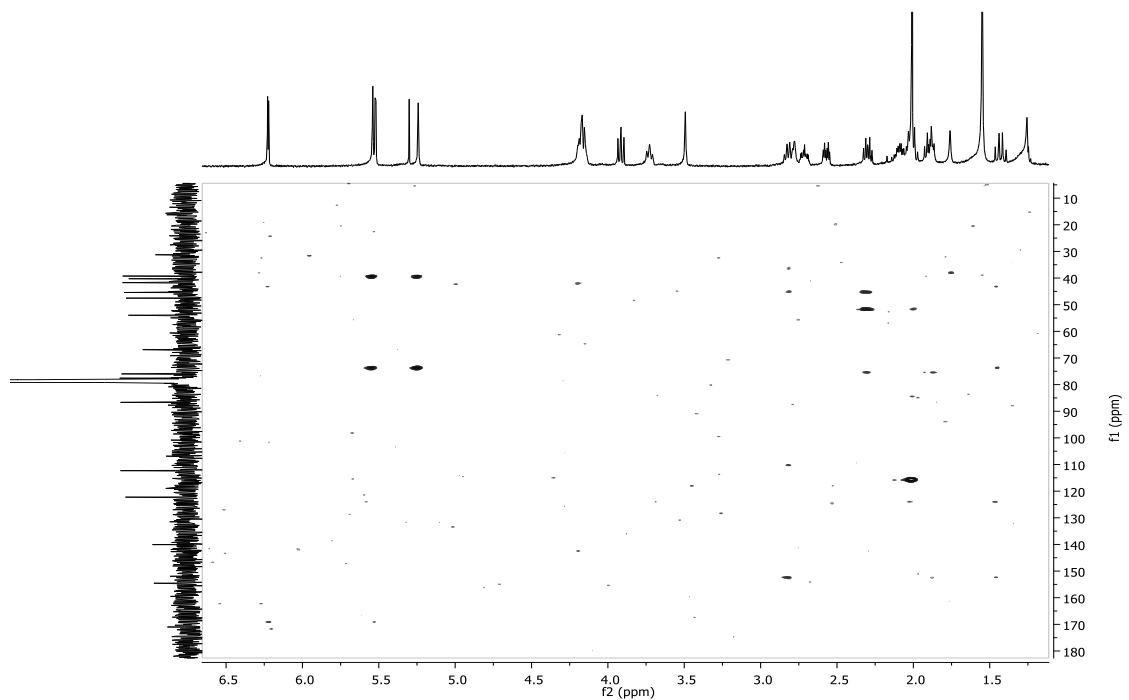
56. NOESY spektar 9 β -hidroksiamforikarpolida (lakton 25)



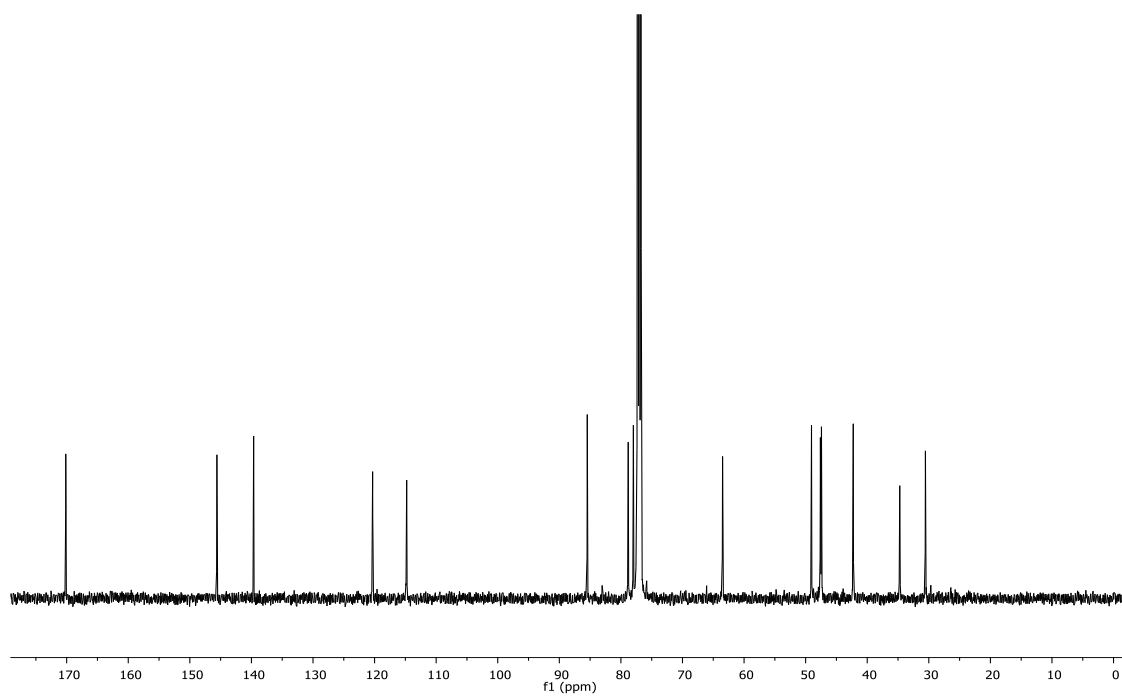
57. HSQC spektr 9 β -hidroksiamforikarpolida (lakton 25)



