



Универзитет у Новом Саду
Природно-математички факултет
Департман за хемију, биохемију и
заштиту животне средине



Видак Раичевић

**СИНТЕЗА НОВИХ БИОЛОШКИ АКТИВНИХ
КОНЈУГАТА СТРОИДА СА ФЕРОЦЕНОМ И
ИДЕНТИФИКАЦИЈА НОВИХ ПРИРОДНИХ
ПРОИЗВОДА ИЗ ЦРНЕ ЗОВЕ (*SAMBUCUS NIGRA L.*)**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Нови Сад, 2023.

Предговор

Највећи део ове докторске дисертације реализован је на Катедри за органску хемију Департмана за хемију, биохемију и заштиту животне средине Природно-математичког факултета у Новом Саду и у Лабораторији за органску синтезу и анализу Департмана за хемију Природно-математичког факултета у Нишу.

Овом приликом се захваљујем својим менторима, др Марији Сакач, редовном професору на Природно-математичком факултету у Новом Саду, и др Нику Радуловићу, редовном професору на Природно-математичком факултету у Нишу, на помоћи и подршци током израде ове докторске дисертације.

Захваљујем се и др Милици Аћимовић, вишем научном сараднику на Институту за ратарство и повртарство у Новом Саду, на помоћи приликом извођења огледа на полуиндустријском дестилатору, др мед. Николи Стојановићу, асистенту на Медицинском факултету у Нишу, за огледе изведене на спленоцитима пацова, као и др Димитру Јакимову, научном сараднику на Институту за онкологију Војводине, др Сандри Аранђеловић, научном саветнику на Институту за онкологију и радиологију Србије, и др Невенки Глигоријевић, вишем научном сараднику на Институту за онкологију и радиологију Србије, за огледе изведене на човечјим ћелијским линијама, као и др Марку Родићу, ванредном професору на Природно-математичком факултету у Новом Саду, на мерењима на дифрактометру и решавању кристалних структура. Хвала и др Марку Младеновићу, вишем научном сараднику на Природно-математичком факултету у Нишу, који је са мном несебично поделио своје искуство у изоловању природних производа.

Дугујем захвалност др Душану Сладићу, редовном професору на Хемијском факултету у Београду, као и др Срђану Бједову, доценту на Природно-математичком факултету у Новом Саду, на примедбама и саветима који су учинили ову дисертацију бољом.

Захвалност изражавам и својој породици, за све оно што су урадили за мене.

РЕЗИМЕ

Конјугати стероида са фероценом чине класу једињења занимљивих за медицинску хемију с обзиром на спектар биолошких активности које испољавају. У овој докторској дисертацији синтетисани су нови конјугати естра-1,3,5(10)-триена (**2–6**, **8–10**), андростана (**11–15**) и прегнана (**16–23**), а поједина једињења испитана су *in vitro* на антипролиферативну и имуномодулаторну активност. У случају једињења добијених алкиловањем естрадиола и естрона (фероценилметил)триметиламонијум-јодидом (**2–6**), једињење **3** истакло се ниском IC₅₀ вредношћу од 0,34 μM на ћелије хормон-зависног канцера дојке (MCF-7), чиме је оно постало конјугат стероида са фероценом са најизраженијим антипролиферативним дејством према туморским ћелијама добијен до сада. Једињење **8**, добијено кондензацијом 2-формилестрадиола и ацетилфероцена, показало се као превише нестабилно да би се изоловало, али је било могуће изоловати његов моноацетат (**9**) и диацетат (**10**). Установљено је да се кондензацијом тестостерона са фероценкарбалдехидом добијају геометријски изомери **11** и **12**, док се кондензацијом дихидротестостерона са овим алдехидом добија искључиво *E*-конфигурисани конјугат **13**, чијим каталитичким хидрогеновањем су добијена два производа, C-3 деоксигеновано једињење **14** и 2α-(фероценилметил)-дериват **15**. Једињења **11–15** испољавала су антипролиферативну активност на ћелије хормон-независног (PC-3) и хормон-зависног (LNCaP) канцера простате у микромоларном опсегу IC₅₀ вредности, али је сличан ниво активности за сва три једињења уочен и на нормалним фибробластима плућа фетуса (MRC-5), неканцерској ћелијској линији, што је доведено у везу с потенцијално малим афинитетом везивања ових једињења за андрогени рецептор. Конјугати прегнанских стероида са фероценом **16–23** добијени су кондензационим реакцијама пет различитих прегнан-20-она, а сва ова једињења инхибирала су пролиферацију спленоцита стимулираних бактеријским липополисахаридом.

Извршена је и идентификација 252 једињења у етарском уљу сувих цветова црне зове (*Sambucus nigra* L.) гасном хроматографијом, потпомогнута изоловањем, синтетским поступцима и експериментима коинјекције. Седам ових једињења (**24–30**) представљала су нове природне производе. Примећена је значајна заступљеност (*Z*)-хекс-3-ен-1-ола и његових естара у овом етарском уљу, као и барем три естра изосенецио-киселине. По први пут у црној зови идентификован је имин метил-естра изолеуцина са бензалдехидом (**31**), као и хомолога серија имиња овог естра са алифатичним *n*-алдехидима (**32–44**) у диетил-етарском испирку свежих цветова ове биљне врсте. Извршена је и потпуна спинска анализа ¹H НМР спектра *транс*-хотриенола и *транс*-ходиендиола. Разјашњен је проблем систематски погрешне идентификације 2-метилнон-2-ен-4-она у различитим биљним врстама, а који је погрешно идентификован уместо 5-оксолиналола услед сличног масеног спектра и погрешног литературног ретенционог индекса.

SUMMARY

Steroid–ferrocene conjugates are a class of compounds of interest in medicinal chemistry due to their diverse range of biological activities. This doctoral thesis focused on the synthesis of new conjugates of estra-1,3,5(10)-trienes (**2–6**, **8–10**), androstanes (**11–15**) and pregnanes (**16–23**), while selected compounds were tested *in vitro* to evaluate their antiproliferative and immunomodulatory effects. In the case of derivatives furnished by alkylating estradiol and estrone by (ferrocenylmethyl)trimethylammonium iodide (**2–6**), compound **3** stood out, as it was found to exhibit a significantly low IC₅₀ value of 0.34 μM toward a hormone-dependent breast cancer cell line (MCF-7), which rendered this compound the most antiproliferative steroid–ferrocene conjugate known to date. Compound **8**, obtained by condensing 2-formylestradiol and acetylferrocene, was discovered to be unstable to such an extent that it was impossible to isolate it in pure form, while its monoacetate (**9**) and diacetate (**10**) could be isolated. It was concluded that the condensation of testosterone and ferrocenecarbaldehyde furnishes two geometric isomers **11** and **12**, while the condensation of dihydrotestosterone and this aldehyde gives the *E*-configured conjugate **13** as the sole product; the catalytic hydrogenation of this compound produced the C-3 deoxygenated compound **14** and the 2 α -(ferrocenylmethyl) derivative **15**. Compounds **11–15** demonstrated antiproliferative activity against hormone-independent (PC-3) and hormone-dependent (LNCaP) prostate cancer cell lines in a micromolar range of IC₅₀ values, but similar activities were also detected against normal fetal lung fibroblasts (MRC-5), a noncancerous cell line, possibly relating this type of activity to a seemingly low affinity of these compounds for the androgen receptor. Conjugates of ferrocene with pregnane-series steroids **16–23** were obtained through condensation reactions involving five different pregnane-20-ones, and each of these compounds was found to inhibit the proliferation of splenocytes stimulated by bacterial lipopolysaccharide.

Furthermore, a total of 252 compounds were identified in the essential oil of dry elder (*Sambucus nigra* L.) flowers using gas chromatography, along with isolation and synthesis procedures, and coinjection experiments. Among these compounds, seven (**24–30**) were identified as new natural products. An abundance of (*Z*)-hex-3-en-1-ol and its esters was noticed in the oil, along with at least three esters of isosenecioic acid. The imine of the isoleucine methyl ester with benzaldehyde (**31**) was found in elder for the first time, as well as a homologue series of imines of this ester with aliphatic *n*-aldehydes (**32–44**), which were detected in ethereal washings of fresh flowers. A full spin analysis of ¹H NMR spectra of *trans*-hotrienol and *trans*-hodiendiol was performed. A case of an ongoing misidentification of 2-methyl-2-en-4-one in various plant species was uncovered, as 5-oxolinalool was mistaken for this compound due to similar mass spectra and an erroneous literature statement regarding the retention index of this compound.

САДРЖАЈ

1. Увод	1
2. Општи део	3
2.1. Конјугати стероида са фероценом.....	3
2.1.1. Стероидна и фероценска једињења и њихов значај у медицинској хемији	3
2.1.2. Конјугати стероида са фероценом као антитуморски агенси.....	6
2.1.3. Конјугати естра-1,3,5(10)-триена са фероценом.....	9
2.1.4. Конјугати андростана са фероценом.....	15
2.1.5. Конјугати стероида осталих серија са фероценом.....	20
2.2. Испарљива једињења црне зове (<i>Sambucus nigra</i> L.)	20
2.2.1. Етарска уља и њихова анализа	20
2.2.2. Црна зова (<i>Sambucus nigra</i> L.)	33
2.2.3. Испарљива једињења из цвета црне зове	35
3. Експериментални део	38
3.1. Опште методе	38
3.2. Синтеза конјугата естра-1,3,5(10)-триенски стероида са фероценом.....	39
3.2.1. (Фероценилметил)триметиамонијум-јодид (1).....	39
3.2.2. Фероценилметиловање естрона и естрадиола	39
3.2.2. Кондензација 2-формилестрадиола са ацетилфероценом и естерификације добијеног конјугата.....	40
3.3. Испитивања конјугата естра-1,3,5(10)-триенских стероида са фероценом на антипролиферативну активност.....	42
3.3.1. Ћелијске линије и узгајање	42
3.3.2. Одређивање антипролиферативне активности	43
3.3.3. Статистичка анализа.....	43
3.4. Синтеза конјугата андростанских стероида са фероценом.....	44
3.4.1. Клајзен-Шмитова кондензација фероценкарбалдехида са тестостероном.....	44

3.4.2. Клајзен-Шмитова кондензација фeroценкарбалдехида са дихидротестостероном	44
3.4.3. Каталитичко хидрогеновање конјугата 13	45
3.5. ИСПИТИВАЊА КОНЈУГАТА АНДРОСТАНСКИХ СТРОИДА СА ФЕРОЦЕНОМ НА АНТИПРОЛИФЕРАТИВНУ АКТИВНОСТ	45
3.5.1. Ћелијске линије и узгајање	45
3.5.2. Одређивање антипролиферативне активности	46
3.6. СИНТЕЗА КОНЈУГАТА ПРЕГНАНСКИХ СТРОИДА СА ФЕРОЦЕНОМ	47
3.6.1. Синтеза полазних стероидних једињења	47
3.6.2. Синтеза конјугата Клајзен-Шмитовим кондензацијама у етанолу	47
3.6.3. Синтеза конјугата Клајзен-Шмитовим кондензацијама у метанолу	49
3.6.4. Синтеза конјугата Клајзен-Шмитовом кондензацијом у изопропил-алкохолу или <i>n</i> -бутил-алкохолу	50
3.7. ИСПИТИВАЊА КОНЈУГАТА ПРЕГНАНСКИХ СТРОИДА СА ФЕРОЦЕНОМ НА ИМУНОМОДУЛАТОРНУ АКТИВНОСТ	50
3.7.1. Лекови и хемикалије	50
3.7.2. Огледне животиње и њихово чување	50
3.7.3. Изоловање и узгајање културе спленocyта пацова	50
3.7.4. Дејство једињења на пролиферацију спленocyта	51
3.7.5. Одређивање преживљавања ћелија МТТ-тестом	51
3.7.6. Статистичка анализа	51
3.8. АНАЛИЗА ПРИРОДНИХ ПРОИЗВОДА ИЗ ЦРНЕ ЗОВЕ (<i>SAMBUCUS NIGRA L.</i>)	52
3.8.1. Биљни материјал	52
3.8.2. Добијање етарског уља	52
3.8.3. Гаснохроматографске анализе	53
3.8.4. Идентификација састојака	53
3.8.5. Дериватизација диметил-дисулфидом	53
3.8.6. Синтеза естара дуголанчаних масних киселина	54
3.8.7. Фракционисање екстракта дестилационе воде	55
3.8.8. Синтеза сенециоата и изосенециоата	56

3.8.9. Синтеза ими́на	57
3.8.10. Укрштена алдолна кондензација ацетона са хептан-2-оном или 5-метилхексан-2-оном	58
3.8.11. Синтеза 5-оксилиналоола	58
3.8.12. Идентификација ими́на из диетил-старског испирка цветова	58
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	61
4.1. СИНТЕЗА И БИОЛОШКА ИСПИТИВАЊА КОНЈУГАТА СТРОИДА СА ФЕРОЦЕНОМ	61
4.1.1. Синтеза конјугата естра-1,3,5(10)-триенских строида са фeroце́ном и њихово испитивање на антипролиферативну активност	61
4.1.2. Синтеза конјугата андростанских строида са фeroце́ном и њихово испитивање на антипролиферативну активност	69
4.1.3. Синтеза конјугата прегнанских строида са фeroце́ном и њихово испитивање на имуномодулаторну активност	81
4.2. ИЗОЛОВАЊЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЈА НОВИХ ИСПАРЉИВИХ ЈЕДИЊЕЊА ИЗ ЦРНЕ ЗОВЕ (<i>Sambucus nigra</i> L.)	91
5. ЗАКЉУЧАК	115
6. СКРАЋЕНИЦЕ	117
7. ЛИТЕРАТУРА	120
8. БИОГРАФИЈА	132
9. ПРИЛОГ	CD

1. УВОД

Развој лекова је комплексно интердисциплинарно поље у које су укључене хемија, фармакологија и клиничке науке, а које је немерљиво утицало на напредак и бољитак човечанства у протеклом веку.^[1] Широм света у употреби је велики број лекова који се заснивају на природним производима.^[2] Медицина и природни производи у спреси су још од раних дана историје човека, а природни производи из биљака били су основа већине раних модерних лекова (попут аспирина, дигитоксина, морфина, хинина и пилокарпина).^[3] Многи познати лекови поседују мане као што су незанемарљиве нуспојаве, али је и стицање резистенције неретко потешкоћа у случају антимикуробних и антитуморских средстава, те је развој алтернативних агенаса непрестано у току.^[4]

Иако се у међувремену појавио и нови приступ за откривање синтетских биолошки активних једињења комбинаторном хемијом, структуре природних производа и даље представљају значајан извор нових лекова, нарочито антинеопластика и антихипертензива.^[5] Ако се узме да структуре природних производа треба да обезбеде биолошку предност организмима који их стварају, односно да ови молекули ефикасно интерагују са одговарајућим рецепторима или другим метама, јасно је да природни производи поседују основне физичко-хемијске предиспозиције за биолошку активност. У поређењу са синтетским молекулима, природни производи често садрже више sp^3 -хибридизованих угљеникових атома и хиралних центара, мање ароматичних прстенова, веће макроцикличне алифатичне прстенове и, уопште узев, сложенију тродимензионалну структуру.^[6] Повољне особине природних производа често се даљим хемијским трансформацијама могу нагласити, а неповољне особине елиминисати. Поступци изоловања и идентификације нових и познатих природних производа из биолошког материјала најчешће су комплексни, али се због својих својстава природни производи и њихови деривати и даље сматрају добрим водећим структурама или кандидатима за нове лекове.^[7]

Као предмет ове докторске дисертације зато су одабрана два правца; први је модификација структура познатих природних производа, а други потрага за новим природним производима. Циљ истраживања у оквиру првог правца био је синтеза и карактеризација конјугата фероцена са стероидима андростанског, естранског и прегнанског скелета и спровођење одговарајућих *in vitro* тестова да би се утврдило јесу ли неки од конјугата носиоци антипролиферативне активности и имуномодулаторне активности. Други правац био је усмерен на идентификацију нових секундарних метаболита црне зове (*Sambucus nigra* L., *Viburnaceae*), врсте са широком применом чији метаболом није опсежно и исцрпно истражен.

У општем делу дисертације дат је преглед литературе који се тиче фероценских и стероидних једињења, њихове медицинске хемије, конјугата стероида са фероценом, њихове синтезе и биолошких активности, као и хемије етарских уља, црне зове и њених испарљивих састојака. Експериментални део укључује описе спроведених синтетских и аналитичких поступака. У резултатима и дискусији представљени су и анализирани

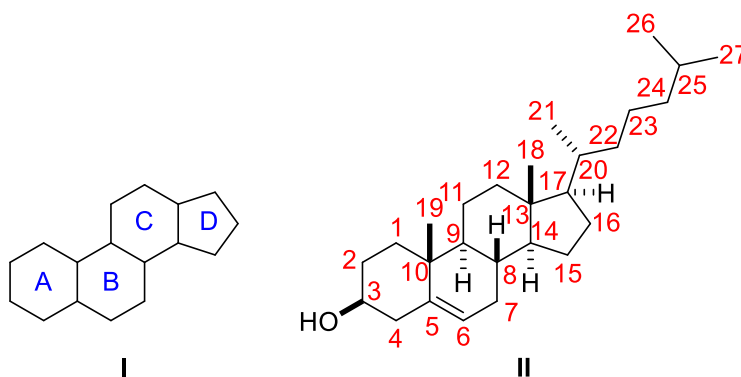
резултати постигнути овим истраживањем и истакнут је њихов значај у односу на претходно постојеће знање у релевантним научним дисциплинама. На крају ове дисертације налази се списак коришћене литературе, а у пропратном електронском прилогу дати су аналитички подаци чије би укључивање непотребно оптеретило овај рукопис.

2. ОПШТИ ДЕО

2.1. Конјугати стероида са фeroценом

2.1.1. Стероидна и фeroценска једињења и њихов значај у медицинској хемији

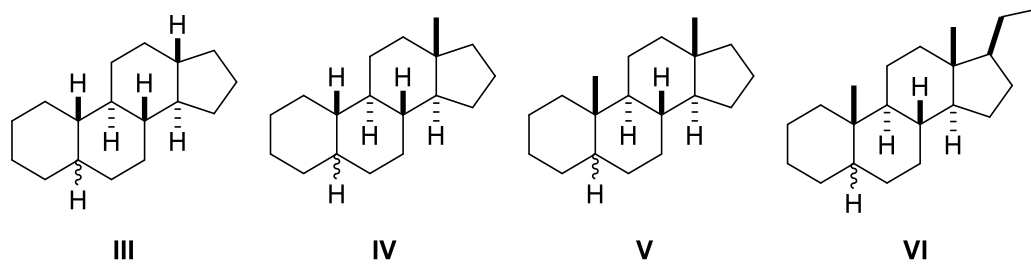
Стероидна једињења су свеprisутни природни производи који могу испољавати широк спектар биолошких дејстава.^[8] Стероидним скелетом сматра се тетрацикличан циклопента[а]перхидрофенантренски систем (I) у којем се прстенови обележавају словима А, В, С и D (слика 1).^[9] Препоручена нумерација стероидног скелета и чешћих супституената дата је на примеру холестерола (II), биосинтетског прекурсора свих других стероидних природних производа у човеку (слика 2.1.1.1). Апсолутна конфигурација стереоцентра на стероидном скелету се уобичајено наводи грчким словима α , β и ξ ; структурне формуле стероидних једињења се пишу тако да се А прстен нађе доле и лево, а D прстен горе и десно, а супституенти који се налазе испод, односно изнад равни коју дефинише овако оријентисан скелет добијају дескриптор „ α ”, односно „ β ”, док се дескриптор „ ξ ” односи на супституенте непознате конфигурације или смеше стереоизомера. Како су по правилу у стероидима природног порекла метил-групе као супституенти на C-10 и C-13 β -оријентисане, а које се због свог положаја на стероидном скелету називају ангуларним, α - и β -конфигурације се могу дефинисати и у односу на стереохемију ангуларних група, где су α -оријентисани супституенти на супротној страни равни коју одређује скелет као и ангуларне групе, а β -конфигурисани супституенти на истој.^[10]



Слика 2.1.1.1. Структура циклопента[а]перхидрофенантрена (I) с обележеним прстеновима и структура холестерола (II) с приказаном нумерацијом.

Познато је на десетине хиљада стероидних једињења. Велика већина садржи стероидни скелет, а међу њима се разликују серије у зависности од присуства или одсуства одређених супституената на скелету,^[11] а које су дефинисане ради лакшег именовања најзначајнијих стероидних природних производа.^[10] Препоруке Заједничке комисије за биохемијску номенклатуру из 1989. дефинишу три серије без супституената на C-17, гонанску (III), естранску (IV) и андростанску (V), као и неколико серија с различитим супституентима на C-17 (укључујући прегнанску, VI, слика 2.1.1.2). У свим случајевима

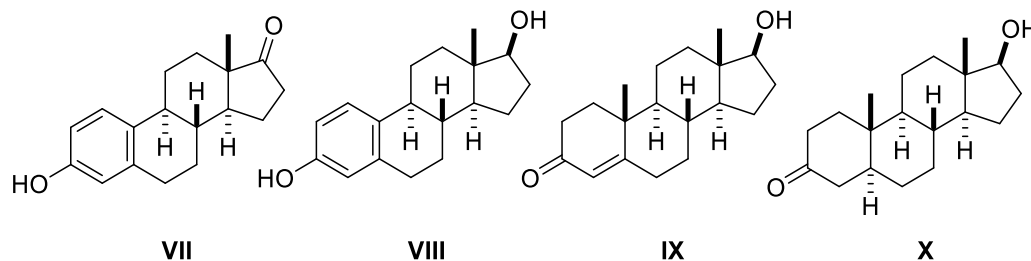
неопходно је дефинисати стереохемију кондензације А и В прстенова префиксом који одређује стереохемију водониковог атома у положају 5 (нпр. 5 α -прегнан), док је стереохемија на осталим чворним угљеницима предодређена и неопходно ју је назначити у имену једињења само уколико се разликује од оне у дефинисаном основном угљоводонику серије.^[10] Иако малобројна, постоје и стероидна једињења у којима је стероидни скелет претрпео промене раскидањем једне или више веза, као и проширењима и смањењима величина прстенова; предлагане су и нове серије стероида измењеног скелета како би се њихово именовање учинило једноставнијим.^[12]



Слика 2.1.1.2. Основни хидриди гонанске (III), естранске (IV), андростанске (V) и прегнанске серије (VI).

Најзначајнији естрански природни производи су хидроксиловани естра-1,3,5(10)-триени, који код човека и других сисара играју улогу женских полних хормона (естрогена). У првом реду, то су естрон (VII) и естрадиол (VIII, слика 2.1.1.3),^[11] који су поред репродуктивног система, развоја секундарних полних карактеристика и одигравања менструалног циклуса одговорни и за друге важне улоге, попут метаболизма калцијума, одржавања коштане масе, синтезе колагена, регулације расположења, когнитивне функције и здравља кардиоваскуларног система, како код жена, тако и код мушкараца.^[13]

Међу андростанским природним производима најзначајнији су андростани оксигеновани у положајима 3 и 17, а који се понашају као мушки полни хормони (андрогени). Њихови кључни представници су тестостерон (IX) и дихидротестостерон (X, слика 2.1.1.3). Код оба пола, тестостерон је одговоран за одржавање мишићне и коштане масе, регулацију хематопоезе, дистрибуцију телесне масноће, расположење, а његов потентнији дериват дихидротестостерон такође има улогу у расту косе, регулацији лучења лојних жлезди и функционисању простате.^[14]



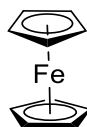
Слика 2.1.1.3. Структуре естрона (VII), естрадиола (VIII), тестостерона (IX) и дихидротестостерона (X).

Од прегнанских природних производа свакако је за човека најзначајнији гестагени хормон прогестерон, кључан код жена за одржавање трудноће, али и регулацију менструалног циклуса. Прогестерон је доведен у везу и с регулацијом телесне температуре и расположења, а такође модулише ефекте естрогена и андрогена.^[15]

Стероидни хормони своје најзначајније ефекте испољавају везивањем за рецепторе стероидних хормона; овакве структуре понашају се као транскрипциони фактори који могу активирати или инхибирати транскрипцију гена и синтезу протеина.^[16] Ово може довести до бројних физиолошких одговора, као што су раст и диференцијација ћелија, регулација метаболизма, контрола функције имунског система и система органа за размножавање.^[17]

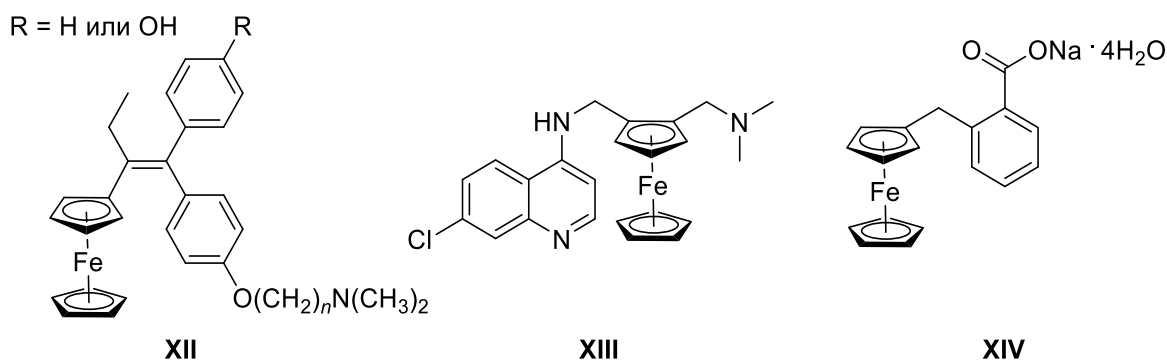
Немали број клинички одобрених лекова заснива се на природним или семисинтетским стероидним структурама.^[18] Бројне привилеговане структуре садрже стероидни скелет, а чак и суптилне хемијске модификације могу довести до корених промена њиховог биолошког дејства, што је једна од последица конформационе ригидности стероидног скелета.^[19] Мноштво стероидних молекула понашају се као антитуморски агенси, и то преко механизма који могу укључивати везивања за рецепторе, али и ензиме и остале нехормонске путеве.^[20,21]

Откриће фероцена (**XI**, слика 2.1.1.4) које се догодило пре нешто више од седамдесет година догађај је од пресудног значаја за развој органометалне хемије.^[22–24] Иако је касније откривено да и многи други метали граде сличне комплексе који су названи металоценима, фероцен је остао један од најзначајнијих и најиспитиванијих, што је разумљиво имајући у виду да је стабилан на ваздуху и у присуству влаге, као и да се лако функционализује.^[23] До данас је синтетисано више од осамдесет хиљада деривата фероцена.^[25] Хемија фероцена и његових деривата је темељно испитана првих неколико деценија по његовом открићу.^[26] Већ при самом открићу примећена је ароматичност фероценових прстенова.^[27] Фероцен се у реакцијама електрофилне ароматичне супституције понаша као активирано језгро, по реактивности слично фенолу, како због чињенице да је 6 π -електрона делокализовано преко пет угљеникових атома (јер је у питању анјон), тако и због донирања d-електрона из јона гвожђа.^[28] Услед овога се већина деривата фероцена добија дериватизацијом фероцена, а не у реакцијама супституисаних циклопентадиена са изворима гвожђа(II), што је много захтевнији приступ.^[26]

**XI**Слика 2.1.1.4. Структура фероцена (**XI**).

Временом су постале очигледне и многе (потенцијалне) примене једињења фероцена, те су нека од њих предлагана за употребу као хомогени катализатори, катализатори за асиметричне синтезе, затим у материјалима за електроде, сензорима, погонским горивима, пестицидима и полимерима.^[29–31] Једињења фероцена привукла су и знатижељу истраживача у области медицинске хемије, односно дисциплине која се понекад

назива биоорганометална хемија.^[32] Данас је већ ваљано установљено да увођење фероценске структуре може изазвати појачање постојећег биолошког дејства неког једињења, а чак постоје случајеви где оно доводи до испољавања нових пожељних биолошких и фармаколошких својстава.^[32,33] Стабилност фероцена у скоро свим условима сем у присуству оксидационих средстава, занемарљива токсичност, значајна липофилност и подложност редокс-процесима који доводе до промене поларности молекула и лакоћа дериватизације чине га пожељном фармакофором.^[33,34] Док замена фенил-групе фероценил-групом може довести до промене врсте и интензитета одговора биолошких система, најважније физичкохемијске особине, поготово оне које се доводе у везу са фармаколошком ефикасношћу, значајно се не мењају, те се понекад фероценил-група наводи као биоизостерна група фенил-групе.^[32] Показано је да многи деривати фероцена показују антипролиферативна, антимикробна,^[35] антималаријска,^[36] анксиолитичка^[37] и стимулишућа својства према централном нервном систему.^[38] Од највећег значаја су фероцифени (**XII**, слика 2.1.1.5), органометални аналози лека тамоксифена који се користи за лечење рака дојке, као и ферохин (**XIII**), аналог антималарика хлорохина. Фероцерон (**XIV**) је лек који је био одобрен у СССР-у и користио се за лечење анемије, али је његова производња обустављена, највероватније деведесетих година.^[39] Како су фероцифени у фази студија развоја формулације,^[40] а ферохин у другој фази клиничких студија,^[41] тренутно у употреби нема лекова чије активне супстанце садрже фероцен.



Слика 2.1.1.5. Структуре фероцифенских молекула (**XII**), ферохина (**XIII**) и фероцерона (**XIV**).

2.1.2. Конјугати стероида са фероценом као антитуморски агенси

Канцер (рак) представља групу болести које одликује неконтролисана пролиферација ћелија, као и својство ћелија канцера да доспеју у друга ткива.^[42] Биолошки процеси који претходе туморогенези су врло сложени и само делимично разјашњени.^[43] Тренутно постоји више или мање ефикасна терапија за већину облика канцера, али је ова болест и даље значајан узрочник морталитета.^[44] Један од приступа лечењу канцера је хемиотерапија, а неколико лекова на бази метала су развијени за ову сврху, као што је цисплатин и карбоплатин.^[45] Ова једињења нажалост поседују врло високу општу

токсичност и изазивају низ нуспојава, највише као последица неселективне природе дејства, а такође су неактивна према неким врстама туморских ћелија и метастаза.^[46]

Позната је улога слободнорадикалских процеса у патогенези канцера. Већина ћелија канцера производи велике количине реактивних кисеоничних врста, што је последица поремећеног редокс-метаболизма.^[47,48] Међутим, услед овог поремећаја, егзогене слободнорадикалске врсте и њихови прекурсори инхибирају раст ћелија канцера, а под одређеним условима могу деловати и селективно.^[30]

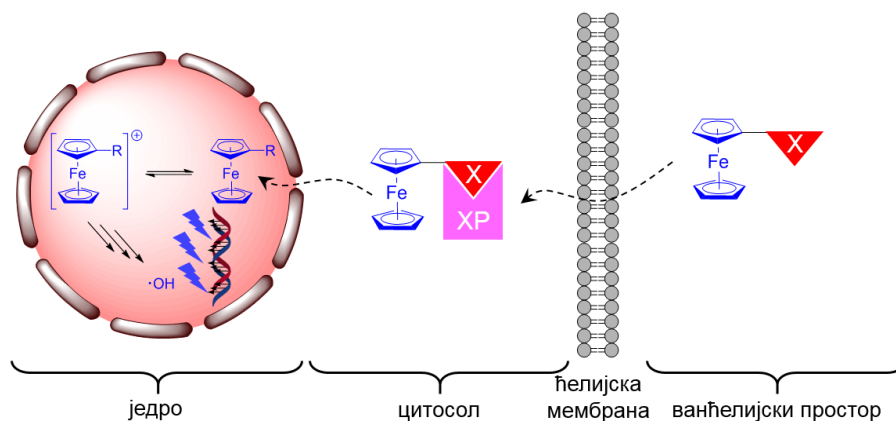
Могућност употребе фероцена за добијање антиканцерских агенаса није била испрва примећена. Рана *in vivo* истраживања показала су да фероцен поседује врло ниску акутну токсичност, а пси који су храњени дозама од 1 g kg^{-1} успешно су се опоравили по излечењу од токсикозе гвожђа која је наступила услед метаболичког ослобађања овог елемента.^[49] Већина простих деривата фероцена показује слично ниску токсичност, са значајним изузетком ацетилфероцена.^[32]

Откриће важно за биоорганометалну хемију начињено је 1984. године, када је установљено да неке водорастворне фероценијум-соли с различитим контрајонима испољавају антинеопластичну активност према Ерлиховом тумору код мишева, док фероцен није показао ово дејство.^[50,51] Затим су Нојзе (Neuse) и сарадници испитали неколико неутралних деривата фероцена као антипролиферативне агенсе, ослањајући се на хипотезу да низак формални редокс-потенцијал фероцена у води може довести до настанка цитотоксичних фероценијум-врста у биолошки условљеном оксидационом процесу.^[52] Како је познато да у биолошким системима постоји редокс-равнотежа између фероцена и фероценијум-јона, намеће се закључак да почетно оксидационо стање гвожђа у биолошки активном фероценском деривату није важно, док год такав дериват има повољне фармакокинетичке особине које дозвољавају транспорт до циљаног ткива.^[53] Кратак полуживот фероценијум-катјона у васкуларној циркулацији је додатна потешкоћа за допремање до циљаних ткива, што обесхрабрује евентуалну интравенску или перитонеалну администрацију фероценијум-соли, и усмерава фокус развоја биолошки активних деривата на неутралне фероцене.^[30]

Везивањем фероценског језгра за ДНК-интеркалатор било је добијено цитотоксично једињење, што је сугерисало да се токсичност фероценијум-јона може испољити преко оштећивања ДНК.^[54] Касније је показано да фероценијум-јони заиста могу да раскидају ланце ДНК, а ово је приписано дејству хидроксил-радикала који настају у реакцији фероценијум-јона и воде, вероватно процесима налик на Фентонову реакцију гвожђа(II) у воденом раствору.^[55] Каснији радови Озеле (Osella) и сарадника показали су да фероценијум-соли могу изазвати стварање хидроксил-радикала, али аутори нису довели овај феномен у везу са уоченим оштећењима ДНК. Даља истраживања ове групе указала су на значај који имају супституенти на фероценијум-јонима, као и да стабилност фероценијум-врсте може утицати на то да ли се токсичност испољава услед интрацелуларних оштећења или оних на ћелијској мембрани.^[56] Топоизомераза II је такође предлагана као могућа ћелијска мета цитотоксичних фероценских агенаса.^[57]

Хормон-зависни тумори пролиферишу приликом дејства ендогених или егзогених полних хормона, а прекомерно експримирани рецептори стероидних хормона утичу на поспешивање раста туморских ћелија.^[58] Најзначајнији облици обухватају андроген-зависан канцер простате и естроген-зависне канцере дојке и јајника.^[59] Код оболелих пацијената примењују се лекови који се супротстављају дејству одговарајућег типа хормона. Примери широко распрострањених лекова којима се лече хормон-зависни канцери су бикалутамид, абиратерон-ацетат и тамоксифен, али се приликом њихове примене у хемиотерапији сусрећу потешкоће као што су резистенција, недовољна ефикасност и незанемарљиве nusпојаве, те је развој алтернативних активних супстанци и даље у току.^[60]

Жауенова (Jaouen) група је вероватно највише допринела развоју антиканцерских агенаса заснованих на фeroцену. Управо из ове истраживачке групе су потекли фeroцифени, а нека од ових једињења се тренутно налазе у касним фазама претклиничких испитивања.^[61] Први конјугат стероида са фeroценом синтетисан је 1973. године,^[62] али ће хипотеза о биолошкој корисности ове класе једињења бити постављена тек деведесетих година прошлог века, када је Жауенова истраживачка група предложила да транспортовање фeroценске врсте конјуговане са лигандом рецептора стероидних хормона до ћелијског једра преко одговарајућег рецептора може довести до испољавања цитотоксичности.^[60] Од тада па надаље овој групи једињења је посвећена нарочита пажња, будући да се могу посматрати као потенцијално селективни антитуморски агенси. Пошто су неутрални и липофилни молекули, они лако продиру кроз ћелијску мембрану и можда се могу концентровати у ћелијама које поседују одговарајућу врсту мембранског или интрацелуларног рецептора, што би, по активацији и транслокацији, довело до транспортовања конјугата у једро, где би оксидација доступним биолошким редокс-паровима произвела цитотоксичне фeroценијум-врсте (слика 2.1.1.6).



Слика 2.1.1.6. Приказ хипотезе селективног цитотоксичног дејства конјугата фeroцена са стероидима. „X” означава стероидни хормон, „XP” одговарајући рецептор стероидних хормона.

Из ове хипотезе следи и да тачна вредност редокс-потенцијала фeroценског језгра у неком агенсу није пресудна, већ је пре важно да ли се налази у оквиру одређеног биолошког опсега.^[32]

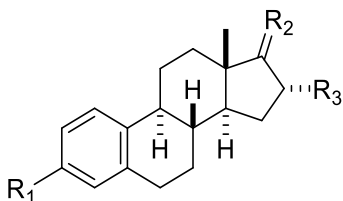
Док је ова идеја надахнула истраживања о конјугатима стероида са фероценом у ширем смислу, она није ограничена само на ову групу једињења. На пример, Липардова (Lippard) група је повезивањем естрадиола са комплексима платине(IV) припремила неколико једињења с израженијим дејством на естроген-зависне ћелијске линије у поређењу са естроген-независним.^[63]

2.1.3. Конјугати естра-1,3,5(10)-триена са фероценом

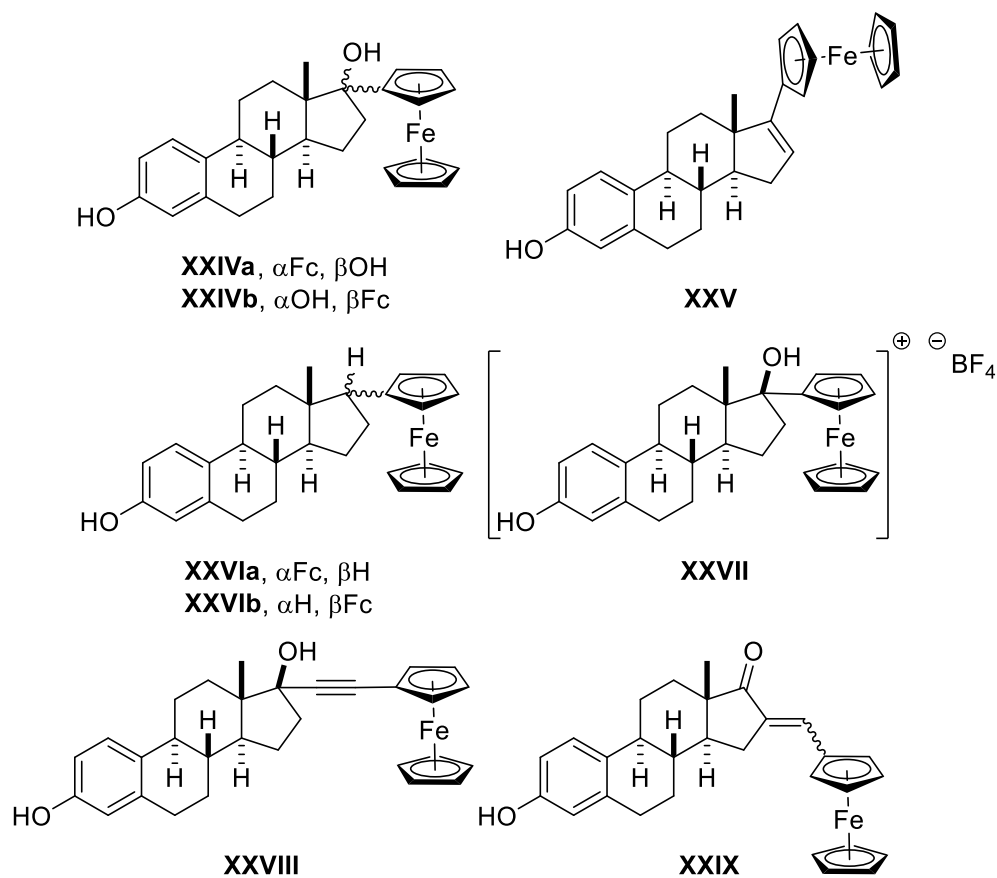
О синтези првих конјугата стероидних естрогена са фероценом извештавају Венцелова (Wenzel)^[64] и Кајсова (Cais)^[65] група седамдесетих година прошлог века. Ниједна од ове две групе није за циљ имала добијање антиканцерских агенаса. Венцел и сарадници бавили су се дистрибуцијом по органима потенцијалних радиофармацеутика у мишевима, и с тим циљем су синтетисана једињења **XV–XVIII** (табела 2.1.3.1), која су послужила као прекурсорни за добијање [¹⁰³Ru]рутеноценских и [^{99m}Tc]цитектрениских деривата.^[64,66,67] С друге стране, Кајсова група је развијала металоимуногест који би заменио радиоимуногестове у квантификацији антигена попут хормона. С тим циљем су припремили неколико естра-1,3,5(10)-триенских карбоксиметилетарских и хемисукцинатних деривата,^[65,68] који су затим у реакцији са аминометилфероценом дали одговарајуће амиде **XIX–XXIII**. Шимада (Shimada) и сарадници изучавали су реакцију простијих фероценских реагенаса са стероидним алкохолима и глукуронидима како би је применили за дериватизацију као предуслов за одређивање течном хроматографијом високе ефикасности са електрохемијском детекцијом (HPLC-ED), али добијена једињења нису окарактерисали.^[69–71]

Први конјугат стероида са фероценом у којем су две целине повезане директно (без употребе атомске групе која служи као „линкер“) добили су Жауен и сарадници 1990. године у реакцији естрона са фероцениллитијумом, која је дала 17 α -фероценил-дериват естрадиола **XXIVa** (слика 2.1.3.1).^[72] Иако су аутори овог рада исказали познавање цитотоксичности фероценијум-јона, једињење **XXIVa** није подвргнуто тестовима цитотоксичности, већ је предложено да се може користити за обележавање естрогеног рецептора α (ER α) на основу афинитета, услед експериментално доказаног својства овог једињења да се везује за рецептор иреверзибилно и са значајним афинитетом (релативни афинитет везивања, RBA = 15%); структура овог рецептора у време ових истраживања није била позната. Електрохемијска својства једињења **XXIVa** су накнадно испитана, при чему је трансформација естрадиола у **XXIVa** предложена као потенцијално корисна за квантификовање естрогена у фармаколошким концентрацијама помоћу HPLC-ED методе.^[73] Жауенова група је у раду објављеном 1994. године појаснила да **XXIVa** није једини производ ове реакције, већ да као производи настају **XXIVa** и **XXIVb** у односу 9:1.^[74]

Табела 2.1.3.1. Конјугати естра-1,3,5(10)-триена са фероценом које су синтетисали Венцел и Кајс



Једињење	R ₁	R ₂	R ₃
XV ^[64]	OCOFc	O	H
XVI ^[64,67]	OCOFc	αH, βOH	H
XVII ^[66]	OH	αH, βOCOFc	H
XVIII ^[66]	OCOFc	αH, βOCOFc	H
XIX ^[68]	OCH ₂ CONHCH ₂ Fc	O	H
XX ^[68]	OCH ₂ CONHCH ₂ Fc	αH, βOH	H
XXI ^[68]	OCH ₂ CONHCH ₂ Fc	αH, βOH	OH
XXII ^[65,68]	OH	αH, βOCO(CH ₂) ₂ CONHCH ₂ Fc	H
XXIII ^[68]	OH	αH, βOCO(CH ₂) ₂ CONHCH ₂ Fc	OCO(CH ₂) ₂ CONHCH ₂ Fc



Слика 2.1.3.1. Структуре конјугата стероидних естрогена са фероценом **XXIV–XXIX**.

Тада су такође извршили елиминацију **XXIVa** до Δ^{16} -алкена **XXV**, као и редукцију **XXIVa** натријум-бор-хидридом у присуству тетрафлуорборатне киселине, при чему су у различитом односу добијена једињења **XXV**, **XXVIa** и **XXVIb** у зависности од температуре. У поменутом раду описана је и оксидација **XXIVa** до тетрафлуорборатне соли **XXVII**. Исте године је објављена и синтеза 17α -(фероцениленил)естрадиола (**XXVIII**) који је добијен у реакцији литијумовог ацетилида етинилфероцена и *терц*-бутилдиметилсилил-етраестрона, као и синтеза 16 -(фероценилметилен)естрона (**XXIX**) алдолном реакцијом стероида са фероценкарбалдехидом.^[75] Ова два конјугата су такође синтетисана као прекурсор цитектрена чије је везивање за ЕР α из материце јувенилних мишева испитивано. Конфигурација егзоцикличне двоструке везе у **XXIX** овом приликом није одређена.

Нешто касније, 1996. године, објављена је синтеза $3,17$ -бис(фероценилметил)-етраестрадиола (**XXX**, схема 2.1.3.1), једињења које је припремљено као састојак мембрана чија се поларност може мењати оксидоредукционим процесима захваљујући фероценил-групи, а стероидни скелет служио је искључиво као хидрофобно језгро.^[76] При коришћеним експерименталним условима алкиловане су и фенолна и алкохолна функција.

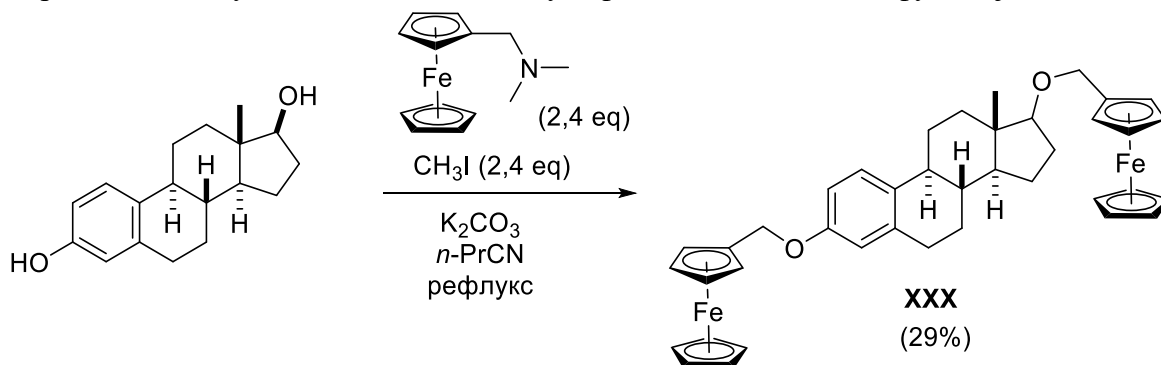
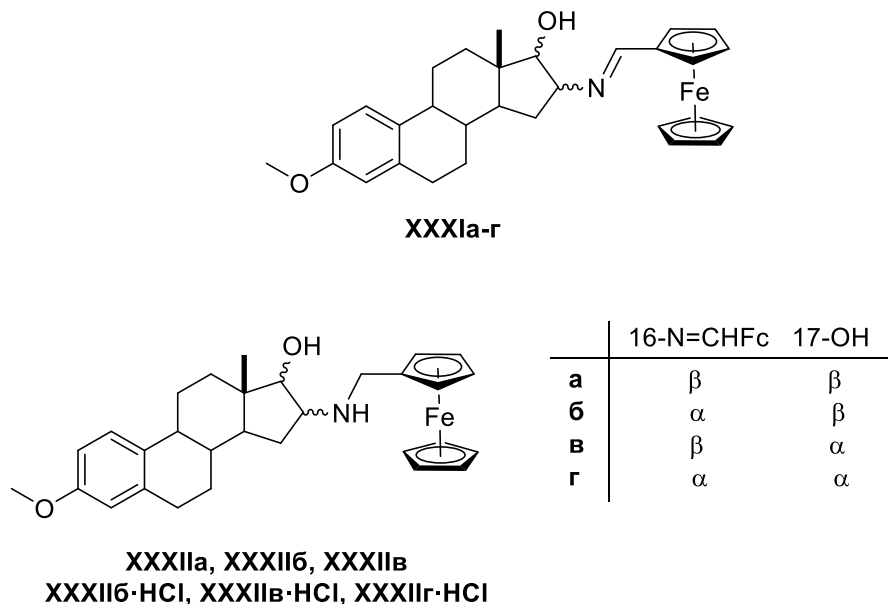


Схема 2.1.3.1. Синтеза конјугата **XXX**.

Шенекер (Schönecker) и сарадници су 1998. године из дијастереоизомерних 16 -аминоестра- $1,3,5(10)$ -триена добили *N*-(фероценилметил)имине **XXXIa-g**, одговарајуће амине **XXXIIa**, **XXXIIb** и **XXXIIc**, као и њихове хидрохлоридне соли (слика 2.1.3.2). Испитана су антимикуробна својства добијених деривата, а 16 -(фероценилметиламино)естра- $1,3,5(10)$ -триени показали су значајну активност и дејство на широки спектар микроорганизама. Овом приликом је синтетисано и неколико конјугата холестанских стероида са фероценом, али они нису показали значајну антимикуробну активност. Антитуморска својства нажалост нису испитана.

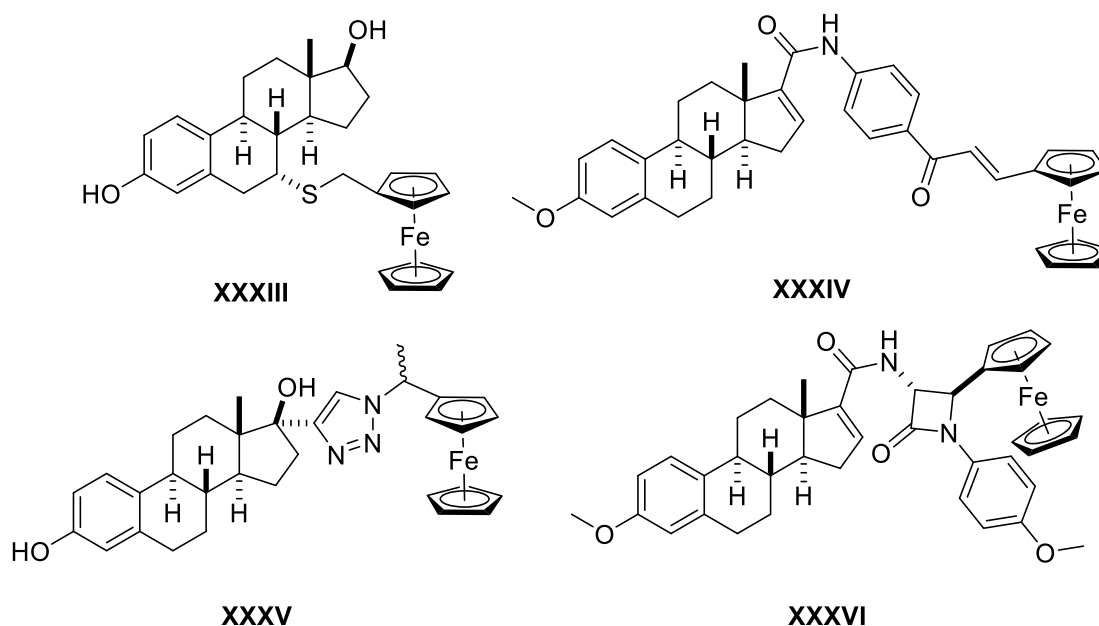
Када су већ постигли значајан успех добивши антипролиферативни агенс са двојаким дејством тако што су фенол-групу тамоксифена заменили фероценил-групом,^[40] Жауен и сарадници су се поново вратили студијама фероцена дериватизованих биолошки активним молекулима, па су предложили алтернативну синтезу једињења **XXVIII** Соногаширином реакцијом 17α -етинилестрадиола и јодфероцена.^[77] Овом приликом је наведена и нестабилност једињења **XXIVa** при физиолошким условима, а као извор цитирана је докторска дисертација Танга (Tang). Како је ово значајна потешкоћа за било какву терапијску примену овог једињења, аутори су се усредсредили на

Слика 2.1.3.2. Структуре конјугата стероидних естрогена са фероценом **XXXI–XXXII**.

добијање стабилнијих конјугата. Утврђено је да је једињење **XXVIII** задржало значајан део афинитета према естрогеним рецепторима ER α (RBA = 28%) и ER β (RBA = 37%), а установљено је и да, за разлику од **XXIVa**, комплекс естрогених рецептора и овог једињења дисосује, премда споро. Каснији рад ових аутора^[78] установио је активности једињења **XXIVa** и **XXVIII**, као и новосинтетисаног 7 α -(фероценилметилтио)-деривата естрадиола **XXXIII** (слика 2.1.3.3), према ћелијама естроген-зависне линије MCF-7. Сва три једињења поседовала су значајно пролиферативно дејство на MCF-7, упоредиво с оним које испољава естрадиол. Антипролиферативну активност према MDA-MB-231 линији (естроген-независни канцер дојке) поседовала су једињења **XXVIII** и **XXXIII**, и то у микромоларном опсегу концентрација, с одговарајућим IC₅₀ вредностима од 13,4 μ M и 18,8 μ M, редом. Уочена активност је објашњена чињеницом да се сва три органометална комплекса добро везују за ER α , што значи да њихова инхерентна естрогеност доминира при ниским концентрацијама, а цитотоксична својства пореклом из фероцена се могу испољити тек при вишим концентрацијама. Овај резултат указује да само присуство фероцена на молекулу стероидног хормона није довољно да би изазвало *in vitro* цитотоксичност, али такође открива важност узимања у обзир афинитета према естрогеним рецепторима приликом дизајна агенаса који делују на хормон-зависне ћелије канцера. Другим речима, положај супституције стероидног језгра преко које се остварује конјугација је изузетно важан.

Група професорке Шкоде-Фелдеш (Skoda-Földes) је у неколико наврата синтетисала стероиде естра-1,3,5(10)-триенске серије са фероценом.^[79–82] Њихова истраживања била су усмерена на употребу сложенијих „линкера”, као што је то халконски остатак (**XXXIV**, слика 2.1.3.3)^[79], триазолов (**XXXV**)^[82] и β -лактамски прстен (**XXXVI**),^[81] због чега су их Ле Бидо (Le Videau) и Дагорн (Dagorne) прозвали химера-једињењима.^[83] Како су њихова изучавања била првенствено синтетске природе, већина једињења која су добили није

биолошки испитана. Недавно је установљено да је једињење **XXXV** врло снажан инхибитор стероид-сулфатазе ($IC_{50} = 35,0 \text{ nM}$), готово упоредив са естрон-3-сулфаматом ($IC_{50} = 4,4 \text{ nM}$).^[84]



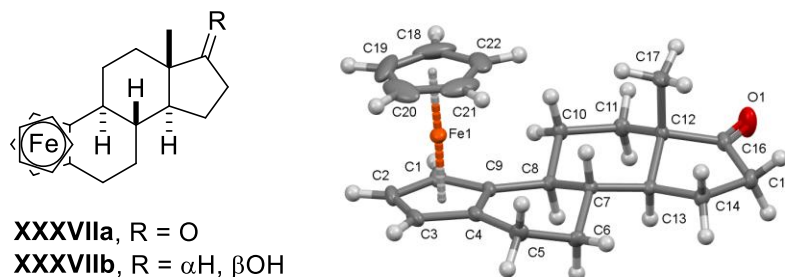
Слика 2.1.3.3. Структуре конјугата стероидних естрогена са фероценом **XXXIII–XXXVI**.

Мансрои (Manosroi) и сарадници су 2010. године објавили синтезу конјугата **XXIX** погрешно га сматрајући новим једињењем,^[85] али су том приликом одредили и активност овог једињења према ћелијској линији HeLa (човечји рак грлића материце) с вредношћу $IC_{50} = 0,50 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ($\approx 1,1 \text{ }\mu\text{M}$). Конфигурација егзоцикличне двоструке везе је овом приликом приказана као *E*, али ово није подржано ниједним спектроскопским податком.

Мелендезова (Meléndez) група добила је једињења **XV** и **XVI** користећи другачији синтетски приступ од Венцеловог, али су ови аутори такође погрешно тврдили да су ова једињења нова.^[86] С друге стране, установљено је да су једињења **XV** и **XVI** активна према MCF-7 линији, с IC_{50} вредностима од 9 и 108 μM , редом, а није уочен концентрациони опсег у којем испољавају пролиферативну активност. Такође су испитана и електрохемијска својства ових једињења, као и активност према ћелијској линији HT-29 (рак дебелог црева).

Котора (Kotora) и сарадници осмислили су и извели тоталну синтезу једињења у којем је бензенов А прстен естра-1,3,5(10)-триенског скелета замењен једним од два петочлана фероценова прстена.^[87] Енантиселективна синтеза фероценестрона (**XXXVIIa**, слика 2.1.3.4) постигнута је у 23 корака почињући од фероцена, а још један корак неопходан је за редукцију фероценестрона до фероценестрола (**XXXVIIb**). Ни једно од ова два једињења није нажалост показало афинитет ни према $ER\alpha$, $ER\beta$ ни андрогеном рецептору (AR), највероватније услед недостатка донора водоничне везе у погодном положају на супституисаном фероценском прстену, али је могуће и да несупституисани фероценски

прстен изазива стерне сметње приликом везивања за активно место. У исцрпном прегледу биоорганометалне хемије фероцена Мецлер-Нолте (Metzler-Nolte) и Салменова (Salmain) пронашли су да је слична синтеза попут оне коју су извели Котора и сарадници спроведена у докторској дисертацији Колера (Koller) одбрањеној 1975. године.^[32]



Слика 2.1.3.4. Структуре фероценестрона (**XXXVIIa**) и фероценестрола (**XXXVIIb**) и молекулска структура фероценестрона добијена рендгеноструктурном анализом на монокристалу.

Рад Мелендеза и сарадника из 2019. године предложио је нову синтезу једињења **XV**,* али су остварене и синтезе нових деривата **XXXVIII–XL** редукцијом једињења **XXIX** са различитим реагенсима (схема 2.1.3.2).^[88] Одређене су и активности једињења **XV** и **XXXVIII–XL** према две естроген-зависне (MCF-7 и T-47D) и једној естроген-

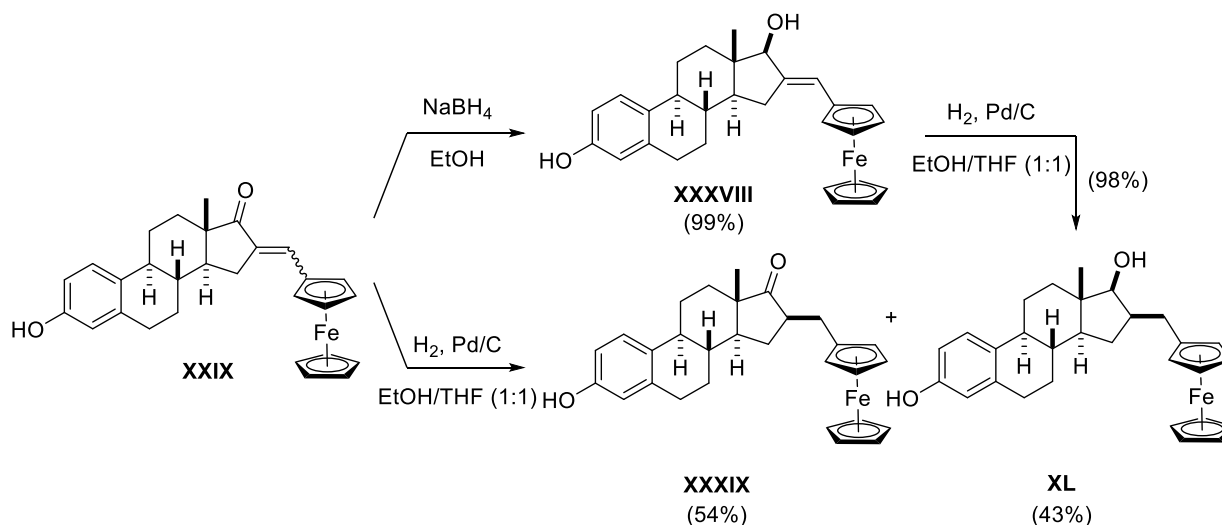


Схема 2.1.3.2. Синтеза конјугата стероидних естрогена са фероценом **XXXVIII–XL**.

независној ћелијској линији (MDA-MB-231). Ниједно од ових једињења није испољавало пролиферативно дејство при испитаним концентрацијама, а IC_{50} вредности налазиле су се у микроларном опсегу, при чему је једињење **XXXVIII** било најпотентније. Занимљиво је приметити да је ово други случај да конјугат естрадиола са фероценом испољава већу активност него одговарајући конјугат естрона са фероценом. У овом раду одређене су и

* Описана синтеза једињења **XV** подразумева реакцију естрона и фероценкарбонил-флуорида. У допунском материјалу приложеном уз рад дати су ^1H и ^{13}C НМР спектри из којих се види да аутори нису успешно припремили фероценкарбонил-флуорид, те је теза да је једињење **XV** добијено новим синтетским поступком погрешна.

кристалне структуре једињења **XV**, **XXIX** и **XXXVIII–XL**, чиме је потврђена *E*-конфигурација егзоцикличне двоструке везе у једињењима **XXIX** и **XXXVIII**. Каснијим радом исте групе добијена је кристална структура новог полиморфа једињења **XL**, а испитано је и његово везивање за албумин људског серума *in vitro* и *in silico* методама.^[89]

У табели 2.1.3.2 сумиране су активности поменутих једињења према ћелијама ћелијских линија естроген-зависног и естроген-независног канцера дојке. Иако су вредности из табеле 2.1.3.2. прикупљене из различитих извора и последица су коришћења различитих експерименталних услова како би се добиле IC₅₀ вредности, неки прелиминарни закључци се ипак могу извести. Чини се да деривати са β-оријентисаном хидроксилном групом на C-17 показују бољу активност од оних који у овом положају поседују кето-групу. Упркос недостатку RBA вредности, очигледно је и да увођење супституената у положаје 3, 4, и 16 доводи до значајног смањења или нестајања естрогености, у толикој мери да се не уочава пролиферативан ефекат на MCF-7. Није јасно да ли ова једињења задржавају довољно афинитета према ERα или ERβ да би могла испољавати активност према хипотези о концентровању у једру. Остаје неопходно разјаснити механизам цитотоксичности ових деривата.

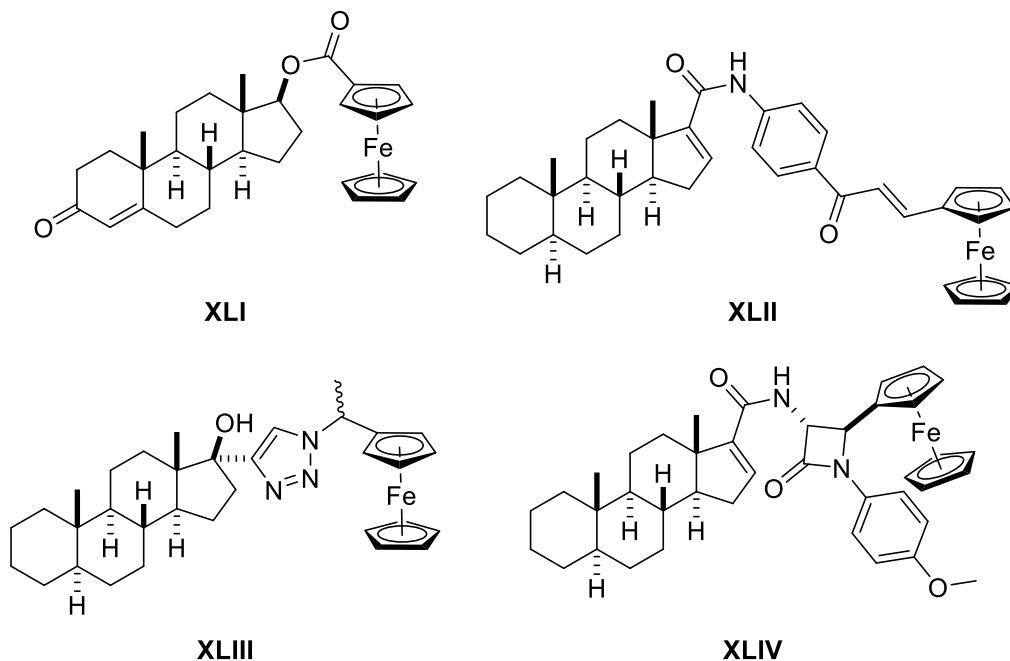
Табела 2.1.3.2. IC₅₀ вредности неких конјугата према MCF-7 и MDA-MB-231 линијама.

Једињење	IC ₅₀ [μM]	
	MCF-7	MDA-MB-231
XV	9 ^{a[86,88]}	17 ^{a[88]}
XVI	108 ^{a[86]}	н. о.
XXIVa	п. е. ^{б[78]}	н. а. ^{б[78]}
XXVIII	п. е. ^{б[78]}	13.4 ^{б[78]}
XXIX	45 ^{a[88]}	103 ^{a[88]}
XXXIII	п. е. ^{б[78]}	18.8 ^{б[78]}
XXXVIII	15 ^{a[88]}	8 ^{a[88]}
XXXIX	32 ^{a[88]}	34 ^{a[88]}
XL	22 ^{a[88]}	29 ^{a[88]}

н. о. – није одређена; н. а. – нема активности; п. е. – пролиферативни ефекат; ^a – МТТ-тест после 3 дана; ^б – укупан садржај протеина после 5 дана; ^в – укупан садржај протеина после 6 дана.

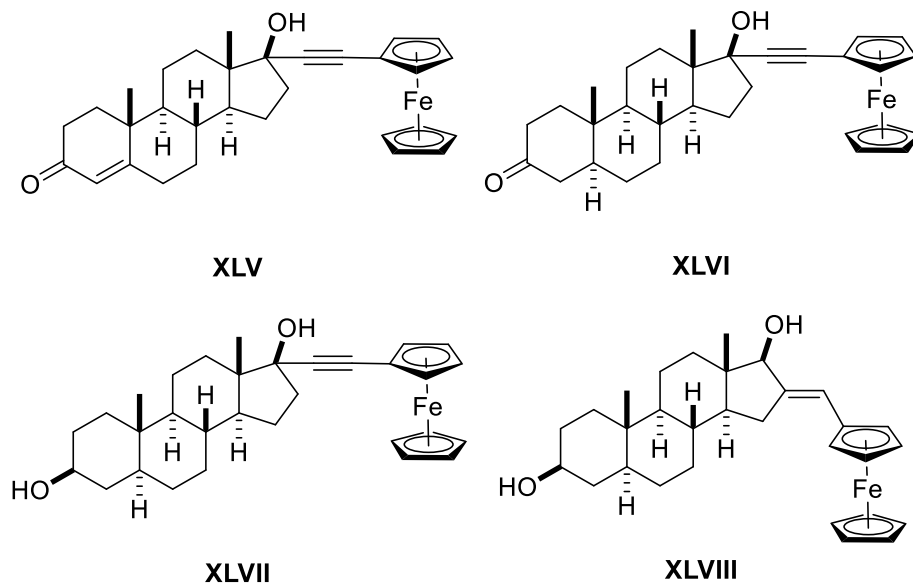
2.1.4. Конјугати андростана са фероценом

Први конјугат андростана са фероценом **XLI** (слика 2.1.4.1), естар тестостерона са фероценкарбоксилном киселином, појавио се у литератури 1980. године, а синтетисала га је Венцелова група.^[66] Такође је познато и неколико химера-једињења припремљених у групи Шкоде-Фелдеш, а која су по структури конјугати андростана, као што су **XLII**,^[79] **XLIII**^[82] и **XLIV**^[81].



Слика 2.1.4.1. Структуре конјугата стероидних андростана са фероценом **XLI–XLIV**.

Најсвеобухватније и најсистематичније су синтези конјугата андростана са фероценом пришли истраживачи из Жауенове групе 2009. године.^[90] Они су синтетисали конјугате андрогена са фероценом **XLV–XLVIII** (слика 2.1.4.2) који поседују структурне



Слика 2.1.4.2. Структуре конјугата стероидних андрогена са фероценом **XLV–XLVIII**.

варијације како би се упоредило узимање сваког једињења за AP, али и одредило дејство на ћелијске линије хормон-зависног (LNCaP) и хормон-независног канцера простате (PC-3). Конјугат **XLV** је добијен Стилијевим купловањем оргонокалајног деривата 17 α -

етинилтестостерона и јодфероцена, док је конјугат **XLVI** добијен адисијом ацетилида етинилфероцена на 3,3-(етилендиокси)-5 α -андростан-17-он и уклањањем диоксоланске заштитне групе; редукцијом конјугата **XLVI** натријум-бор-хидридом добијен је конјугат **XLVII**. Синтеза конјугата **XLVIII** из 3,3-(етилендиокси)-16-(фероценилметилен)-5 α -андростан-17-она постигнута је Кневенагеловом кондензацијом фероценкарбалдехида и полазног стероида, а затим уклањањем ацеталне заштите и стереоселективном редукцијом натријум-бор-хидридом (схема 2.1.4.1).

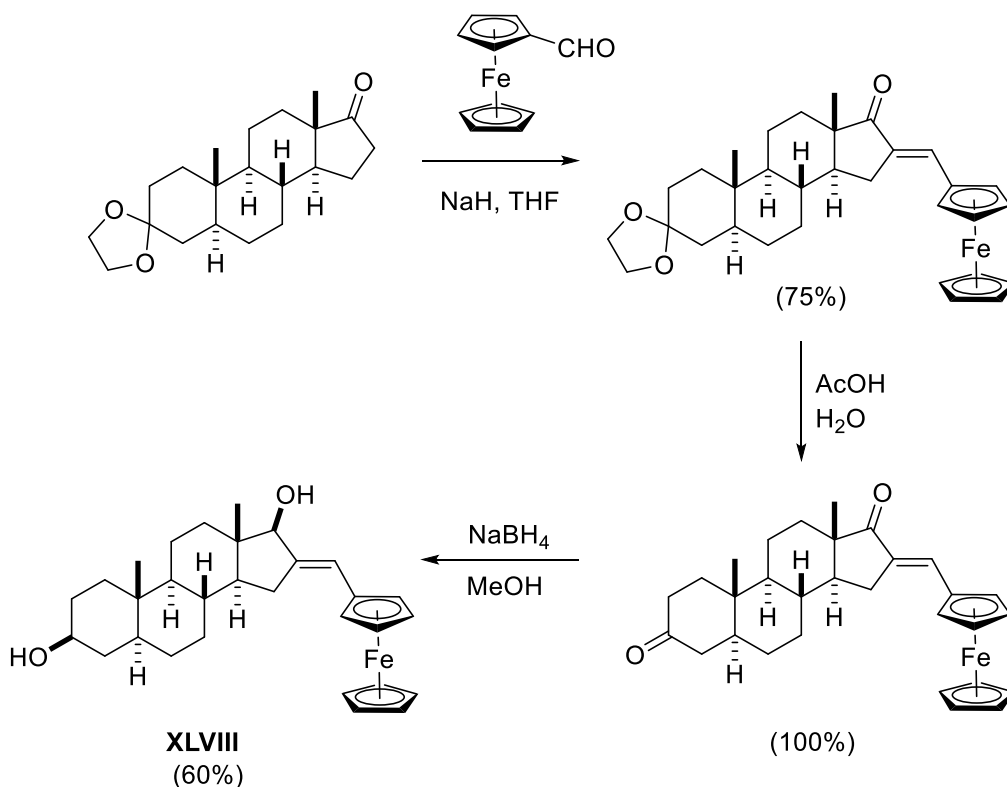


Схема 2.1.4.1. Синтеза конјугата **XLVIII**.

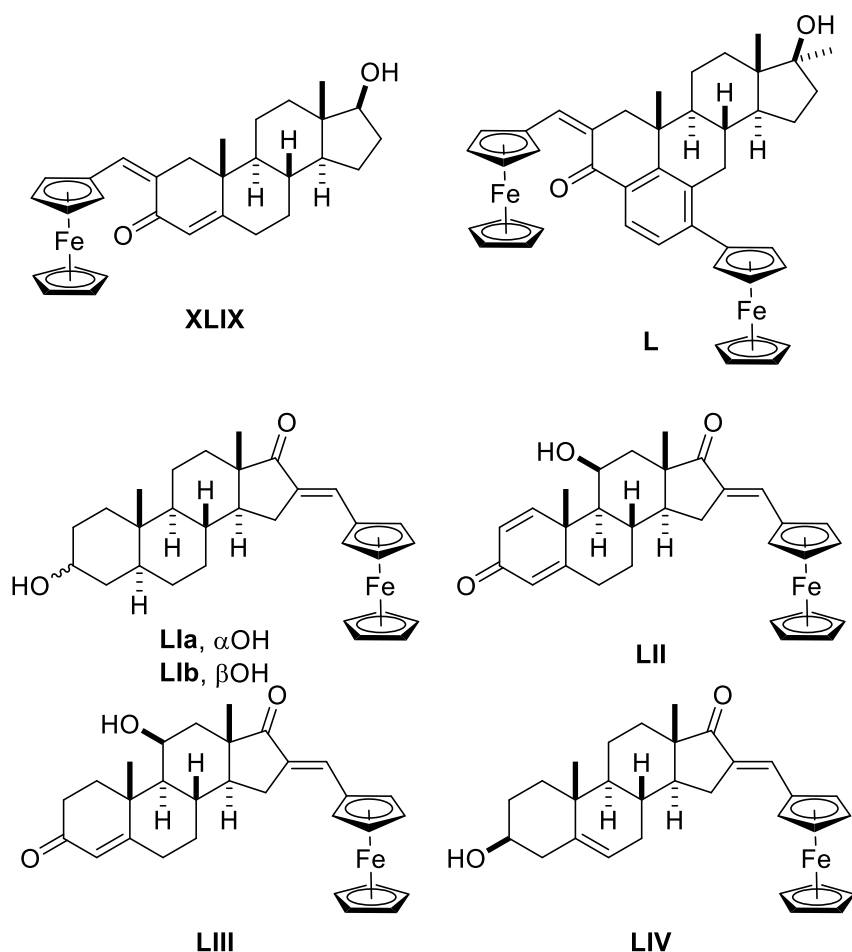
Резултати биолошких испитивања ових једињења сумирани су у табели 2.1.4.1. Резултати одређивања афинитета везивања указали су да AP много мање толерише супституенте у положају 17 α него EP α и EP β , а конјугати **XLV** и **XLVI** показали су нешто већи афинитет у односу на **XLVII** и **XLVIII**. Конјугати **XLV** и **XLVI** су очекивано изазвали пролиферацију ћелија LNCaP при концентрацији од 1 μM , али су показали антипролиферативно дејство при 10 μM . Предложено је да **XLV** и **XLVI** имају довољно андрогених својстава да изазову пролиферацију андроген-зависних ћелија при нижим концентрацијама, док цитотоксичност изазвана присуством фероцена доминира при вишим концентрацијама. Сва четири конјугата показала су инхибицију пролиферације PC-3 ћелија у ниском микроларном опсегу IC₅₀ вредности.

Табела 2.1.4.1. Релативни афинитети везивања и IC₅₀ вредности конјугата андрогених стероида са фероценом XLV–XLVIII.^[90]

Једињење	RBA за андрогени рецептор [%]	IC ₅₀ [μM]	
		LNCaP	PC-3
XLV	0,57	п. е.	4,7
XLVI	0,32	п. е.	8,3
XLVII	0,032	н. о.	5,5
XLVIII	0,020	н. о.	12,2

п. е. – пролиферативни ефекат; н. о. – није одређена

У претходном одељку поменути су резултати Маносроија и сарадника из 2010. године.^[85] Изузев наведеног конјугата из естранске серије, остатак једињења добијених том приликом припада конјугатима андростанске серије. Они су добијени базно-

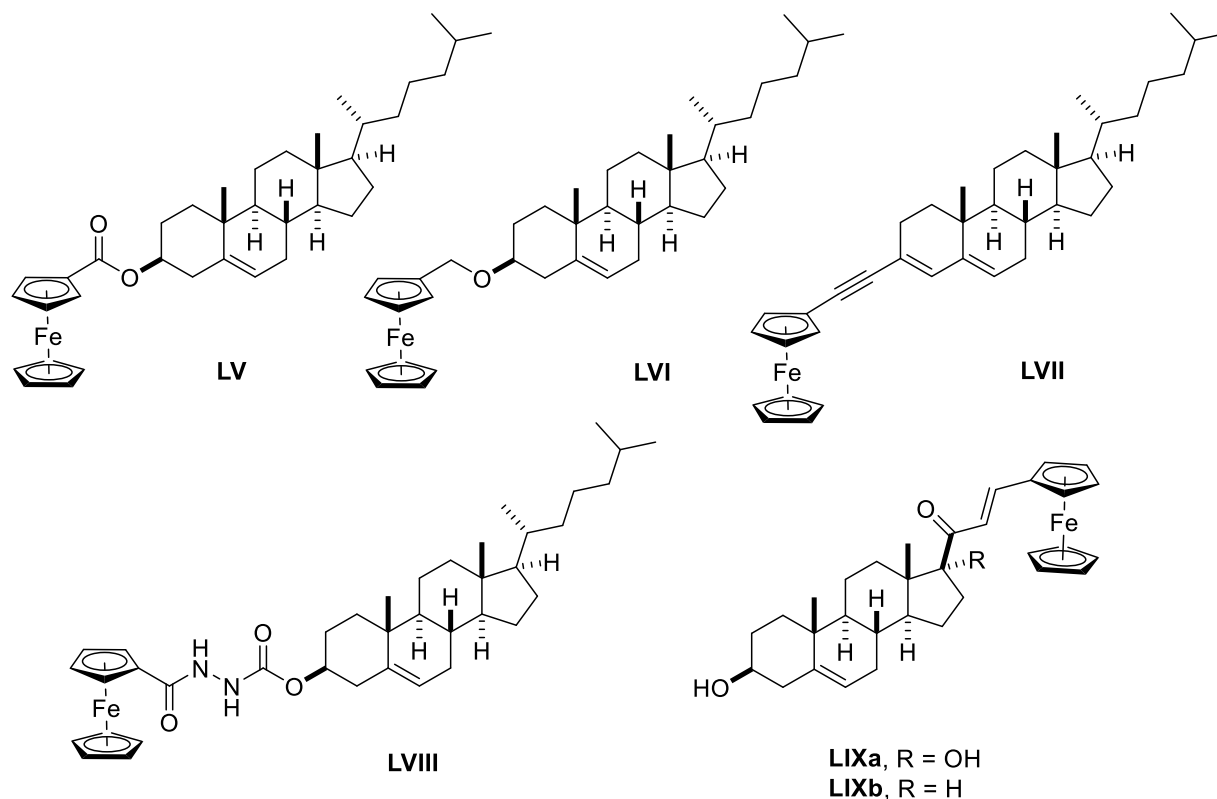


Слика 2.1.4.3. Структуре конјугата андростана са фероценом XLIX–LIV.

катализованом алдолном кондензацијом фероценкарбалдехида и следећих кетостероида: тестостерона, 17α-метилтестостерона, андростерона, преднизолона и хидрокортизона, а на тај начин су добијени конјугати **XLIX**, **L**, **LIa**, **LII**, **LIII**, редом (слика 2.1.4.3). Док тестостерон и андростерон дају очекиване еноне, није очигледно зашто 17α-

метилтестостерон даје бензо[*d,e*]-систем, о чему нема никаквих коментара ни аутора рада. Такође је пожељно разјаснити да се хидроксиметилкарбонил-бочни ланац кортикостероида у овим условима уклања у ретро-алдолној реакцији, што оставља 17-кето функцију на D прстену, која може наградити енолат, чиме се фероценилметилен-група уводи на C-16. Конјугати **XLIX**, **L** и **Lla** инхибирали су пролиферацију HeLa ћелија, а добијене IC₅₀ вредности биле су 0,223, 0,271, и 1,72 µg/mL (≈ 0,46 µM, 0,38 µM, 3,5 µM), редом. Такође је установљено да **LII** и **LIII** поседују слабију антиинфламаторну активност у поређењу са кортикостероидима из којих су добијени.

Неколико година касније, Мелендез и сарадници су утврдили молекулску структуру једињења **Lla** дифракцијом рендгенских зрака на монокристалу и проширили библиотеку ових једињења користећи исти синтетски приступ, а почевши од *транс*-андростерона и дехидроепиандростерона и фероценкарбалдехида, што је дало конјугате **LIIb** и **LIV**.^[91] За једињење **LIIb** структура је такође потврђена кристалографском анализом. Аутори су испитали дејство **Lla**, **LIIb** и **LIV** на MCF-7 и HeLa, а најнижа вредност IC₅₀ добијена је конјугат **Lla** у случају HeLa ћелија. Касније је такође испитано везивање ових једињења за албумин из људског серума помоћу *in vitro* и *in silico* метода.^[92]



Слика 2.1.5.1. Структуре конјугата стероида са фероценом **LV–LIX**.

2.1.5. Конјугати стероида осталих серија са фероценом

Први конјугат стероида са фероценом који је забележен у литератури био је естар фероценкарбоксилне киселине и холестерола (LV, слика 2.1.5.1), а ова естерификација описана је у раду из 1973. године,^[62] а поновљена 1980. године.^[72] Гокелова (Gokel) група је нешто касније синтетисала моно- и дихолестерил-естре 1,1'-фероцендикарбоксилне киселине, као и 3-О-фероценилметил-дериват LVI, као прекурсоре за добијање амфибилних једињења.^[93] Холестански конјугат LVII добијен је Соногаширином реакцијом у оквиру истраживања различитих начина на које се природни производи могу обележити фероценом.^[94] За конјугат LVIII утврђено је да може да се понаша као супергелатор са циклохексаном, а добијени гел реаговао је на различите стимулусе.^[95] Што се тиче конјугата прегнана са фероценом, до сада су позната само два таква једињења, LIXa^[85] и LIXb^[91], добијена претходно описаним поступком укрштене алдолне кондензације.

2.2. Испарљива једињења црне зове (*Sambucus nigra* L.)

2.2.1. Етарска уља и њихова анализа

Различити извори другачије дефинишу етарска уља. Европска фармакопеја наводи да су етарска уља смеше једињења које се добијају из биљних сировина дестилацијом воденом паром, сувом дестилацијом или неком другом погодном механичком техником без загревања.^[96] Бики (Bicchi) и Жулен (Joulain) одређују етарска уља као производ који се добија из биљног материјала помоћу једног од следећа три поступка: дестилацијом помоћу воде (хидродестилација) или водене паре, са водом или без ње у дестилационом апарату, сувом дестилацијом, или механичким процесом на собној температури из епикарпа *Citrus* spp. плодова.^[97] Оба извора су сагласна да се приликом одвајања етарског уља од водене фазе могу користити само физичке методе. Екстракти конвенционалним или суперкритичним растварачима се дакле не могу сматрати етарским уљима, као ни испарљива уља добијена у процесима потпомогнутим микроталасним зрачењем. По саставу, етарска уља су комплексне смеше испарљивих једињења, најчешће израженог мириса, која су биљни метаболити или артефакти процеса изоловања. Она су испарљива, обично течна, бистра, безбојна и лакша од воде, а растворна у органским растварачима.^[98] На енглеском језику се најчешће означавају као „essential oils” (есенцијална уља), вероватно по угледу на Парацелзусов термин „quinta essentia” за активни састојак.^[99] Термин „етарско уље” је превод латинског aetheroleum, чиме се истиче њихова испарљивост. У домаћој литератури се често среће кроатизам „етерична уља”.

Познато је да су се још у Старом веку, у Египту, Античкој Грчкој и Старом Риму користила ароматична уља за верске церемоније, као и медицинске и козметичке сврхе. Први записи о производњи етарских уља дестилацијом приписују се учењацима Ал-Киндију и Ибн Сини, који су живели у деветом, односно десетом веку.^[100] Антисептичка и

антимикробна својства етарских уља су брзо уочена, па су се користила у медицинске сврхе и за конзервисање хране. Данас се користе у индустрији хране, лекова, и парфема.^[101] Познато је неколико хиљада различитих етарских уља, али је од комерцијалног значаја само око три стотине. Етарска уља или њихови састојци користе се у парфемима, шминци, хигијенским производима, козметици, стоматологији, пољопривреди, конзервансима и адитивима и у народној медицини.^[98]

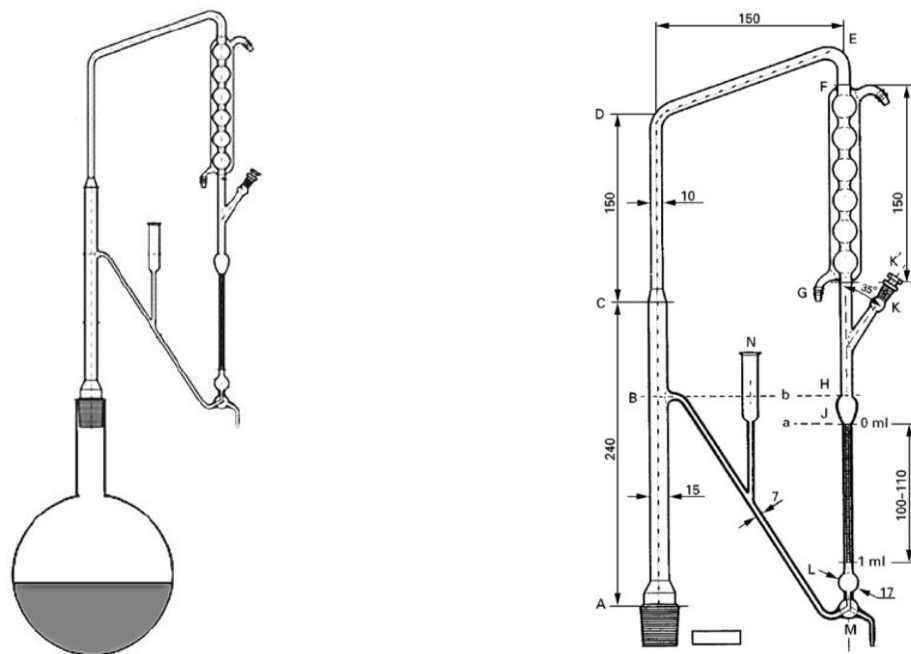
У природи, антибактеријска, антивирусна, антифунгална и инсектицидна својства етарских уља биљкама служе као механизам одбране, али својим мирисом могу привући опрашујуће инсекте, али и одвратити непожељне. Могу се синтетисати у свим органима и деловима биљке, укључујући пупољке, цветове, листове, стабљике, гране, семена, плодове, коренове, дрво, кору дрвета, а складиште се у секреторним ћелијама, дупљама, каналима, ћелијама епидермиса и трихомима.^[98] Етарска уља чине врло мали део масе свеже биљне дроге, обично око 1% или мање.^[99] На принос и састав етарских уља могу утицати многи фактори, укључујући климатске факторе, доступност нутритијената и стрес.^[99] Неке породице биљака су познате по количини етарског уља које стварају јединке њихових врста, као што су *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Cupressaceae*, *Hypericaceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Fabaceae*, *Liliaceae*, *Myrtaceae*, *Pinaceae*, *Piperaceae*, *Rosaceae*, *Rutaceae*, *Santalaceae*, *Zingiberaceae* и *Zugophyllaceae*.^[99] Биљке које садрже етарска уља некада се називају ароматичним биљкама.^[102] Иако се сматра да неке биљне врсте не поседују етарска уља, ово је вероватно нетачно и последица одсуства адекватних истраживања.^[103] Маховине, јетрењаче, макроалге и сунђери такође садрже етарска уља. Изузев виших биљака, познато је да испарљива једињења синтетишу и неки микроорганизми, инсекти, као и друге копнене и водене животиње.^[104]

Највећи број етарских уља се на индустријској скали добија користећи дестилацију воденом паром, где се пара генерисана у котловима (бојлерима) проводи кроз биљни материјал у дестилатору, а добијена смеша водене паре и етарског уља хлади се проласком кроз кондензатор и скупља у фирентинској боци (сепаратору, слика 2.2.1.1).^[105] Принцип дестилације воденом паром омогућава дестилацију и једињења која кључају на значајно вишој температури од тачке кључања воде, па чак и до 250–350 °C.^[105]

Етарска уља се на лабораторијској скали много чешће изолују хидродестилацијом употребом апаратуре по Клевенцеру (слика 2.2.1.2).^[106] Овај поступак користи се и за одређивање садржаја уља у некој биљној дроги.^[102] Биљни материјал се поставља у балон и прелива водом, а на балон се поставља Клевенцеров наставак за дестилацију, који обезбеђује да се паре воде и уља хладе, а кондензат се накупља у цеви која је најчешће градуисана. Етарска уља лакша од воде овде се издвајају, а вишак воде враћа се повратном цеви у балон; ова апаратура је стога погодна једино за изоловање уља лакших од воде, што је срећом већина етарских уља.^[105] Биљна дрога није изложена температурама од преко 100 °C, што спречава да се она прегреје.^[107]

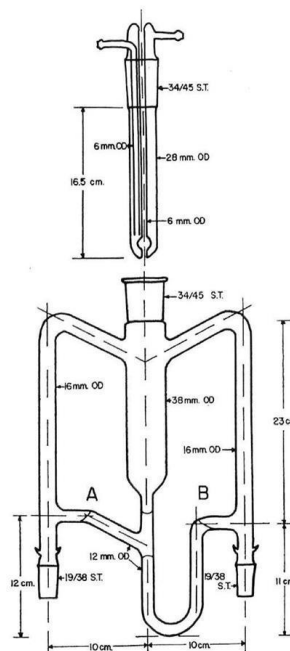


Слика 2.2.1.1. Погон за дестилацију етарских уља воденом паром на Одељењу за повртарске и алтернативне биљне врсте Института за ратарство и повртарство (Бачки Петровац).