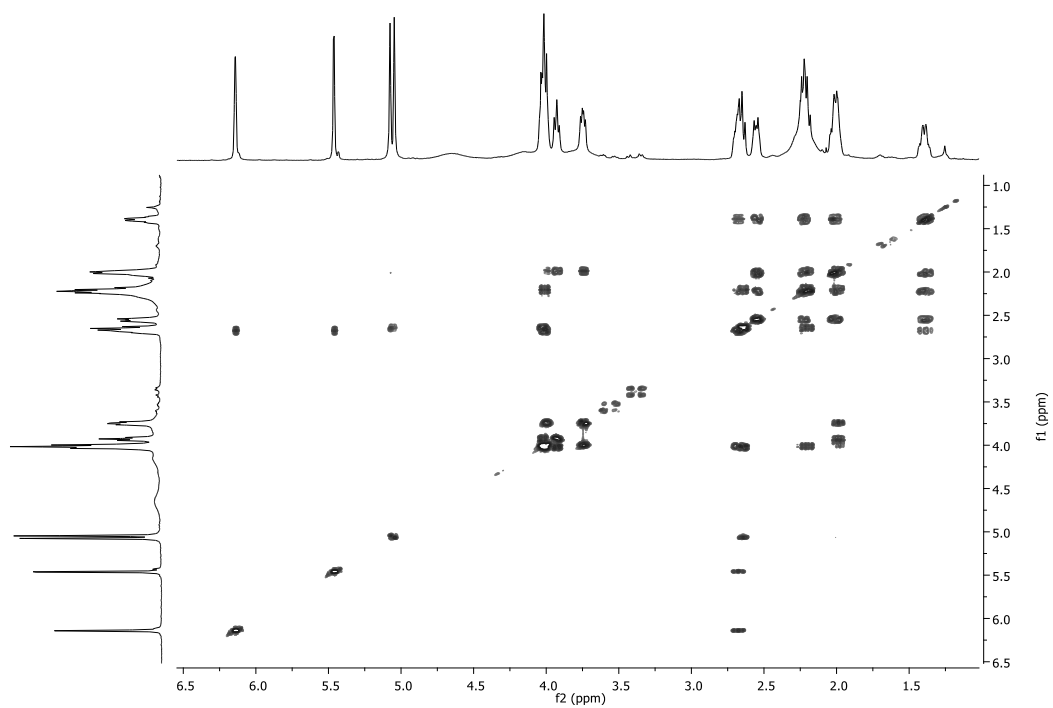
58. HMBC spektr 9 β -hidroksiamforikarpolida (lakton 25)



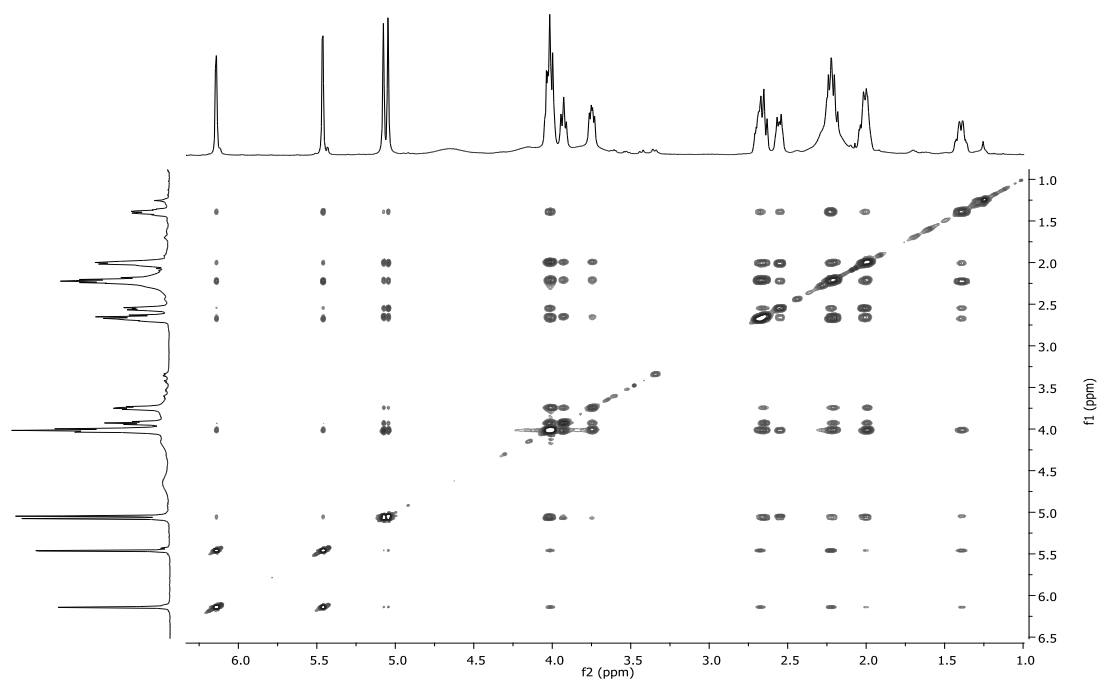
59. ^{13}C NMR spektar 2α -hidroksiamforikarpolida (lakton 26)