Слика 2.2.1.2. Схематски приказ лабораторијске апаратуре за хидродестилацију (лево) и нацрт наставка за дестилацију по Клевенцеру по Европској фармакопеји.^[108]

Некада се употребљава и апаратура по Лајкенсу и Никерсоновој (енгл. Likens-Nickerson apparatus), где се симултано врши дестилација и екстракција неполарним растварачем (слика 2.2.1.3).^[109] Бики и Жулен наводе да се производи добијени у оваквим апаратурама не могу сматрати етарским уљима, већ екстрактом дестилационе воде,^[97] али ова разлика и даље није заживела у литератури.^[110–112] С друге стране, ако се етарско уље одвоји декантовањем, а минимална количина растварача искористи да се заостало уље спере са зидова апаратуре, а растварач накнадно уклони, добијени производ се, по овим ауторима, може сматрати етарским уљем.^[97]

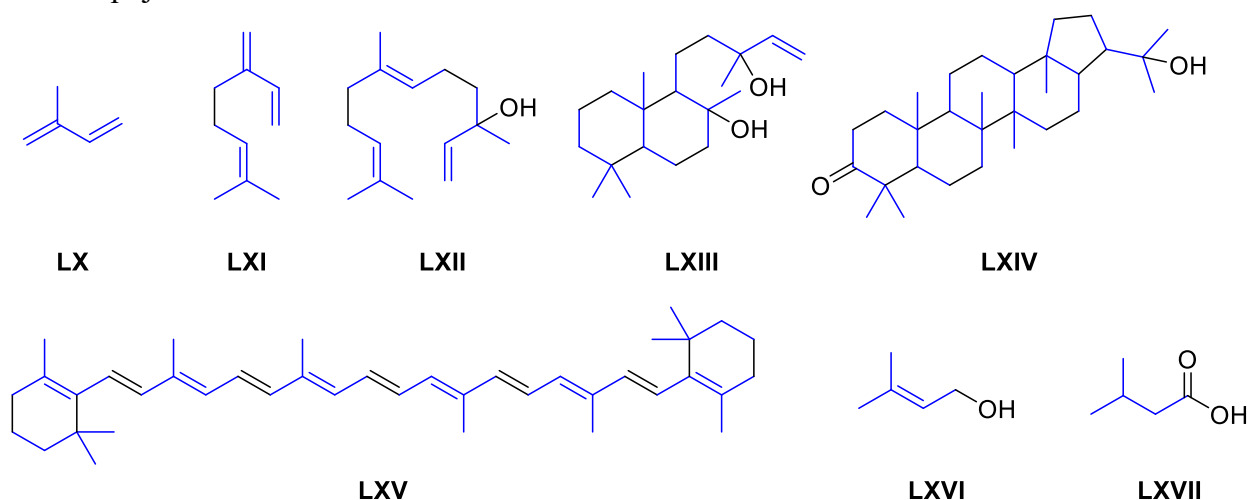


Слика 2.2.1.3. Фотографија апаратуре за симултану дестилацију и екстракцију (лево) и нацрт наставка по Лајкенсу и Никерсоновој.^[109]

Етарска уља садрже највише угљоводоника и кисеоничних органских једињења, али се понекад јављају и једињења која садрже сумпор или азот. То могу бити алкохоли, карбоксилне киселине, естри, епоксиди, алдехиди, кетони, амини, тиестри итд. Најчешће су доминантни састојци етарских уља терпеноиди, као и фенилпропаноиди, алкани, масне киселине и њихови естри или производи деградације.^[104] Понекад су ова испарљива једињења везана у облику гликозида, из којих се ослобађају ензимским реакцијама које се одигравају приликом сушења биљног материјала.^[104]

Терпеноиди (изопреноиди) су једна од највећих класа природних производа, а формално настају везивањем две или више изопренске јединице (**LX**, слика 2.2.1.4) по принципу „глава за реп”.^[99] Познато је преко тридесет хиљада различитих терпеноида.^[104] У оквиру терпеноида разликујемо монотерпене, који су изграђени од две изопренске јединице, затим сесквитерпене, који су изграђени од три, дитерпене, који су изграђени од четири, тритерпене, који су изграђени од шест, док су тетратерпени изграђени од осам изопренских јединица. У етарским уљима најзаступљенији су монотерпени и

сесквитерпени, а тетратерпени се због своје врло ниске испарљивости не јављају у етарским уљима.^[98,99,104] Структурне формуле представника сваке класе терпеноида дате су на слици 2.2.1.4, где су истакнуте и изопренске јединице које их сачињавају. У етарским уљима се могу јавити и деривати самог изопрена (тзв. хемитерпени), као што су пренол и изовалеријанска киселина.^[98,99]



Слика 2.2.1.4. Структурне формуле изопрена (**LX**) и представника различитих класа терпеноида (**LXI–LXVII**): β-мирцен (**LXI**, монотерпен), (*E*)-неролидол (**LXII**, сесквитерпен), склареол (**LXIII**, дитерпен), хидроксихопанон (**LXIV**, тритерпен), β-каротен (**LXV**, тетратерпен), пренол (**LXVI**, хемитерпен), изовалеријанска киселина (**LXVII**, хемитерпен); стереохемија није приказана ради јасноће.

Биогенетски прекурсори терпеноида су изопентенил-пирофосфат (IPP) и диметилаллил-пирофосфат (DMAPP), а ови молекули настају из по три ацил-остатка ацетил-коензима А у мевалонатном или метил-еритритол-фосфатном биосинтетском путу. Реакцијом IPP и DMAPP добија се геранил-пирофосфат (GPP), из којег даље, формално преко интермедијерних геранил- (линалил-) и α-терпинил карбокатјона, настају монотерпени (схема 2.2.1.1).^[104,113] Разликујемо ацикличне, моноцикличне, бицикличне, трицикличне и неправилне монотерпене. Ациклични попут мирцена, β-оцимена, гераниола и линалоола настају из геранил-катјона. Најзаступљенија подгрупа монотерпена су они који поседују *пара*-ментански скелет (*транс*-1-метил-4-изопропилциклохексан), а они настају различитим премештањима терпинил-карбокатјона. У њих убрајамо, на пример, лимонен, терпинолен, α-терпинеол, терпинене и β-феландрен. У етарским уљима се често срећу и пинански монотерпени, попут α- и β-пинена, који поседују бицикло[3.1.1]хептански систем. Циклизацијом α-терпинил-катјона се добијају и борнански (борнеоли), камфански (камфен) и фенхански (фенхоли) монотерпени, који поседују бицикло[2.2.1]хептански систем, као и тујански, који поседују циклопропанов кондензовани прстен (бицикло[3.1.0]хексански скелет). Представници тујанских монотерпена су α-тујен, сабинен и сабинен-хидрати. Карански монотерпени попут 3-карена садрже бицикло[4.1.0]хептански скелет. Постоје и бициклични монотерпенски етри, попут 1,8-синеола, познатији као еукалиптол. Јавља се и значајан број монотерпена у којима се не остварује везивање изопренских јединица по

принципу „глава за реп”, а такви су молекули који садрже хризантеманске, артемизанске и сантоланске скелете итд.^[99,104,113]

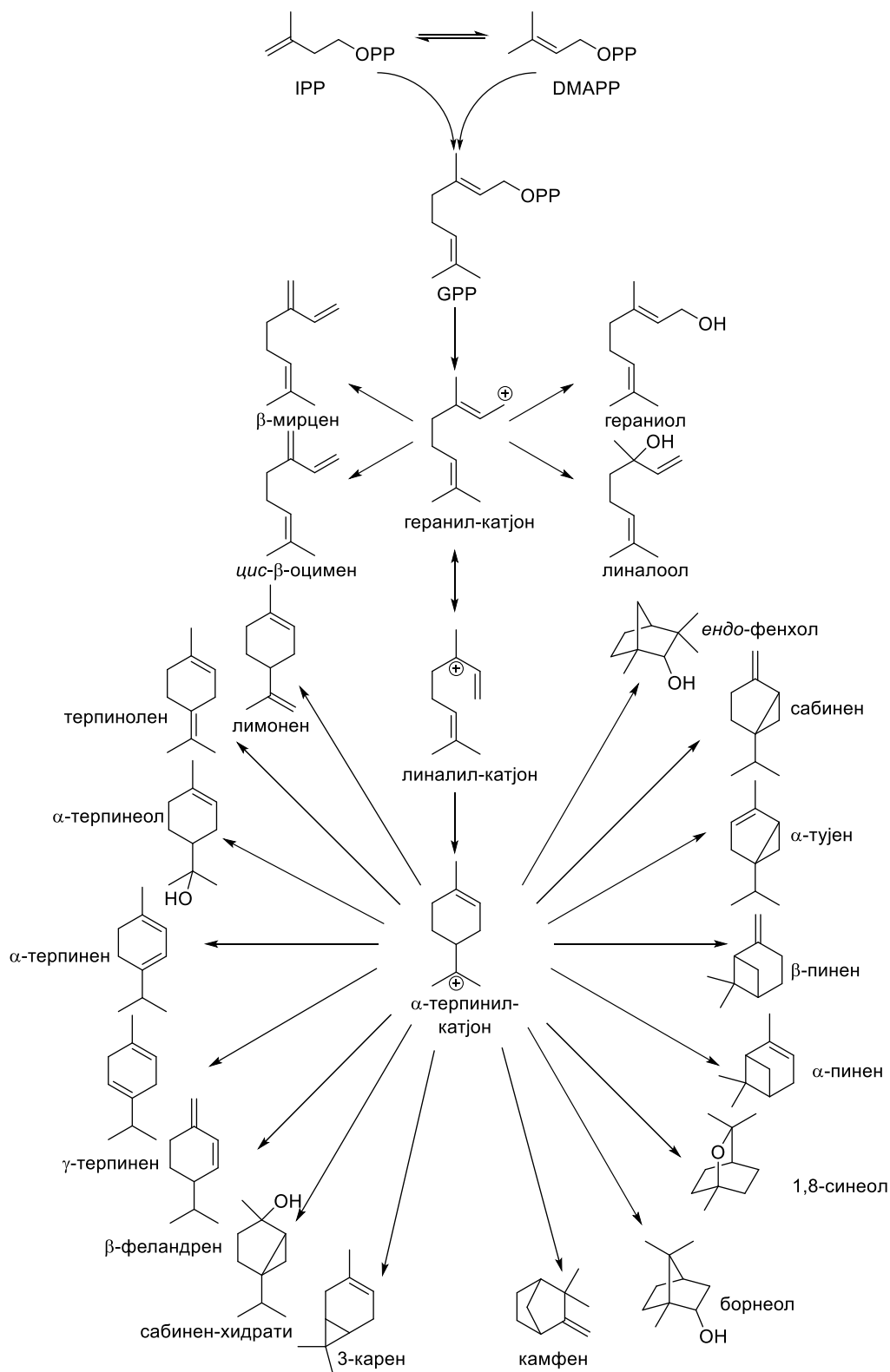
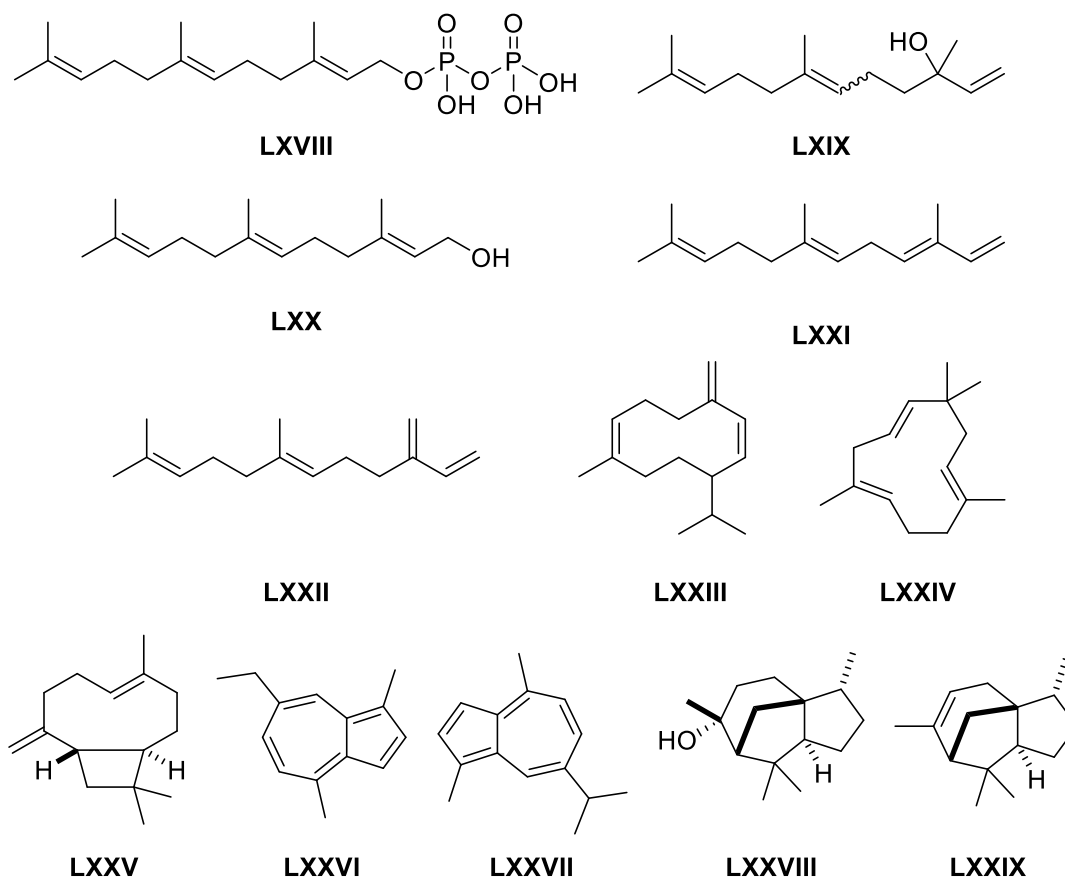


Схема 2.2.1.1. Преглед биосинтетских путева монотерпена.^[114]

Сесквитерпени настају укључивањем још једне изопренске јединице у структуру монотерпена. У реакцији GPP и IPP настаје фарнезил-пирофосфат (FPP, **LXVIII**, слика 2.2.1.5), чији молекул има петнаест угљеникових атома, и који је биосинтетски прекурсор свих сесквитерпена.^[113] Различити сесквитерпенски скелети настају циклизацијама и/или премештањима, а познато је чак 147 различитих структурних типова сесквитерпена.^[104] Ациклични сесквитерпени неролидол (**LXIX**) и фарнезоли (**LXX**), као и α - и β -структурни изомери фарнезена (**LXXI** и **LXXII**) широко су распрострањени у етарским уљима. Циклични сесквитерпени могу бити моноциклични, бициклични и трициклични. Примери моноцикличних сесквитерпена су гермакрен Д (**LXXIII**) и α -кариофилен (хумулен, **LXXIV**). Бициклични сесквитерпен β -кариофилен (**LXXV**) прилично је чест састојак етарских уља. Азулени су бициклични сесквитерпени који појединим уљима дају плаву боју, а садрже ароматични систем сачињен од два кондензована прстена, једног седмочланог, а једног петочланог. Најпознатији азулени су хамазулен (**LXXVI**), који се среће у етарском уљу камилице (*Matricaria chamomilla* L.), и гвајазулен (**LXXVII**), који се среће у етарском уљу мирисне мушкатле (*Pelargonium graveolens* L'Hér.). Пример трицикличних сесквитерпена су α -кедрен (**LXXVIII**) и кедрол (**LXXIX**), који се јављају у многим етарским уљима, укључујући уље кедровине.^[104,115]

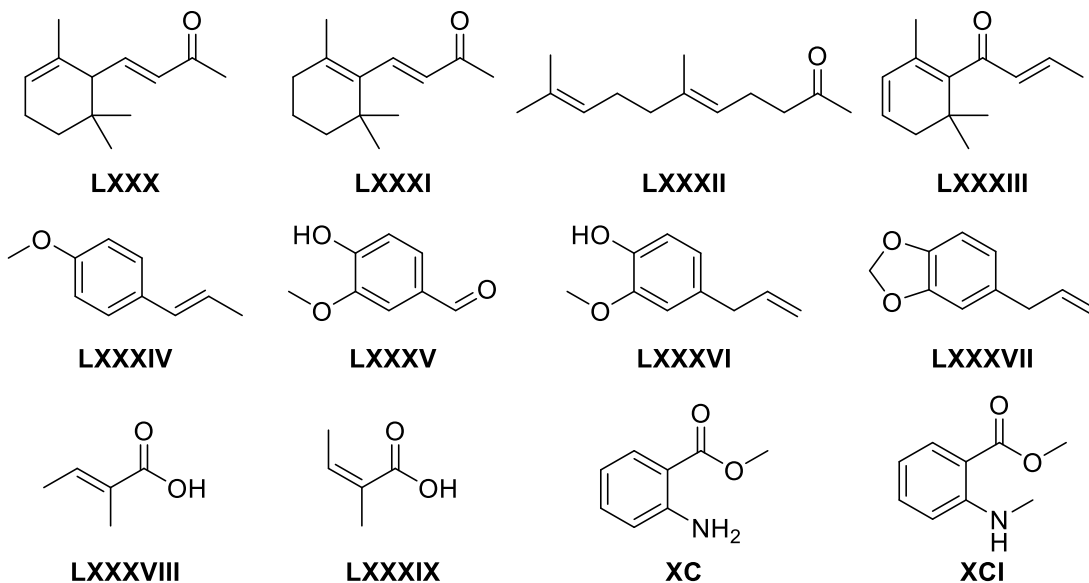


Слика 2.2.1.5. Структуре одабраних сесквитерпена (**LXIX–LXXIX**) и њиховог биосинтетског прекурсора фарнезил-пирофосфата (**LXVIII**).

Значајна група терпеноида су и C_{13} -норизопреноиди, који се сматрају производима деградације каротеноидних тетратерпена или апсцисинске киселине. Најпознатији примери ових једињења су α -јонон (**LXXX**, слика 2.2.1.6) и β -јонон (**LXXXI**), али им припадају и геранилацетон (**LXXXII**), и псеудојонони попут β -дамасценона (**LXXXIII**), као и едулани и сродна једињења.^[104]

Фенилпропаноиди (ArC_3) настају шикиматним биосинтетским путем из *L*-фенилаланина, из којег се помоћу ензима фенилаланин-амонијак-лијаза (PAL) испрва добија циметна киселина.^[104] Ензимском редукцијом бочног низа циметне киселине настаје низ деривата као што су *транс*-анетол (**LXXXIV**, слика 2.2.1.6), ванилин (**LXXXV**), еугенол (**LXXXVI**) и сафрол (**LXXXVII**).^[113] Прости фенилпропаноиди су често састојци етарских уља, али се у биљном материјалу обично налазе у виду гликозида, те је њихов садржај условљен техником изоловања. Познато је само око 50 фенилпропаноида који се јављају у етарским уљима.^[99]

Естри бензеноидних и монотерпенских киселина или алкохола, као и незасићених киселина попут тиглинске (**LXXXVIII**, слика 2.2.1.6) и ангелинске (**LXXXIX**) такође се проналазе у етарским уљима.^[104] Азотна једињења су значајно ређа у етарским уљима. Најпознатија испарљива једињења која садрже азот, а налазе се у етарским уљима су метилантранилат (**XC**) и метил-*N*-метилантранилат (**XCI**), који се јављају у мандарини, горкој поморанци и врстама рода *Ruta*.^[99] Пиридини и пиразини пронађени су у етарским уљима црног бибера, наранџе и ветивера. Сумпорна једињења нарочито су заступљена у белом луку, црном луку и празилуку, и одговорна су за њихове карактеристичне ароме. Неке од функционалних група које садрже сумпор, а које се јављају у састојцима етарских уља су тиоетарска, дисулфидна, тиолна, тијазолна и изотиоцијанатна.^[104]



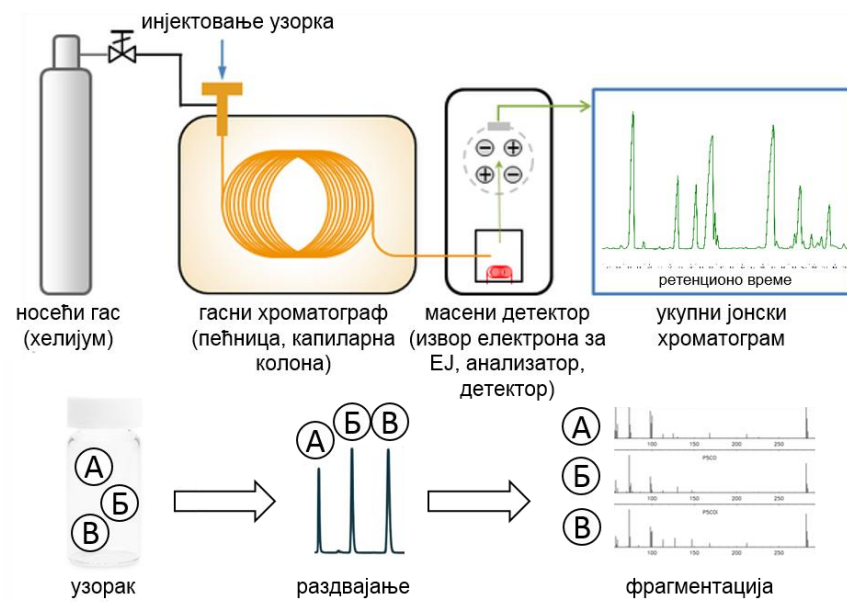
Слика 2.2.1.6. Структуре одабраних C_{13} -норизопреноида (**LXXX–LXXXIII**), фенилпропаноида (**LXXXIV–LXXXVII**) и осталих једињења која се јављају у етарским уљима (**LXXXVIII–XCI**).

Као састојци етарских уља, нарочито оних врста које су сиромашне уљем, могу се пронаћи виши алкани, као и дуголанчана једињења која садрже једну функционалну групу

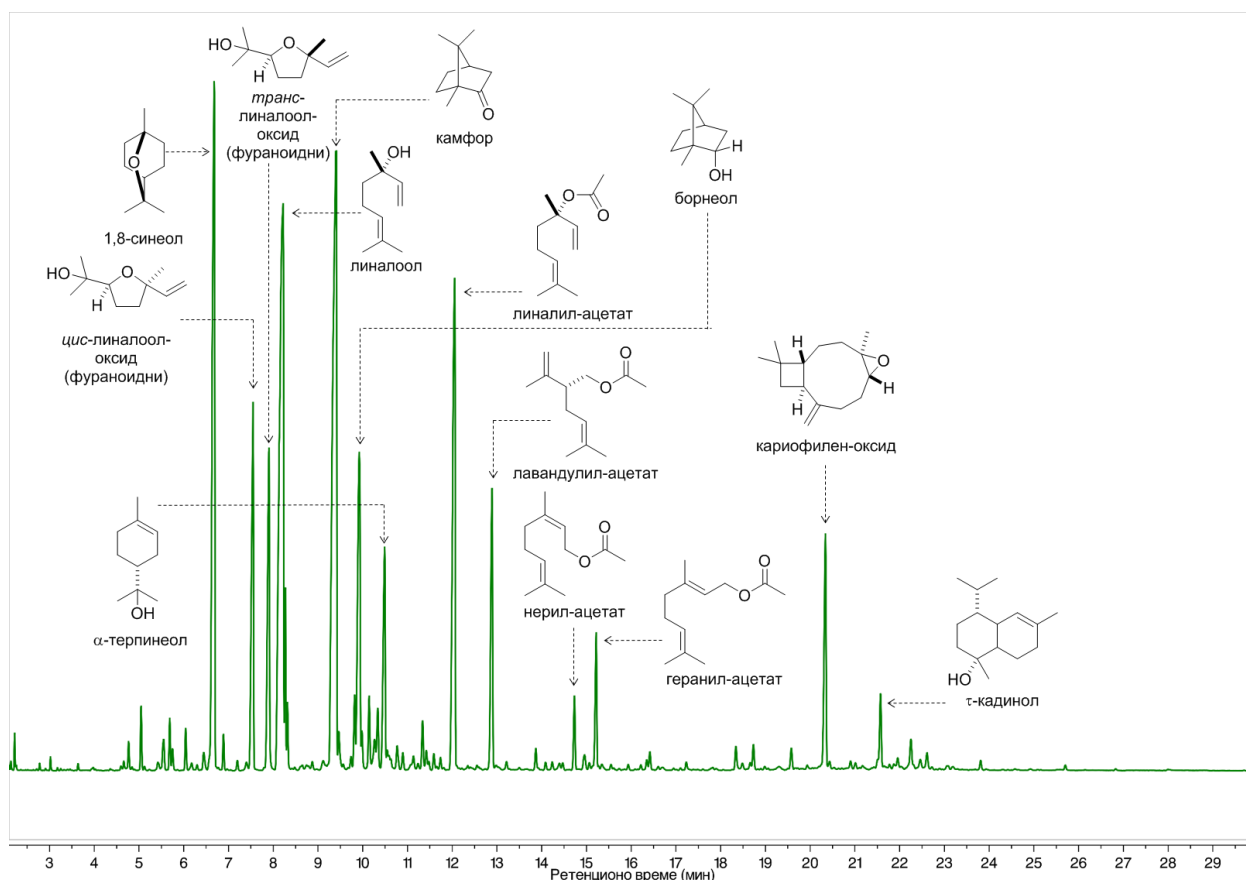
на крају или близу краја ланца (1-алканоли, 2-алканоли, 2-алканони, алдехиди, естри), често у серијама једињења, од 20 до скоро 40 угљеникових атома.^[116] Док су нека од ових једињења свеприсутна у биљним восковима (нпр. алкани), поједине врсте имају специфичан хемијски састав воскова.^[117] Ова једињења сачињавају епикутикуларне воскове, а могу се засебно изоловати испирањем биљног материјала неполарним растварачима попут хлороформа или диетил-етра.^[118] Многа од њих настају метаболичким трансформацијама и деградацијама масних киселина и сродних метаболита.^[104]

Уопште узев, етарска уља може сачињавати велики број разнородних једињења. Резултати истраживања најчешће наводе 100 до 250 различитих састојака, али у неким уљима је откривено и око 450 до 500. Врло често се накнадним истраживањима проналазе нови састојци већ познатих уља.^[119] Потребна за хемијском анализом етарских уља указује се из различитих разлога, од контроле квалитета до фундаменталних истраживања.^[120] Етарска уља за ширу индустријску употребу обично се анализирају стандардним процедурама, док мање позната уља могу да се испитују врло детаљно, користећи различите технике за инструменталну органску анализу.^[113] Развој гасне хроматографије (енгл. gas chromatography, GC, ГЦ) и гасне хроматографије спрегнуте са масеном спектрометријом (енгл. gas chromatography–mass spectrometry, GC-MS, ГЦ-МС) осамдесетих година прошлог века представља прекретницу у анализи етарских уља. Данас је то научна дисциплина која је незамислива без ове и сличних техника са цртицом и рачунарски аутоматизованих процедура.^[121] Како је течна хроматографија спрегнута са масеном спектрометријом (енгл. liquid chromatography–mass spectrometry, LC-MS, ЛЦ-МС) повезана са потешкоћама капацитета колоне, репродуктивности и ограничене фрагментације, ГЦ-МС је и даље основна аналитичка техника за анализу комплексних смеша испарљивих једињења као што су то етарска уља.^[122]

Схематски приказ анализе етарских уља помоћу ГЦ-МС технике дат је на слици 2.2.1.7. Узорак уља растворен у лако испарљивом растварачу (најчешће диетил-етру) инјектује се на колону пошто се преведе у гасовиту фазу. За хроматографију обично се користи хелијум као носећи гас (мобилна фаза) и неполарне капиларне колоне, на којима се једињења раздвајају према тачкама кључања. Могу се користити и поларне капиларне колоне, на којима се једињења раздвајају према поларности. Како би се постигло оптимално раздвајање, колоне се загрева одабраном брзином, према дефинисаном температурном програму. На одређене временске инкременте, елуат са колоне анализира се масеним детектором. Резултат овакве анализе је низ масених скенова који се могу представити као укупни јонски хроматограм (total ion chromatogram, ТИС), где интензитет сигнала на одређеном ретенционом времену (retention time, RT) одговара збиру интензитета свих пикова у масеном скену (слика 2.2.1.8).^[123]



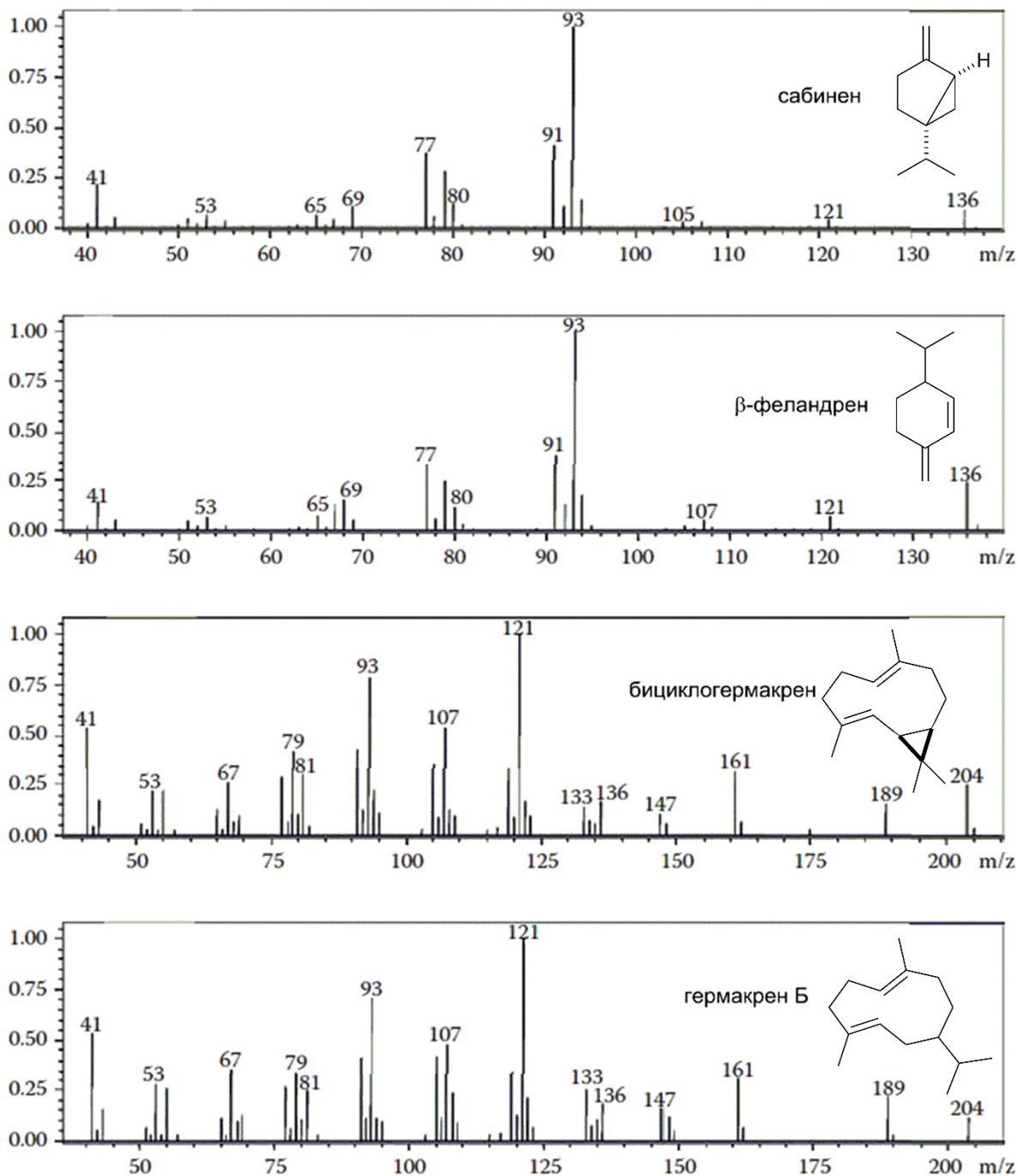
Слика 2.2.1.7. Схематски приказ ГЦ-МС анализе



Слика 2.2.1.8. Укупни јонски хроматограм етарског уља лаванде (*Lavandula angustifolia* Mill.).

Иницијална идентификација састојака етарских уља врши се на основу поређења масених спектра и ретенционих времена са литературним вредностима.^[120] Најчешће се

користе масени детектори са електронском јонизацијом (енгл. electron impact ionization, EI); у том случају долази до екстензивне фрагментације, а m/z вредности и интензитети фрагментних јона врло су корисни за одређивање структуре. Постоје комерцијално



Слика 2.2.1.9. Масени спектри (EI) одабраних монотерпена и сесквитерпена.^[123]

доступне библиотеке масених спектра помоћу којих се може вршити аутоматизована идентификација састојака одговарајућим софтвером. У многим случајевима се на овај

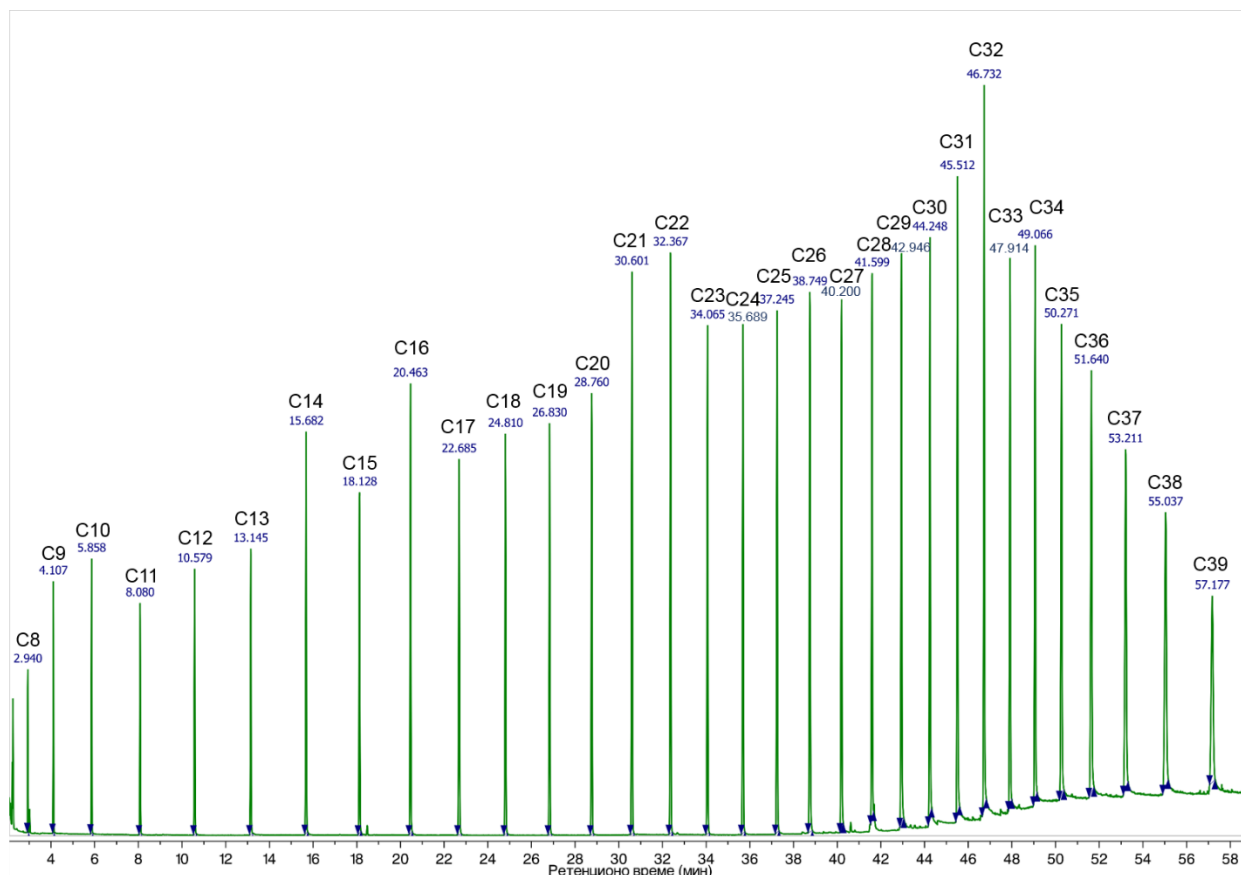
начин може поуздано идентификовати састојак етарског уља, али не и у свим. Етарска уља садрже углавном терпене сродних структура, чији се масени спектри некад не разликују довољно (нпр. сабинен и β -феландрен, бициклогермакрен и гермакрен Б, в. слику 2.2.1.9).^[123]

Идентификације претходно познатих једињења могу се рутински извршити поређењем ретенционих индекса и масених спектра са оним који су прибављени помоћу узорака стандарда.^[123] Врло користан податак за квалитативну анализу етарских уља је ретенциони индекс (retention index, RI, РИ). Израчунава се из ретенционог времена, али за разлику од њега, представља својствену вредност једињења. Оно зависи од врсте употребљене колоне, али не и од осталих услова при којим се анализа врши, те се добијена вредност за одређено једињење може поредити са литературним вредностима које су често такође дате у комерцијалним библиотекама масених спектра. Ретенциони индекс неког једињења је релативна вредност и представља однос његовог ретенционог времена и ретенционих времена одговарајућих *n*-алкана или неке друге референтне серије једињења. Два најпознатија начина одређивања ретенционих индекса дали су Ковач (Kováts) 1958. године^[124] и Ван Ден Дол и Крац (van Den Dool, Kratz) 1963. године,^[125] при чему Ковачеви ретенциони индекси (енгл. Kováts index, KI) користе логаритамску скалу и примењују се приликом изотермалних услова хроматографског раздвајања, а Ван Ден Долови користе линеарну скалу (енгл. linear retention index, LRI) и примењују се у случајевима када се користи температурно програмирање (температурна рампа).^[123]

Најпознатији и најчешће коришћени хомологи низ за одређивање ретенционих индекса је низ *n*-алкана, али се такође могу користити и низови, 2-алканона, алкил-етара, алкил-халогенида, алкил-ацетата или метил-естара алканских киселина.^[123] За одређивање ретенционог времена на некој капиларној колони неопходно је прво прибавити хроматограм референтне смеше *n*-алкана (слика 2.2.1.10), с којег се читавају ретенциона времена, а идеално је извршити коинјекцију смеше алкана са узорком. Ван ден Долов ретенциони индекс једињења које се на времену t_x елуира после алкана са *n* угљеникових атома (ретенционог времена t_n), а пре алкана са *n*+1 угљеникових атома (ретенционог времена t_{n+1}) добија се као:

$$RI = 100n + 100 \frac{t_x - t_n}{t_{n+1} - t_n}. \quad [120]$$

Када се користе *n*-алкани, прихваћено је да је репродуцибилна вредност ретенционих индекса добијена у различитим лабораторијама уколико разлика две вредности није већа од 5 јединица за колоне са неполарном стационарном фазом, односно 10 јединица за колоне са поларном стационарном фазом.^[126] Помоћу поузданих база ретенционих индекса могуће је разликовати различите структурне изомере, па чак и дијастереоизомере.^[120]



Слика 2.2.1.10. Укупни јонски хроматограм комерцијалне смеше *n*-алкана.

Велика подударност масеног спектра и вредности ретенционог индекса са литературним подацима за неко једињење најчешће је довољна да се изврши његова поуздана идентификација у етарском уљу. Дефинитивна потврда идентитета неког једињења може се добити коинјекцијом, односно анализирањем узорка уља у који је додат узорак чистог једињења. У том случају, у хроматограму се примећује повећавање површине пика који одговара непознатом једињењу.^[122] Иако продужава време анализе и упркос чињеници да је неке састојке етарских уља тешко набавити или припремити у чистом облику, коинјекциони експерименти су нарочито важни код идентификације претходно неидентификованих састојака етарских уља.

Квантификација идентификованих састојака у етарском уљу лако се врши помоћу вредности интеграла одговарајућих пикова. Често се за прецизнију квантификацију прибегава анализи узорка уља гасном хроматографијом са пламено-јонизационим детектором (ГЦ-ФИД).^[127]

Када су доступни поуздани аналитички подаци, ГЦ-МС постаје врло брза, ефикасна и економична аналитичка метода којом се могу идентификовати на хиљаде једињења без потребе поседовања стандарда за сваки аналит.^[128] Поузданост сваке идентификације може се унапредити мерењем и упоређивањем ретенционих индекса на две или више колона различите поларности.^[122] Међутим, коинјекција аутентичног узорка аналита са етарским

уљем приликом анализе свакако нуди дефинитивни доказ идентификације и препоручује се када год је истраживач у стању да изврши овај оглед.^[129]

Хемијска карактеризација етарских уља је од великог значаја за науку јер резултати који се добијају могу допринети хемотаксономији, помоћи разумевању механизма биосинтетских путева и евентуалних одбрамбених механизма и разјаснити утицаје еколошких фактора, али је и од великог комерцијалног значаја.^[130] Погрешне идентификације приликом анализе етарских уља могу се на први мах учинити не претерано важним, али заправо могу имати далекосежне последице, јер идентификација одређених једињења у биљним сировинама може довести до тога да се она у комерцијалним производима могу обележити као природна или као идентична природним.^[131] С овим на уму је организација под именом International Organization of the Flavour Industry (IOFI) издала изјаве којим захтева строжије услове када се неко једињење први пут наводи као састојак природне сировине.^[132,133] Важност пажљиве и савесне идентификације није релевантна само за индустрију арома и мириса, на шта указује пример погрешне ГЦ-МС идентификације диметилалиламина, синтетског симпатомиметичког стимуланса, у етарском уљу мирисне мушкатле (*Pelargonium graveolens* L'Her.).^[134] Ова идентификација олакшала је увођење овог једињења у дијететске суплементе под називом „geranium oil” (уље мушкатле) или „geranium extract” (екстракт геранијума).^[135] Неколико смртних случајева је доведено у везу с употребом оваквих суплемената.^[136]

Нажалост се непрестано као састојци етарских уља и других биљних екстраката наводе егзогене нечистоће (нпр. пластификатори, стабилизатори растварања, синтетски антиоксиданси), најчешће као последица употребе растварача и/или контакта биљног материјала са пластиком.^[137] Овакав поступак последица је недостатка критичког става према резултатима инструменталних техника, као и недостатка знања о природним производима.^[138] Јављају се и друге погрешне интерпретације ГЦ и ГЦ-МС података, као што су непоуздане идентификације једињења која не дају довољно карактеристичне масене спектре (нпр. сесквитерпени).^[122,138] Како се овакве грешке не би дешавале неопходно је користити и спектроскопске технике (ИР и НМР), као и користити библиотеке података које су састављене из физикохемијских података измерених коришћењем аутентичних узорака, добијених било изоловањем, било синтезом.^[122,138]

2.2.2. Црна зова (*Sambucus nigra* L.)

Црна зова, или најчешће само зова, *Sambucus nigra* L. (Viburnaceae), листопадни је жбун или дрво широко распрострањено у Европи (слика 2.2.2.1).^[139] Распрострањена је и у нашој држави, а највише расте по влажним и запуштеним местима, по насељима и око њих, по ободу шума и шумским просецима.^[140] Има мноштво алтернативних народних имена, као што су: абзов, бажовина, базга, базговина, баздов, базовика, безговина, белика, б'зга, б'з, бзовка, боз, будзова, бузовка, заовљика, зовик, зовљика, зофа, зоха, обзовка, овзовина, питоми боз, црна зовика, црни базаг, црни безег.^[140]

Придевом „црна” се наглашава разлика између ове и друге две врсте рода *Sambucus* које успевају код нас, а то су апта, *Sambucus ebulus* L., и црвена зова, *Sambucus racemosa* L. Апта је трајна зељаста биљка која се још среће под називима аптовина (абдовина), автика, автуга, бурјан, кокошије грожђе и курјачки реп, а која је такође широко распрострањена, најчешће у рудералним стаништима. С друге стране, црвена зова је знатно ређа и ретко се јавља у Србији, најчешће не испод 800 m надморске висине, а назива се још и планинском зовом, дивљом зовом, грозном зовом и пиштаљником.^[140,141]

Црна зова се сматра врстом са највише забележених примена међу бобичастим воћем. У српској народној медицини се од поменуте три врсте црна зова највише користи за справљање народних лекова и то највише њен цвет и плод у лечењу уринарног тракта и система органа за дисање.^[140] И у другим народним медицинама наилази се на широку употребу цветова, плодова, листова, коренова, коре и сржи ове биљке.^[142] Етнофармаколошка примена зове датира још од времена Теофраста и Плинија Старијег, који су оставили писане трагове о њеној употреби.^[140,142]



Слика 2.2.2.1. Жбун *S. nigra* у цвету.

Тренутно се сматра да су зовине бобице (плод) врло богате разним састојцима важним за људску исхрану,^[143] док се цветови обично прерађују у пића којима дају карактеристично пријатну арому,^[144] али се такође користе и у козметици и у индустрији парфема.^[145] Некада су се производи од зове производили само у домаћинствима, али је популарност ових производа довела до узгајања зове на већим површинама.^[146] Најраспрострањенији култивар у Европи је Хашберг (Haschberg),^[147,148] који су селекционисали Штраус (Strauß) и Новак (Novak) користећи јединке које су расле у дивљини у приобалном појасу Дунава близу Клостернојбурга у Аустрији.^[149] У југоисточној Европи се велике количине цветова зове и даље сакупљају из дивљине и

најчешће се извозе, али се и конзумирају као чај или прерађују у фитофармацеутике.^[150] Ово такође важи и за Србију, где се зова узгаја на површини мањој од 100 ha,^[151] најчешће на северу Војводине као култивар Хашберг. Иако су постојали напори да се из домаћих генотипова развију култивари,^[152,153] њих и даље узгајају само воћари-аматери.^[151]

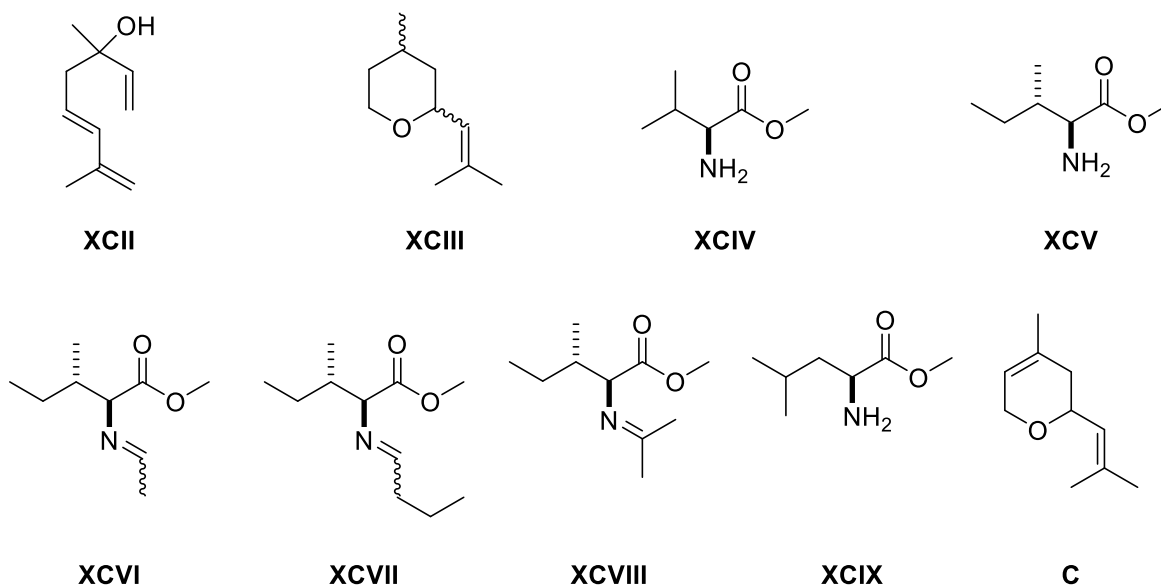
2.2.3. Испарљива једињења из цвета црне зове

Мада је у већем делу Европе позната по ароматичном соку који се справља од њених цветова, не може се сматрати да тренутна сазнања о профилу испарљивих једињења из цвета црне зове пружају довољно података за разумевање комплексности његовог мириса. Хемијски састав цвета и плода зове, укључујући неиспарљива^[154,155] и испарљива једињења,^[144,156–170] био је предмет бројних истраживања протеклих деценија. Установљено је да, иако мирисни, цветови ове врсте дају зачуђујуће мало етарског уља (приближно 0,05%, *m/m*, срачунато на масу сувог биљног материјала).^[163]

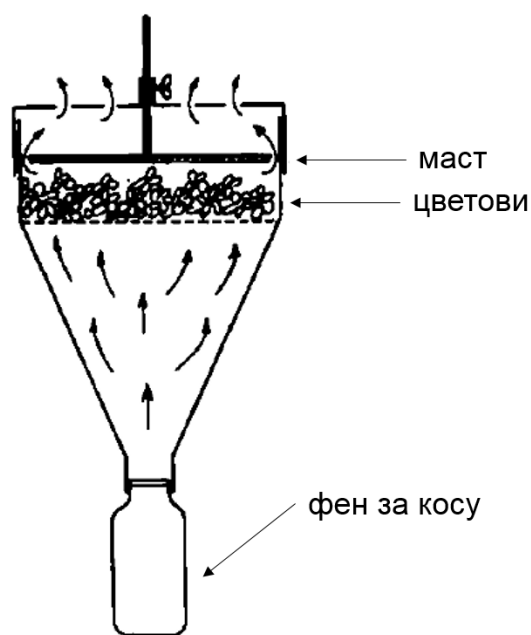
Скоро 200 различитих испарљивих једињења пронађено је у етарском уљу цветова, екстрактима цветова добијеним применом неполарних растварача и воде, као и гасовитој фази изнад цветова (тзв. headspace). Међутим, након прве детаљне студије коју су извели Тулемонд (Toulemond) и Ришар (Richard),^[163] сви накнадни покушаји анализе испарљивих једињења зове ослањали су се искључиво на ГЦ-МС технику. Највећи број испарљивих једињења идентификовали су Бајерова (Bajerová) и сарадници,^[157] али су бројна једињења која наводе очигледне нечистоће у узорку (2,6-ди(*мери*-бутил)-4-(1-оксопропил)фенол, *N,N*-диметилдодециламин итд.). Радови Агалара (Ağalar),^[170] Шимањског (Szumański)^[160] и Вујановићеве^[161] такође садрже сличне мањкавости.

Користећи гасну хроматографију, масену спектрометрију и инфрацрвену спектроскопију, Тулемонд и Ришар су као главне састојке етарског уља зове пронашли хотриенол (*транс*-3,7-диметилокта-1,3,7-триен-3-ол, **XCII**, слика 2.2.3.1), палмитинску киселину, линалоол, (*Z*)-хекс-3-ен-1-ол и *цис*- и *транс*-ружа-оксиде (**XCIII**). Ови аутори описали су арому етарског уља као мускатну, и приписали је хотриенолу.^[163]

Жулен је међу испарљивим једињењима цвета зове први идентификовао деривате аминокиселина, и то користећи технику коју је сам развио.^[165] У овом поступку, око 100 g свеже убраних цветова постави се на мрежу уређаја од нерђајућег челика, а затим се феном за косу који издувава хладан ваздух цветови продувавају (слика 2.2.3.2). Покренута испарљива једињења се хватају на слоју пречишћене масти која се налази изнад, из које се после одговарајуће обраде могу изоловати. У потрази за непријатним нотама мириса зовиног цвета, Жулен је на овај начин међу испарљивим једињењима идентификовао метил-естре валина (**XCIV**, слика 2.2.3.1) и изолеуцина (**XCv**), као и имиња метил-изолеуцината са ацеталдехидом (**XCVI**), бутаналом (**XCvII**) и ацетоном (**XCvIII**), додуше само у траговима. Касније је присуство метил-естара валина, леуцина (**XCIX**) и изолеуцина у цветовима зове потврђено и техником HSPME (енгл. headspace–solid-phase microextraction).^[157]



Слика 2.2.3.1. Структуре испарљивих једињења из цветова *S. nigra* **XCII–C**.



Слика 2.2.3.2. Уређај за изоловање испарљивих једињења из цветова по Жулену.^[165]

Бавећи се истраживањем о ароматичним једињењима у пићима на бази цвета зове, Какова (Кааск) група је у водено-шећерном екстракту цветова зове идентификовала 59 једињења.^[166] Анализом помоћу гасне хроматографије спрегнуте са олфактометријом (ГЦ-О), ови истраживачи су карактеристичне пријатне ноте овог пића приписали дијастереомерним ружа-оксидима, нонаналу, нерол-оксиду (**C**, слика 2.2.3.1) и хотриенолу.

Неки од ових радова наводе постојање одређеног броја умерено заступљених састојака које није било могуће идентификовати; у једном случају је наведено да је то због некарактеристичних масених спектра ових једињења, који не постоје у комерцијалним базама података.^[144] Да се једнозначно одреди структура ових једињења било би неопходно изоловати их, али како етарско уље зове није лако доступно у већим количинама, такав подухват представља изазов. Идентификација мирисних једињења цвета црне зове као потенцијалних доприносилаца његовој ароми важна је и са фитохемијског и са комерцијалног становишта.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. Опште методе

Коришћене су хемикалије р.а. квалитета произвођача Sigma Aldrich, Fisher Scientific, TCI, Alfa Aesar, Merck, Centrohem и Lachner без претходног пречишћавања, уколико није другачије назначено. Танкослојна хроматографија вршена је на плочицама Silica gel 60 plates дебљине слоја 0,2 mm (Merck, Дармштат, Немачка) са индикатором F₂₅₄. По развијању, визуелизација је постигнута помоћу ултраљубичасте светлости или бојеним реакцијама, прскањем плочица 50% (v/v) воденим раствором сумпорне киселине или 10% (m/m) раствором фосфомолибденске киселине, уз накнадно кратко загревање на решоу. Флеш-колонска хроматографија је извршена на силика-гелу 60 (0,040–0,063 mm, Merck), драјфлеш-колонска хроматографија на силика-гелу 60 (0,015–0,040 mm, Merck), а хроматографија на гелу Sephadex LH-20 (Merck) по бубрењу у 1:1 (v/v) смеши хлороформа и метанола. Неутрализовани силика-гел припремљен је слично по поступку Нађа и сарадника,^[171] тако што је силика-гел 60 (0,040–0,063 mm, Merck) суспендован у 0,1 M воденом раствору натријум-хидроксида и мешан у току 30 min на собној температури. Тачке топљења одређене су на апарату Büchi В-540 (Büchi Labortechnik AG, Флавил, Швајцарска) и нису кориговане. ИР спектри снимљени су на уређају Spectrum Two (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) користећи калијум-бромидне плочице на које је помоћу халогенованих растварача нанет танак филм раствора супстанце, или на уређају Thermo Nicolet NEXUS 670 FTIR припремивши калијум-бромидне таблете или директно, користећи АТР технику. УВ-Вис спектри снимљени су користећи ацетонитрил као растварач, на Т80+ UV/Vis спектрофотометру (PG Instruments, Ltd., Латерворт, Уједињено Краљевство). Масена спектрометрија високе резолуције извршена је на MALDI-TOF уређају Micromass TofSpec 2E Time-of-Flight (Waters Corporation, Милфорд, САД) или на уређају LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific Inc., Бремен, Немачка). НМР спектри језгара снимљени су користећи Bruker Avance III спектрометар (Bruker, Феланден, Швајцарска, ¹H на 400 MHz, ¹³C на 101 MHz), опремљен двојном ¹³C/¹H мерном главом од 5–11 mm која ради на собној температури или CryoProbe Prodigy мерном главом, у CDCl₃ или DMSO-*d*₆, са тетраметилсиланом као интерним стандардом, а хемијска померања изражена су у ppm (δ) у односу на тетраметилсилан. За снимање 2Д спектра (градијентни ¹H–¹H COSY, ме-NSQC, HMBC, NOESY) и вишепулских спектра (DEPT90 и DEPT135) коришћене су уобичајене пулсне секвенце. У случају присуства комплексних сигнала (преклопљених сигнала и/или сигнала вишег реда), вредности δ_H и *J* (изражене у Hz) одређене су итеративном симулацијом, при чему су ручно подешаване и оптимизоване како би се добиле вредности које одговарају експерименталним помоћу програма MestreNova (v. 11.0.3, Mestrelab Research, Шпанија). Дифракциони подаци добијени су на дифрактометру Gemini S (Oxford Diffraction, Вроцлав, Пољска) опремљеним са Мо K α извором зрачења и Sapphire CCD детектором.

3.2. Синтеза конјугата естра-1,3,5(10)-триенских стероида са фероценом

3.2.1. (Фероценилметил)триметиламонијум-јодид (1)

У интензивно мешан раствор бис(диметиламино)метана (2,88 mL, 21,2 mmol) и фосфорне киселине (2,25 g) у глацијалној сирћетној киселини (20 mL) дода се фероцен (2,16 g, 11,6 mmol). Добијена суспензија се загрева на око 100 °C на уљаном купатилу у атмосфери аргона у току 5 h. Након истека реакционог времена и хлађења смеше до собне температуре, она се разблажи водом (30 mL). Како би се уклонио неизреаговани фероцен, разблажена смеша се екстрахује диетил-етром (3×16 mL). Уз хлађење у леденом купатилу се воденом слоју дода чврст натријум-хидроксид (12,25 g) уз интензивно мешање. У добијену смешу дода се вода (10 mL), а затим се она екстрахује диетил-етром (3×20 mL). Органски слој испере се водом, суши анхидрованим натријум-сулфатом и упари, после чега се добија (диметиламинометил)фероцен као тамноцрвена течност. Ова течност се раствори у метанолу (2,7 mL), а у добијени раствор се дода метил-јодид (2,7 mL, 43,4 mmol) и он се загрева уз рефлукс у току 5 min. По хлађењу до собне температуре, реакциона смеша се излије у етар (40 mL). Грбањем стакленим штапићем добијено уље амонијум-соли **1** кристалише у облику наранцастог талога који се филтрира преко Бихнеровог левка под вакуумом, а затим испере са мало хладног диетил-етра, после чега заостаје наранцаст прах **1** (3,70 g, 83%).^[172]

3.2.2. Фероценилметиловање естрона и естрадиола

Фероценилметиловање у *N,N*-диметилформамиду врши се тако што се суспензија калијум-карбоната (152 mg, 1,10 mmol), естрона или естрадиола (0,55 mmol) и једињења **1** (425 mg, 1,10 mmol) загрева на 100 °C у *N,N*-диметилформамиду (10 mL) у атмосфери аргона. По истеку реакционог времена, реакциона смеша се охлади до собне температуре, разблажи засићеним раствором натријум-хлорида, а затим интензивно екстрахује диетил-етром (5×25 mL). Спојени органски слојеви се испирају засићеним раствором натријум-хлорида (5×30 mL), суше анхидрованим натријум-сулфатом и упаре. Добијена чврста смеша се пречисти флеш-колонском хроматографијом на неутрализованом силика-гелу (елуент: бензен за реакцију на естроноу, бензен–етил-ацетат 25:1, v/v, за реакцију на естрадиолу).

Фероценилметиловање у метанолу врши се тако што се суспензија калијум-карбоната (152 mg, 1,10 mmol), естрона или естрадиола (0,55 mmol) и једињења **1** (425 mg, 1,10 mmol) загрева у метанолу (10 mL) уз рефлукс у току 20 h у атмосфери аргона. По истеку реакционог времена, реакциона смеша се концентрује на ротационом вакуум-упаривачу, охлади до собне температуре, а добијена суспензија екстрахује диетил-етром (25 mL). По филтрацији, чврсти остатак се испере малом количином диетил-етра. Етарски раствор се затим испира засићеним раствором натријум-хлорида (3×10 mL), суши анхидрованим натријум-сулфатом, а после уклањања растварача добијена чврста смеша се пречисти флеш-колонском хроматографијом на неутрализованом силика-гелу (елуент: бензен, за реакцију на естроноу, бензен–етил-ацетат 25:1, v/v, за реакцију на естрадиолу).

3.2.2.1. 3-(Фероценилметокси)естра-1,3,5(10)-триен-17 β -ол (2)

Принос: 63% у DMF, 32% у MeOH; наранџасти прах; т. т. 144 °C (разлаже се); ИР (CH₂Cl₂ филм) ν_{\max} cm⁻¹: 3401, 2923, 2868, 1607, 1498, 1249, 1053; УВ-Вис (MeCN) λ_{\max} nm (log ϵ): 236 (3,74), 278sh (3,46), 286sh (3,34), 323 (2,00), 437 (2,05) (sh, раме); ¹H НМР (400 MHz, CDCl₃, ppm): в. табелу 4.1.1.1; ¹³C НМР (101 MHz, CDCl₃, ppm): в. табелу 4.1.1.2; ХРМС (MALDI-TOF): Израчунато за C₂₉H₃₄FeO₂: 470,1908, нађено: 470,1909.

3.2.2.2. 4-(Фероценилметил)естра-1,3,5(10)-триен-3,17 β -диол (3)

Принос: 0% у DMF, 9% у MeOH; наранџасти прах; т. т. 138 °C (разлаже се); ИР (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3434, 2924, 2867, 1635, 1446, 1279, 1058; УВ-Вис (MeCN) λ_{\max} nm (log ϵ): 233 (3,84), 278sh (3,58), 286sh (3,51), 323 (2,37), 438 (2,16); ¹H НМР (400 MHz, CDCl₃, ppm): в. табелу 4.1.1.1; ¹³C НМР (101 MHz, CDCl₃, ppm): в. табелу 4.1.1.2; ХРМС (MALDI-TOF): Израчунато за C₂₉H₃₄FeO₂: 470,1908, нађено: 470,1910.

3.2.2.3. 3-(Фероценилметокси)естра-1,3,5(10)-триен-17-он (4)

Принос: 66% у DMF, 33% у MeOH; наранџасти прах; т. т. 155 °C (разлаже се); ИР (CH₂Cl₂ филм) ν_{\max} cm⁻¹: 2927, 2862, 1738, 1608, 1499, 1247, 1053; УВ-Вис (MeCN) λ_{\max} nm (log ϵ): 237 (3,81), 277sh (3,50), 285sh (3,36), 316 (2,22), 435 (2,09); ¹H НМР (400 MHz, CDCl₃, ppm): в. табелу 4.1.1.1; ¹³C НМР (101 MHz, CDCl₃, ppm): в. табелу 4.1.1.2; ХРМС (MALDI-TOF): Израчунато за C₂₉H₃₂FeO₂: 468,1752, нађено: 468,1752.

3.2.2.4. 4-(Фероценилметил)-3-хидроксиестра-1,3,5(10)-триен-17-он (5) и

2-(Фероценилметил)-3-хидроксиестра-1,3,5(10)-триен-17-он (6)

Смеша 5 и 6 у односу 7:3; укупан принос: 0% у DMF, 10% у MeOH; наранџасти прах; ИР (CH₂Cl₂ филм) ν_{\max} cm⁻¹: 3401, 2927, 1723, 1610, 1452, 1280, 1033; УВ-Вис (MeCN) λ_{\max} nm (log ϵ): 231 (3,78), 279sh (3,51), 325sh (2,25), 439 (2,06); ¹H НМР (400 MHz, CDCl₃, ppm): в. табелу 4.1.1.1; ¹³C НМР (101 MHz, CDCl₃, ppm): в. табелу 4.1.1.2; ХРМС (MALDI-TOF): Израчунато за C₂₉H₃₂FeO₂: 468,1752, нађено: 468,1755.

3.2.3. Кондензација 2-формилестрадиола са ацетилфероценом и естерификације добијеног конјугата

3.2.3.1. 2-Формилестрадиол (7)

Анхидровани магнезијум-хлорид (285 mg, 2,0 mmol), триетиламин (0,42 mL, 3,0 mmol) и параформалдехид (285 mg, 4,0 mmol) додају се у раствор естрадиола (272 mg, 1,0 mmol) у сувом тетраhydroфурану (10 mL), а реакциона смеша загрева под атмосфером аргона у току 4 h. По истеку реакционог времена, реакциона смеша се охлади и у њу се дода 1 M хлороводонична киселина (10 mL), а затим се екстрахује етил-ацетатом (3×10 mL). Спојени органски слојеви се осуше анхидрованим натријум-сулфатом и растварају упари.

Добијена чврста смеша се пречисти колонском флеш-хроматографијом (елуент: бензен–етил-ацетат 5:1, *v/v*), после чега се добија 2-формилестрадиол (252 mg, 84%).^[173]

3.2.3.2. (*E*)-2-(3-Фероценил-3-оксопроп-1-енил)естра-1,3,5(10)-триен-3,17β-диол (**8**)

У апсолутном етанолу (10 mL) се растворе 2-формилестрадиол (140 mg, 0,47 mmol) и ацетилфероцен (114 mg, 0,50 mmol, добијен претходно описаним поступком^[174]), а затим се дода натријум-етоксид (272 mg, 4,0 mmol). Реакциона смеша се загрева под атмосфером аргона уз рефлукс у току 6 h. По истеку реакционог времена, реакциона смеша се излије у воду и екстрахује етил-ацетатом (3×10 mL), а спојени органски слојеви третирају 10% раствором натријум-тиосулфата (1×10 mL) и исперу водом (3×10 mL). Екстракт се осуши анхидрованим натријум-сулфатом, а растварач упари. Добијена смеша се пречисти колонском флеш-хроматографијом (елуент: бензен–етил-ацетат 5:1, *v/v*), после чега се добија (*E*)-2-(3-фероценил-3-оксопроп-1-енил)естра-1,3,5(10)-триен-3,17β-диол, који се распада приликом покушаја упаравања раствора у елуенту.

3.2.3.3. (*E*)-2-(3-Фероценил-3-оксопроп-1-енил)-17β-хидроксиестра-1,3,5(10)-триен-3-ил-ацетат (**9**)

У раствор спојених фракција које садрже једињење **8** (добијених по претходно описаном поступку), упарених до запремине од око 10 mL, додају се триетиламин (61 mg, 0,6 mmol) и ацетанхидрид (35 μL, 37 mg, 0,36 mmol), а реакциона смеша меша се на собној температури под атмосфером аргона у току 12 h. Потом се дода вода (10 mL), добијена смеша екстрахује етил-ацетатом (3×10 mL), а спојени органски слојеви исперу водом (1×10 mL) и засићеним раствором натријум-хлорида (1×10 mL), екстракт осуши анхидрованим натријум-сулфатом, а растварач упари. Добијени сирови производ се пречисти колонском флеш-хроматографијом (елуент: бензен–етил-ацетат 5:1, *v/v*), после чега се добија (*E*)-2-(3-фероценил-3-оксопроп-1-енил)-17β-хидроксиестра-1,3,5(10)-триен-3-ил-ацетат (**9**, 107 mg, 41% у односу на 2-формилестрадиол).

Црвена уљаста супстанца; ИР (CHCl₃ филм) ν_{\max} cm⁻¹: 3424, 2925, 2868, 1761, 1650, 1591, 1453, 1197; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): 7,81 (d, 1H, *J* = 15,7, H-1'), 7,66 (s, 1H, H-1), 7,06 (d, 1H, *J* = 15,7, H-2'), 6,86 (s, 1H, H-4), 4,91 (m, 2H, H-5', H-8'), 4,61 (m, 2H, H-6', H-7'), 4,23 (s, 5H, H-1''–5''), 3,76 (dd, 1H, *J* = 9,2, 7,7, H-17α), 2,87–2,93 (више преклопљених мултиплета, 2H, H-6α, H-6β), 2,40 (s, 3H, H-2'''), 2,40–1,20 (више преклопљених мултиплета, 13H), 0,82 (s, 3H, H-18); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃, ppm): 192,7 (C-3'), 169,6 (C-1'''), 147,4 (C-3), 140,9, 138,6, 134,5 (C-1'), 125,0, 124,9 (C-1), 123,9 (C-2'), 123,1 (C-4), 81,7 (C-17), 81,0 (C-4'), 72,7 (C-6', C-7'), 70,1 (C-1''–5''), 69,5 (C-5', C-8'), 49,9, 44,1, 42,9, 38,2, 36,7, 30,1 (C-6), 27,9, 27,4, 25,8, 24,5, 21,4, 21,3 (C-2'''), 11,1 (C-18); ХРМС (MALDI-TOF): Израчунато за C₃₃H₃₆FeO₄: 552,1963, нађено: 552,1960.

3.2.3.4. (*E*)-2-(3-Фероценил-3-оксопроп-1-енил)естра-1,3,5(10)-триен-3,17β-диил-диацетат (**10**)

У раствор спојених фракција које садрже једињење **8** (добитених по претходно описаном поступку), упарених до запремине од око 10 mL, додају се сирћетна киселина (0,06 mL, 1,0 mmol), *N,N'*-дициклохексилкарбодиимид (206 mg, 1,0 mmol) и 4-(диметиламино)пиридин (36 mg, 0,3 mmol). Реакциона смеша меша се у току 24 h на собној температури у атмосфери аргона. По истеку реакционог времена дода се *n*-хексан (5 mL), а исталожена *N,N'*-дициклохексилуреа уклони филтрирањем. Добитени филтрат се упари, а сирови производ пречисти колонском флеш-хроматографијом (елуент: петрол-етар–етил-ацетат 8:1, *v/v*), после чега се добија (*E*)-2-(3-фероценил-3-оксопроп-1-енил)естра-1,3,5(10)-триен-3,17β-диил-диацетат (**10**, 98 mg, 32% у односу на 2-формилестрадиол).

Црвена уљаста супстанца; ИР (CHCl₃ филм) ν_{\max} cm⁻¹: 2921, 2863, 1765, 1745, 1652, 1588, 1450, 1194; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): 7,83 (d, 1H, *J* = 15,7, H-1'), 7,66 (s, 1H, H-1), 7,08 (d, 1H, *J* = 15,7, H-2'), 6,88 (s, 1H, H-4), 4,92 (m, 2H, H-5', H-8'), 4,74 (dd, 1H, *J* = 9,2, 7,7, H-17α), 4,62 (m, 2H, H-6', H-7'), 4,23 (s, 5H, H-1''–5''), 2,92 (више преклопљених мултиплета; 2H; H-6α, H-6β), 2,42 (s, 3H, H-2'''), 2,10 (s, 3H, H-2''''), 2,44–1,23 (више преклопљених мултиплета, 13H), 0,88 (s; 3H, H-18). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃, ppm): 192,9 (C-3'), 171,3 (C-1'''), 169,6 (C-1'''), 147,5 (C-3), 140,9, 138,6, 134,8 (C-1'), 125,0, 124,8 (C-1), 123,9 (C-2'), 123,1 (C-4), 82,6 (C-17), 80,6 (C-4'), 72,8 (C-6', C-7'), 70,2 (C-1''–5''), 69,8 (C-5', C-8'), 49,9, 43,9, 42,9, 38,1, 36,8, 29,6 (C-6), 27,6, 26,9, 26,1, 23,3, 21,2 (C-2''''), 21,1 (C-2'''), 12,1 (C-18). ХРМС (MALDI-TOF): Израчунато за C₃₅H₃₈FeO₅: 594,2069, нађено: 594,2067.

3.3. Испитивања конјугата естра-1,3,5(10)-триенских стероида са фероценом на антипролиферативну активност

3.3.1. Ћелијске линије и узгајање

Седам човечјих ћелијских линија су коришћене за тестирање: аденокарцином дојке позитиван на естрогене рецепторе MCF-7 (American Type Culture Collection, ATCC HTB22), аденокарцином дојке негативан на естрогене рецепторе MDA-MB-231 (ATCC HTB26), канцер простате негативан на андрогене рецепторе PC-3 (ATCC CRL-1435), канцер грлића материце HeLa (ATCC CCL-2), аденокарцином дебелог црева HT-29 (ATCC HTB-38), аденокарцином плућа A549 (ATCC CCL-185), и нормални фибробласти плућа фетуса MRC-5 (ATCC CCL-171). Наведене културе ћелија су пореклом из колекције ћелијских линија Института за онкологију Војводине. Ћелије су узгајане у Дулбековом модификованом „Eagle” медијуму DMEM) са 0,45% (*w/v*) глукозе уз додатак 10% серума говеђег фетуса (Sigma Aldrich, Сент Луис, Мисури, САД) и раствора антибиотика и антимицотика (Sigma Aldrich). Ћелије су узгајане у фласковима (величина 25 cm², Costar, Sigma Aldrich) на 37 °C у атмосфери са 100% влажности и 5% (*v/v*) CO₂. Преживљавање ћелија одређивано је тестом искључења трипанским плавим.

3.3.2. Одређивање антипролиферативне активности

Једињења 2–6 тестирана су на антипролиферативну активност користећи тетразолијумски колориметријски МТТ-тест.^[175] Ћелије су излагане једињењима у току 72 h у опсегу концентрација од 10^{-8} до 10^{-4} M. Доксорубицин (DOX), неселективни антипролиферативни агенс, коришћен је као општа контрола цитотоксичности. Ћелије у фази експоненцијалног раста сакупљене су, пребројане бојењем трипанским плавим и засејане на микротитарским плочама са 96 бунарчића (Costar, Sigma Aldrich, Сент Луис, Мисури, САД) при густини сејања од око 5000 ћелија по бунарчићу како би се обезбедила логаритамска брзина раста током трајања целокупног теста. Живе ћелије засејане су у запремини од 90 μL по бунарчићу и претходно инкубиране у комплетном медијуму на 37 °C у току 24 h како би се обезбедила стабилизација ћелија пре додатка једињења. За сва испитивана, једињења су растворена у диметил-сулфоксиду и разблажена хранљивим медијумом како би се добили раствори десетоструко веће концентрације у односу на жељену коначну концентрацију. Ови разблажени раствори (10 μL по бунарчићу) додати су у све бунарчиће и плоче су инкубиране у току 24 h. Бунарчићи који су садржали нетретиране ћелије, без тестираних једињења, коришћени су као негативна контрола. МТТ је растворен у медијуму при концентрацији од 5 mg mL⁻¹ и стерилизован филтрацијом, а и како би се отклонила мала количина нерастворног остатка који је присутан у неким шаржама МТТ-а. Три сата пре истека инкубационог времена, 10 μL раствора МТТ је додато у сваки бунарчић. Закисељени изопропил-алкохол (100 μL 0,04 M HCl у воденом изопропил-алкохолу) је додат у сваки бунарчић и интензивно промешан како би се растворили тамноплави кристали. После неколико минута инкубације на собној температури (како би се обезбедило да се сав МТТ раствори), апсорбанце у плочама су очитане на спектрофотометријском читачу плоча (Multiskan MCC340, Labsystems, Thermo Scientific, Волтам, Масачусетс, САД) на 540 nm са корекцијом позадинске апсорпције на 690 nm. Бунарчићи без ћелија, а у којима се налазио искључиво комплетан медијум и МТТ, коришћени су као слепе пробе. Средње вредности и стандардне девијације израчунате су за сваку концентрацију. Два независна експеримента спроведена су с четири понављања за сваку концентрацију тестираног једињења. Антипролиферативне активности изражене су као IC₅₀ вредности (концентрација која изазива 50% инхибиције) добијене анализом средњег ефекта (енгл. median effect analysis).

3.3.3. Статистичка анализа

У тестовима на антипролиферативну активност статистички значајне разлике одређене су користећи једнофакторску дисперзиону анализу (ANOVA) праћену Тукијевим *post-hoc* тестом за вишеструко поређење (GraphPad, Prism version 5.03, Сан Дијего, Калифорнија, САД). Вредности вероватноће од $(p) \leq 0,05$ сматране су статистички значајним.

3.4. Синтеза конјугата андростанских стероида са фероценом

3.4.1. Клајзен-Шмитова кондензација фероценкарбалдехида са тестостероном

У етанолу (30 mL) се растворе фероценкарбалдехид (215 mg, 1,0 mmol) и тестостерон (290 mg, 1,0 mmol), а затим се дода калијум-хидроксид (224 mg, 4,0 mmol). Реакциона смеша се загрева уз рефлукс у току 2 h у атмосфери аргона. По истеку реакционог времена, реакциона смеша се излије у воду и екстрахује етил-ацетатом (3×25 mL), а спојени органски слојеви исперу засићеним воденим раствором натријум-хлорида (3×20 mL), а затим суше анхидрованим натријум-сулфатом и растварач упари. Добијена чврста смеша пречисти се колонском флеш-хроматографијом на силика-гелу (елуент: бензен–етил-ацетат 20:1, v/v), после чега се добија (*E*)-2-(фероценилметилен)-17β-хидроксиандрост-4-ен-3-он (**11**, 35 mg, 7%) и (*Z*)-2-(фероценилметилен)-17β-хидроксиандрост-4-ен-3-он (**12**, 115 mg, 24%).

3.4.1.1. (*E*)-2-(Фероценилметилен)-17β-хидроксиандрост-4-ен-3-он (**11**)

Љубичаста уљаста супстанца; ИР (CHCl₃ филм) ν_{\max} cm⁻¹: 3412, 2927, 2852, 1656, 1585, 1330, 1243, 1106, 1053; ¹H НМР (400 MHz, CDCl₃, ppm): в. табелу 4.1.2.1; ¹³C НМР (101 MHz, CDCl₃, ppm): в. табелу 4.1.2.1; ХРМС (HESI): Израчунато за C₃₀H₃₆FeO₂: 484,20647, пронађено: 484,20751.

3.4.1.2. (*Z*)-2-(Фероценилметилен)-17β-хидроксиандрост-4-ен-3-он (**12**)

Црвена уљаста супстанца; ИР (CHCl₃ филм) ν_{\max} cm⁻¹: 3419, 2934, 1653, 1584, 1330, 1243, 1106, 1053; ¹H НМР (400 MHz, CDCl₃, ppm): в. табеле 4.1.2.1. и 4.1.2.2; ¹³C НМР (101 MHz, CDCl₃, ppm): в. табелу 4.1.2.1; ХРМС (HESI): Израчунато за C₃₀H₃₆FeO₂: 484,20647, пронађено: 484,20685.

3.4.2. Клајзен-Шмитова кондензација фероценкарбалдехида са дихидротестостероном

У етанолу (30 mL) се растворе фероценкарбалдехид (82 mg, 0,38 mmol) и дихидротестостерон (110 mg, 0,38 mmol), а затим се дода калијум-хидроксид (112 mg, 2,0 mmol). Реакциона смеша се загрева уз рефлукс у току 2 h у атмосфери аргона. По истеку реакционог времена, реакциона смеша се излије у воду и екстрахује са етил-ацетатом (3×25 mL), а спојени органски слојеви исперу засићеним воденим раствором натријум-хлорида (3×10 mL), а затим суше анхидрованим натријум-сулфатом и растварач упари. Добијена чврста смеша пречисти се колонском флеш-хроматографијом на силика-гелу (елуент: бензен–етил-ацетат 20:1, v/v) као елуент, после чега се добија (*E*)-2-(фероценилметилен)-17β-хидрокси-5α-андростан-3-он (**13**, 139 mg, 75%).

3.4.2.1. (E)-2-(Фероценилметилен)-17 β -хидрокси-5 α -андростан-3-он (**13**)

Црвени кристали; т. т. 246 °C (разлаже се); ИР (CHCl₃ филм) ν_{\max} cm⁻¹: 3424, 2926, 1668, 1578, 1236, 1047; ¹H НМР (400 MHz, CDCl₃, ppm): в. табелу 4.1.2.3; ¹³C НМР (101 MHz, CDCl₃, ppm): в. табелу 4.1.2.3; ХРМС (HESI): Израчунао за: C₃₀H₃₈FeO₂: 486,22212, пронађено: 486,22083.

3.4.3. Каталитичко хидрогеновање конјугата **13**

У метилен-хлориду (30 mL) се раствори једињење **13** (107 mg, 0,22 mmol), а затим се дода паладијум на угљенику (10%, *m/m*, 12 mg). Реакциона смеша се меша под атмосферским притиском на собној температури у атмосфери водоника у току 1 h, а после тога филтрира преко целита и филтрат упари. Добијена чврста смеша пречисти се колонском флеш-хроматографијом на силика-гелу (елуент: бензен–етил-ацетат 20:1, *v/v*), после чега се добијају 2-(фероценилметилен)-5 α -андростан-17 β -ол (**14**, 19 mg, 18%) и 2 α -(фероценилметил)-17 β -хидрокси-5 α -андростан-3-он (**15**, 56 mg, 52%).

3.4.3.1. 2-(Фероценилметилен)-5 α -андростан-17 β -ол (**14**)

Жути прах; т. т. 178 °C (разлаже се); ИР (CHCl₃ филм) ν_{\max} cm⁻¹: 3364, 2916, 2844, 1445, 1218, 1051, 1000; ¹H НМР (400 MHz, CDCl₃, ppm): в. табелу 4.1.2.3; ¹³C НМР (101 MHz, CDCl₃, ppm): в. табелу 4.1.2.3; ХРМС (MALDI-TOF): Израчунао за C₃₀H₄₀FeO: 472,2429, нађено: 472,2431.

3.4.3.2. 2 α -(Фероценилметил)-17 β -хидрокси-5 α -андростан-3-он (**15**)

Жути прах; т. т. 182 °C (разлаже се); ИР (CHCl₃ филм) ν_{\max} cm⁻¹: 3441, 2929, 2848, 1704, 1444, 1221, 1024; ¹H НМР (400 MHz, CDCl₃, ppm): в. табелу 4.1.2.4; ¹³C НМР (101 MHz, CDCl₃, ppm): в. табелу 4.1.2.4; ХРМС (MALDI-TOF): Израчунао за C₃₀H₄₀FeO₂: 488,2378, нађено: 488,2377.

3.5. Испитивања конјугата андростанских стероида са фероценом на антипролиферативну активност

3.5.1. Ћелијске линије и узгајање

Две човечје ћелијске линије су коришћене: канцер простате негативан на андрогене рецепторе PC-3 (ATCC CRL-1435), канцер простате позитиван на андрогене рецепторе LNCaP (ATCC CRL-1740) и нормални фибробласти плућа фетуса MRC-5 (ATCC CCL-171). Наведене културе ћелија су из колекције ћелијских линија Института за онкологију и радиологију Србије, Одсек за експерименталну онкологију. Ћелијске линије су одржаване као монослој у хранљивој подлози RPMI 1640 опскрбљеном са 10% (*v/v*) серума говеђег фетуса, пеницилином (192 IU/mL), стрептомицином (200 μ L/mL), L-глутамином (3 mM) и 4-(2-хидроксиетил)-1-пиперазинетансулфонском киселином (25 mM).

Култура се одржава као монослој у за њу одговарајућој хранљивој подлози. Култура ћелија гаји се у инкубатору на 37 °C у атмосфери ваздуха са 5% (v/v) CO₂ zasiћеног воденом паром. За гајење ћелија коришћени су фласкови за адхерирајуће ћелијске културе, који су стерилни, површине 25 cm² (T25). Одржавање ћелија у монослоју постигнуто је пресејавањем ћелија у свежу подлогу, тј. „пасажирањем”, сваких 4–5 дана.

Пасажирање ћелија је обављано у стерилној комори, уз коришћење стерилних лабораторијских судова и ношење заштитне лабораторијске опреме. Пасажирање се врши када ћелије потпуно прекрију дно суда или када се истроше нутријенти подлоге, на шта указује индикатор промене рН подлоге.

3.5.2. Одређивање антипролиферативне активности

Једињења 11–15 тестирана су на антипролиферативну активност користећи тетразолијумски колориметријски МТТ-тест.^[176] У средишње бунарчиће полистиренске плоче са 96 бунарчића са равним дном (Thermo Scientific Biolite 96F-Well, Cell Culture-Treated, Flat-Bottom Microplate) засејано је 4000 ћелија по бунарчићу у 100 µL хранљиве подлоге (за РС-3 ћелије) или 3000 ћелија по бунарчићу у 100 µL хранљиве подлоге (за МРС-5 ћелија). Ћелије су засађене у трипликату, на три бунарчића ћелија остављена су три судића у које је сипана само хранљива подлога (слепа проба). Ћелије су гајене 24 h у инкубатору на 37 °C, у атмосфери ваздуха zasiћеног воденом паром, са 5% (v/v) CO₂.

Непосредно пре додатка појединачних једињења за свако испитивано једињење направљени су раствори у диметил-сулфоксиду у концентрацији 10 mM. За свако једињење је затим формирана серија разблажења у одговарајућој хранљивој подлози. По истеку 24 h од засејавања ћелија у бунарчиће, пошто су се ћелије залепиле за дно суда, у бунарчиће са ћелијама, као и у бунарчиће који су искључиво садржали подлогу (слепа проба), сипано је у трипликату 50 µL сваког разблажења испитиваног једињења. Разблажења једињења у одговарајућој подлози била су таква да финалне концентрације једињења у бунарчићу плоче буду редом 6,25, 12,5, 25, 50 и 100 µM.

Ћелије су затим инкубирани са испитиваним једињењима у инкубатору са 5% (v/v) CO₂ на 37 °C, током 72 h. Након инкубирања 20 µL раствора МТТ (5 mg/mL у физиолошком раствору) додато је у сваки бунарчић. После 4 h додато је 100 µL раствора 10% (m/m) натријум-додецилсулфата, а после 24 h прочитана је апсорбанција на 570 nm.

После инкубације и гајења ћелија са различитим концентрацијама испитиваних једињења и после третмана бојом МТТ и растварањем награвљеног формаза, одређена је апсорбанција узорака. Ако је A_k средња вредност апсорбанце узорака ћелија гајених у хранљивој подлози, A средња вредност апсорбанци узорака ћелија гајених у присуству различитих концентрација испитиваног једињења, и ако се као слепа проба користе апсорбанце хранљивог медијума без ћелија, са одговарајућим концентрацијама испитиваног једињења, тада је преживљавање ћелија (%) = $A/A_k \times 100$. Конструисан је дијаграм преживљавања ћелија (%) = $f(\text{концентрација једињења})$ и из наведене криве

добијен је податак о концентрацији једињења која изазива смањење преживљавања ћелија за 50%, IC₅₀.

3.6. Синтеза конјугата прегнанских стероида са фероценом

3.6.1. Синтеза полазних стероидних једињења

Епиалопрегнанолон (3 β -хидрокси-5 α -прегнан-20-он) је синтетисан по литературној процедури,^[177] као и оба коришћена епоксистероида,^[178] док је 16-дехидропрегненолон^[179] био лако доступан једноставном сапонификацијом његовог ацетатног естра.

3.6.2. Синтеза конјугата Клајзен-Шмитовим кондензацијама у етанолу

Фероценкарбалдехид (214 mg; 1,0 mmol) се дода у раствор одговарајућег стероидног једињења (1,0 mmol) у етанолу (20 mL) у којем је суспендован калијум-хидроксид (220 mg; 4,0 mmol). Реакциона смеша се загрева уз рефлукс у току 2 h у атмосфери аргона, затим излије у воду (25 mL), екстрахује етил-ацетатом (3 \times 25 mL), а спојени органски слојеви суше анхидрованим натријум-сулфатом и растварач се уклони на ротационом вакуум-упаривачу. Добијена чврста смеша пречисти се колонском флеш-хроматографијом на силика-гелу (елуент: бензен–етил-ацетат 95:5, v/v).