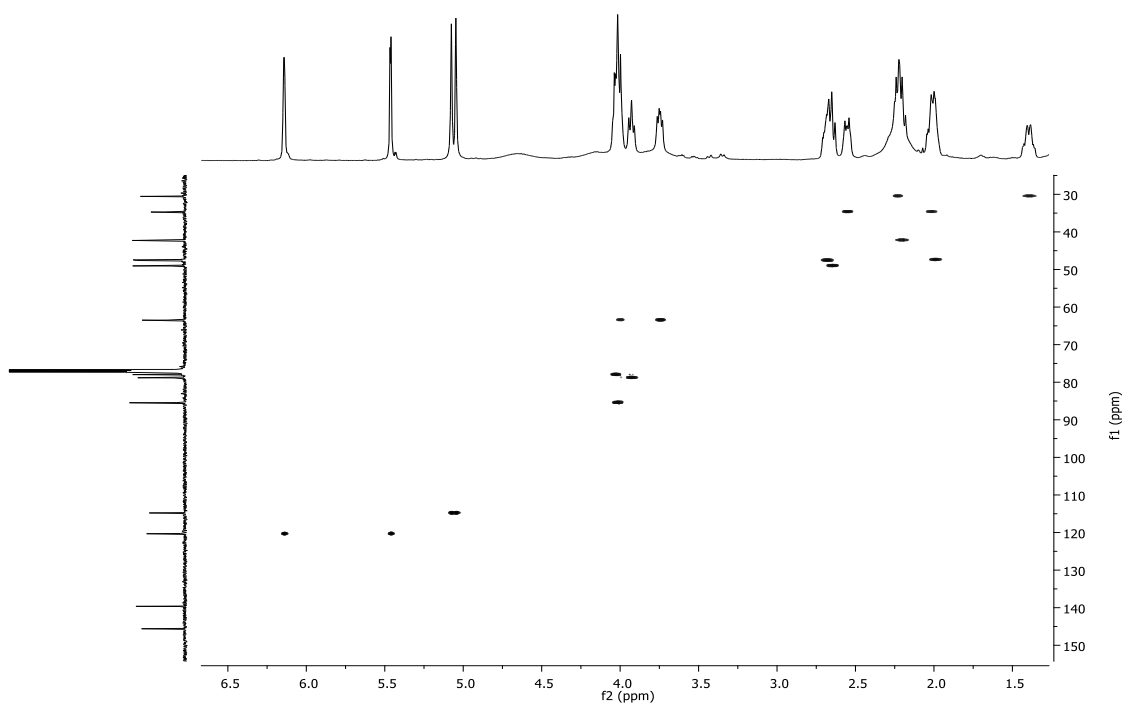
60. COSY spektar 2α -hidroksiamforikarpolida (lakton 26)



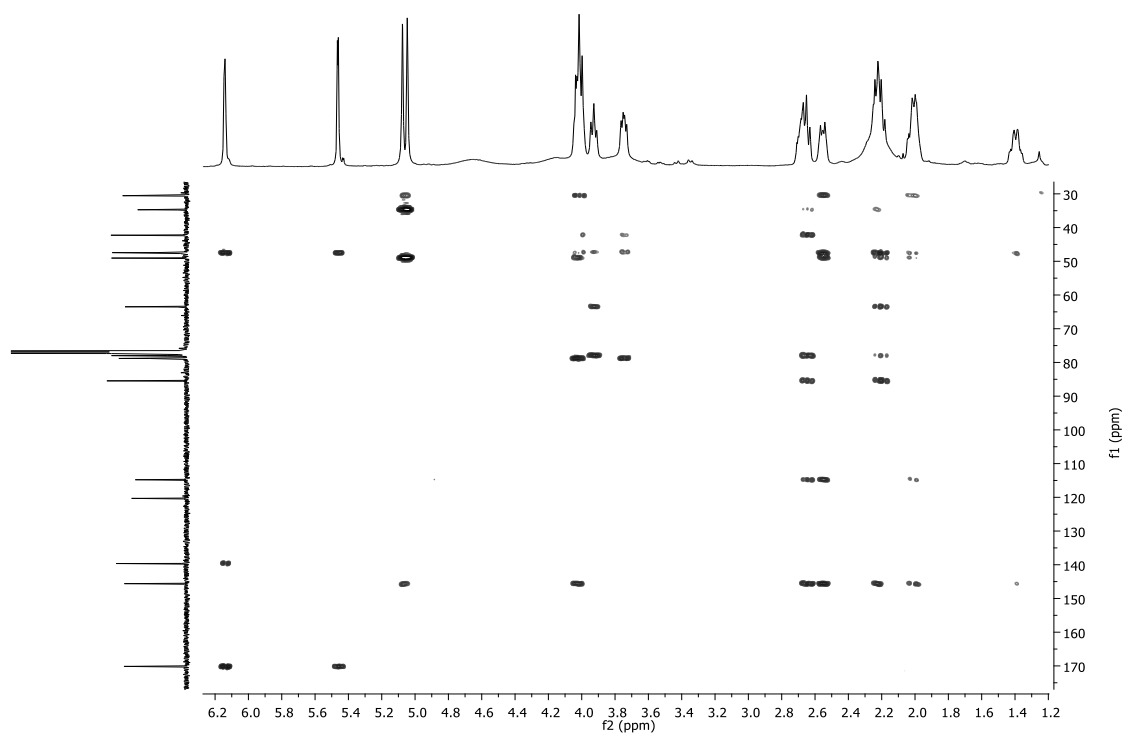
61. NOESY spektar 2 α -hidroksiamforikarpolida (lakton **26)**