3.6.2.1. (21E)-21-(Фероценилметилен)прегн-4-ен-3,20-дион (**16**)

Принос: 40%; црвена уљаста супстанца; ИР (CHCl₃ филм) ν_{\max} cm⁻¹: 2940, 1674, 1595, 1361, 1106; УВ-Вис (MeCN) λ_{\max} nm (log ϵ): 203 (3,24), 235 (3,01), 316 (2,90), 489 (2,01); ¹H НМР (400 MHz, CDCl₃, ppm): 0,68 (s, 3H, H-18), 0,97–1,15 (више преклопљених мултиплета, 2H, H-9, H-7 α), 1,20 (s, 3H, H-19), 1,21–1,80 (више преклопљених мултиплета, 9H, H-14, H-15 β , H-11 β , H-8, H-12 α , H-11 α , H-16 α , H-1 α , H-15 α), 1,90 (dddd, 1H, $J = 12,9, 5,7, 2,6, 2,5$, H-7 β), 1,99–2,07 (више преклопљених мултиплета, 2H, H-1 β , H-12 β), 2,26–2,48 (више преклопљених мултиплета, 5H, H-6 α , H-2 α , H-16 β , H-6 β , H-2 β), 2,78 (dd, 1H, $J = 8,9, 8,9$, H-17), 4,16 (s, 5H, H-1''–5''), 4,43–4,45 (више преклопљених мултиплета, 2H, H-4', H-5'), 4,51–4,54 (више преклопљених мултиплета, 2H, H-3', H-6'), 5,75 (br s, 1H, H-4), 6,39 (d, 1H, $J = 15,7$, H-21), 7,47 (d, 1H, $J = 15,7$, H-1'); ¹³C НМР (101 MHz, CDCl₃, ppm): в. табелу 4.1.3.2; ХРМС (HESI): Израчунато за C₃₂H₃₈FeO₂: 510,22212, пронађено: 510,22118.

3.6.2.2. (21E)-16 α ,17-Епокси-21-(фероценилметилен)прегн-4-ен-3,20-дион (**17**)

Принос: 28%; црвени прах; т. т. 192 °C (разлаже се); ИР (CHCl₃ филм) ν_{\max} cm⁻¹: 2941, 2858, 1669, 1592, 1187, 1043; УВ-Вис (MeCN) λ_{\max} nm (log ϵ): 205 (3,20), 236 (3,03), 313 (2,93), 492 (2,02); ¹H НМР (400 MHz, CDCl₃, ppm): 0,93–1,12 (више преклопљених мултиплета, 2H, H-9, H-7 α), 1,12 (s, 3H, H-18), 1,19 (s, 3H, H-19), 1,23 (m, 1H, H-14), 1,38 (dd, 1H, $J = 12,3, 12,1$, H-15 β), 1,44–1,53 (2H, H-12 α , H-11 β), 1,61–1,81 (више преклопљених мултиплета, 4H, H-11 α , H-8, H-1 α , H-7 β), 1,96–2,12 (више преклопљених мултиплета, 3H, H-15 α , H-1 β , H-12 β), 2,23–2,45 (више преклопљених мултиплета, 4H, H-6 α , H-2 α , H-6 β , H-2 β), 3,67 (br s, 1H, H-

16), 4,14 (s, 5H, H-1''-5''), 4,41-4,44 (више преклопљених мултиплета, 2H, H-4', H-5'), 4,47 (m, 1H, H-3' или H-6'), 4,50 (m, 1H, H-3' или H-6'), 5,71 (br s, 1H, H-4), 6,39 (d, 1H, $J = 15,6$, H-21), 7,61 (d, 1H, $J = 15,6$, H-1'); ^{13}C НМР (101 MHz, CDCl_3 , ppm): в. табелу 4.1.3.2; ХРМС (HESI): Израчунаато за $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{FeO}_3$: 524,20138, пронађено: 524,20081.

3.6.2.3. (21E)-16 α -Етокси-21-(фероценилметилен)-3 β -хидроксипрегн-5-ен-20-он (18)

Принос: 35%; црвена уљаста супстанца; ИР (CHCl_3 филм) ν_{max} cm^{-1} : 3418, 2931, 2854, 1667, 1593, 1106; УВ-Вис (MeCN) λ_{max} nm (log ϵ): 202 (3,36), 257 (2,79), 306 (2,99), 483 (2,08); ^1H НМР (400 MHz, CDCl_3 , ppm): 0,67 (s, 3H, H-18), 1,00 (s, 3H, H-19), 1,03-1,17 (више преклопљених мултиплета, 2H, H-9, H-1 α), 1,17 (dd, 3H, $J = 6,9$, 6,9, OCH_2CH_3), 1,42-1,94 (више преклопљених мултиплета s, 12H, H-2 β , H-11 β , H-12 α , H-11 α , H-14, H-7 α , H-8, H-15 β , H-15 α , H-1 β , H-2 α , H-12 β), 2,00 (dddd, 1H, $J = -17,3$, 5,2, 4,1, 2,0, H-7 β), 2,18-2,36 (више преклопљених мултиплета, 2H, H-4 β , H-4 α), 2,83 (d, 1H, $J = 6,4$, H-17), 3,36 (ABX_3 , 2H, $J = -9,3$, 7,0, OCH_2CH_3), 3,56 (dddd, 1H, $J = 12,3$, 10,3, 5,8, 4,5, H-3 α), 4,17 (s, 5H, H-1''-5''), 4,43-4,46 (више преклопљених мултиплета, 2H, H-4', H-5'), 4,52-4,62 (више преклопљених мултиплета, 3H, H-3', H-6', H-16), 5,37 (dd, 1H, $J = 5,2$, -1,5, H-6), 6,43 (d, 1H, $J = 15,8$, H-21), 7,52 (d, 1H, $J = 15,8$, H-1'); ^{13}C НМР (101 MHz, CDCl_3 , ppm): в. табелу 4.1.3.2; ХРМС (HESI): Израчунаато за $\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{FeO}_3$: 556,26399, нађено: 556,26334.

3.6.2.4. (21E)-21-(Фероценилметилен)-3 β -хидроксипрегн-5,16-диен-20-он (19)

Принос: 7%; црвени прах; т. т. 165 °C (разлаже се); ИР (CHCl_3 филм) ν_{max} cm^{-1} : 3401, 2932, 2860, 1647, 1580, 1106; УВ-Вис (MeCN) λ_{max} nm (log ϵ): 265 (2,72), 316 (2,88), 488 (2,03); ^1H НМР (400 MHz, CDCl_3 , ppm): 0,98-1,12 (s, 3H, H-18; s, 3H, H-19; више преклопљених мултиплета, 2H, H-9, H-1 α), 1,34-2,49 (више преклопљених мултиплета, 15H, H-12 α , H-14, H-2 β , H-11 β , H-11 α , H-7 α , H-8, H-1 β , H-2 α , H-7 β , H-15 β , H-4 β , H-4 α , H-15 α , H-12 β), 3,53 (dddd, 1H, $J = 12,3$, 10,4, 5,8, 4,3, H-3 α), 4,18 (s, 5H, H-1''-5''), 4,40-4,43 (више преклопљених мултиплета, 2H, H-4', H-5'), 4,49-4,53 (више преклопљених мултиплета, 2H, H-3', H-6'), 5,36 (dd, 1H, $J = 5,2$, -1,7, H-6), 6,73 (dd, 1H, $J = 3,6$, 1,8, H-16), 6,78 (d, 1H, $J = 15,5$, H-21), 7,48 (d, 1H, $J = 15,5$, H-1'); ^{13}C НМР (101 MHz, CDCl_3 , ppm): в. табелу 4.1.3.2; ХРМС (HESI): Израчунаато за $\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{FeO}_2$: 510,22212, нађено: 510,22141.

3.6.2.5. (21E)-16 α ,17-Епокси-21-(фероценилметилен)-3 β -хидроксипрегн-5-ен-20-он (21)

Принос: 23%; црвени прах; т. т. 183 °C; ИР (CHCl_3 филм) ν_{max} cm^{-1} : 2935, 2860, 1701, 1376, 1057; УВ-Вис (MeCN) λ_{max} nm (log ϵ): 204 (3,26), 264 (2,63), 313 (3,00), 492 (2,05); ^1H НМР (400 MHz, CDCl_3 , ppm): 0,94-1,12 (s, 3H, H-1; s, 3H, H-19; више преклопљених мултиплета, 2H, H-9, H-1 α), 1,17-2,33 (више преклопљених мултиплета, 15H, H-14, H-15 β , H-12 β , H-2 β , H-12 α , H-11 β , H-11 α , H-8, H-1 β , H-2 α , H-7 α , H-15 α , H-7 β , H-4 β , H-4 α), 3,51 (dddd, 1H, $J = 12,3$, 10,4, 5,4, 4,0, H-3 α), 3,66 (br s, 1H, H-16), 4,14 (s, 5H, H-1''-5''), 4,41-4,43 (више преклопљених мултиплета, 2H, H-4', H-5'), 4,47 (m, 1H, H-3' или H-6'), 4,50 (m, 1H, H-3' или

H-6'), 5,33 (d, 1H, $J = 4,7$, H-6), 6,41 (d, 1H, $J = 15,6$, H-21), 7,60 (d, 1H, $J = 15,6$, H-1'); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3 , ppm): в. табелу 4.1.3.2; XPMC (HESI): Израчунао за $\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{FeO}_3$: 526,21703, нађено: 526,21649.

3.6.2.6. Смеша (21E)-21-(фероценилметилен)-3 β -хидрокси-5 α -прегнан-20-он (**22**) и (21E)-21-(фероценилметилен)-3 β -хидрокси-5 α ,17 α -прегнан-20-он (**23**)

Укупан принос: 31%; црвени прах; т. т. 120–131 °C (разлаже се); ИР (CHCl_3 филм) ν_{max} cm^{-1} : 3416, 2928, 2850, 1671, 1593, 1105; УВ-Вис (MeCN) λ_{max} nm (log ϵ): 203 (3,33), 259 (2,83), 305 (3,05), 481 (2,08); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm): 0,66 (s, 3H, H-18(**22**)), 0,71 (ddd, 1H, $J = 13,2, 9,2, 4,2$, H-9(**22+23**)), 0,79 (s, 3H, H-19(**23**)), 0,80 (s, 3H, H-19(**22**)), 0,97 (s, 3H, H-18(**23**)), 0,93–1,75 (више преклопљених сигнала, остали сигнали стероидног скелета једињења **22** и **23**), 1,95 (ddd, 1H, $J = 12,0, 3,9, 2,7$, H-12 β (**22+23**)), 2,74 (dd, 1H, $J = 8,8, 8,8$, H-17 α (**22**)), 3,01 (dd, 1H, $J = 8,3, 2,6$, H-17 β (**23**)), 3,59 (m, 1H, H-3 α (**22+23**)), 4,14 (s, 5H, H-1''–5''(**22+23**)), 4,46 (m, 2H, H-4' и H-5'(**22+23**)), 4,51 (m, 2H, H-3' и H-6'(**22+23**)), 6,35 (d, 1H, $J = 15,8$, H-21(**23**)), 6,38 (d, 1H, $J = 15,8$, H-21(**22**)), 7,37 (d, 1H, $J = 15,8$, H-1'(**23**)), 7,44 (d, 1H, $J = 15,8$, H-1'(**22**)); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3 , ppm): в. табелу 4.1.3.2; XPMC (HESI): Израчунао за $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{FeO}_2$: 514,25342, нађено: 514,25286.

3.6.3. Синтеза конјугата Клајзен-Шмитовом кондензацијом у метанолу

Фероценкарбалдехид (214 mg; 1,0 mmol) се дода у раствор 16-дехидропрегненолона (315 mg; 1,0 mmol) у метанолу (20 mL) у којем је суспендован калијум-хидроксид (220 mg; 4,0 mmol). Реакциона смеша се загрева уз рефлукс у току 8 h у атмосфери аргона, затим излије у воду (25 mL), екстрахује етил-ацетатом (3 \times 25 mL), а спојени органски слојеви суше анхидрованим натријум-сулфатом и растварач се уклони на ротационом вакуум-упаривачу. Добијена чврста смеша пречисти се колонском флеш-хроматографијом на силика-гелу (елуент: бензен–етил-ацетат 95:5, v/v), чиме су добијена једињења **19** (у приносу од 7%) и **20** (у приносу од 13%).

3.6.3.1. (21E)-21-(Фероценилметилен)-3 β -хидрокси-16 α -метоксипрегн-5-ен-20-он (**20**)

Црвена уљаста супстанца; ИР (CHCl_3 филм) ν_{max} cm^{-1} : 3412, 2928, 2851, 1671, 1594, 1106; УВ-Вис (MeCN) λ_{max} nm (log ϵ): 203 (3,30), 255 (2,78), 305 (2,97), 483 (2,02); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm): 0,66 (s, 3H, H-18), 1,01 (s, 3H, H-19), 1,03–1,17 (више преклопљених мултиплета, 2H, H-9, H-1 α), 1,43–1,95 (више преклопљених мултиплета, 12H, H-2 β , H-11 β , H-8, H-12 α , H-14, H-11 α , H-7 α , H-15 β , H-15 α , H-1 β , H-2 α , H-12 β), 2,00 (dddd, 1H, $J = -16,9, 5,2, 4,0, 2,2$, H-7 β), 2,18–2,36 (више преклопљених мултиплета, 2H, H-4 β , H-4 α), 2,79 (d, 1H, $J = 6,1$, H-17), 3,24 (s, 3H, OCH_3), 3,55 (dddd, 1H, $J = 12,3, 10,3, 5,8, 4,5$, H-3 α), 4,16 (s, 5H, H-1''–5''), 4,44–4,47 (више преклопљених мултиплета, 2H, H-4', H-5'), 4,49–4,45 (више преклопљених мултиплета, 3H, H-3', H-6', H-16), 5,38 (dd, 1H, $J = 5,2, -1,6$, H-6), 6,42 (d, 1H,

$J = 15,7$, H-21), 7,51 (d, 1H, $J = 15,7$, H-1'); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3 , ppm): в. табелу 4.1.3.2; ХРМС (HESI): Израчунато за $\text{C}_{33}\text{H}_{42}\text{FeO}_3$: 542,24834, пронађено: 542,24773.

3.6.4. Синтеза конјугата Клајзен-Шмитовом кондензацијом у изопропил-алкохолу или *n*-бутил-алкохолу

Фероценкарбалдехид (214 mg; 1,0 mmol) додат је у раствор 16-дехидропрегненолона (315 mg; 1,0 mmol) у изопропил-алкохолу, односно *n*-бутил-алкохолу (20 mL) са суспендованим калијум-хидроксидом (220 mg; 4,0 mmol). Реакциона смеша се загрева под рефлуксом у току 2 h у атмосфери аргона, а затим излије у воду (25 mL), екстрахује етил-ацетатом (3×25 mL), а спојени органски слојеви суше анхидрованим натријум-сулфатом и упаре на ротационом вакуум-упаривачу. Добијена чврста смеша пречисти се колонском флеш-хроматографијом на силика-гелу (елуент: бензен–етил-ацетат, 95:5, *v/v*), при чему се у оба случаја добија једињење **19** (с приносима од 36%, односно 24%).

3.7. Испитивања конјугата прегнанских стероида са фероценом на имуномодулаторну активност

3.7.1. Лекови и хемикалије

Спрашени МТТ, трипанско плаво и липополисахарид из серотипа 0111:B4 организма *Escherichia coli* (LPS) набављени су од произвођача Sigma-Aldrich (Сент Луис, Мисури, САД), док је дексаметазон (Dex) прибављен од Галенике (Београд, Србија). Ћелијски медијум (RPMI, Sigma-Aldrich) коришћен у свим експериментима састојао се од RPMI 1640 са 20 mM 4-(2-хидроксиетил)-1-пиперазинетансулфонском киселином и L-глутамином (без натријум-бикарбоната) и са 10% (*v/v*) серума говеђег фетуса, као и антибиотиком и антимицотиком (Sigma-Aldrich).

3.7.2. Огледне животиње и њихово чување

Експерименти су изведени користећи одрасле мужјак Вистар пацова (250–300 g) који су чувани у виваријуму Научноистраживачког центра за биомедицину Медицинског факултета Универзитета у Нишу, под стандардним лабораторијским условима, са приступом храни и води без ограничења, на температури од 22 ± 2 °C и влажности од 60%. Експериментални поступци пратили су препоруке Хелсиншке декларације, као и Препоруке Европске уније за етично поступање према лабораторијским животињама (ЕУ директива из 2010. године, 2010/63/EU) и етичке регулативе Републике Србије. Ово истраживање добило је одобрење републичке етичке комисије (323-07-06862/2016-05/2).

3.7.3. Изоловање и узгајање културе спленцита пацова

Под стерилним условима, слезине животиња су дисециране по њиховом жртвовању. Како би се добила суспензија појединачних ћелија, ткиво слезина је пажљиво уситњено и

пропуштено кроз сито величине пора од 100 μm (Fisher Scientific, Хемптон, Њу Хемпшир, САД). Из суспензије спленоцита после центрифугирања на 1200 обртаја по минути (у току 10 min, на 4 °C) уклоњена су црвена крвна зрнца користећи изотоничан раствор амонијум-хлорида и испирајући двапут раствором натријум-хлорида у фосфатном пуферу. Затим су спленцити поново суспендовани у медијуму RPMI, ћелијска густина подешена на $2,5 \times 10^6$ ћелија/mL и њихово преживљавање испитано бојењем трипанским плавим (више од 95% ћелија је било живо). Ове ћелије су затим пренете у плоче од 96 бунарчића (Greiner Bio-One, Фрикенхаузен, Немачка). Сваки бунарчић је садржао 100 μL суспензије која садржи или медијум RPMI или, у појединим случајевима, у RPMI је додато 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS растворен у истом медијуму. Такође је 100 μL суспензије спленоцита по бунарчићу узгајано уз додаток једнаке запремине медијума RPMI. Дексаметазон је коришћен као позитивна контрола у финалној концентрацији од 1×10^{-1} mM у бунарчићима. Једињења **16–23** и полазна стероидна једињења испитана су у осам различитих концентрација, у опсегу 5×10^{-7} до 1×10^{-4} M. Плоче без додатог стимулатора инкубирани су на 37 °C током 24, 48 и 72 h у атмосфери ваздуха са 5% (v/v) CO₂, док су плоче са LPS-ом инкубирани на 37 °C током 48 и 72 h под истим условима. Сви експерименти урађени су у квадруплику и поновљени три пута.

3.7.4. Дејство једињења на пролиферацију спленоцита

Пошто је густина спленоцита подешена на $2,5 \times 10^6$ ћелија/mL, ћелије су поново суспендоване у RPMI с додатком 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS. Истовремено контролни спленцити су узгајани у идентичној запремини медијума RPMI.

3.7.5. Одређивање преживљавања ћелија МТТ-тестом

Како би се одредило преживљавање узгајаних ћелија, коришћена је митохондријски-зависна редукција МТТ до формазанских кристала. Експеримент је извршен после 24, 48, и 72 h од инкубирања спленоцита са различитим концентрацијама тестираних једињења, а негативна контрола састојала се од спленоцита узгајаних под идентичним условима у медијуму RPMI. За накнадне експерименте, мерења су извршена после 48 и 72 h по инкубирању спленоцита са 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS, са или без тестираних једињења. Медијум у бунарчићима је уклоњен и додато је 100 μL свежег RPMI медијума и раствора МТТ (5 mg/mL), а затим је инкубирање настављено још 4 h. Потом је у све бунарчиће додат закисељени изопропил-алкохол, а садржај плоча је промешан како би се кристали формазана растворили. По растварању кристала апсорбанција је мерена на 550 nm користећи аутоматизован читач микроплоча (Multiscan Ascent, Labsystems, Хелсинки, Финска).

3.7.6. Статистичка анализа

Добијени резултати изражени као проценат преживљавања у односу на спленцитите у RPMI, са или без стимулације помоћу LPS, представљени су као средња вредност \pm

стандардна девијација. Статистички значајне разлике одређене су користећи једнофакторску дисперзиону анализу (ANOVA) праћену Тукијевим *post-hoc* тестом за вишеструко поређење (GraphPad, Prism version 5.03, Сан Дијего, Калифорнија, САД). Вредности вероватноће од $(p) \leq 0,05$ сматране су статистички значајним.

3.8. Анализа природних производа из црне зове (*Sambucus nigra* L.)

3.8.1. Биљни материјал

Цветови *Sambucus nigra* L. (Viburnaceae) су сакупљани из популација у дивљини током времена када су јединке у пуном цвету, а у току дана без падавина. Дршке цветова нису уклањане, а цветови су у танком слоју сушени на ваздуху на оквирима за сушење до константне масе. Примерци су заведени у Хербаријуму Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу под бројем 17753. Идентитет биљног материјала потврдио је радник хербаријума.

Узорак **СРБ1** састојао се из биљног материјала који је сакупљен у близини Шајкаша (општина Тител) 28. маја 2017. године. Узорак **СРБ2** сакупљен је на истом локалитету 15. маја 2020. године. Узорак **УК** састојао се из биљног материјала који је сакупљен у близини села Холмфирт, у Холм Велију у Уједињеном Краљевству 20. јуна 2017. године. Већа количина биљног материјала, за потребе дестилације воденом паром на великој скали, сакупљана је широм општине Тител (укључујући Специјални резерват природе Тителски брег) од 16. до 27. маја 2019. године, а том приликом је прикупљено 323 kg свежих цветова, што је дало 38 kg сувог биљног материјала.

3.8.2. Добијање етарског уља

Суви цветови зове (400 g за **СРБ1**, 400 g за **СРБ2** и 350 g за **УК**) подвргнути су хидродестилацији у апаратури по Клевенцеру у трајању од 2 h. Добијена етарска уља (0,1–0,2 mL) издвојена су помоћу диетил-етра, који је касније сушен анхидрованим магнезијум-сулфатом и упарен у струји азота на собној температури и притиску. Принос етарских уља кретао се у опсегу 0,02–0,05% (*m/m*, 88 mg за **СРБ1**, 195 mg за **СРБ2**, 102 mg за **УК**).

Дестилација сувих цветова зове (38 kg) воденом паром на великој скали извршена је у прохромском дестилационом суду од 800 L (Инокс д.о.о., Бачки Петровац, Србија) који је напајан воденом паром с дна. Водена пара добијена је користећи генератор који ради под притиском (Varogah, Ventilator Ltd., Загреб, Хрватска). Дестилат је излазио из дестилационог суда на врху кроз цев пречника 10 cm, а затим је пропуштан кроз стаклени кондензатор хлађен протоком воде и сакупљан у фирентинској боци.^[180] Како се слој етарског уља није одвојио у фирентинској боци, хидролат који је сакупљен у току једног сата (укупно *ca.* 60 L) екстрахован је диетил-етром у левку за одвајање од 2 L, у порцијама, пошто је засићен натријум-хлоридом. Спојени органски слојеви осушени су магнезијум-сулфатом и упарени у струји азота на собној температури и притиску, што је дало 6,8 g (*ca.* 0,02%) жутонаранцастог екстракта дестилационе воде (хидролата).

3.8.3. Гаснохроматографске анализе

ГЦ-МС анализе извршене су на Hewlett-Packard 6890N гасном хроматографу са капиларном кварцном колоном (DB-5MS; 5% полидифенилсилоксана, 95% полидиметилсилоксана, 30 m × 0.25 mm, дебљина филма од 0,25 μm; Agilent Technologies, Пало Алто, Калифорнија, САД) који је био спрегнут са 5975В масеним детектором. Све анализе извршене су у трипликату. Инјектор је радио на 250 °C, а интерфејс на 300 °C. Температура пећнице подизана је са 70 °C на 290 °C брзином грејања од 5 °C min⁻¹, а температурни програм се завршавао изотермалним периодом од 10 min. Хелијум је коришћен као гас носач са протоком од 1,0 mL min⁻¹. Узорци (1,0 μL етарског раствора уља или његових фракција, 1 mg/mL) су инјектовани у пулсном „сплит” моду користећи фактор раздвајања од 40:1. Проток је износио 1,5 mL min⁻¹ у првих пола минута, а затим 1,0 mL min⁻¹ за остатак анализе. Масени детектор радио је при јонизационом напону од 70 eV, у опсегу масене аквизиције од 35–650 *m/z*, са временом скенирања од 0,32 s.

ГЦ-ФИД анализе извршене су на Agilent 7890А гасном хроматографу са једним инјектором и капиларном кварцном колоном (HP-5MS; 5% полидифенилсилоксана, 95% полидиметилсилоксана, 30 m × 0,25 mm, дебљина филма од 0,25 μm; Agilent Technologies) који је био спрегнут са пламено-јонизационим детектором (FID). Све анализе извршене су у трипликату. Температура пећнице програмирана је на 15 °C min⁻¹ за распон од 150 до 300 °C, а температурни програм се завршавао са изотермалним периодом од 5 min. Азот је коришћен као гас носач са протоком од 3,0 mL min⁻¹. Инјектор је радио на 300 °C. Узорци су инјектовани у „сплитлес” моду. Параметри пламено-јонизационог детектора били су следећи: температура 300 °C, проток H₂ 30 mL min⁻¹, проток ваздуха 400 mL min⁻¹, проток допунског гаса 23,5 mL min⁻¹, а учесталост бележења сигнала је била 20 Hz.

3.8.4. Идентификација састојака

Аналити су идентификовани поређењем линеарних ретенционих индекса (RI)^[125] у односу на хомологи низ *n*-алкана на DB-5MS колони са литературним подацима, као и поређењем масених спектра с оним који су поседовали стандарди, било из лабораторијске базе масених спектра или комерцијалних база Wiley 11, NIST17 и MassFinder 2.3. Коинјекција стандарда такође је изведена где је то било могуће. Поједини састојци идентификовани су НМР анализом после изоловања.

3.8.5. Дериватизација диметил-дисулфидом

Узорци етарских уља растворени су у диметил-дисулфиду (DMDS, 0,25 mL по mg узорка) и раствору јода у диетил-етру (60 mg mL⁻¹, 0,05 mL по mg узорка). Смеша је мешана на собној температури преко ноћи. Затим је додат диетил-етар, а добијена смеша испрана 10% воденим раствором натријум-тиосулфата, сушена анхидрованим магнезијум-сулфатом, и упарена. Остатак је растворен у диетил-етру и директно анализиран помоћу ГЦ-МС.

3.8.6. Синтеза естара дуголанчаних масних киселина

Естри дуголанчаних киселина ((*Z*)-хекс-3-ен-1-ил-еикозаноат, (*Z*)-хекс-3-ен-1-ил-докозаноат и геранил-хенеикозаноат, **24–26**) синтетисани су користећи општу процедуру за Штеглихову естерификацију. Раствор (*Z*)-хекс-3-ен-1-ола или гераниола (200 mg), одговарајуће карбоксилне киселине (1,1 eq), 4-(диметиламино)пиридина (0,3 eq) и *N,N'*-дициклохексилкарбодиимида (1 eq) у метилен-хлориду (20 mL) меша се преко ноћи на собној температури. Исталожена *N,N'*-дициклохексилуреа уклони се филтрирањем, а филтрат упари. Добијени чврсти остатак пречишћава се колонском драјфлеш-хроматографијом (елуент: *n*-хексан–диетил-етар, растућа поларност). Чистоћа фракција испита се помоћу ТЛЦ-а и ГЦ-МС-а.

3.8.6.1. (*Z*)-Хекс-3-ен-1-ил-еикозаноат ((*Z*)-хекс-3-ен-1-ил-арахидат, **24**)

Принос: 83%; безбојна уљаста супстанца; РИ = 2786 (DB-5MS); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, ppm): 0,88 (t, $J = 6,7$ Hz, 3H, H-20'), 0,97 (td, $J = 7,5, 0,2$ Hz, 3H, H-6), 1,20–1,36 (више преклопљених мултиплета, 32H, H-4'–H-19'), 1,61 (tt, $J = 7,5, 7,2$ Hz, 2H, H-3'), 2,06 (qdd, $J = 7,5, 7,3, -1,6$ Hz, 2H, H-5), 2,29 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, H-2'), 2,37 (dtd, $J = 7,3, 6,9, -1,5$, 2H, H-2), 4,06 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H, H-1), 5,31 (dtt, $J = 10,8, 7,3, -1,6$, 1H, H-3), 5,50 (dttq, $J = 10,8, 7,3, -1,5, 0,2$ Hz, 1H, H-4); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 101 MHz, ppm): 14,13 (C-20'), 14,24 (C-6), 20,61 (C-5), 22,72 (C-19'), 25,00 (C-3'), 26,78 (C-2), 29,17, 29,30, 29,40, 29,49, 29,63, 29,69, 29,73 (више преклопљених сигнала), 31,96 (C-18'), 34,36 (C-2'), 63,74 (C-1), 123,81 (C-3), 134,50 (C-4), 173,92 (C-1'); ИР (ATR) ν_{max} cm^{-1} : 2959, 2914, 2844, 1738, 1464, 1388, 1314, 1285, 1270, 1253, 1238, 1164, 1111, 995, 719; ХРМС (MALDI-TOF): Израчунато за $\text{C}_{26}\text{H}_{50}\text{O}_2$: 394,3811, пронађено 394,3812; МС (EI), m/z (%): 312 (2), 295 (5), 85 (3), 83 (23), 82 (100), 71 (5), 69 (6), 67 (29), 57 (11), 55 (22), 43 (14), 41 (12).

3.8.6.2. (*Z*)-Хекс-3-ен-1-ил-докозаноат ((*Z*)-хекс-3-ен-1-ил-бехенат, **25**)

Принос: 79%; безбојна уљаста супстанца; РИ = 2987 (DB-5MS); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, ppm): 0,88 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H, H-22'), 0,97 (td, $J = 7,5, 0,3$ Hz, 3H, H-6), 1,23–1,33 (више преклопљених мултиплета, 36H, H-4'–H-21'), 1,61 (tt, $J = 7,5, 7,2$ Hz, 2H, H-3'), 2,06 (qdd, $J = 7,5, 7,3, -1,6$ Hz, 2H, H-5), 2,29 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, H-2'), 2,37 (dtd, $J = 7,3, 6,9, -1,6$, 2H, H-2), 4,06 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H, H-1), 5,32 (dtt, $J = 10,8, 7,3, -1,6$, 1H, H-3), 5,50 (dttq, $J = 10,8, 7,3, -1,6, 0,3$ Hz, 1H, H-4); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 101 MHz, ppm): 14,14 (C-22'), 14,25 (C-6), 20,65 (C-5), 22,72 (C-21'), 25,01 (C-3'), 26,80 (C-2), 29,18, 29,30, 29,39, 29,49, 29,63, 29,69, 29,73 (више преклопљених сигнала), 31,96 (C-20'), 34,39 (C-2'), 63,77 (C-1), 123,82 (C-3), 134,52 (C-4), 173,97 (C-1'); ИР (ATR) ν_{max} cm^{-1} : 2958, 2915, 2848, 1737, 1464, 1389, 1315, 1301, 1284, 1269, 1253, 1238, 1165, 1109, 994, 719; ХРМС (MALDI-TOF): Израчунато за: $\text{C}_{28}\text{H}_{54}\text{O}_2$: 422,4124, пронађено 422,4126; МС (EI), m/z (%): 340 (2), 323 (5), 97 (4), 85 (4), 83 (23), 82 (100), 81 (4), 71 (6), 69 (6), 67 (26), 57 (12), 55 (22), 43 (13), 41 (11).

3.8.6.3. Геранил-хенеикозаноат (**26**)

Принос: 75%; безбојна уљаста супстанца; РИ = 3244 (DB-5MS); ^1H НМР (CDCl_3 , 400 MHz, ppm): 0,88 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H, H-21'), 1,22–1,33 (више преклопљених мултиплета, 34H, H-4'–H-20'), 1,60 (dtq, $J = -1,5, 0,7, -0,2$, 3H, H-8), 1,62 (tt, $J = 7,5, 7,2$ Hz, 2H, H-3'), 1,68 (tdq, $J = -1,5, 0,6, -0,2$, 3H, H-9), 1,70 (dt, $J = -1,4, 0,5, -0,5$, 3H, H-10), 2,04 (AA'BB', $J = -14,3, 9,9, 6,2$, 2H, H-4), 2,10 (AA'BB', $J = -13,7, 9,9, 6,2, {}^3J_{\text{H-6}} = 7,1$, 2H, H-5), 2,30 (t, $J = 7,5$, 2H, H-2'), 4,59 (dq, $J = 7,1, 0,5$, 2H, H-1), 5,08 (tqqt, $J = 7,1, -1,5, -1,5, -0,4$, 1H, H-6), 5,34 (tqt, $J = 7,1, -1,4, -0,4$, 1H, H-2); ^{13}C НМР (CDCl_3 , 101 MHz, ppm): 14,13 (C-21'), 16,47 (C-10), 17,69 (C-8), 22,71 (C-20'), 25,04 (C-3'), 25,69 (C-9), 26,31 (C-5), 29,18, 29,30, 29,39, 29,50, 29,63, 29,68, 29,72 (више преклопљених сигнала), 31,95 (C-19'), 34,42 (C-2'), 39,55 (C-4), 61,18 (C-1), 118,45 (C-2), 123,78 (C-6), 131,83 (C-7), 142,11 (C-3), 173,96 (C-1'); ИР (ATR) ν_{max} cm^{-1} : 2922, 2852, 1736, 1456, 1379, 1350, 1164, 1119, 1076, 1045, 968, 831, 721; ХРМС (MALDI-TOF): Израчунао за $\text{C}_{31}\text{H}_{58}\text{O}_2$: 462,4437, пронађено: 462,4438; МС (EI), m/z (%): 154 (7), 137 (9), 136 (43), 129 (7), 123 (9), 122 (6), 121 (53), 111 (5), 108 (6), 107 (15), 98 (4), 97 (9), 95 (13), 94 (21), 93 (97), 92 (32), 91 (9), 85 (11), 84 (5), 83 (11), 82 (4), 81 (24), 80 (52), 79 (9), 77 (6), 73 (11), 71 (17), 70 (9), 69 (100), 68 (44), 67 (18), 60 (9), 57 (27), 56 (6), 55 (24), 53 (7), 43 (34), 42 (5), 41 (42).

3.8.7. Фракционисање екстракта дестилационе воде

Део екстракта (3,15 g) подвргнут је колонској драјфлеш-хроматографији на силикагелу чиме је добијено 45 фракција. Примењено је градијентно елуирање смешом *n*-хексан–диетил-етар (100:0 до 0:100, v/v), праћено елуирањем чистим етил-ацетатом. Добијене фракције су, одмах по упаравању, анализирани помоћу ТЛЦ-а и ГЦ-МС-а. Девета фракција (спрана са елуентом *n*-хексан–диетил-етар 95:5, v/v), односно тридесетдруга фракција (спрана са елуентом *n*-хексан–диетил-етар 85:15, v/v) садржале су бензил-3-метилбут-3-еноат (**27**, 37 mg), односно *транс*-хотриенол (201 mg), док је четрдесетдруга фракција (спрана са чистим етил-ацетатом) садржала *транс*-ходиендиол (80 mg).

3.8.7.1. Бензил-3-метилбут-3-еноат (бензил-изосенециоат, **27**)

Безбојна уљаста супстанца; РИ = 1409 (DB-5MS); НМР: в. табелу 4.2.2; ИР (ATR) ν_{max} cm^{-1} : 2929, 1735, 1651, 1498, 1455, 1376, 1330, 1234, 1144, 1028, 997, 896, 827, 747, 696; ХРМС (MALDI-TOF): Израчунао за $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2$: 190,0994, пронађено: 190,0991; МС (EI), m/z (%): 190 (1, M^+), 131 (5), 130 (12), 107 (4), 92 (9), 91 (100), 89 (5), 77 (6), 65 (12), 55 (5), 51 (5).

3.8.7.2. (*E*)-3,7-Диметилокта-1,5,7-триен-3-ол (*транс*-хотриенол)

Безбојна уљаста супстанца; РИ = 1108 (DB-5MS); НМР: в. табелу 4.2.3; ИР (ATR) ν_{max} cm^{-1} : 3301, 2925, 2870, 1654, 1610, 1513, 1448, 1412, 1369, 1223, 1170, 1107, 1043, 1022, 990, 920, 836, 729; ХРМС (MALDI-TOF): Израчунао за $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$: 152,1201, пронађено: 152,1199;

МС (EI), m/z (%): 134 (1), 119 (2), 91 (5), 83 (5), 82 (61), 81 (9), 79 (10), 77 (6), 72 (4), 71 (100), 67 (34), 65 (5), 55 (14), 53 (12), 51 (5), 43 (58), 41 (21).

3.8.7.3. (E)-2,6-Диметилוקта-3,7-диен-2,6-диол (*транс*-ходиендиол)

Безбојна уљаста супстанца; РИ = 1189 (DB-5MS); НМР: в. табелу 4.2.3; ИР (ATR) ν_{\max} cm^{-1} : 3648, 3395, 2977, 2886, 1641, 1516, 1480, 1328, 1223, 1053, 993, 922, 899; ХРМС (MALDI-TOF): Израчунато за $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2$: 170,1307, пронађено: 170,1306; МС (EI), m/z (%): 137 (1), 134 (2), 119 (4), 109 (2), 91 (6), 85 (9), 83 (8), 82 (100), 71 (87), 69 (7), 67 (58), 55 (20), 43 (73), 41 (21).

3.8.8. Синтеза сенециоата и изосенециоата

Сенециоати и изосенециоати синтетисани су користећи општу процедуру Штеглихове естерификације. Раствор (Z)-хекс-3-ен-1-ола или 2-фенилетан-1-ола (200 mg), сенецио-киселине (1,1 eq), 4-(диметиламино)пиридина (0,3 eq) и N,N' -дициклохексилкарбодиимида (1 eq) у метилен-хлориду (20 mL) меша се преко ноћи на собној температури. Исталожена N,N' -дициклохексилуреа уклони се филтрирањем, а филтрат упари. Добијени чврсти остатак пречишћава се колонском драјфлеш-хроматографијом (елуент: *n*-хексан–диетил-етар, растућа поларност). Чистоћа фракција испита се помоћу ТЛЦ-а, ГЦ-МС-а и НМР-а; 74 mg (Z)-хекс-3-ен-1-ил-естара (98:2 однос сенециоат–изосенециоат) и 70 mg фенетил-естара (98:2 однос сенециоат–изосенециоат) је добијено.

3.8.8.1. (Z)-Хекс-3-ен-1-ил-3-метилбут-2-еноат ((Z)-хекс-3-ен-1-ил-сенециоат, **28**)

Безбојна уљаста супстанца; РИ = 1329 (DB-5MS); ^1H НМР (CDCl_3 , 400 MHz, ppm): 0,97 (td, $J = 7,5, 0,4$, 3H, H-6'), 1,89 (dd, $J = -1,4, -0,2$, 3H, H-4), 2,06 (qdd, $J = 7,5, 7,3, -0,8$, 2H, H-5'), 2,16 (qd, $J = -1,3, -0,2$, 3H, H-5), 2,39 (dt, $J = 7,3, 6,0, -0,8$, 2H, H-2'), 4,08 (t, $J = 6,9$, 2H, H-1'), 5,34 (dttq, $J = 10,8, 7,3, -0,8, 0,4$, 1H, H-4'), 5,50 (dqt, $J = 10,8, 7,3, -0,8$, 1H, H-3'), 5,67 (tt, $J = -1,4, -1,3$, 1H, H-2); ^{13}C НМР (CDCl_3 , 101 MHz, ppm): 14,2 (C-6'), 20,2 (C-5), 20,6 (C-5'), 26,9 (C-2'), 27,4 (C-4), 63,1 (C-1'), 116,1 (C-2), 124,0 (C-4'), 134,4 (C-3'), 156,6 (C-3), 166,8 (C-1); ИР (ATR, cm^{-1}): 2942, 1715, 1651, 1605, 1497, 1453, 1377, 1347, 1272, 1225, 1140, 1076, 1031, 1001, 850, 744; ХРМС (MALDI-TOF): Израчунато за $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_2$: 182,1307, пронађено: 182,1305; МС (EI), m/z (%): 101 (9), 84 (5), 83 (100), 82 (48), 81 (3), 67 (39), 55 (30), 54 (5), 53 (8), 41 (12).

3.8.8.2. (Z)-Хекс-3-ен-1-ил-3-метилбут-3-еноат ((Z)-хекс-3-ен-1-ил-изосенециоат, **29**)

РИ = 1249 (DB-5MS); НМР: в. табелу 4.2.2; МС (EI), m/z (%): 141 (12), 83 (41), 82 (86), 81 (8), 67 (73), 55 (100), 54 (8), 53 (9), 41 (30), 40 (12).

3.8.8.3. 2-Фенилетил-3-метилбут-3-еноат (фенетил-изосенециоат, **30**)

РИ = 1508 (DB-5MS); НМР: в. табелу 4.2.2; МС (EI), m/z (%): 106 (2), 105 (35), 104 (100), 103 (8), 91 (14), 83 (5), 77 (9), 65 (5), 55 (20), 51 (3).

3.8.9. Синтеза имиња

Смеша свеже предестилованог бензалдехида (335 mg, 1,1 eq), хидрохлорида метил-L-изолеуцината ((2*S*,3*S*)-3-метил-1-метокси-1-оксопентан-2-амонијум-хлорид) или метил-L-леуцината ((*S*)-4-метил-1-метокси-1-оксопентан-2-амонијум-хлорид), припремљених према литературном поступку,^[181] (500 mg, 1 eq), триетиламина (425 μ L, 1,1 eq) и анхидрованог натријум-сулфата (1 g) у сувом метилен-хлориду (30 mL) меша се преко ноћи на собној температури. Натријум-сулфат се уклони филтрирањем, а филтрат упари. Добијени чврсти остатак пречишћава се колонском драјфлеш-хроматографијом (елуент: *n*-хексан–диетил-етар 9:1, *v/v*).

3.8.9.1. Метил-(2*S*,3*S*)-2-(бензилиденамино)-3-метилпентаноат (*N*-бензилиден-метил-L-изолеуцинат, **31**)

Принос: 32%; безбојна уљава супстанца; РИ = 1697 (DB-5MS); ¹H НМР (DMSO-*d*₆, 400 MHz, ppm): 0,85 (ddqd, $J = 7,6, 7,4, -0,4, -0,3$, 3H, H-5), 0,88 (dqdd, $J = 6,8, -0,4, -0,3, -0,2$, 3H, H-6), 1,11 (ddqd, $J = -13,6, 9,0, 7,4, -0,2$, 1H, H-4a), 1,43 (dqdd, $J = -13,6, 7,6, 4,0, -0,3$, 1H, H-4b), 2,04 (ddqdd, $J = 9,0, 7,0, 6,8, 4,0, -0,3$, 1H, H-3), 3,66 (s, 3H, OCH₃), 3,85 (dd, $J = 7,0, -0,3$, 1H, H-2), 7,47 (dddd, $J = 7,8, 7,5, 0,5, 0,4$, 2H, H-4' и H-6'), 7,50 (ttt, $J = 7,5, 1,3, -0,4$, 1H, H-5'), 7,77 (dddd, $J = 7,8, 1,3, 0,5, -0,4$, 2H, H-3' и H-7'), 8,37 (ttt, 0,4, -0,4, -0,4, 1H, H-1'); ¹³C НМР (DMSO-*d*₆, 101 MHz, ppm): 11,4 (C-5), 16,1 (C-6), 25,06 (C-4), 37,9 (C-3), 52,1 (OCH₃), 78,1 (C-2), 128,7 (C-3' и C-7'), 129,2 (C-4' и C-6'), 131,6 (C-5'), 136,1 (C-2'), 164,1 (C-1'), 172,1 (C-1), ИР (ATR) ν_{\max} cm⁻¹: 2957, 2864, 1736, 1708, 1642, 1599, 1580, 1459, 1391, 1264, 1186, 1159, 1129, 970, 798, 706; ХРМС (MALDI-TOF): Израчунао за C₁₄H₁₉NO₂: 233,1416, пронађено 233,1417; МС (EI), m/z (%): 232 (1), 204 (1), 174 (100), 144 (10), 132 (11), 117 (54), 106 (18), 91 (22), 77 (7), 69 (8), 51 (3), 41 (10).

3.8.9.2. Метил-(*S*)-2-(бензилиденамино)-4-метилпентаноат (*N*-бензилиден-метил-L-леуцинат)

Принос: 44%; безбојна уљава супстанца; РИ = 1699 (DB-5MS); ¹H НМР (DMSO-*d*₆, 400 MHz, ppm): 0,87 (dtq, $J = 6,6, -0,2, -0,2$, 3H, H-5), 0,90 (dtq, $J = 6,7, -0,2, -0,2$, 3H, H-6), 1,47 (tqq, $J = 7,0, 6,7, 6,6$, 1H, H-4), 1,73 (ddqq, $J = 7,1, 7,0, -0,2, -0,2$, 2H, H-3a и H-3b), 3,65 (s, 3H, OCH₃), 4,14 (t, $J = 7,1$, 1H, H-2), 7,47 (dddd, $J = 8,4, 7,9, 0,5, 0,3$, 2H, H-4' и H-6'), 7,50 (ttt, $J = 8,4, 1,2, -0,2$, 1H, H-5'), 7,78 (dddd, $J = 7,9, 1,2, 0,5, -0,4$, 2H, H-3' и H-7'), 8,43 (ttt, $J = -0,4, 0,3, -0,2$, 1H, H-1'); ¹³C НМР (DMSO-*d*₆, 101 MHz, ppm): 21,3 (C-5), 22,90 (C-6), 24,0 (C-4), 41,5 (C-3), 51,8 (OCH₃), 70,1 (C-2), 128,1 (C-3' и C-7'), 128,7 (C-4' и C-6'), 131,1 (C-5'), 135,5 (C-2'), 163,4 (C-1'), 172,1 (C-1), ИР (ATR) ν_{\max} cm⁻¹: 2953, 2869, 1735, 1702, 1640, 1598,

1580, 1467, 1451, 1435, 1385, 1368, 1271, 1253, 1196, 1167, 1142, 1023, 974, 752, 692; ХРМС (MALDI-TOF): Израчунато за $C_{14}H_{19}NO_2$: 233,1416, пронађено: 233,1418; МС (EI), m/z (%): 232 (1), 218 (2), 190 (2), 177 (16), 174 (100), 146 (20), 131 (25), 117 (43), 105 (25), 91 (36), 77 (12), 41 (10).

3.8.10. Укрштена алдолна кондензација ацетона са хептан-2-оном или 5-метилхексан-2-оном

Раствору хептан-2-она или 5-метилхексан-2-она (200 mg, 1,75 mmol) у ацетону (10 mL) додат је 10% (m/m) раствор калијум-хидроксида у метанолу (0,5 mL). По мешању преко ноћи на собној температури реакциона смеша се концентрује на ротационом вакуум-упаривачу до запремине од око 1 mL, која се, по разблаживању, анализира гасном хроматографијом.

3.8.10.1. 2-Метилнон-2-ен-4-он

РИ = 1180 (DB-5MS); МС (EI), m/z (%): 154 (1), 139 (2), 125 (1), 111 (3), 98 (16), 83 (100), 77 (1), 67 (1), 55 (25), 53 (5), 43 (4), 41 (7).

3.8.10.2. 2,7-Диметилхект-2-ен-4-он

РИ = 1146 (DB-5MS); МС (EI), m/z (%): 154 (1), 139 (2), 111 (3), 98 (20), 83 (100), 79 (3), 77 (2), 67 (1), 55 (24), 53 (5), 43 (6), 41 (9).

3.8.11. Синтеза 5-оксолиналола

5-Оксолиналол (6-хидрокси-2,6-диметилхект-2,7-диен-4-он) је синтетисан према претходно описаном поступку.^[182]

Принос: 79%; безбојна уљаста супстанца; РИ = 1215 (DB-5MS); 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, ppm): 6,03 (dddd, 1H, H-3, $J = -1,6, -1,5, -1,2, -1,1$), 5,92 (dd, 1H, H-7, $J = 17,2, 10,7$), 5,23 (dd, 1H, pro-Z H-8, $J = 17,2, 1,2$), 5,02 (dd, 1H, pro-E H-8, $J = 10,7, 1,2$), 2,69 (dd, 1H, H-5a, $J = -16,5, -1,1$), 2,65 (dd, 1H, H-5b, $J = -16,5, -1,6$), 2,13 (d, 3H, H-1b, $J = -1,2$), 1,88 (d, 3H, H-1a, $J = -1,5$), 1,29 (s, 3H, 6- CH_3); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 101 MHz, ppm): 201,7 (C-4), 157,7 (C-2), 144,2 (C-7), 124,4 (C-3), 112,1 (C-8), 73,4 (C-6), 52,6 (C-5), 28,9 (6- CH_3), 27,6 (C-1), 22,5 (2- CH_3); ХРМС (MALDI-TOF): Израчунато за $C_{10}H_{16}O_2$: 168,1150, пронађено 168,1154; МС (EI) m/z (%): 168 (0,2), 153 (5), 150 (2), 135 (3), 126 (2), 111 (3), 108 (2), 107 (4), 98 (11), 84 (5), 83 (100), 82 (12), 79 (3), 71 (14), 68 (5), 55 (27), 53 (6), 43 (31).

3.8.12. Идентификација имиња из диетил-етарског испирка цветова

Двадесет свеже убраних цветова *S. nigra* сукцесивно су потапани у диетил-етар (200 mL) уз дејство ултразвука у трајању од по 5 s. Добијени испирак је филтриран, а растварач

уклоњен у струји азота на собној температури и притиску, што је дало 460 mg жутог екстракта. По његовој ГЦ-МС анализи идентификована су једињења **32–44**.

3.8.12.1. Метил-2-(етилиденамино)-3-метилпентаноат (*N*-етилиден-метил-изолеуцинат, **32**)

РИ = 1127 (DB-5MS); МС (EI), m/z (%): 114 (27), 112 (100), 101 (6), 83 (16), 73 (11), 69 (20), 59 (32), 55 (31), 44 (29), 41 (24).

3.8.12.2. Метил-2-(хексилиденамино)-3-метилпентаноат (*N*-хексилиден-метил-изолеуцинат, **33**)

РИ = 1489 (DB-5MS); МС (EI), m/z (%): 184 (7), 168 (85), 115 (27), 112 (100), 69 (27), 54 (20), 41 (34).

3.8.12.3. Метил-2-(хептилиденамино)-3-метилпентаноат (*N*-хептилиден-метил-изолеуцинат, **34**)

РИ = 1579 (DB-5MS); МС (EI), m/z (%): 240 (1), 184 (25), 182 (88), 171 (17), 156 (30), 115 (29), 114 (31), 112 (100), 69 (35), 55 (11), 41 (40).

3.8.12.4. Метил-2-(октилиденамино)-3-метилпентаноат (*N*-октилиден-метил-изолеуцинат, **35**)

РИ = 1675 (DB-5MS); МС (EI), m/z (%): 196 (79), 171 (23), 156 (33), 138 (13), 115 (37), 114 (31), 112 (100).

3.8.12.5. Метил-2-(нонилиденамино)-3-метилпентаноат (*N*-нонилиден-метил-изолеуцинат, **36**)

РИ = 1772 (DB-5MS); МС (EI), m/z (%): 268 (1), 171 (19), 156 (31), 142 (19), 129 (19), 115 (29), 112 (100), 69 (34), 55 (10), 41 (36).

3.8.12.6. Метил-2-(децилиденамино)-3-метилпентаноат (*N*-децилиден-метил-изолеуцинат, **37**)

РИ = 1871 (DB-5MS); МС (EI), m/z (%): 224 (100), 171 (28), 166 (16), 129 (20), 115 (34), 112 (95), 69 (37).

3.8.12.7. Метил-2-(додэцилиденамино)-3-метилпентаноат (*N*-додэцилиден-метил-изолеуцинат, **38**)

РИ = 2068 (DB-5MS); МС (EI), m/z (%): 252 (69), 171 (25), 156 (31), 142 (12), 115 (28), 114 (11), 112 (100), 41 (43).

3.8.12.8. Метил-2-(тетрадецилиденамино)-3-метилпентаноат (*N*-тетрадецилиден-метил-изолеуцинат, **39**)

РИ = 2267 (DB-5MS); МС (EI), m/z (%): 338 (1), 280 (71), 184 (9), 171 (34), 156 (35), 142 (12), 115 (34), 112 (100), 69 (21), 41 (23).

3.8.12.9. Метил-2-(пентадецилиденамино)-3-метилпентаноат (*N*-пентадецилиден-метил-изолеуцинат, **40**)

РИ = 2367 (DB-5MS); МС (EI), m/z (%): 294 (100), 152 (38), 142 (64), 112 (90).

3.8.12.10. Метил-2-(хексадецилиденамино)-3-метилпентаноат (*N*-хексадецилиден-метил-изолеуцинат, **41**)

РИ = 2467 (DB-5MS); МС (EI), m/z (%): 308 (71), 280 (3), 184 (9), 171 (42), 156 (33), 142 (12), 115 (34), 114 (12), 112 (100), 98 (3), 88 (5), 59 (7), 43 (12).

3.8.12.11. Метил-2-(октадецилиденамино)-3-метилпентаноат (*N*-октадецилиден-метил-изолеуцинат, **42**)

РИ = 2669 (DB-5MS); МС (EI), m/z (%): 336 (72), 308 (5), 184 (8), 171 (55), 156 (36), 142 (13), 129 (20), 115 (35), 112 (100), 102 (4), 88 (5), 59 (5), 41 (11).

3.8.12.12. Метил-2-(еикозилиденамино)-3-метилпентаноат (*N*-еикозилиден-метил-изолеуцинат, **43**)

РИ = 2871 (DB-5MS); МС (EI), m/z (%): 422 (2), 364 (77), 308 (4), 184 (9), 171 (61), 156 (36), 142 (13), 129 (20), 115 (34), 112 (100), 69 (20), 55 (15), 43 (24).

3.8.12.13. Метил-2-(докозилиденамино)-3-метилпентаноат (*N*-докозилиден-метил-изолеуцинат, **44**)

РИ = 3072 (DB-5MS); МС (EI), m/z (%): 392 (45), 364 (4), 171 (60), 156 (30), 142 (16), 112 (100), 69 (39), 55 (32).

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. Синтеза и биолошка испитивања конјугата стероида са фероценом

4.1.1. Синтеза конјугата естра-1,3,5(10)-триенских стероида са фероценом и њихово испитивање на антипролиферативну активност

Током наших претходних радова^[183] започели смо истраживања о алкиловању А-прстена естрадиола (**E2**) и естрона (**E1**) (фероценилметил)триметилмонијум-јодидом (**1**).^[173] Реакција фероценилметиловања овом сољу, праћена издвајањем триметиламина, добро је позната и извођена је са различитим нуклеофилима.^[184,185] Било је очекивано да ће стероидни феноксид наградити фероценилметил-етарске конјугате, а реакција је изведена у *N,N*-диметилформамиду (DMF), као апротичном, и метанолу, као протичном растварачу, уз употребу калијум-карбоната као базе. Исходи изведених реакција дати су на схеми 4.1.1.1.

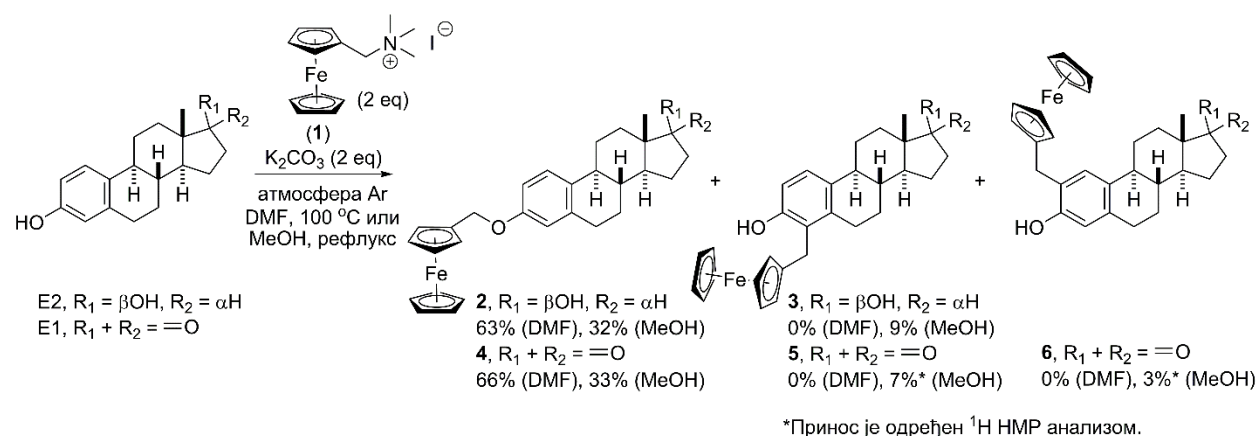


Схема 4.1.1.1. Фероценилметиловање естрадиола (**E2**) и естрона (**E1**).

Реакције **E2** и **E1** са метјодидом **1** у *N,N*-диметилформамиду искључиво су дале производе *O*-фероценилметиловања, а етри **2** и **4** су добијени у умереним приносима (63%, односно 66%). Ова једињења су добијена у нешто нижим приносима (32%, односно 33%) из смеше производа ове реакције у метанолу. Изузев ових етара, у метанолу су настајали и производи *C*-фероценилметиловања. Док је 4-(фероценилметил)-дериват **3** добијен у приносу од 9% из **E2**, смеша једињења **5** и **6** у количинском односу 7:3 добијена је из естрона у укупном приносу од 10%. Ова смеша региоизомера није се могла раздвојити колонском хроматографијом на силика-гелу нормалне фазе. У случају хроматографије на гелу Sephadex LH-20 уочено је раздвајање, али с обзиром на добијену количину није било могуће добити довољно чистих узорака ова два једињења, те је смеша **5** и **6** коришћена приликом хемијске карактеризације и биолошких испитивања.

Познато је да су α -металоценил-карбокатијони термодинамички стабилне врсте. Иако потпуни увид недостаје, према посредним експерименталним подацима чини се да се ова реакција одвија по S_N1 механизму.^[185] Док је *O*-фероценилметиловање фенола (самог фенола и 2-нафтола) (фероценилметил)триметиламонијум-јодидом претходно изведено, *S*-алкиловани производи нису изоловани.^[186] Познато је да у протичним растварачима нуклеофилност феноксидног јона смањена као последица водоничног везивања, што свакако може поспешити *S*-алкиловање. Ово би могло објаснити настајање производа **3**, **5** и **6** приликом фероценилметиловања у метанолу. Приноси производа сугеришу да се *S*-алкиловање лакше одвија у положају 4 стероидног скелета. Другачије објашњење уочене реактивности би подразумевало реакцију која укључује једноелектронски процес који би претходно поменуто водонично везивање убрзало у односу на конвенционални S_N1 процес. Другим речима, трансфер електрона са електронима богатог феноксида на фероценилметил-катијон дало би два стабилна радикала. Инхерентна *S*-реактивност била би израженија код феноксидног радикала него код анијона, што би довело до *S*-алкиловања. Када је реакција извођена у одсуству заштитне атмосфере аргона, кисеоник је вероватно ометао радикалски механизам, па су приноси *S*-алкилованих производа били смањени и износили мање од 5%. Верујемо да су оба механизма могућа и да реакциони услови одређују који од два процеса преовладава.

Структуре једињења **2–6** потврђене су ИР, УВ–Вис, 1Д и 2Д НМР спектроскопијом, а за једињења **4** и **5** и рендгеноструктурном анализом. Молекулске формуле једињења потврђене су резултатима масене спектрометрије високе резолуције (Δ вредности за **2–6** су +0,1, +0,2, 0, +0,3 mи, редом). Присуство или одсуство хидроксилних група (*ca.* 3400 cm^{-1}) било је очигледно из ИР спектра. УВ–Вис спектри једињења **2–6** били су прилично слични и садржали су врло широку и слабу траку на *ca.* 440 nm која се јавља као последица два прелаза електрона из фероцена, $^1A_{1g} \rightarrow a^1E_{1g}$ и $^1A_{1g} \rightarrow ^1E_{2g}$ и она је узрок наранџасте боје ових једињења.^[187] Слаба али ужа трака која потиче од $^1A_{1g} \rightarrow b^1E_{1g}$ прелаза јавља се на *ca.* 320 nm. У опсегу 210–300 nm јављају се два апсорпциона максимума, један на 280 nm који одговара $\pi \rightarrow \pi^*$ прелазима естра-1,3,5(10)-триенског ароматичног А прстена, а други на *ca.* 230 nm који највероватније потиче од преклопљених трака крајњих апсорпција фероценских ароматичних прстенова и стероидног ароматичног прстена.

Потпуна асигнација ^1H и ^{13}C НМР спектра једињења **2–6** дата је у табелама 4.1.1.1 и 4.1.1.2. Протонски НМР спектри свих једињења могу се поделити на три главне регије. Протони ароматичног А прстена јављају се на 6,5–7,25 ppm, протони фероценских прстенова на 4,0–5,0 ppm, а протони везани за sp^3 -угљенике стероидног језгра на 0,5–3,0 ppm. Кључне НМВС и NOESY корелације које показују положаје супституције А прстена приказане су на слици 4.1.1.1.

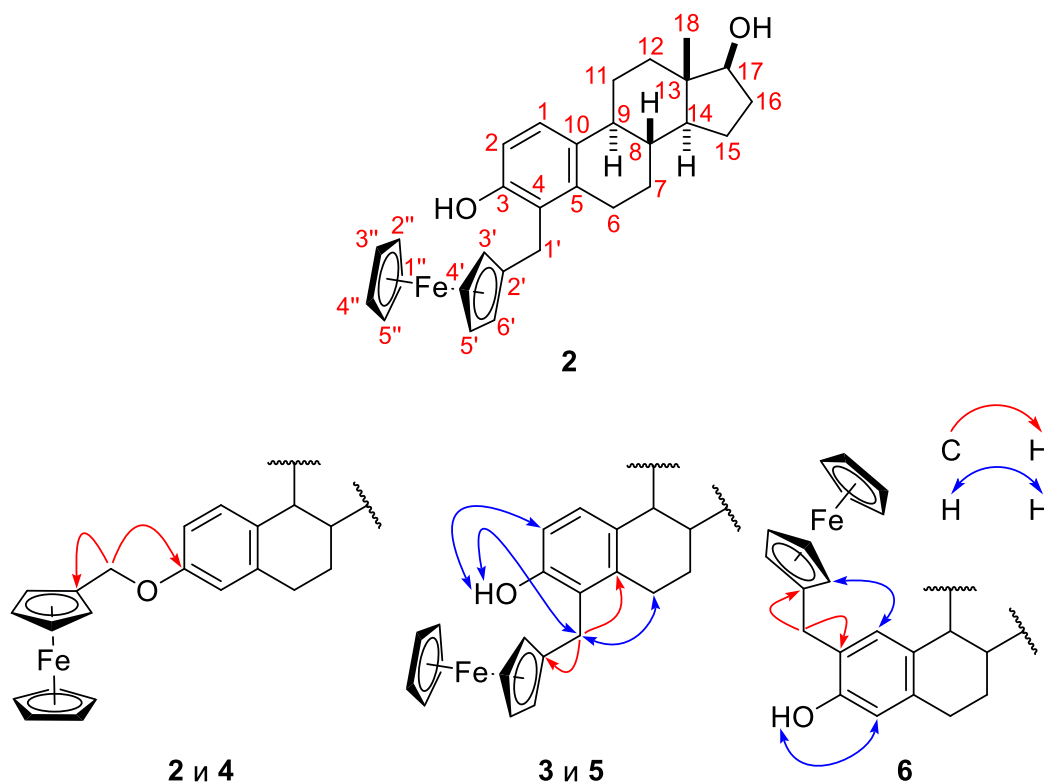
Табела 4.1.1.1. ^1H НМР хемијска померања (ppm) једињења **2–6** у CDCl_3 (400 MHz); константе спрезања дате су у заградама (у Hz).

Положај	2	3	4	5	6
1	7,21 d (8,6)	7,05 d (8,4)	7,21 d (8,5)	7,03 d (8,4)	6,95 s
2	6,75 dd (8,6, 2,6)	6,63 d (8,4)	6,77 dd (8,5, 2,6)	6,61 d (8,4)	/
3–ОН	/	4,92 m	/	4,99 s	4,90 s
4	6,68 d (2,6)	/	6,70 d (2,6)	/	6,48 s
6 α		2,92 dd (17,1, 5,0)		2,98 dd (17,1, 5,5)	
6 β	2,81–2,93	2,74 ddd (17,1, 11,4, 6,7)	2,88–2,93	2,78 ^k	2,79–2,85 ^k
7 α	1,32 ^e	1,29 ^e	1,48 ^u	1,40 ^b	1,40 ^b
7 β	1,88 dddd (12,6, 5,7, 2,6, 2,6)	1,93 ^f	2,04 ^z	2,06 ^z	1,98 ^z
8	1,44 ^e	1,37 ^e	1,61 ^u	1,49 ^b	1,55 ^b
9	2,19 ^g	2,17 ^d	2,27 ddd (10,6, 10,6, 4,1)	2,23 ^z	2,23 ^z
11 α	2,32 dddd (13,1, 3,7, 3,7, 3,3)	2,28 dddd (13,2, 3,8, 3,8, 3,4)	2,42 dddd (11,9, 3,7, 3,7, 3,1)	2,35 ^z	2,35 ^z
11 β	1,48 ^e	1,46 ^e	1,53 ^u	1,44 ^b	1,44 ^b
12 α	1,28 ^e	1,27 ^e	1,52 ^u	1,49 ^b	1,49 ^b
12 β	1,95 ddd (12,6, 3,3, 3,3)	1,93 ^h	1,98 ^z	2,00 ^z	2,00 ^z
14	1,18 ^e	1,15 ^e	1,56 ^u	1,50 ^b	1,50 ^b
15 α	1,70 dddd (12,4, 9,8, 6,9, 3,0)	1,70 dddd (12,4, 10,0, 7,3, 3,1)	2,09 ^z	2,04 ^z	2,04 ^z

наставак табеле 4.1.1.1.

Положај	2	3	4	5	6
15 β	1,37 ^e	1,35 ^e	1,65 ^u	1,61 ^b	1,61 ^b
16 α	2,11 ^b	2,12 ^d	2,16 ³	2,13 ^t	2,13 ^t
16 β	1,48 ^e	1,48 ^e	2,51 dd (18,8, 8,5)	2,50 dd (18,8, 8,6)	2,50 dd (18,8, 8,6)
17	3,74 m	3,73 ²	/	/	/
18	0,78 s	0,76 s	0,91 s	0,89 s	0,89 s
1'	4,75 s	3,72 s ²	4,75 s	3,71 d (15,5) 3,76 d (15,5)	3,66 s
3', 6'	4,31 m	4,20 m	4,32 m	4,32 m	4,22 ^j
4', 5'	4,19 ^a	4,03 m	4,19 ^h	4,13 m	4,15 m
1''–5''	4,19 s ^a	4,15 s	4,19 s ^h	4,25 s	4,22 s ^j

a–b – групе преклопљених сигнала



Слика 4.1.1.1. Нумерација атома илустрована на примеру једињења **2** и одабране НМВС-корелације (црвене стрелице) и NOESY-корелације (плаве стрелице) једињења **2–6**.

Табела 4.1.1.2. ^{13}C НМР хемијска померања (ppm) једињења **2–6** у CDCl_3 (101 MHz).

Положај	2	3	4	5	6
1	126,29	124,16	126,33	124,16	127,21
2	112,23	112,92	112,35	113,02	131,91
3	156,83	151,59	156,99	151,69	151,41
4	114,64	133,08	114,76	132,47	115,56
5	137,95	136,02	137,74	135,81	135,80
6	29,82	27,12	29,71	26,97	29,07
7	27,27	27,39	26,61	26,69	26,55
8	38,86	37,99	38,41	37,53	38,39
9	43,98	44,32	44,03	44,34	43,97
10	132,72	125,76	132,13	125,86	125,00
11	26,32	26,54	25,96	26,14	25,97
12	36,72	36,73	31,63	31,59	31,59
13	43,27	43,16	48,05	47,94	48,03
14	50,05	50,09	50,44	50,46	50,40
15	23,13	23,10	21,63	21,57	21,57
16	30,62	30,64	35,92	35,92	35,89
17	81,94	81,94	220,99	221,09	221,09
18	11,06	11,03	13,90	13,83	13,87
1'	66,48	25,58	66,52	25,58	30,45
2'	82,98	87,42	82,91	87,89	87,53
3', 6'	69,11	68,80	69,13	69,10	68,83
4', 5'	68,57	67,19/67,08	68,60	67,45/67,31	67,89/67,84
1''–5''	68,62	68,87	68,64	69,22	69,05

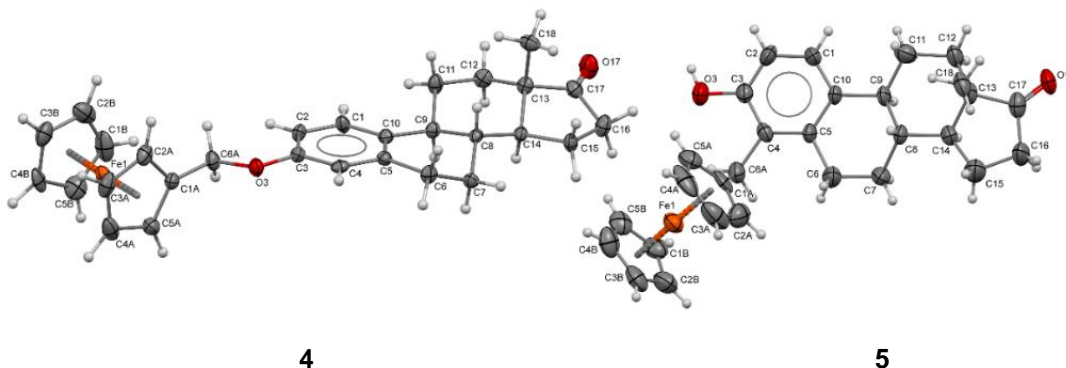
^1H НМР спектри једињења **2** и **4** поседовали су спински систем који чине три сигнала карактеристична за 1,3,4-трисупституисана ароматична језгра: 1,2-спрегнут дублет (8,5 Hz, H-1), 1,3-спрегнут дублет (2,6 Hz, H-4), и одговарајући дублет дублета (H-2). У случају једињења **3** и **5** постојала су само два 1,2-спрегнута дублета у регији ^1H НМР спектра која садржи сигнале ароматичних прстенова. На нижем пољу налазио се сигнал који потиче од H-1 језгра, које уједно показује и NOE интеракцију са језгром за које је касније установљено

да је H-11 α . На вишем пољу био је сигнал који потиче од H-2. ^1H НМР спектар једињења **6** садржао је у овој регији два синглета који су асигнирани на сличан начин.

Распоред сигнала који одговарају магнетно нееквивалентним протонима моносупституисаног циклопентадиенилног прстена био је истоветан код свих једињења: H-3' и H-6' били су изохрони, као и H-4' и H-5', вероватно услед даљине стереоцентра на C-8 и C-9. У ^1H НМР спектрима једињења **2** и **4** сигнали H-4' и H-5' били су преклопљени са сигнаlima H-1''–5''. Дијастереотопни метиленски водоници на C-1' случајно су били изохрони у свим једињењима изузев једињења **4**, где су чинили АВ кватрет.

Као и код многих других стероидних молекула, регија у којој је постојало значајно преклапање сигнала јављала се на 1,0–2,5 ppm, што је отежавало асигнацију и анализу мултиплета из овог дела ^1H НМР спектра. Овакве потешкоће се могу пренебрегнути ослањањем на корелације разлучених ^1H НМР сигнала (као што су сигнали језгара А прстена и ангуларне метил-групе) са одговарајућим ^{13}C НМР сигнаlima. Како у ^{13}C НМР спектрима стероида обично нема значајних преклапања, хемијска померања преклопљених сигнала који потичу од водоникових језгара могу се одредити на основу HSQC спектра. Оријентација дијастереотопних водоникових атома стероидног скелета може се одредити анализом мултиплета и помоћу NOESY-спектра. Користећи овакав алгоритам извршена је потпуна асигнација ^1H и ^{13}C НМР спектра једињења **2–6**, а хемијска померања била су у складу са претходно познатим вредностима за сродна једињења.^[188,189]

Једињење **4** лако је кристалисало из хлороформа приликом спорог испаравања растварача, а кристали који су добијени на овај начин показали су се погодним за рендгеноструктурну анализу. Приликом покушаја да се смеша једињења **5** и **6** раздвоји прекристаллизацијом из хлороформа добијена је мања количина кристала, за које је касније установљено да их чине молекули једињења **5**. Молекулске структуре једињења **4** и **5** добијене дифракцијом рендгенских зрака на монокристалу приказане су на слици 4.1.1.2. Увид у структуру стероидног скелета ових једињења добијен је одређивањем параметара набирања прстенова.^[190,191] Израчунавање је вршено у свим случајевима у смеру казаљке на сату, почињући од угљениковог атома с најнижим бројем, по критеријумима које је поставио Бојенс.^[192] Прстен А је планаран у обе структуре,



Слика 4.1.1.2. Молекулске структуре једињења **4** и **5** добијене дифракцијом рендгенских зрака на монокристалу.

прстен В у једињењу **4** поседује конформацију која је најближа $7\alpha,8\beta$ -полустолици (4H_5), док је у једињењу **5** приближно 8β -коверта (4E) са значајним карактером полустолице. Ова разлика се може приписати положају стерно захтевне фeroценилметил групе у једињењу **5**. Прстен С је скоро савршена $8\beta,12\alpha$ -столица (1C_4) у оба молекула, а прстен D 14α -коверта (E_5).

Испитан је утицај једињења **2–6** на одабраним ћелијским линијама канцера укључујући аденокарцином дојке позитиван на естрогене рецепторе (MCF-7), аденокарцином дојке негативан на естрогене рецепторе (MDA-MB-231), канцер простате негативан на андрогене рецепторе (PC-3), канцер грлића материце (HeLa), аденокарцином дебелог црева (HT-29) и аденокарцином плућа (A549). Фибробласти плућа фетуса (MRC-5) коришћени су као контролна човечја неканцерска ћелијска линија. За потребе ових експеримената коришћена је смеша једињења **5** и **6** (у количинском односу 7:3). *In vitro* антипролиферативна активност одређена је 72 h по третирању ћелија помоћу МТТ-теста. Лек доксорубицин (DOX) коришћен је као позитивна контрола.

Резултати ових експеримената сумирани су у табели 4.1.1.3. Ниједан од тестираних конјугата стероида са фeroценом није испољио цитотоксичност према MRC-5 ћелијама. Изузев два случаја, ова једињења нису показала значајну антипролиферативну активност према PC-3, HeLa, HT-29, и A549 ћелијским линијама, јер су њихове IC_{50} вредности за њих биле веће од 100 μM . Изузетак је била активност смеше једињења **5** и **6** према PC-3 ($IC_{50} = 27 \mu\text{M}$), и активност **3** према A549 (84 μM).

Табела 4.1.1.3. Антипролиферативне активности једињења **2–6** и доксорубицина (DOX) изражене у $IC_{50} \pm$ стандардна девијација.

Једињења	IC_{50} (μM)						
	MCF-7	MDA-MB-231	PC-3	HeLa	HT-29	A549	MRC-5
2	20 ± 4	49 ± 7	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
3	$0,34 \pm 0,05$	> 100	> 100	> 100	> 100	84 ± 22	> 100
4	> 100	60 ± 4	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
5+6	> 100	64 ± 9	27 ± 9	> 100	> 100	> 100	> 100
DOX	$0,69 \pm 0,09$	$0,15 \pm 0,04$	94 ± 12	$1,52 \pm 0,17$	$0,14 \pm 0,05$	8 ± 2	$0,15 \pm 0,07$

Као што је очекивано, MCF-7 и MDA-MB-231 биле су најосетљивије на ова једињења. Једињење **3** са IC_{50} вредношћу у подмикромоларном опсегу (0,34 μM) на MCF-7 испољило је најснажнији антипролиферативни ефекат и према овој ћелијској линији било

је нешто активније него доксорубицин. Колико је нама познато, из овога резултата следи да је једињење **3** најцитотоксичнији конјугат стероида са фероценом који је досада откривен. И једињење **2** је имало значајан ефекат на MCF-7 ($IC_{50} = 20 \mu M$), док су на MDA-MB-231 ћелије умерено утицала сва једињења изузев једињења **3** (са. 50–60 μM , статистички незначајна разлика).

За разлику од претходно познатих 7 α - и 17 α -деривата, ниједно од ових једињења није имало пролиферативно дејство на MCF-7, што сведочи о томе да функционализација стероидног А прстена волуминозним фероценом највероватније доводи до губитка естрогености, што дозвољава испољавање инхерентне цитотоксичности фероцена. Ово је у складу са хипотезом коју су изнели Жауен и сарадници.^[90] Како су нека од једињења показала много значајније дејство на MCF-7, разумно је претпоставити да и положај супституције и начин везивања фероценског језгра игра улогу, као и остале функционалне групе на стероидном скелету. Наиме, деривати естрона испољили су много слабију активност него деривати естрадиола.

Имајући на уму обећавајуће биолошке активности конјугата овог типа, желели смо да проширимо наша истраживања синтезом других А-супституисаних конјугата. Сматра се да је за биолошку активност хидроксифероцифена (в. слику 2.1.1.5, једињење **XII**) одговорна управо чињеница да се фенолна група и фероценски прстен налазе у јединственом систему проширене конјугације.^[40] Стога смо сличне конјугате покушали да припремимо користећи се кондензацијом 2-формилестрадиола (**7**) и ацетилфероцена (схема 4.1.1.2). Једињење **7** добијено је формиловањем естрадиола помоћу параформалдехида, у присуству анхидрованог магнезијум-хлорида и триетиламина, у тетраhydroфурану уз рефлукс и заштитну атмосферу аргона, у приносу од 84%. У рефлуктујућем етанолу у присуству натријум-етоксида и ацетилфероцена у атмосфери аргона настало је једињење **8**. Нажалост, приликом покушаја да се изолује упаравањем чистих фракција добијених колонском хроматографијом, ово једињење се тренутно распадало уз издвајање неорганских врста гвожђа(III). Естерификацијом до моноацетата (**9**) и диацетата (**10**) добијена су једињења која су стабилна на ваздуху, што указује да постојање конјугације између фероценског језгра и фенолне групе заиста олакшава оксидацију, а што је документовано у литератури.^[60] Моноацетат **9** добијен је у условима естерификације ацетанхидридом у присуству триетиламина, а диацетат **10** у условима Штеглихове естерификације сирћетном киселином. Велика нестабилност једињења **8** свакако онемогућава његову директну употребу као биолошког агенса, али је неопходно испитати биолошку активност једињења **9** и **10**, која би се *in vitro* и *in vivo* могла трансформисати у **8** дејством распрострањених ензима из групе естераза. У тренутку писања ове дисертације биолошка испитивања једињења **9** и **10** су још била у току.

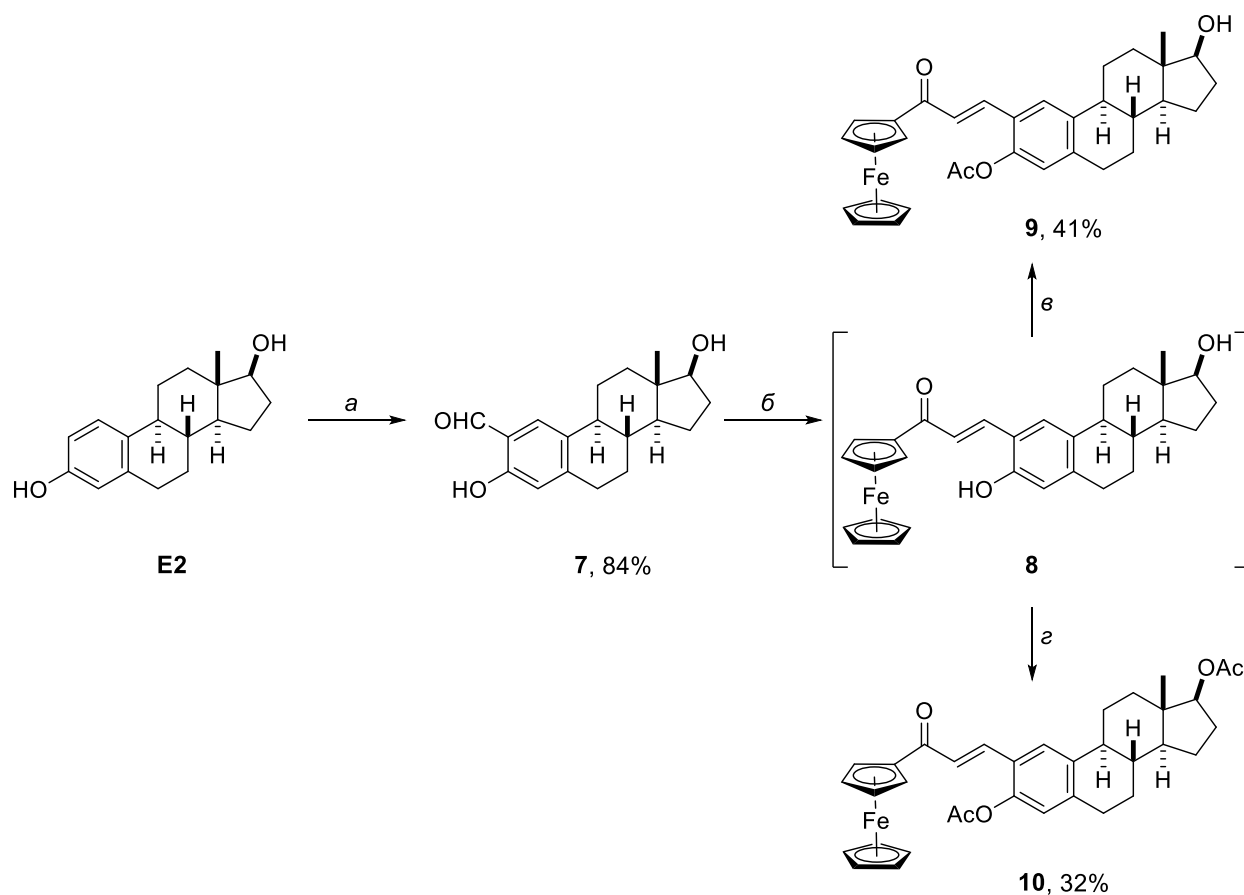


Схема 4.1.1.2. *a*: MgCl₂, Et₃N, параформалдехид, THF, рефлукс, атмосфера Ar, 4 h;
б: FcCOCH₃, NaOEt, EtOH, рефлукс, атмосфера Ar, 6 h; *в*: Ac₂O, Et₃N, с. т., атмосфера Ar, 12 h;
з: AcOH, DCC, DMAP, с. т., атмосфера Ar, 24 h. Приноси једињења **9** и **10** су исказани у односу на 2-формилестрадиол.

4.1.2. Синтеза конјугата андростанских стероида са фероценом и њихово испитивање на антипролиферативну активност

Иако је структурни диверзитет познатих конјугата андростана са фероценом незанемарљив, постојале су одређене недоумице у вези с производима који настају у Клајзен-Шмитовој реакцији тестостерона (17 β -хидроксиандрост-4-ен-3-она, **T**) са фероценкарбалдехидом.^[85] Такође, најпотентнији андроген у људском телу дихидротестостерон (ДХТ, 17 β -хидрокси-5 α -андростан-3-он) није досад подвргнут овој реакцији.

Понављајући реакционе услове у случају реакције на тестостерону коју су описали Маносрои и сарадници^[85] (рефлуковање у етанолу са стехиометријском количином фероценкарбалдехида) установили смо да се исход донекле разликује од оног који су ови аутори навели. Наиме, колонском хроматографијом изоловани су геометријски изомери **11** и **12** (схема 4.1.2.1) у малим приносима (7%, односно 24%). Иако Маносрои и сарадници

нису дефинисали геометрију на егзоцикличној двострукој вези производа реакције, поларнији од два изомера који смо изоловали је по спектралним подацима одговарао једињењу које су ови научници описали, па се може закључити да је претходно описано једињење заправо *E*-изомер 2-(фероценилметилен)-17β-хидроксиандрост-4-ен-3-она, а ново једињење његов *Z*-изомер. Могуће објашњење зашто је претходно добијен искључиво један изомер (и то поларнији) следи из описа поступка пречишћавања који аутори описују, а који је укључивао неколико раздвајања колонском хроматографијом на силика-гелу користећи смешу петролетар–етил-ацетат као елуент, а затим додатно пречишћавање препаративном HPLC-методом на неполарној стационарној фази. Врло је могуће да је услед потешкоћа приликом иницијалног хроматографског раздвајања било немогуће добити други изомер у чистом облику. У нашем случају, пречишћавање колонском хроматографијом било је најефикасније уз употребу система бензен–етил-ацетат као елуента.

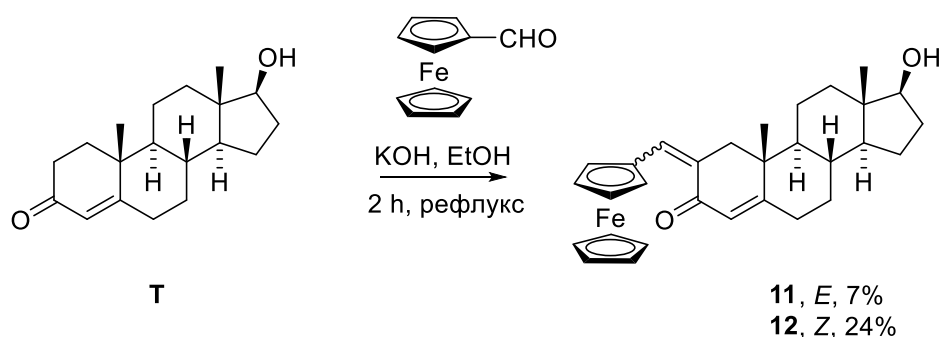
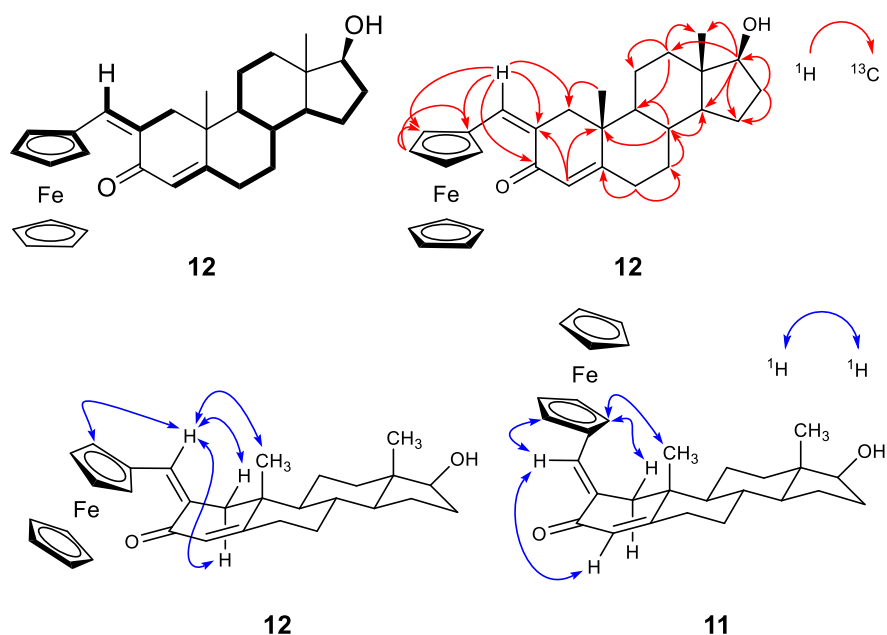


Схема 4.1.2.1. Клајзен-Шмитова кондензација тестостерона са фероценкарбалдеhidом.



Слика 4.1.2.1. ^1H - ^{13}C COSY-корелације (подебљане везе) и HMBC-корелације (црвене стрелице) за једињење **12** и одабране NOESY-корелације за једињења **11** и **12**.

Асигнације резонанци једињења **11** и **12** у ^1H и ^{13}C НМР-спектрима дате су у табели 4.1.2.1. Корелације у дводимензионалним НМР-техникама које су омогућиле асигнацију ових спектра приказане су на слици 4.1.2.1.

Табела 4.1.2.1. ^1H НМР и ^{13}C НМР спектрални подаци за једињења **11** и **12** у CDCl_3 (^1H на 400 MHz, ^{13}C на 101 MHz); константе спрезања дате су у заградама (у Hz).