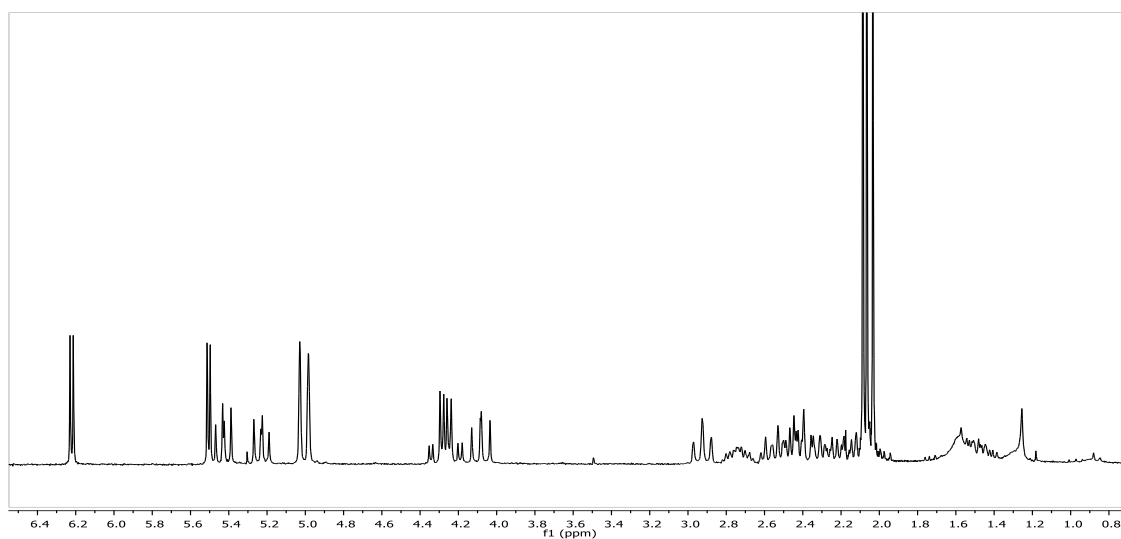
62. HSQC spektar 2 α -hidroksiamforikarpolida (lakton **26)**



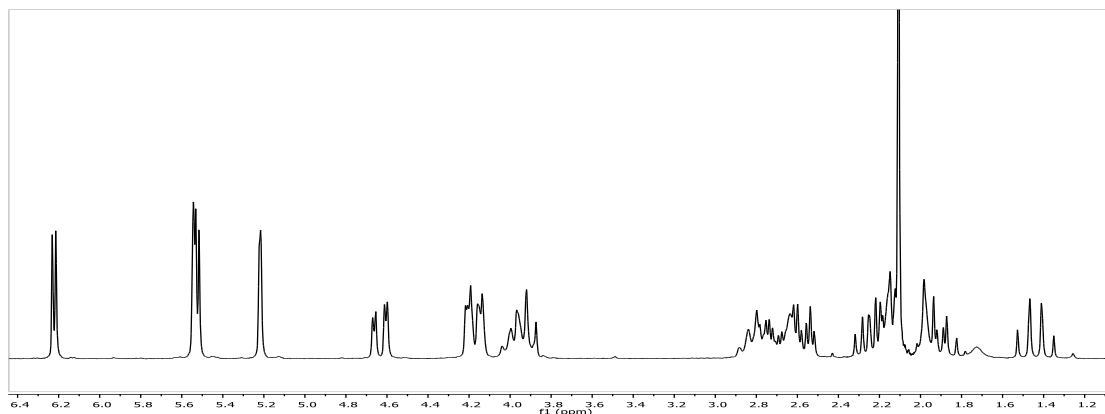
63. HMBC spektar 2 α -hidroksiamforikarpolida (lakton 26)



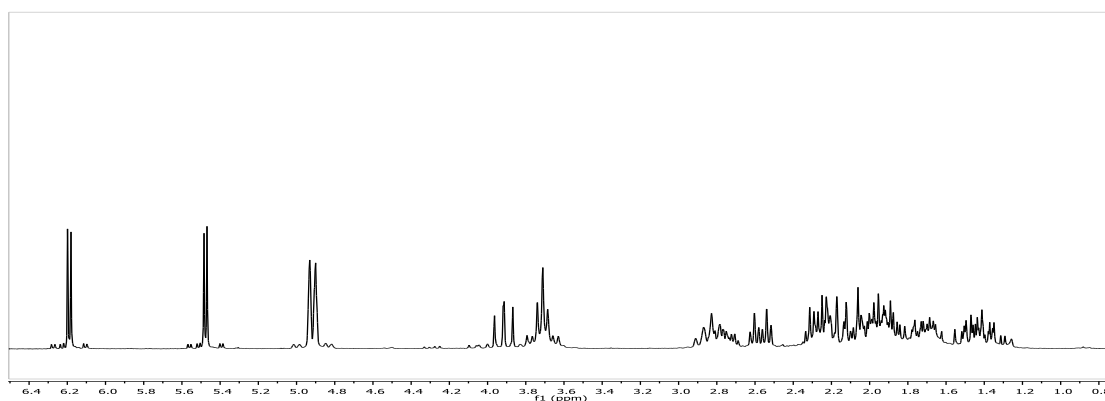
64. ¹H NMR spektar 3,15-*O*-diacetil-2 α -acetoksiamforikarpolida (lakton 2)