Положај	12		11	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
1	40,1	2,21 dd (14,6; 2,4); 3,27 d (14,6)	39,7	2,41 dd (14,7; 2,3); 3,34 d (14,7)
2	129,3	/	127,7	/
3	188,1	/	200,4	/
4	125,1	5,89 d (1,4)	128,6	6,54 s
5	169,8	/	157,3	/
6	32,4	2,33–2,48	46,0	2,07 dd (16,4; 12,3); 2,73 dd (16,4; 4,0)
7	31,2	1,06 ^a 1,85 dddd (11,1; 5,7; 5,7; 3,1)	36,1	1,81–2,00
8	35,8	1,56 ^a	33,7	1,93 ^a
9	53,2	1,07 ^a	49,8	1,50 ^a
10	40,2	/	40,3	/
11	21,2	1,70 ^a 1,54 ^a	21,0	1,84 ^a 1,58 ^a
12	36,6	1,16 ^a 1,92 ddd (12,4; 3,3; 3,3)	36,1	1,20–1,28
13	42,8	/	42,9	/
14	50,6	1,01	51,2	1,16 ^a
15	23,4	1,65 1,31	23,2	1,68 ^a 1,34 ^a
16	30,5	1,48 2,10 dddd (14,6; 8,5; 4,6; 4,6)	30,4	1,54 ^a 2,12 dddd (14,9; 8,6; 5,0; 5,0)
17	81,7	3,69 dd (8,5; 8,5)	81,4	3,73 dd (8,6; 8,6)
18	11,1	0,81 s	11,0	0,82 s
19	19,4	1,13 s	20,6	1,11 s
1'	135,3	7,38 d (2,4)	138,5	7,54 d (2,3)
2'	79,2	/	78,6	/
3', 6'	70,5	4,49 m	70,2	4,51 m
	70,8	4,51 m	71,8	4,55 m
4', 5'	70,3	4,38–4,42	71,0	4,46 ^a
	70,4			4,49 ^a
1''–5''	69,4	4,16 s	69,5	4,18 s

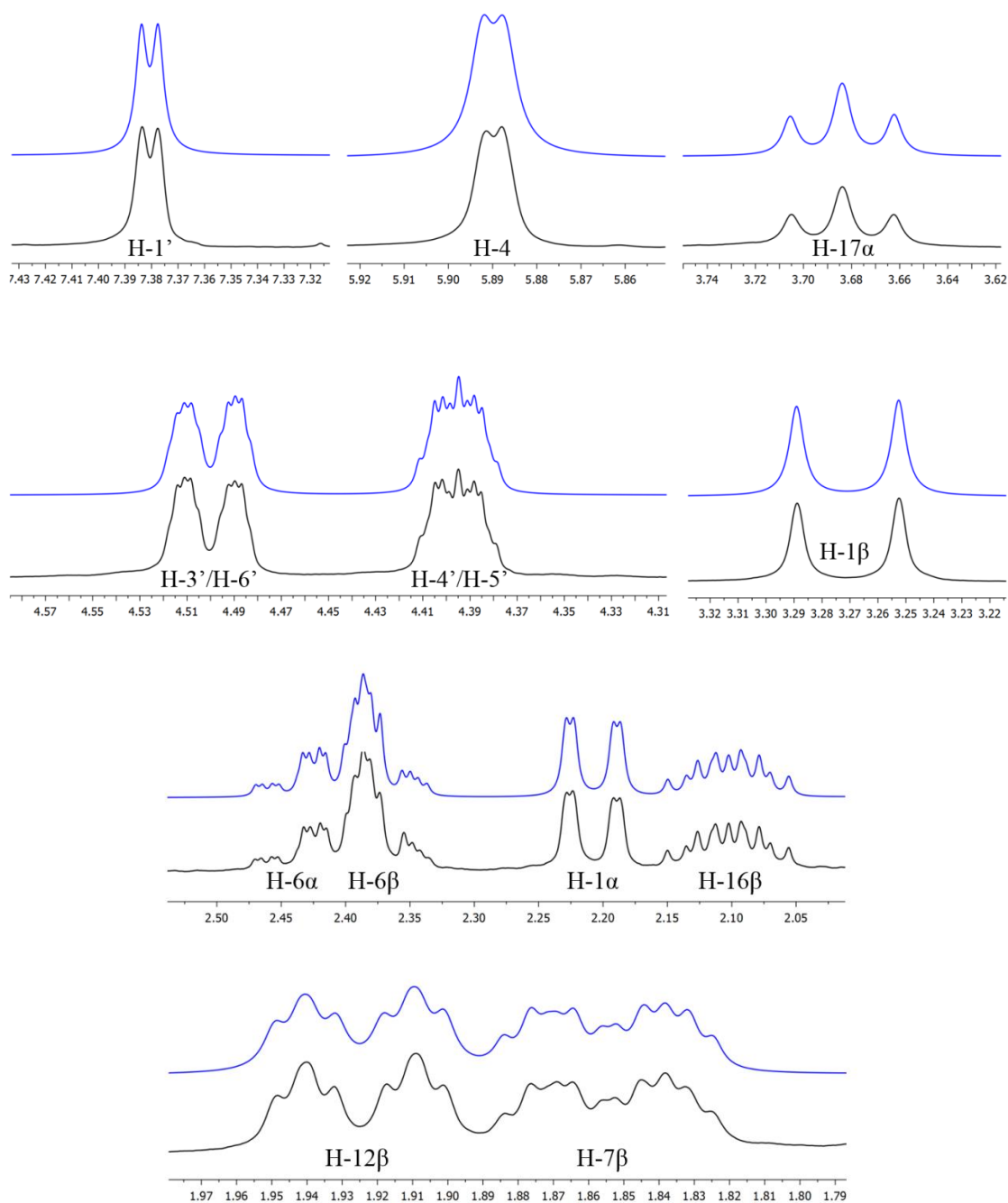
a – међусобно преклопљени сигнали

Услед отежане интерпретације комплексног спектра, како због присуства стероидног језгра, тако и због присуства фeroценског језгра са хемијски еквивалентним али магнетно нееквивалентним протонима, ^1H НМР новог једињења **12** подвргнут је ^1H итеративној потпуној спинској анализи (HiFSA) помоћу методологије по узору на рад Радуловића и сарадника.^[193] Пошто је поменути спектар претходно асигниран, очитана хемијска померања искоришћена су за иницијални скуп вредности, док су за иницијалне вредности константи спрезања искоришћене претходно објављене вредности за тестостерон,^[194] а за константе спрезања протона моносупституисаног фeroценског прстена одабране су типичне вредности.^[195]

Резултати HiFSA анализе једињења **12** дати су у табели 4.1.2.2, док су важнији сигнали приказани на сликама 4.1.2.2. и 4.1.2.3. Из добијених резултата следи да су фeroценски и стероидни спински системи одвојени. Иако се Н-1' алилно спреже са Н-1 α (али не и са Н-1 β , јер С–Н-1 β веза очигледно није нормална на раван С-2=C-1'), значајно спрезање са Н-3' и/или Н-6' није уочено. Константе спрезања у моносупституисаном циклопентадиенилном прстену фeroценског језгра износиле су око 2,6 Hz за спрезање кроз три везе, а 1,3 Hz за спрезање кроз четири везе. Што се тиче водоника на конформационо крутом стероидном скелету, константе вициналног спрезања аксијално–аксијално налазиле су се у опсегу 10–14 Hz, аксијално–екваторијално 4–6 Hz, а екваторијално–екваторијално 2–3 Hz. Добијени су и корисни подаци о јако спрегнутом систему којег чине изохрони протони Н-6 α и Н-6 β (слика 4.1.2.2), где је показано да се искључиво Н-6 β алилно спреже са Н-4. Тачна хемијска померања одређена су и за практично изохроне сигнале Н-11 α и Н-15 α , као и Н-8 β , Н-11 β и Н-16 α , што је нарочито важно, јер без потпуне спинске анализе не би било могуће разликовати врло слична хемијска померања Н-8 β (1,5455 ppm) и Н-11 β (1,5432 ppm). Ширине линија сигнала стероидног скелета биле су нешто веће у односу на сигнале водоника са фeroценског језгра, што се може објаснити многобројним могућностима за даљинско спрезање (највероватније кроз четири или шест веза).

Како до сада нису били познати конјугати дихидротестостерона и фeroцена, извршена је и Клајзен-Шмитова кондензација овог стероида са фeroценкарбалдеhidом, у идентичним реакционим условима (рефлуктовање са стехиометријском количином фeroценкарбалдехида у етанолу). Изолован је само један производ реакције, једињење **13**, у приносу од 75% (схема 4.1.2.2). НМР анализом утврђено је да је овај производ 2-(фeroценилметилен)-дериват и да је конфигурација егзоцикличне двоструке везе у овом случају *E*, што је потврђено и рендгеноструктурном анализом. Фаворизација кондензације у положају 2 није неочекивана. Познато је да је код стероидних 5 α -3-кетона алдолна реакција у положају 2 знатно повољнија у односу на положај 4.^[196] Два су разлога за то: 2-ен-3-олат стабилнији је у односу на 3-ен-3-олат, и кондензација у положају 2 је мање стерно захтевна. Одсуство геометријског изомера једињења **13** као производа реакције потенцијално се може приписати одсуству Δ^4 -двоструке везе; краћи конјуговани систем значио би померање апсорпционог максимума према ултраљубичастој области, па би тиме енергија коју молекула може добити апсорпцијом светлости из видљивог дела

електромагнетног спектра била мања, што је релевантно уколико се између једињења **11** и **12** успоставља фотохемијска равнотежа у овим реакционим условима.



Слика 4.1.2.2. Одабрани сигнали из експерименталног (црно) и симулираног дела (плаво) ¹H NMR спектра једињења **12** у CDCl₃ (400 MHz).

Табела 4.1.2.2. ¹H NMR хемијска померања и константе спрезања за једињење **12** добијене HiFSA приступом (CDCl₃, 400 MHz).

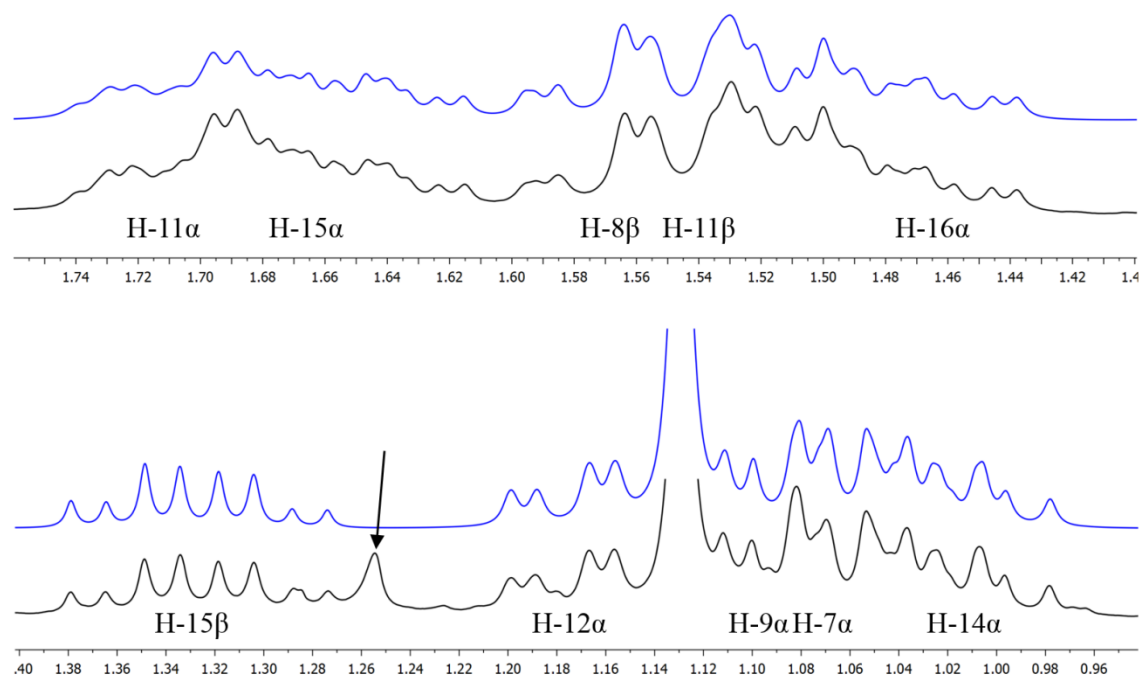
протон	позиција	хемијско померање (ppm)	ширина линија (Hz)	константе спрезања		
				<i>J</i> (Hz)	протон	врста
1α		2,2078	2,5	-14,6	1β	² <i>J</i>
				-2,5	1'	⁴ <i>J</i>
				-0,5	19	⁴ <i>J</i> (CH ₃)
1β		3,2705	2,5	-14,6	1α	² <i>J</i>
4		5,8898	2,5	-2,3	6β	⁴ <i>J</i>
6α	eq	2,3710	2,2	-14,6	6β	² <i>J</i>
				4,2	7α	eq-ax
				2,4	7β	eq-eq
6β	ax	2,4200	2,2	-14,6	6α	² <i>J</i>
				13,8	7α	ax-ax
				5,4	7β	ax-eq
7α	ax	1,0599	2,5	-2,3	4	⁴ <i>J</i>
				-12,9	7β	² <i>J</i>
				11,9	8β	ax-ax
7β	eq	1,8540	2,5	4,2	6α	ax-eq
				13,8	6β	ax-ax
				-12,9	7α	² <i>J</i>
8β	ax	1,5455	2,5	2,4	6α	eq-eq
				5,4	6β	eq-ax
				3,3	8β	eq-ax
8β	ax	1,5455	2,5	11,9	7α	ax-ax
				3,3	7β	ax-eq
				10,7	9	ax-ax
9α	ax	1,0775	2,5	10,9	14α	ax-ax
				4,3	11α	ax-eq
				12,3	11β	ax-ax
11α	eq	1,7069	3,5	10,7	8β	ax-ax
				-13,3	11β	² <i>J</i>
				4,2	12α	eq-ax
11β	ax	1,5432	2,5	2,9	12β	eq-eq
				4,3	9α	eq-ax
				-13,3	11α	² <i>J</i>
12α	ax	1,1625	2,5	13,4	12α	ax-ax
				4,2	12β	ax-eq
				12,3	9α	ax-ax
12β	eq	1,9246	3,0	-12,4	12β	² <i>J</i>
				4,2	11α	ax-eq
				13,4	11β	ax-ax
12β	eq	1,9246	3,0	-0,5	18	⁴ <i>J</i> (CH ₃)
				-12,4	12α	² <i>J</i>
				2,9	11α	eq-eq
				4,2	11β	eq-ax

наставак табеле 4.1.2.2.

протон	позиција	хемијско померање (ppm)	ширина линија (Hz)	константе спрезања		
				J (Hz)	протон	врста
14 α	ax	1,1072	2,5	7,2	15 α	3J
				12,3	15 β	3J
				10,9	8 β	ax–ax
15 α		1,6553	2,5	-12,6	15 β	2J
				3,5	16 α	3J
				9,5	16 β	3J
				7,2	14 α	3J
15 β		1,3280	2,0	-12,6	15 α	2J
				11,9	16 α	3J
				5,9	16 β	3J
				12,3	14 α	3J
16 α		1,4825	2,5	-13,5	16 β	2J
				3,5	15 α	3J
				11,9	15 β	3J
				8,3	17 α	3J
16 β		2,1018	2,5	-13,5	16 α	2J
				9,5	15 α	3J
				5,9	15 β	3J
				9,1	17 α	3J
17 α		3,6838	3,0	8,3	16 α	3J
				9,1	16 β	3J
				-0,5	12 α	4J
18		0,8090	2,0	-0,5	12 α	4J
19		1,1292	2,0	-0,5	1 α	4J
1'		7,3806	2,0	-2,5	1 α	4J
3 a		4,5110	1,8	2,7	4'	3J
				-1,3	5'	4J
				-1,3	6'	4J
6 a		4,4895	1,6	-1,3	3'	4J
				-1,3	4'	4J
				2,6	5'	3J
				2,7	3'	3J
4 b		4,4027	1,5	2,6	5'	3J
				-1,3	6'	4J
				-1,3	3'	4J
5 b		4,3871	1,5	2,6	4'	3J
				2,6	6'	3J
				-	-	-
1''–5''		4,1595	1,2	-	-	-

ax – аксијални положај, eq – екваторијални положај;

код парова сигнала означених са a и b је асигнација можда пермутована.



Слика 4.1.2.3. Одабрани сигнали из експерименталног (црно) и симулираног дела (плаво) ^1H НМР спектра једињења **12** у CDCl_3 (400 MHz); стрелица показује сигнал који потиче од нечистоће (алкански остатак).

Са циљем повећавања молекуског диверзитета групе синтетисаних конјугата извршено је каталитичко хидрогеновање једињења **13** у присуству паладијума на угљенику, са жељом да се добије конјугат у којем су фероценско и стероидно језгро повезани преко sp^3 -угљеника. Праћењем тока реакције танкослојном хроматографијом закључено је да је у метилен-хлориду на собној температури ова реакција готова после 1 h (једињење **13** је у потпуности изреаговало); колонска хроматографија реакционе смеше дала је чисте узорке једињења **14** и **15** (схема 4.1.2.2).

У табелама 4.1.2.3. и 4.1.2.4. дате су асигнације водоникових и угљеникових атома једињења **13–15**. Конфигурација егзоцикличне двоструке везе код једињења **13** и **14** је одређена NOESY-корелацијама (слика 4.1.2.3), а у случају једињења **13**, потврђена је и рендгеноструктурном анализом (слика 4.1.2.4).

Најочигледнија разлика у НМР спектрима једињења **13** и **14** била је одсуство сигнала у ^{13}C НМР спектру **14** на око 200 ppm који одговара кетону. Друга разлика је била видљива у ^1H НМР спектру једињења **14**: сигнал језгра $\text{H-1}'$ јављао се на 5,95 ppm у виду сигнала који је дублет дублета с две мале константе спрезања (~ 2 Hz). $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY-корелације и HSQC-корелације потврдиле су да се $\text{H-1}'$ алилно спреже са два водоника на различитим угљеницима, чиме је установљено да је у А прстену дошло до деоксигенације на C-3. Конфигурација егзоцикличне двоструке везе поново се могла поуздано утврдити NOESY корелацијама (слика 4.1.2.3).

Са друге стране, ^{13}C НМР-спектар једињења **15** поседовао је сигнал на 212,1 ppm, што је очекивано хемијско померање за неконјуговане угљенике кетона. Такође, у овом спектру нису били уочљиви сигнали у регији 100–140 ppm, што је значило потпуно одсуство двоструких угљеник–угљеник веза. На 2,41 ppm у ^1H НМР спектру овог једињења налазио се сигнал чији водоник се спрезао са водонцима на C-1 (^1H – ^1H COSY, HMBC), али и показивао NOE-интеракцију са водонцима на C-19 (слика 4.1.2.5); у питању је водоник H-2, а NOE-интеракција демонстрира његову β -оријентацију.

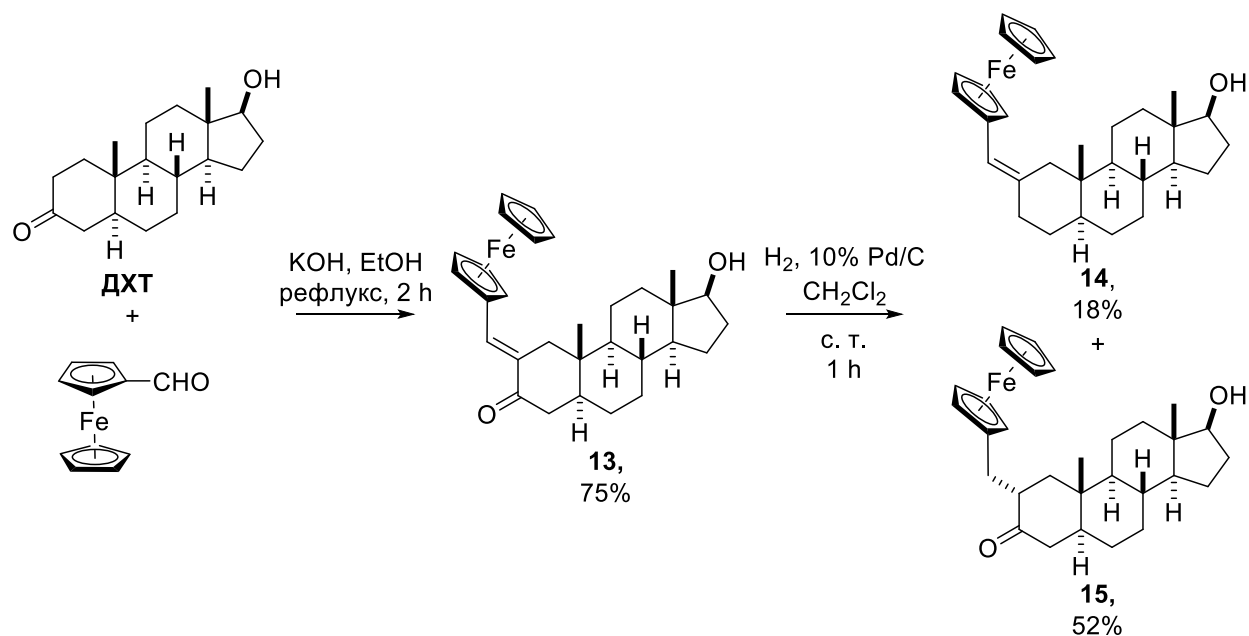
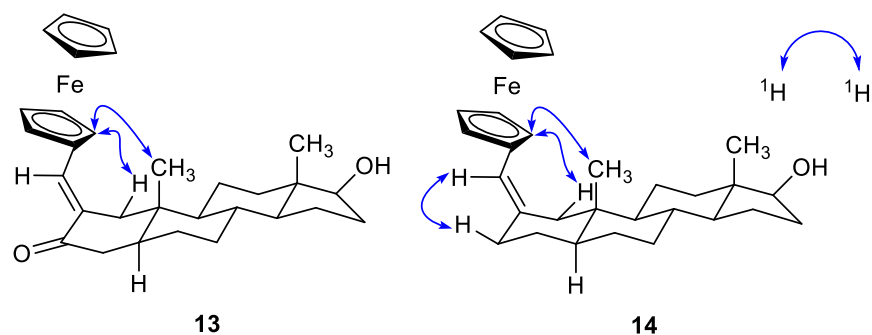
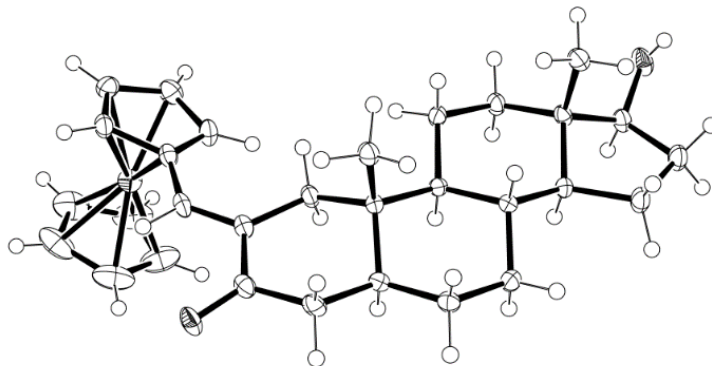


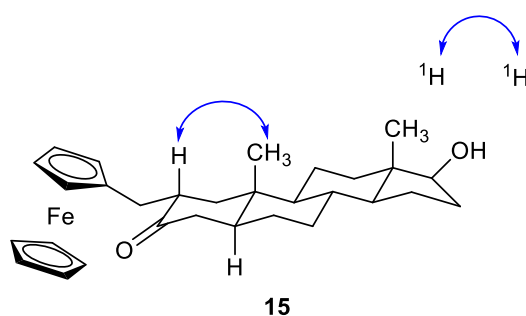
Схема 4.1.2.2. Клајзен-Шмитова кондензација дихидротестостерона са фероценкарбалдехидом и редукација добијеног конјугата.



Слика 4.1.2.3. Одабране NOESY корелације једињења **13** и **14**.



Слика 4.1.2.4. ORTEP-приказ молекулске структуре једињења **13** одређене рендгеноструктурном анализом.



Слика 4.1.2.5. Одабрана NOESY-корелација једињења **15**.

Иако би било очекивано да се каталитичким хидрогеновањем добије 2β -епимер једињења **15**, првенствено услед лакоће приступа α -стране стероидног скелета активним местима на површини катализатора, могуће је да је настајање једињења **15** као производа ове реакције последица кето-енолне равнотеже која омогућава настајање термодинамички стабилнијег производа.

Антипролиферативни потенцијал једињења **11–15** утврђен је колориметријским МТТ-тестом на ћелијским линијама PC-3, LNCaP и MRC-5. Резултати су приказани у табели 4.1.2.4. Иако је уочена значајна токсичност према PC-3 и LNCaP ћелијама у микроларном опсегу концентрација, сличан ниво токсичности једињења су испољила и према нетуморским ћелијама, те у случају ових конјугата не постоји селективност попут оне уочене код конјугата естрона и естрадиола са фероценом. Такође, LNCaP ћелије, у којим се експримирају AP, нису биле осетљивије на тестиране конјугате него PC-3 ћелије, које не експримирају AP. Ови резултати сугеришу да је афинитет синтетисаних конјугата према AP вероватно безначајан. Такође, очигледно је присуство инхерентне токсичности коју овим једињењима вероватно даје фероценско језгро. Пошто оваква токсичност није примећена у случају конјугата припремљених у естра-1,3,5(10)-триенској серији, очигледно је да и хемијско окружење фероценског језгра игра улогу, поготово узимајући у обзир да су једињења **11–13** и **14** Мајклови акцептори, а једињење **15** прекурсор Мајкловог акцептора.

Табела 4.1.2.3. ^1H НМР и ^{13}C НМР спектрални подаци за једињења **13** и **14** (^1H на 400 MHz, ^{13}C на 101 MHz), J су дате у заградама и изражене су у Hz.

Положај	13		14	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
1	42,00	1,96 ^a 2,97 d (15,8)	41,5	1,36 ^δ 3,03 dd (13,0; 1,8)
2	130,6	/	138,5	/
3	199,7	/	37,7	2,26 m 2,10 ^β
4	42,3	2,38 dd (18,9; 5,4) 2,15 dd (18,9; 13,1)	30,7	1,37 ^δ
5	41,8	1,00 ^β	47,2	1,23 ^δ
6	28,5	1,48 ^ε 1,24 ^ζ	31,6	1,69 ^ε 0,85 ^{жс}
7	31,1	1,73 ^a 0,92 ^β	28,4	1,32 ^δ 1,26 ^δ
8	35,1	1,40 ^ε	35,6	1,36 ^δ
9	53,9	0,90 ^ζ	54,1	0,82 ^{жс}
10	35,5	/	38,7	/
11	21,2	1,73 ^a 1,48 ^ε	20,6	1,63 ^ε 1,35 ^δ
12	36,8	1,91 ^a 1,17 ^ζ	36,7	1,84 ^ε 1,06 ^{жс}
13	42,9	/	41,9	/
14	50,9	1,00 ^β	51,1	0,96 ^{жс}
15	23,4	1,27 ^ζ 1,62 dddd (12,5; 9,8; 7,1; 2,9)	23,4	1,64 ^ε 1,35 ^δ
16	30,6	2,08 m 1,44 ^ε	30,6	2,06 ^β 1,40 ^δ
17	81,9	3,67 dd (8,4; 8,4)	82,0	3,68 dd (8,0; 4,4)
18	11,1	0,76 s	11,14	0,75 s
19	12,2	0,84 s	12,07	0,77 s
1'	139,0	7,46 d (2,6)	120,4	5,95 dd (1,6; 1,6)
2'	78,7	/	83,3	/
3', 6'	71,0		68,2	
4', 5'	72,3	4,40–4,51	69,3	4,17–4,31
	70,4		67,8	
	70,8		67,9	
1''–5''	69,5	4,13 s	68,9	4,12 s

a–жс – међусобно преклопљени сигнали.

Табела 4.1.2.4. ^1H и ^{13}C спектрални подаци за једињење **15** (^1H на 400 MHz, ^{13}C на 101 MHz), *J* су дате у заградама и изражене су у Hz.

Положај	15	
	^{13}C	^1H
1	29,4	2,99 dd (14,4; 4,8) 2,18 dd (14,4; 7,6)
2	48,7	2,41 dd (9,6; 3,6)
3	212,1	/
4	44,9	2,30 dd (14,0; 14,0) 2,05 ddd (17,0; 6,6; 3,3)
5	48,1	1,49 ^a
6	28,6	1,45 ^a 1,33 m
7	31,3	1,67 ddd (6,8; 3,0; 3,0) 0,84 ^b
8	35,3	1,41 ^a
9	54,0	0,68 m
10	36,4	/
11	21,2	1,52 dd (13,0; 3,6; 3,6) 1,31 dd (13,0; 3,6)
12	36,6	1,78 ddd (12,5; 4,0; 2,7) 1,03 m
13	43,0	/
14	50,8	0,95 ^b
15	23,4	1,59 ddd (10,8; 7,3; 3,8) 1,26 dd (10,8; 5,9)
16	30,5	2,07 m 1,44 ^a
17	81,8	3,64 dd (8,6; 8,6)
18	11,5	0,74 s
19	12,5	1,00 s
1'	46,1	2,07 dd (14,4; 3,6)
2'	86,2	/
3', 6'	68,8	
	69,5	
4', 5'	67,2	4,04–4,09
	67,4	
1''–5''	68,6	4,12 s

a, b – међусобно преклопљени сигнали.

Табела 4.1.2.5. Антипролиферативне активности једињења **11–15** и цисплатина (цис-диаминдихлоридоплатина(II), CDDP) изражене у $IC_{50} \pm$ стандардна девијација.

Једињење	IC_{50} (μM)		
	PC-3	LNCaP	MRC-5
11	$11,1 \pm 0,2$	40 ± 4	$14,1 \pm 0,3$
12	20 ± 2	90 ± 5	19 ± 1
13	$64,2 \pm 0,6$	44 ± 2	$27,4 \pm 0,3$
14	$16,8 \pm 0,2$	16 ± 1	$8,5 \pm 0,4$
15	$8,40 \pm 0,06$	17 ± 1	$7,7 \pm 0,2$
CDDP	$21,9 \pm 0,3$	$12,6 \pm 0,2$	$0,15 \pm 0,07$

4.1.3. Синтеза конјугата прегнанских стероида са фeroценом и њихово испитивање на имуномодулаторну активност

Будући да се веома мали број истраживања бавио конјугатима прегнанских стероида са фeroценом, жеља нам је била да проширимо молекулски диверзитет ове класе једињења. Разлог за мањак интересовања за ову класу једињења можда следи из чињенице да не постоје облици канцера који су искључиво зависни од прогестогена. Неопходно је истаћи да су прогестеронски рецептори (ПР) експримирани у ћелијама одређених врста рака дојке^[197] и ендометријума,^[198] али досад није било покушаја да се одреди какве последице дериватизација фeroценом има по афинитет везивања природних лиганада ових рецептора. Међутим, још једна значајна мета повезана са канцером и инфламаторним болестима је прегнански X рецептор (PXR),^[199] за који је познато да игра имунорегулаторну улогу у Т-лимфоцитима.^[200] Познато је да је активно место овог рецептора „промискуитетно” и установљено је да се за њега може везати већи број стероидних и нестероидних лиганада.^[201] С овим на уму, синтетисана је мала библиотека конјугата прегнанских стероида са фeroценом како би се испитало да ли она испољавају имуномодулаторно дејство.

Клајзен-Шмитова реакција чини 21-фeroценилметилен-деривате прегнан-20-она лако доступним, па су на овај начин раније дериватизовани прегненолон^[91] и 17 α -хидроксипрегненолон.^[85] Ми смо за потребе ове реакције одабрали пет стероидних структура: прогестерон (прегн-4-ен-3,20-дион, **II**), епоксипрогестерон (16 α ,17-епоксипрегн-4-ен-3,20-дион, **ЕII**), 16-дехидропрегненолон (3 β -хидроксипрегна-5,16-диен-20-он, **ДII**), Δ^{16} -епоксид 16-дехидропрегненолона (16 α ,17-епокси-3 β -хидроксипрегна-5,16-диен-20-он, **ЕДII**), као и епиалопрегнанолон (3 β -хидрокси-5 α -прегнан-20-он, **ЕАII**). Ова једињења подвргнута су кондензацији са фeroценкарбалдехидом у присуству калијум-хидроксида у етанолу уз рефлукс у току 2 h.

Прогестерон и његов епоксид дали су одговарајуће 21-фероценилметилен-деривате **16** и **17**, у скромним приносима од 40%, односно 28% (схема 4.1.3.1), при чему код **ЕП** нису уочени производи отварања епоксидног прстена. С друге стране, производ Клајзен-Шмитове реакције 16-дехидропрегненолона са фероценкарбалдеhidом било је једињење **18** (у приносу од 35%), последица конјуговане адиције етоксида присутног у равнотежи, као и чисто кондензациони производ **19**, који је добијен у приносу од 7%. Помоћу NOESY-експеримената установљено је да је етокси-група α -оријентисана (слика 4.1.3.1). Ово је у складу са познатом реактивношћу прегн-16-ен-20-она, где напон кондензованог петочланог прстена чини двоструку везу у положају 16 реактивном према реакцијама конјуговане адиције.^[196]

Како је једињење **19** добијено у ниском приносу, одлучили смо се да реакцију спроведемо и у другим алкохолним растварачима, а резултати су сумирани у табели 4.1.3.1. Извођењем реакције у кључалом метанолу при дужем реакционом времену (8 h) такође је добијен производ конјуговане адиције. У изопропил-алкохолу и *n*-бутил-алкохолу једињење **19** било је једини изолован производ, у нешто већем приносу (36%, односно 24%). Одсуство производа конјуговане адиције у ова два растварача може се довести у везу с мањом киселостју, односно волуминозношћу *i*-PrOH и *n*-BuOH.

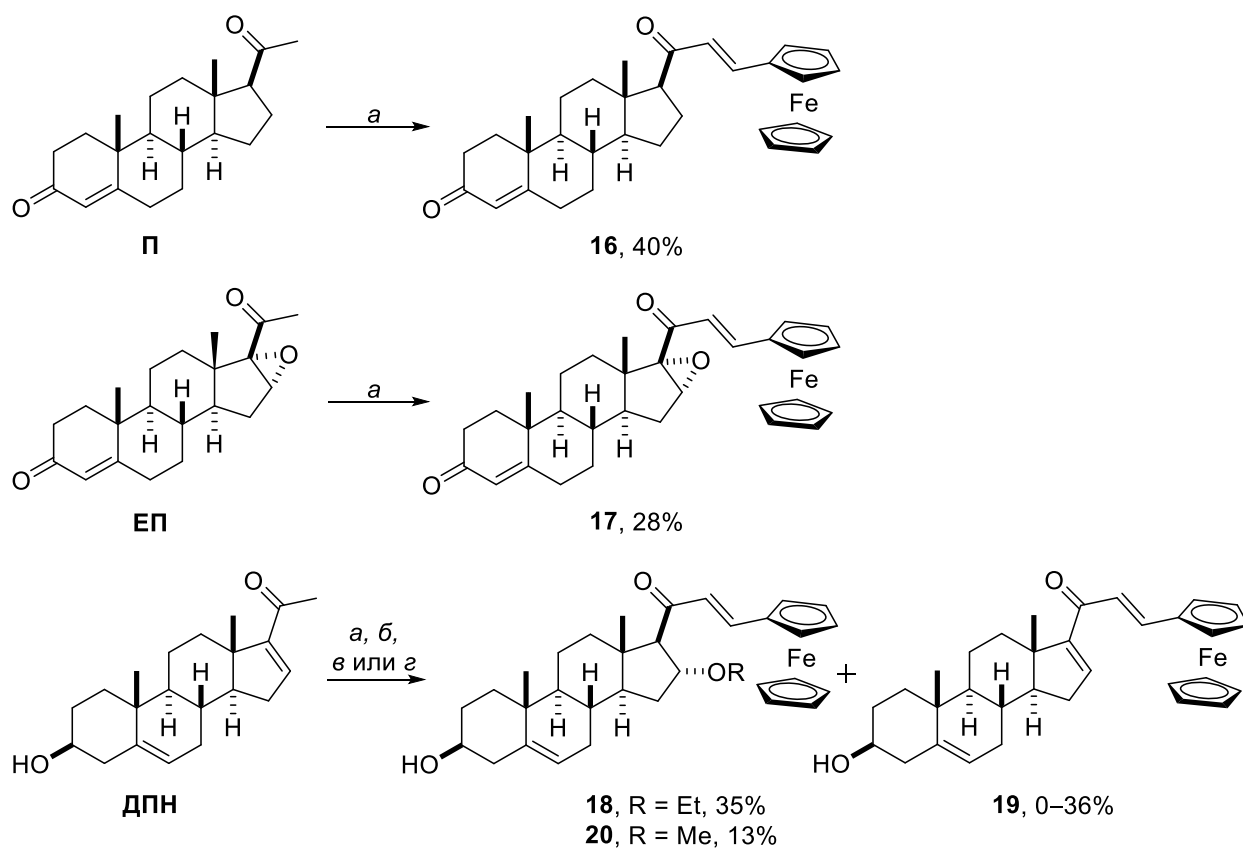
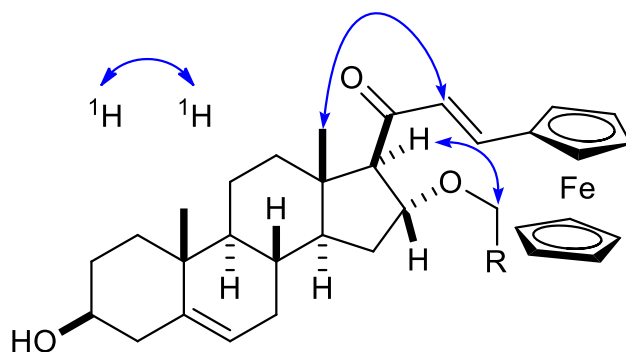


Схема 4.1.3.1. *a*: FcCHO, KOH, EtOH, рефлукс, 2 h, *б*: FcCHO, KOH, MeOH, рефлукс, 8 h; *в*: FcCHO, *i*-PrOH, рефлукс; *г*: FcCHO, KOH, *n*-BuOH, рефлукс, 2 h (табела 4.1.3.1).



Слика 4.1.3.1. NOESY-интеракције (плаве стрелице) кључне за утврђивање конфигурације једињења **18** (R = Me) и **20** (R = H).

Табела 4.1.3.1. Исход реакција кондензације 16-дехидропрегненолона са FcCHO при различитим реакционим условима.

реакциони услови	растварач	реакционо време	производ(и) (принос)
<i>a</i>	EtOH	2 h	18 (35%), 19 (7%)
<i>b</i>	MeOH	8 h	20 (13%), 19 (7%)
<i>v</i>	<i>i</i> -PrOH	2 h	19 (36%)
<i>z</i>	<i>n</i> -BuOH	2 h	19 (24%)

Кондензација еоксида 16-дехидропрегненолона и FcCHO под раније изведеним реакционим условима дала је искључиво очекивани хомопрегнански конјугат **21** у приносу од 23% (схема 4.1.3.2). У истим реакционим условима епиалопрегнанолон је дао смешу епимера **22** и **23** која се показала нераздвојивом помоћу колонске хроматографије на силикагелу. Овај резултат може се објаснити настајањем термодинамички контролисаног енолата полазног стероида из којег не настају кондензациони производи, али који доводи у равнотежу 17 β - и 17 α -епимер стероида. Под таквом претпоставком, сличан исход би се очекивао и у случају прогестерона. Зашто епимеризација није уочена код прогестерона (у овој дисертацији) и прегненолона (у претходним радовима)^[91] остаје нејасно, али се може приписати конформационој трансмисији,^[202] што је термин који објашњава разлике у реактивности које настају услед промене угла веза због присуства/одсуства двоструких веза и других атомских група у осталим прстеновима стероидног језгра.

Резонанце ^1H и ^{13}C језгара једињења **16–23** асигниране су помоћу 2Д НМР-експеримената (^1H – ^1H COSY, NOESY, HSQC, HMBC) и ^1H -селективним распрезањем. Хемијска померања ^{13}C резонанци конјугата налазе се у табели 4.1.3.2. Конфигурација новонастале двоструке везе (*E*) код свих конјугата била је недвосмислена јер су измерене $^3J_{\text{H,H}}$ вредности износиле 15,5–15,8 Hz у свим случајевима.

Приликом успореног испаравања растварача из хлороформског раствора једињења **22** и **23** добијена је мала количина монокристала погодних за рендгеноструктурну анализу,

за које се показало да потичу од монохидрата једињења **22**. Молекулска структура одређена овом методом приказана је на слици 4.1.3.2.

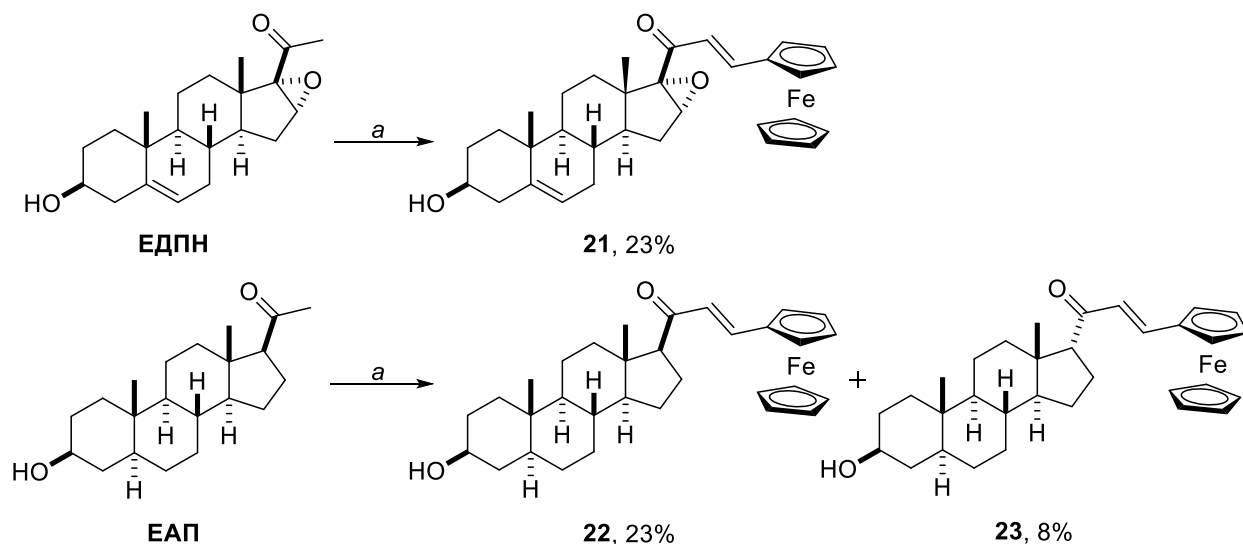
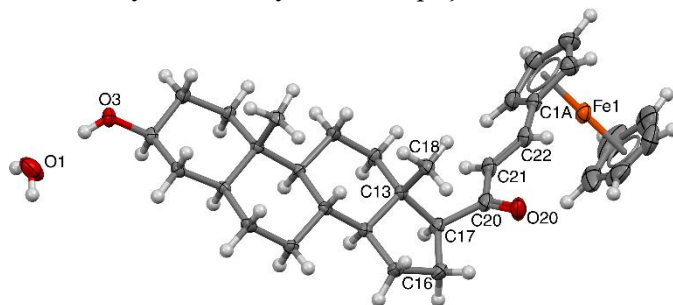


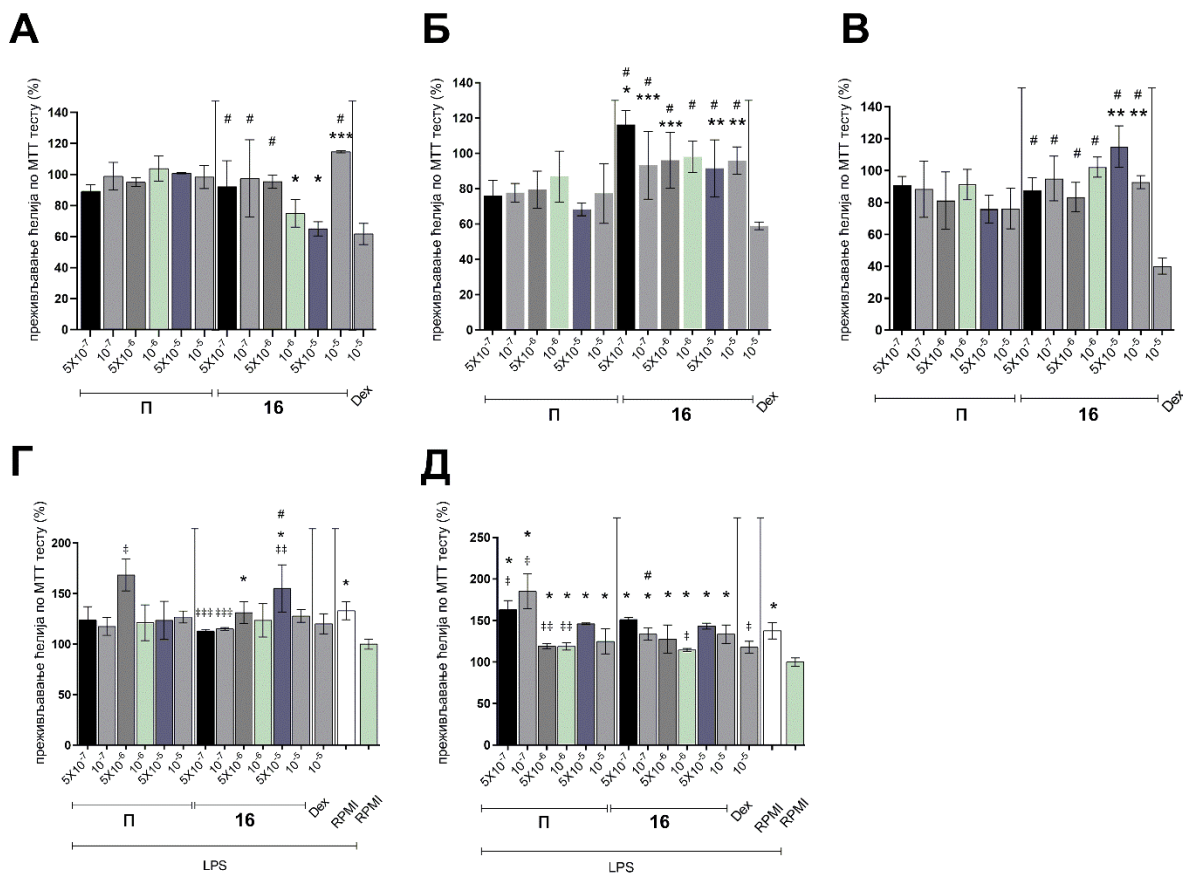
Схема 4.1.3.2. *a*: FcCHO , KOH , EtOH , рефлукс, 2 h. Приноси за једињења **22** и **23** исказани су помоћу релативних заступљености у смеси одређених ^1H НМР спектроскопијом.