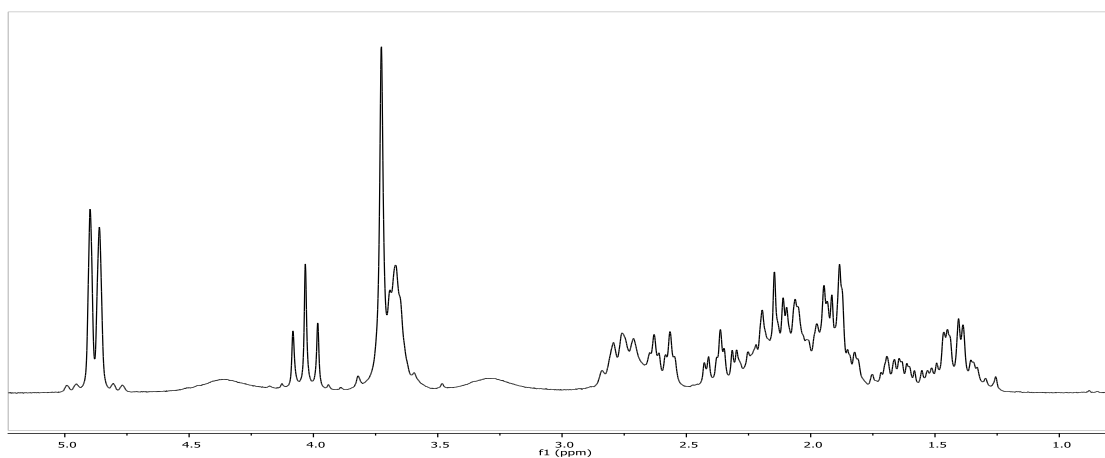
65. ^1H NMR spektar 15-*O*-acetil-9 β -hidroksiamforikarpolida (lakton **7**)



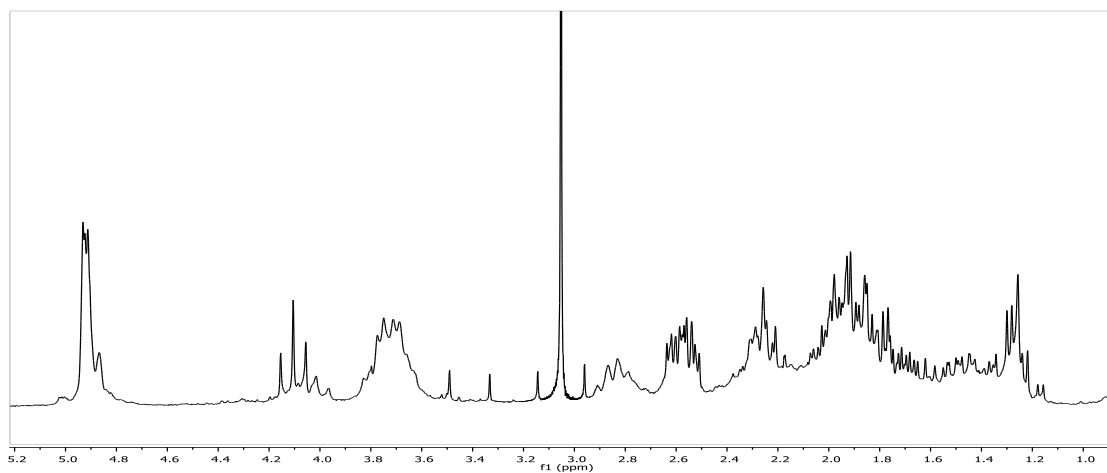
66. ^1H NMR spektar 3-deoksiamforikarpolida (lakton **10**)



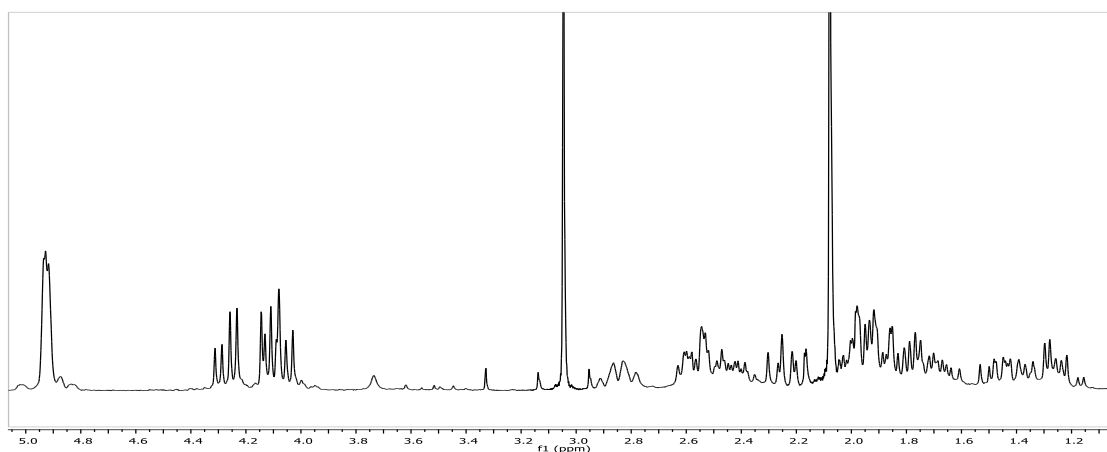
67. ^1H NMR spektar 3-deoksi-11,13-dihidroksiamforikarpolida (lakton **13**)



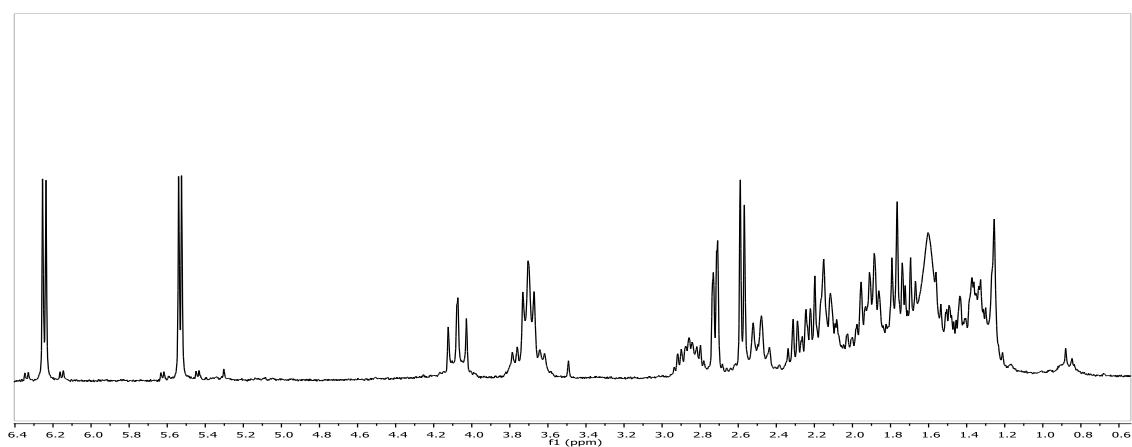
68. ^1H NMR spektar 3-deoksi-11 α ,13-epoksiamforikarpolida (lakton **14**)



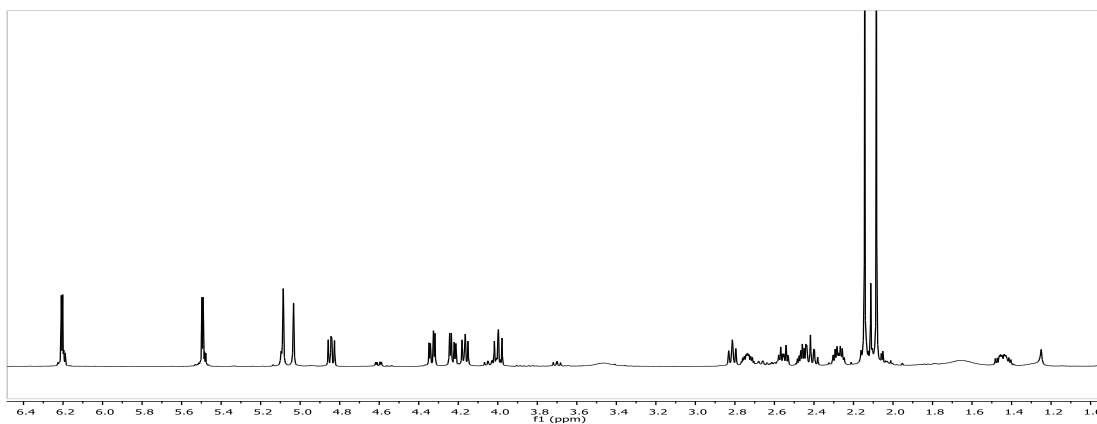
69. ^1H NMR spektar 3-*O*-deoksi-15-*O*-acetyl-11 α ,13-epoksiamforikarpolida (lakton **15**)



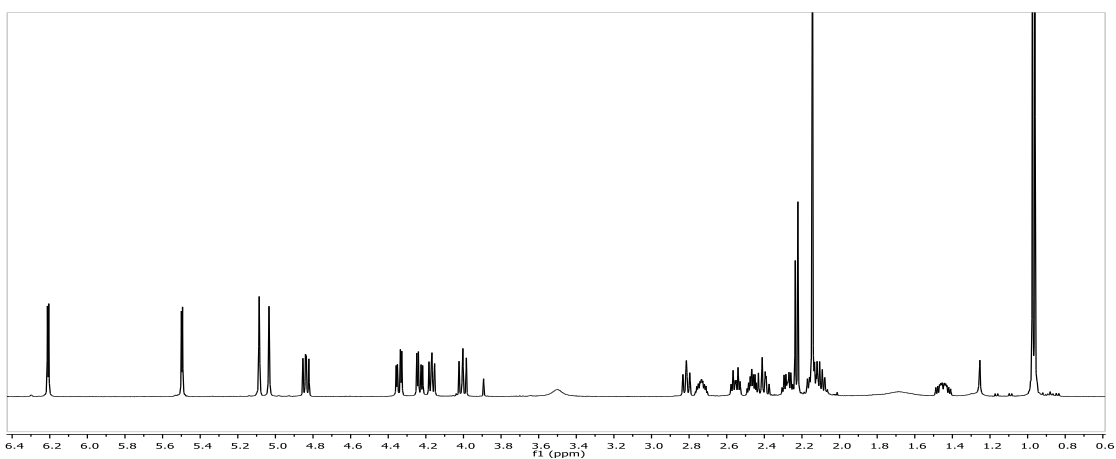
70. ^1H NMR spektar 3-deoksi-10 α ,14-epoksiamdorikarpolida (lakton **16**)



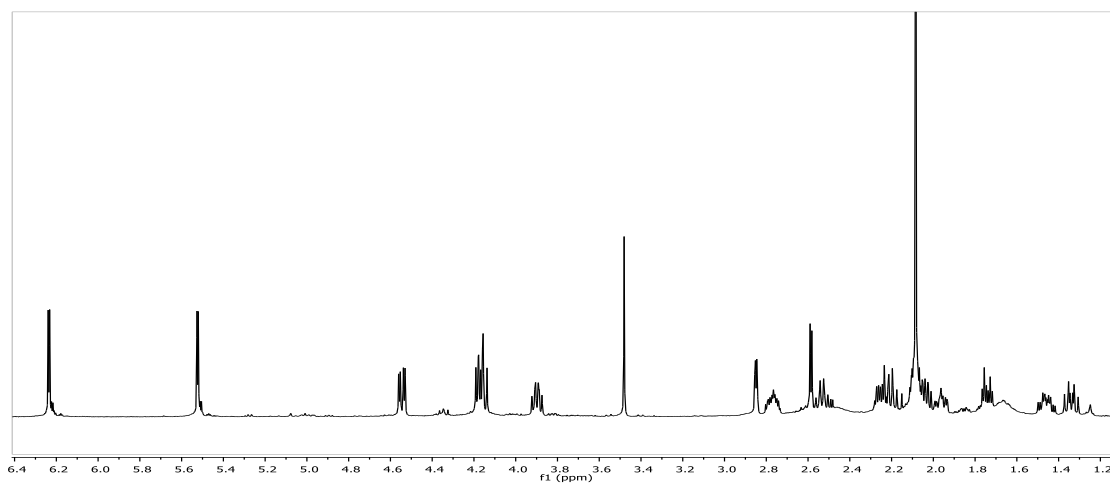
71. ^1H NMR spektar 3,15-*O*-diacetil-2 α -hidroksiamforikarpolida (lakton **18**)



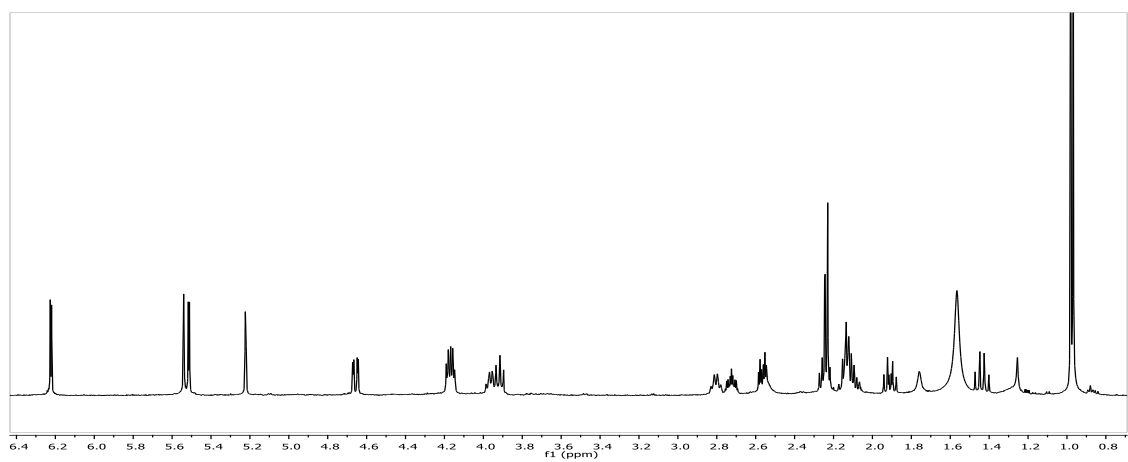
72. ^1H NMR spektar 15-*O*-izovaleroil-3-*O*-acetil-2 α -hidroksiamforikaroplida (lakton **21**)



73. ^1H NMR spektar 15-*O*-acetil-10 α ,14-epoksiamforikarpolida (lakton **22**)



74. ^1H NMR spektar 15-*O*-izovaleroil-9 β -hidroksiamforikarpolida (lakton **23**)



Biografija

Mirjana (Tomica) Cvetković je rođena 13. aprila 1986. godine u Smederevu. Osnovnu školu i Gimnaziju je završila u Smederevu. Školske 2005/06. upisala se na Hemijski fakultet u Beogradu, diplomirala 22. maja 2012, a master studije na Hemijskom fakultetu u Beogradu, na Odeljenju za instrumentalnu analizu pri Katedri za organsku hemiju kod mentora prof. dr Veleta Teševića upisala je 2012/13. godine i odbranila master rad 03. oktobra 2013. godine. Doktorske studije na Hemijskom fakultetu u Beogradu, na Odeljenju za instrumentalnu analizu pri Katedri za organsku hemiju kod mentora prof. dr Veleta Teševića i prof. dr Iris Đorđević, upisala je 2013/14.

Od 01. decembra 2013. godine zaposlena je u Centru za hemiju NU IHTM kao istraživač pripravnik, a od 22. aprila 2016. kao istraživač saradnik.

Od 2013. godine angažovana je na projektu br. 172053 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja „Bioaktivni prirodni proizvodi samoniklih, gajenih i jestivih biljaka: određivanje strukture i aktivnosti” (2011–), a od 2015–2020. godine i na projektu međuakademijske saradnje između Bugarske akademije nauka (BAN) i Srpske akademije nauka i umetnosti (SANU) „Sekundarni metaboliti divlje rastućih i kultivisanih biljaka sa potencijalnom biološkom aktivnošću”. U toku 2016–2017. godine učestvovala je na projektu naučno-tehnološke bilateralne saradnje sa Biotehničkim fakultetom Univerziteta u Ljubljani pod nazivom: „Metabolomičke promene u voću i povrću izazvane tretmanima nakon berbe”, a u toku 2017–2018. na projektu naučno-tehnološke bilateralne saradnje sa Univerzitetom u Crnoj Gori pod nazivom „The effect of heavy metals on the altering of medicinal plant metabolism”. Učesnik je na projektu naučno-tehnološke bilateralne saradnje sa Univerzitetom u Bolonji (2019–2021.) pod nazivom „ Metabolomic approach for the determination of herbs and spices fraud”, kao i međunarodnog (OPCW) projekta pod nazivom „Razvoj automatizovanih GC-MS i LC-MS metoda zasnovanih na mikroekstrakciji na pakovanom sorbentu (MEPS) za potrebe OPCW testova stručnosti laboratorija, kao i terenskih analiza”.

U okviru svog naučno istraživačkog rada bavi se hemijom sekundarnih metabolita biljaka, spektroskopskim i hromatografskim tehnikama analize organskih

jedinjenja, kao i biološkim dejstvima hemijskih jedinjenja i biljnih ekstrakata. Do sada je objavila jedan naučni rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), dva naučna rada u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), deset radova u međunarodnom časopisu (M23) i jedan rad u nacionalnom časopisu međunarodnog značaja (M24). Osim toga, koautor je jednog poglavlja u knjizi (M14), dva rada u vodećem časopisu nacionalnog značaja (M51), osam radova u časopisu nacionalnog značaja (M52) i jednog rada u naučnom časopisu (M53), kao i pet saopštenja sa skupa međunarodnog značaja štampanih u celini (M33), četrnaest saopštenja sa skupa međunarodnog značaja štampanih u izvodu (M34) i tri saopštenja sa skupa nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64).

Radovi koji su rezultat doktorske disertacije:

1. **Mirjana Cvetković**, Ana Damjanović, Tatjana Stanojković, Iris Đorđević, Vele Tešević, Slobodan Milosavljević, Dejan Gođevac, (2020) **Integration of dry-column flash chromatography with NMR and FTIR metabolomics to reveal cytotoxic metabolites from *Amphoricarpos autariatus***, *Talanta*, 206, 120248. (M21) IF= 4,916 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120248>
 2. **Cvetković Mirjana**, Đorđević Iris, Jadranin Milka, Vajs Vlatka, Vučković Ivan, Menković Nebojša, Milosavljević Slobodan, Tešević Vele, (2014) **Further amphoricarpolides from the surface extracts of *Amphoricarpos* complex from Montenegro**, *Chemistry and Biodiversity*, 11 (9) 1428-1437. (M22) IF=1,515 <https://doi.org/10.1002/cbdv.201400101>
 3. **Mirjana Cvetković**, Boban Anđelković, Vladimir Stevanović, Milka Jadranin, Iris Đorđević, Vele Tešević, Slobodan Milosavljević, Dejan Gođevac, (2018) **NMR-based metabolomics study of *Amphoricarpos* species from Montenegro**, *Phytochemistry Letters*, 25 1–5. (M23) IF= 1,338 <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.03.013>
1. Dejan Gođevac, Boban Anđelković, Milka Jadranin, **Mirjana Cvetković**, Slobodan Milosavljević. NMR-Based metabolomics of *Amphoricarpos* species from Montenegro. International Conference on Natural Products Utilization: From Plants to Pharmacy Shelf (INCPU), 14-17 october 2015, Plovdiv, Bulgaria, Book of Abstracts, PP78. (M34)

2. **Mirjana Cvetković**, Ana Damjanović, Tatjana Stanojković, Boban Anđelković, Slobodan Milosavljević, Dejan Gođevac, NMR-based metabolic combined with dry-column flesh chromatography to identify cytotoxic metabolites from *Amphoricarpus autariatus*, Book of Abstracts, 8th International Conference on Oxidative Stress in Skin Biology and Medicine, 6-9 September 2018, Andros, Greece. (M34)

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Мирјана Цветковић

Број индекса ДХ26/2013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Метаболомичка студија балканских врста рода *Amphoricarpos* Vis. (Asteraceae)“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Мирјана Цветковић

Број индекса ДХ26/2013

Студијски програм Хемија

Наслов рада „Метаболомичка студија балканских врста рода *Amphoricarpos* Vis. (Asteraceae)“

Ментор проф. др Веле Тешевић и др Ирис Ђорђевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

М. Цветковић

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Метаболомичка студија балканских врста рода *Amphoricarpos* Vis. (Asteraceae)“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.