Слика 4.1.3.2. Молекулска структура $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{FeO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**22**) добијена дифракцијом рендгенских зрака на монокристалу.

Како би се установило да ли неки од конјугата **16–23** поседује имуномодулаторна својства, испитано је дејство ових једињења, као и полазних стеродних једињења, на изоловане спленоците пацова, са или без присуства имуномодулатора LPS. Дексаметазон (Dex) је коришћен као позитивна контрола. Токсичност конјугата **16** на спленоците у односу на прогестерон била је израженија после инкубације у трајању од 24 h, док је после 48 и 72 h прогестерон имао већу токсичност (слика 4.1.3.3, А–В). Када је испитано дејство једињења **16** на спленоците чија је пролиферација индукована помоћу LPS, највећа антипролиферативна активност после 48 h уочена је при најнижој концентрацији, што сугерише да ова активност није у вези с токсичношћу (слика 4.1.3.3, Г). После 72 h антипролиферативна активност конјугата **16** скоро је нестала (слика 4.1.3.3, Д).

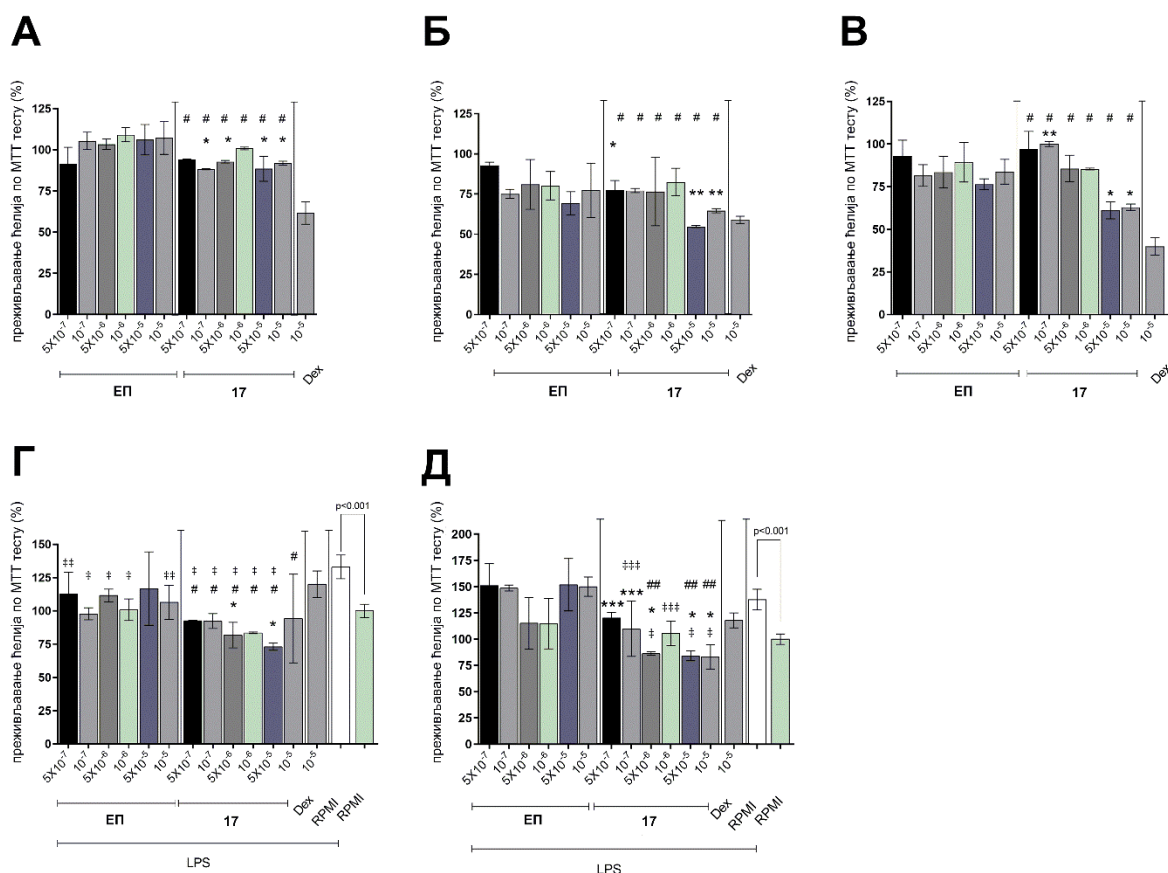
Конјугат **17** испољио је израженију токсичност на нестимулисане спленоците у односу на епоксипрогестерон на крају сва три периода испитивања (слика 4.1.3.4, А–В). Упркос томе, преживљавање ћелија није умањено за



Слика 4.1.3.3. Дејство различитих концентрација (у μM) прогестерона (П) и конјугата **16** на преживљавање нестимулисаних спленоцита (А–В) и пролиферацију стимулираних спленоцита (Г и Д); знаковима *, # и ‡ обележене су статистички значајне разлике.

више од 30%, колико је то био случај после 72 h (слика 4.1.3.4, В). Установљено је да и епоксипрогестерон и **17** делују антипролиферативно на спленоците активирани помоћу LPS после 48 h (слика 4.1.3.4, Г), али је ова активност после 72 h инкубације једино била уочљива за **17** (слика 4.1.3.4, Д). Досад ни једно истраживање није се бавило дејством ЕП на културе лимфоцита. Овде је по први пут установљено да ово стероидно једињење не испољава значајну цитотоксичност на ове ћелије, као и да је његова имуномодулаторна активност врло слаба. Конјугација са фероценом изазвала је повећање токсичности, поготово у већим концентрацијама и током продужене инкубације, а имуносупресивна својства овог једињења могу се приписати смањењу преживљавања ћелија, али није могуће искључити и могућност да модификује каскаду догађаја који следе по везивању бактеријског липополисахарида за одговарајуће рецепторе у спленоцитима.

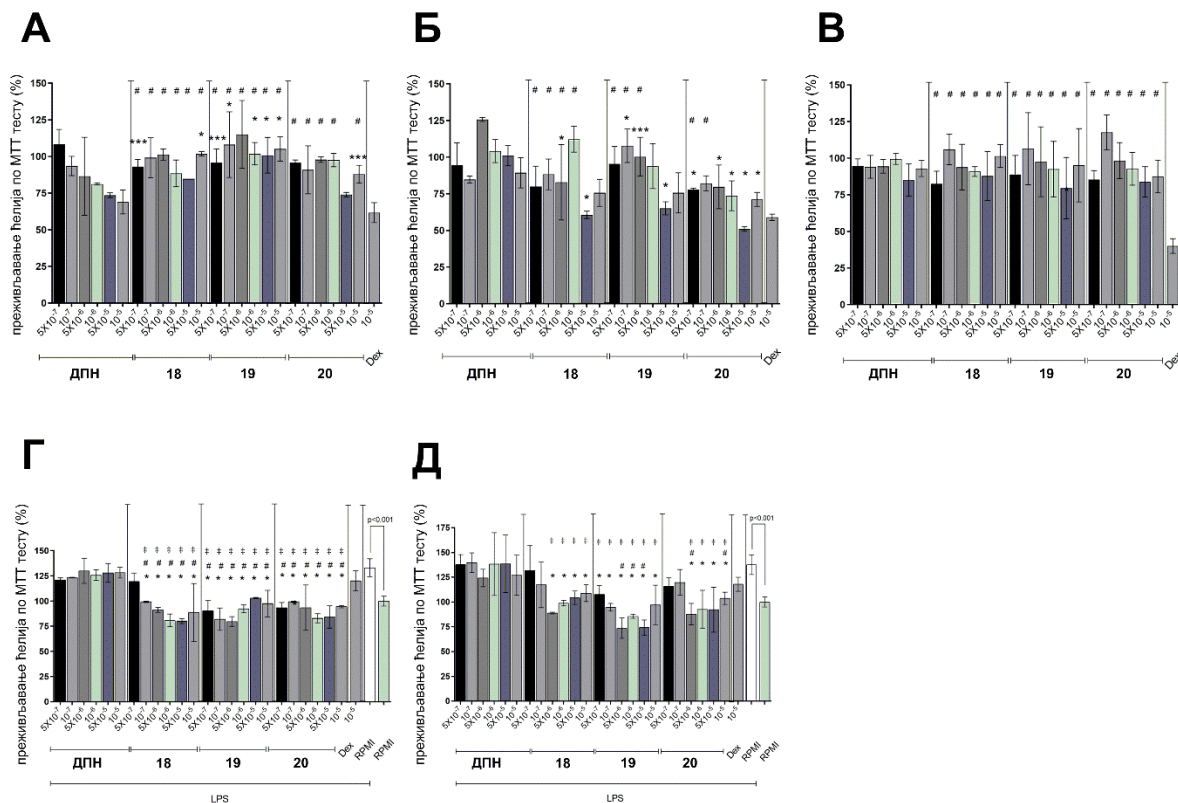
После инкубације од 24 h, цитотоксичност једињења **18** и **20** била је готово истоветна оној коју је испољио 16-дехидропрегненолон, док је активност једињења **19**



Слика 4.1.3.4. Дејство различитих концентрација (у μM) епоксипрогестерона (ЕП) и конјугата 17 на преживљавање нестимулисаних спленочита (А–В) и пролиферацију стимулираних спленочита (Г и Д); знаковима *, # и ‡ обележене су статистички значајне разлике.

била значајно мања (слика 4.1.3.5, А). После 48 h, најзначајнију токсичност испољило је једињење 20, у свим испитиваним концентрацијама, а такође је била уочљива зависност активности од концентрације. (слика 4.1.3.5, Б). После 72 h није било разлике у цитотоксичности полазног стероидног једињења и конјугата 18–20 (слика 4.1.3.5, В). Уочена активност ДПН може се делимично приписати његовом својству да активира апоптозу којој посредују митохондрије и да зауставља ћелијски циклус у G1 фази.^[203] Док су конјугати 18–20 испољили имуномодулаторну активност, ДПН није испољио антипролиферативну активност према спленочитима активираним помоћу LPS (слика 4.1.3.5, Г и Д).

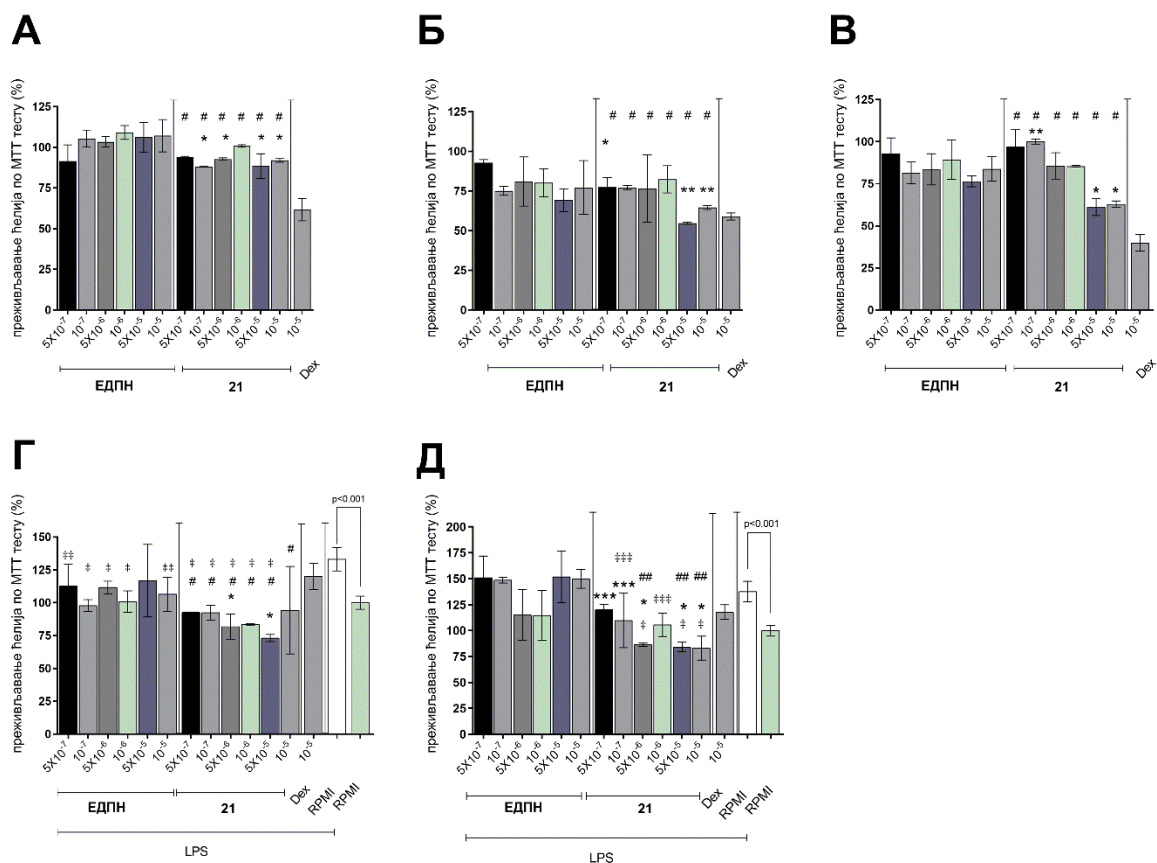
Цитотоксичност једињења 21 била је мање изражена у току првих 24 h у односу на епоксид D-прстена 16-дехидропрегненолона (слика 4.1.3.6, А). Међутим, после дуже инкубације (48 и 72 h) цитотоксичност овог конјугата била је израженија (слика 4.1.3.6, Б



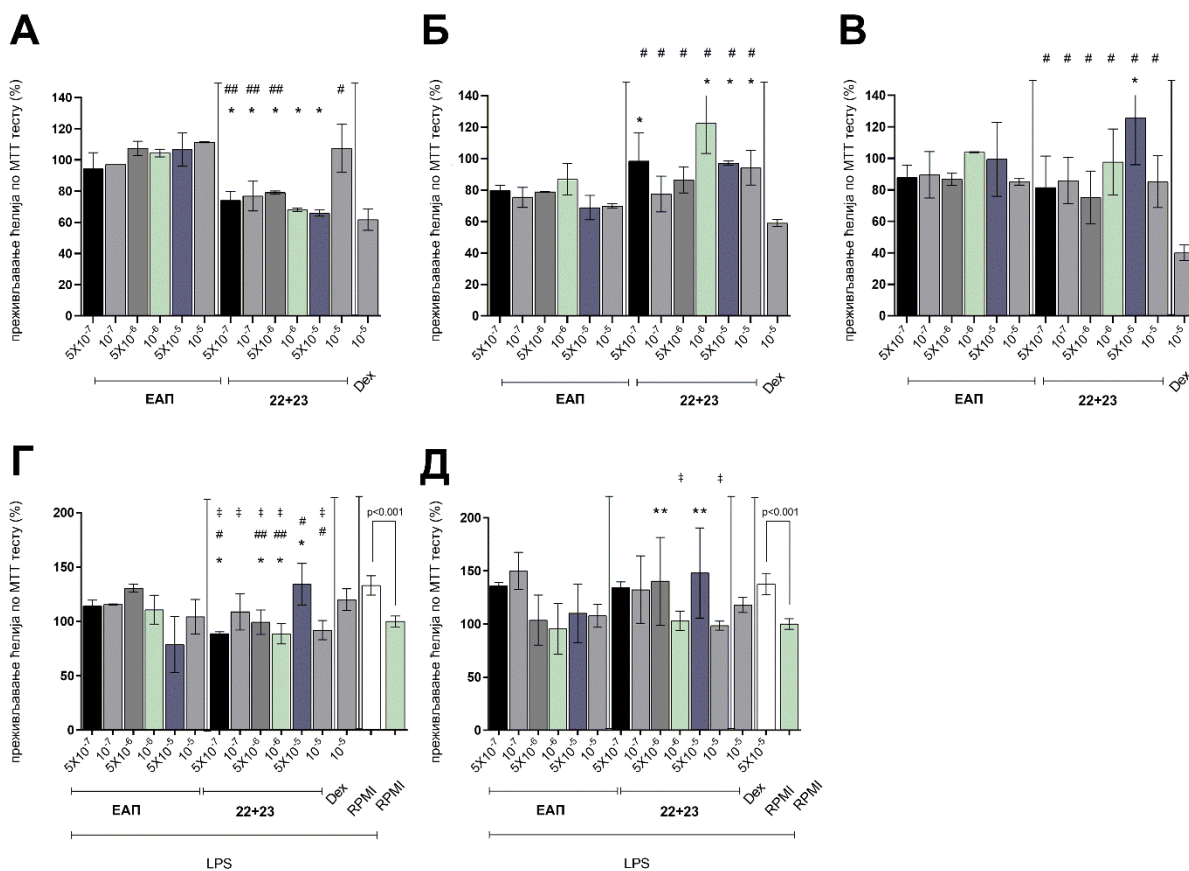
Слика 4.1.3.5. Дејство различитих концентрација (у μM) 16-дехидропрегненолона (ДПН) и конјугата **18–20** на преживљавање нестимулисаних спленоцита (А–В) и пролиферацију стимулираних спленоцита (Г и Д); знаковима *, # и ‡ обележене су статистички значајне разлике.

и В). Ово је такође прво истраживање у којем је испитан имуномодулаторни потенцијал ЕДПН. Ово стероидно једињење било је начелно нетоксично, што је нарочито добро уочљиво из резултата после дужих времена инкубације. Док је конјугат **21** деловао антипролиферативно на спленоците активирание помоћу LPS, ЕДПН није показао такав ефекат (слика 4.1.3.6, Г и Д).

Излагање спленоцита смеши епимера **22** и **23** изазвало је смањење преживљавања у току првих 24 h, али је ова цитотоксичност била значајно смањена после 48 и 72 h (слика 4.1.3.7, А–В). Епиалопрегнанолон није утицао на преживљавање ћелија током првих 24 h, али је изазвао смањење преживљавања за око 20% после 48 и 72 h (слика 4.1.3.7, А–В). Из огледа на активираним спленоцитима (слика 4.1.3.7, Г и Д) може се закључити да конјугација с фероценом донекле појачава инхибицију пролиферације спленоцита индуковану помоћу LPS после 48 h, док је после 72 h активност конјугата и полазног стероида била готово истоветна.



Слика 4.1.3.6. Дејство различитих концентрација (у μM) епоксида D-прстена 16-дехидропрегненолона (**ЕДПН**) и конјугата **21** на преживљавање нестимулисаних спленоцита (**А**–**В**) и пролиферацију стимулираних спленоцита (**Г** и **Д**); знаковима *, # и ‡ обележене су статистички значајне разлике.



Слика 4.1.3.7. Дејство различитих концентрација (у μM) епиалопрегнанолона (ЕАП) и семеше конјугата **22** и **23** на преживљавање нестимулисаних спленоцита (А–В) и пролиферацију стимулираних спленоцита (Г и Д); знаковима *, # и ‡ обележене су статистички значајне разлике.

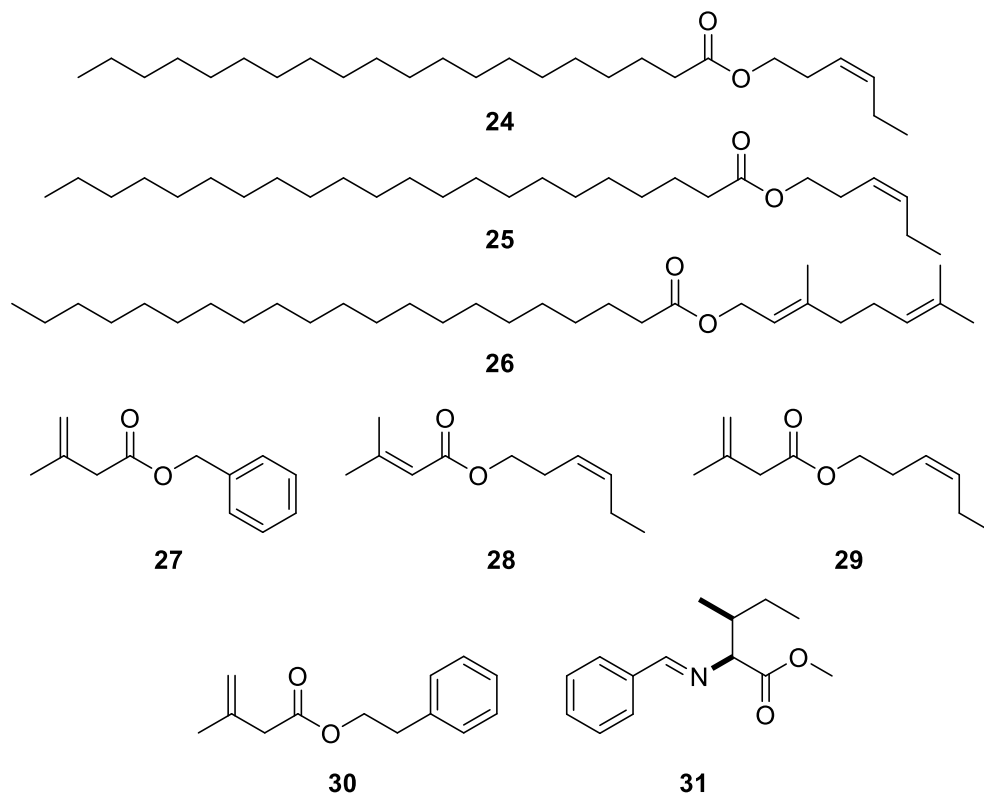
Табела 4.1.3.2. ^{13}C НМР хемијска померања за једињења **16–23** у CDCl_3 (101 MHz).

Положај	δ_{C} (ppm)							
	16	17	18	19	20	21	22	23
1	35,7	35,6	37,2	37,8	37,2	35,7	37,06	37,00
2	33,9	33,9	31,6	31,7	31,5	33,9	31,5	31,4
3	199,5	199,4	71,7	71,7	71,7	199,5	71,3	71,2
4	124,0	124,0	42,2	42,4	42,2	124,0	38,1	38,2
5	171,1	170,7	140,7	141,4	140,8	171,1	28,7	28,7
6	32,8	33,4	121,4	121,1	121,4	32,8	24,2 ^a	24,2
7	32,0	31,6	31,7	31,8	31,7	32,0	32,14	32,32
8	38,6	32,7	31,9	30,4	31,6	38,6	35,4	35,7
9	53,8	53,9	50,0	50,7	50,0	53,8	54,4	53,6
10	34,0	38,7	36,6	36,7	36,6	34,0	50,6 ^a	50,6
11	21,1	20,5	20,8	20,8	20,8	21,1	21,16	21,33
12	39,0	31,5	39,0	34,7	39,1	39,0	39,5 ^a	39,5
13	44,7	42,1	45,2	46,8	45,2	44,7	44,9	44,7
14	56,3	44,9	54,7	56,5	54,7	56,3	45,0 ^a	45,0
15	24,6	27,5	33,1	32,7	32,5	24,6	37,00	37,06
16	22,7	60,0	80,1	142,3	81,9	22,7	22,7 ^a	22,7
17	61,3	70,8	68,9	156,0	68,9	61,3	61,7	58,7
18	13,6	15,4	14,6	16,0	14,6	13,6	12,34	21,02
19	17,4	17,2	19,4	19,4	19,4	17,4	13,7	12,28
20	199,3	193,9	198,5	187,9	198,3	199,3	199,7	202,7
21	124,4	118,4	124,7	120,8	124,6	124,4	124,6	125,8
1'	143,2	145,8	144,1	143,2	144,2	143,2	142,82	142,84
2'	79,0	78,9	79,0	79,7	78,9	79,0	79,11	79,08
3'	68,7/ 69,0	68,6/ 69,6	69,0/ 69,1	68,6/ 68,9	68,7/ 69,1	68,7/ 69,0	68,7 ^a / 68,87	68,7 ^a / 68,89
4'	71,1	71,3/ 71,4	71,4	71,0	71,2	71,1	70,99 ^a / 71,00 ^a	70,99 ^a / 71,00 ^a
5'	71,1	71,3/ 71,4	71,4	71,0	71,2	71,1	70,99 ^a / 71,00 ^a	70,99 ^a / 71,00 ^a
6'	68,7/ 69,0	68,6/ 69,6	69,0/ 69,1	68,6/ 68,9	68,7/ 69,1	68,7/ 69,0	68,7 ^a / 68,87 ^a	68,7 ^a / 68,87 ^a
1''–5''	69,8	69,8	69,9	69,7	69,7	69,8	69,7 ^a	69,7 ^a
OCH_2CH_3	/	/	65,0	/	/	/	/	/
OCH_2CH_3	/	/	15,5	/	/	/	/	/
OCH_3	/	/	/	/	57,2	/	/	/

^aРезонанце се у $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ спектру смеше **22** и **23** јављају као јединствени сигнал.

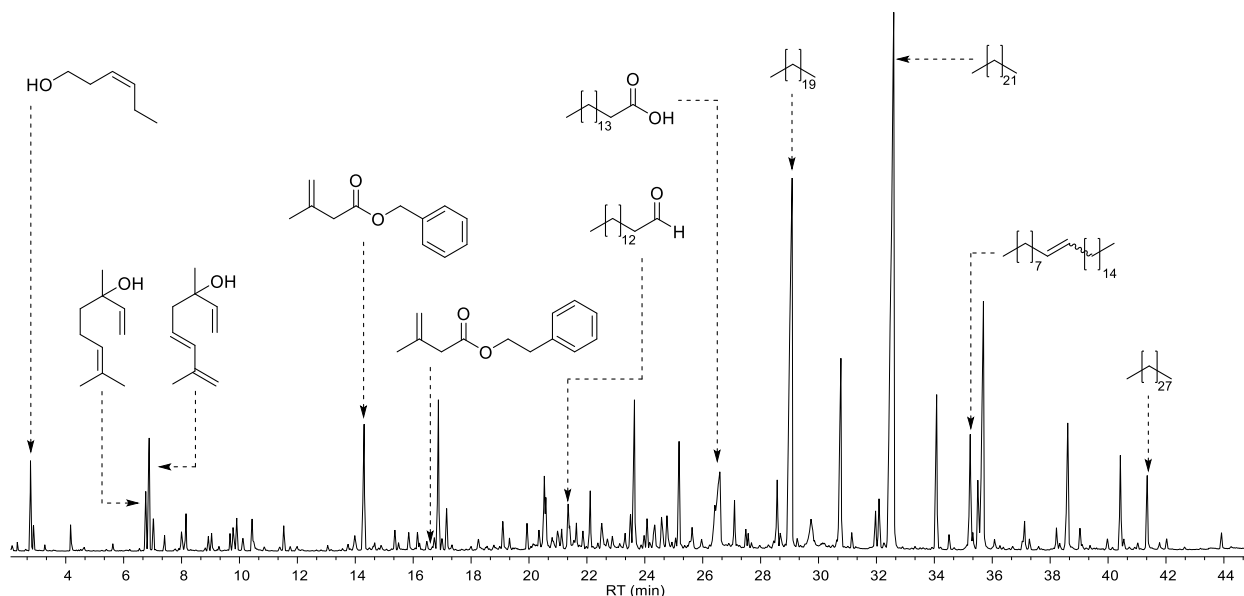
4.2. Изоловање и идентификација нових испарљивих једињења из црне зове (*Sambucus nigra* L.)

Анализирани су хемијски састав испарљивих једињења три узорка сувих цветова црне зове из популација које расту у дивљини у Србији и Уједињеном Краљевству. Пронађено је укупно 252 једињења као састојака етарског уља, а од овог броја 115 је пронађено по први пут као испарљиво једињење из цветова *S. nigra*, укључујући и седам нових природних естара. Три естра дуголанчаних карбоксилних киселина, (*Z*)-хекс-3-ен-1-ил-арахидат (**24**, слика 4.2.1), (*Z*)-хекс-3-ен-1-ил-бехенат (**25**) и геранил-хенеикозаноат (**26**), прелиминарно су идентификована интерпретацијом њихових масених спектра, а затим је њихово присуство у етарским уљима показано експериментима коинјекције. Бензил-3-метилбут-3-еноат (бензил-изосенециоат, **27**), једињење за које је претходно било непознато да се јавља у природи, изоловано је хроматографским раздвајањем етарског уља, а његова структура установљена је НМР спектроскопијом. Откриће овог изосенециоатног естра потпомогло је откриће још два естра ове ретке киселине, једног са (*Z*)-хекс-3-ен-1-олом (**29**), а другог са фенетил-алкохолом (**30**), као и (*Z*)-хекс-3-ен-1-ил-сенециоата (**28**), чији ретенциони индекси и масени спектри су се подударали с оним добијеним из синтетских смеша производа. Такође је идентификован и *N*-бензилиден-метил-изолеуцинат (**31**), имин који је претходно једино нађен у цветовима сремзе (*Prunus padus* L., Rosaceae).



Слика 4.2.1. Новооткривени састојци етарског уља сувих цветова *S. nigra*.

Наши првобитни покушаји да се анализира етарско уље сувих цветова црне зове подразумевали су хидродестилацију на лабораторијској скали, а затим анализу добијених етарских уља гасном хроматографијом. Два испитана узорка (**СРБ1** и **СРБ2**) прикупљена су у две различите године с истог локалитета у Србији, а трећи узорак (**УК**) прибављен је са севера Енглеске, Уједињено Краљевство, исте године као и **СРБ1**. Приноси етарских уља су очекивано били врло ниски за сва три узорка (0,02% за **СРБ1**, 0,05% за **СРБ2** и 0,03% за **УК**, *m/m*), па су нам жућкаста етарска уља била доступна у врло ограниченим количинама. Резултати ГЦ–МС и ГЦ–ФИД анализа ових узорка сумирани су у табели 4.2.1, а један типичан хроматограм приказан је на слици 4.2.2.



Слика 4.2.2. Репрезентативан укупни јонски хроматограм етарског уља сувих цветова зове (**СРБ1**); пикови појединих састојака су обележени.

Табела 4.2.1. Идентификована једињења у етарском уљу сувих цветова *S. nigra*.

РИ ^а	Састојак	Класа ^б	Узорак ^с			Лит. ^д	Идентиф. ^е
			СРБ1	УК	СРБ2		
731	3-Метилбутан-1-ол	НТ			tr	+	RI, MS
733	2-Метилбутан-1-ол	НТ			0,1	+	RI, MS
740	Хекс-5-ен-2-он	ОЛ			tr	–	RI, MS
762	Пентан-1-ол	ОЛ			tr	–	RI, MS, CoI
765	(Z)-Пент-2-ен-1-ол	ОЛ			tr	–	RI, MS
802	2-Хидроксипропионитрил (лактонитрил)	О	tr			–	RI, MS
803	3-Метилбут-2-ен-1-ол (пренол)	НТ	tr		tr	–	RI, MS
811	3-Метилбут-2-енал	НТ	tr		tr	–	RI, MS
819	4-Метилпент-3-ен-2-он	О	tr			+	RI, MS
845	Фурфурал	ОЛ	tr	tr		+	RI, MS, CoI
850	3-Метилпентан-1-ол	О	tr	tr	tr	–	RI, MS
856	(E)-Хекс-3-ен-1-ол	ОЛ	tr	tr	tr	+	RI, MS
861	(Z)-Хекс-3-ен-1-ол	ОЛ	1,0	8,3	0,7	+	RI, MS, CoI
869	Хексан-1-ол	ОЛ	0,2	1,1	0,1	+	RI, MS, CoI
879	3-Метилпент-3-ен-2-ол	О	tr			–	RI, MS
887	2,6-Диметилхепта-1,5-диен	О	tr	tr		–	RI, MS
894	Хептан-2-он	ОЛ	tr	tr	tr	–	RI, MS
897	Метил-2-хидрокси-3-метилбутаноат	НТ	tr	tr		–	RI, MS
903	(Z)-Хепт-4-енал	ОЛ	tr	tr	tr	–	RI, MS
904	Хептанал	ОЛ	0,1	0,1		+	RI, MS, CoI
911	(Z)-Хекс-3-ен-1-ил-формијат	ОЛ		tr		–	RI, MS
927	(E)-Хепт-3-ен-2-он	ОЛ			tr	–	RI, MS
956	(E)-Хепт-2-енал	ОЛ	tr	tr		+	RI, MS
964	Бензалдехид	О	0,4	9,1	0,4	+	RI, MS, CoI
969	Хептан-1-ол	ОЛ	tr	tr	tr	+	RI, MS, CoI
978	Окт-1-ен-3-ол	ОЛ	tr	0,1	tr	+	RI, MS, CoI
982	2-Метилоктан-3-он	О	tr			–	RI, MS
987	6-Метилхепт-5-ен-2-он	О	tr	0,1	tr	+	RI, MS
992	4-Метилтиобутан-2-он	О	tr	tr		–	RI, MS
994	2-Пентилфуран	ОЛ	tr	0,3	tr	+	RI, MS

наставак табеле 4.2.1.

РИ ^а	Састојак	Класа ^б	Узорак ^в			Лит. ^г	Идентиф. ^д
			СРБ1	УК	СРБ2		
996	Метил-2-хидрокси-3-метилпентаноат ^е	О	0,1	tr	tr	–	RI, MS
1000	(<i>E</i>)-2-(Пент-2-ен-1-ил)фуран	OL		tr		+	MS
1004	Октанал	OL	tr	tr	tr	+	RI, MS, CoI
1008	<i>цис</i> -Дехидроксилиналоол-оксид	МО		tr	tr	+	RI, MS
1013	(<i>E,E</i>)-Хепта-2,4-диенал	OL	tr	tr	tr	+	RI, MS
1014	2-Ацетилтијазол	О			tr	–	RI, MS
1028	Лимонен	МН			tr	+	RI, MS, CoI
1029	Бензил-алкохол	О	Tr	0,2		+	RI, MS, CoI
1033	(<i>E</i>)-Окт-3-ен-2-он	OL		tr		–	RI, MS
1034	(<i>Z</i>)- β -Оцимен	МН			tr	+	RI, MS, CoI
1046	Фенилацеталдехид	О	0,1	0,3	0,1	+	RI, MS
1048	(<i>E</i>)- β -Оцимен	МН			0,1	+	RI, MS
1054	Салицилалдехид	О			tr	–	RI, MS
1058	(<i>E</i>)-Окт-2-енал	OL	tr	0,1	tr	+	RI, MS
1060	(<i>E</i>)-Окт-2-ен-1-ол	OL		0,1		–	RI, MS
1069	Октан-1-ол	OL	tr	tr	tr	+	RI, MS, CoI
1071	(<i>E,E</i>)-Окта-3,5-диен-2-он	OL	tr	tr		–	RI, MS
1076	<i>цис</i> -Линалоол-оксид (фураноидни)	МО	tr	2,5	tr	+	RI, MS
1093	<i>транс</i> -Линалоол-оксид (фураноидни)	МО	tr	0,6	0,1	+	RI, MS
1093	<i>орто</i> -Гвајакол	О		tr		–	RI, MS
1096	(<i>E,Z</i>)-Окта-3,5-диен-2-он	OL		tr		–	RI, MS
1099	2-Метилбутил-2-метилбутаноат	О			tr	–	RI, MS
1103	Линалоол	МО	1,0	3,9	3,8	+	RI, MS, CoI
1107	Нонанал	OL	tr			+	RI, MS, CoI
1108	<i>транс</i> -Хотриенол	МО	1,9	5,2	0,8	+	RI, MS, NMR
1114	<i>цис</i> -Ружа-оксид	МО	0,4	1,7	0,1	+	RI, MS
1117	2-Фенилетанол (фенетил-алкохол)	О	tr	0,5	tr	+	RI, MS, CoI
1120	1,3,8- <i>p</i> -Ментатриен	МН			tr	–	RI, MS
1130	<i>транс</i> -Ружа-оксид	МО	0,2	0,8	tr	+	RI, MS

наставак табеле 4.2.1.

РИ ^а	Састојак	Класа ^б	Узорак ^в			Лит. ^г	Идентиф. ^д
			СРБ1	УК	СРБ2		
1142	Фенилацетонитрил	О	tr	Tr		–	RI, MS
1145	Јоргован-алдехид А	МО	tr	0,1	tr	+	RI, MS
1146	(<i>Z</i>)-2,6-Диметил-5,7-октадиен-4-он (<i>Z</i> -тагетон)	МО	tr	0,1	tr	+	RI, MS
1149	Камфор	МО		Tr		+	RI, MS, CoI
1152	Јоргован-алдехид Б	МО		0,2		+	RI, MS
1155	Изоборнеол	МО			tr	–	RI, MS, CoI
1155	1-Етенил-4-метоксибензен (<i>para</i> -виниланизол)	О	0,4	0,9	0,7	+	RI, MS
1156	Нерол-оксид	МО		Tr		+	RI, MS, CoI
1161	Неидентификовани састојак ^б		0,5	2,1			
1168	Јоргован-алдехид Д	МО	tr	0,1	tr	+	RI, MS
1169	Нонан-1-ол	ОЛ			0,1	+	RI, MS, CoI
1172	<i>cis</i> -Линалоол-оксид (пираноидни)	МО		7,8	tr	+	RI, MS
1175	<i>trans</i> -Линалоол-оксид (пираноидни)	МО	tr	0,8		+	RI, MS
1177	2-Фенилетил-формијат	О		Tr		–	RI, MS
1189	(<i>E</i>)-2,6-Диметилукта-3,7-диен-2,6-диол (ходиендиол)	МО	tr	0,2	tr	–	RI, MS, NMR
1193	α -Терпинеол	МО	0,2	0,3	tr	+	RI, MS
1198	Метил-салицилат	О	0,2	0,9	0,7	+	RI, MS, CoI
1200	Додекан	АНЕ	tr			+	RI, MS, CoI
1206	Деканал	ОЛ	tr	Tr	0,1	+	RI, MS, CoI
1215	5-Оксолиналоол (6-хидрокси-2,6-диметилукта-2,7-диен-4-он)	МО	0,2	Tr	tr	+	RI, MS, CoI
1219	(<i>Z</i>)-Хекс-3-ен-1-ил-2-метилбутаноат	ОЛ			tr	+	MS
1228	β -Цитронелол	МО	0,6	1,8	1,5	+	RI, MS
1233	(<i>Z</i>)-2,6-Диметилукта-2,5,7-триен-4-он ((<i>Z</i>)-оцименон)	МО	0,5	0,7	0,1	–	RI, MS
1242	(<i>E</i>)-2,6-Диметилукта-2,5,7-триен-4-он ((<i>E</i>)-оцименон)	МО	0,2	1,0	0,3	–	RI, MS

наставак табеле 4.2.1.

РИ ^а	Састојак	Класа ^б	Узорак ^в			Лит. ^г	Идентиф. ^д
			СРБ1	УК	СРБ2		
1242	Хексил-2-метилбутаноат	OL			tr	+	RI, MS
1245	Нерал	MO			0,3	+	RI, MS, CoI
1249	(Z)-Хекс-3-ен-1-ил-3-метилбут-3-еноат ((Z)-хекс-3-ен-1-ил-изосенециоат, 29)*	OL		Tr	tr	–	RI, MS
1255	Гераниол	MO	0,5	0,6	0,8	+	RI, MS, CoI
1257	Анисалдехид	O	0,2	0,3	tr	+	RI, MS
1272	Гераниал	MO	tr	0,2		+	RI, MS, CoI
1294	Дихидроедулан ПА	C	0,1	0,2	0,1	+	RI, MS
1294	Индол	O		Tr		+	RI, MS
1299	Дихидроедулан IA	C	0,4	0,5	0,7	+	RI, MS
1299	Карвакрол	MO		0,3		+	RI, MS, CoI
1300	Тридекан	ANE	tr			+	RI, MS, CoI
1315	<i>para</i> -Винилгвајакол	O	tr	0,1		+	RI, MS
1316	(E,E)-Дека-2,4-диенал	OL		0,1		+	RI, MS
1323	(Z)-Хекс-3-ен-1-ил-тиглат	OL		0,1	0,8	+	RI, MS
1326	Неролна киселина	MO	tr		tr	–	RI, MS, CoI
1329	(Z)-Хекс-3-ен-1-ил-сенециоат (28)*	OL	tr	tr		–	RI, MS, CoI
1330	Хексил-тиглат	OL			tr	+	RI, MS, CoI
1360	Еугенол	O	0,1	1,8	tr	+	RI, MS, CoI
1384	α -Копаен	SH			tr	+	RI, MS
1388	(E)- β -Дамасценон	C	0,1	0,1	0,1	+	RI, MS
1394	β -Бурбен	SH			tr	+	RI, MS
1400	Тетрадекан	ANE		tr	tr	+	RI, MS, CoI
1403	Метилеугенол	O		tr		–	RI, MS, CoI
1409	Бензил-3-метилбут-3-еноат (бензил-изосенециоат, 27)*	O	2,5	2,4	1,5	–	RI, MS, NMR
1418	(E)- β -Дамаскон	C			tr	–	RI, MS
1420	Дихидродехидро- β -јонон	C		tr	tr	+	RI, MS
1423	3,4-Дихидродехидро- β -јонол	C	tr		0,1	–	MS
1426	(E)-Кариофилен	SH	tr	0,4	0,1	+	RI, MS, CoI

наставак табеле 4.2.1.

РИ ^a	Састојак	Класа ^b	Узорак ^e			Лит. ^c	Идентиф. ^d
			СРБ1	УК	СРБ2		
1432	(E)- α -Јонон	C			tr	–	RI, MS
1436	(Z)-Хекс-3-ен-1-ил-(E)-хекс-2-еноат	OL			tr	–	RI, MS
1437	Мегастигма-3,5-диен-9-ол	C			tr	–	RI, MS
1437	2-Метилбутил-бензоат	O		tr	0,1	–	RI, MS
1454	Геранилацетон	C	0,4	0,2	0,5	+	RI, MS
1457	6,10-Диметилундека-5,9-диен-2-ол	C			tr	–	RI, MS
1460	Хумулен	SH	0,1	0,2	tr	+	RI, MS
1470	ало-Аромадендрен	SH			tr	+	RI, MS
1475	Додекан-1-ол	FAD-OL	0,4	0,2		+	RI, MS, CoI
1487	Гермакрен Д	SH	0,2	tr	0,4	+	RI, MS, CoI
1490	(E)- β -Јонон	C	0,1	tr		+	RI, MS
1500	Пентадекан	ANE	0,2	tr	0,3	+	RI, MS, CoI
1502	Бициклогермакрен	SH			tr	–	RI, MS, CoI
1505	2-Фенилетил-пентаноат (фенетил-валерат)	O		tr	tr	–	RI, MS, CoI
1508	2-Фенилетил-3-метилбут-3-еноат (фенетил-изосенециоат, 30)*	O	0,1			–	RI, MS
1508	(E,E)- α -Фарнезен	SH		0,2	0,3	+	RI, MS
1511	Гермакрен А	SH	0,2			–	RI, MS
1520	γ -Кадинен	SH			tr	+	RI, MS
1522	Дихидробоволид	FAD	0,2	0,2		–	RI, MS
1526	δ -Кадинен	SH			0,3	–	RI, MS
1529	Боволид	FAD	0,7	0,2	0,1	–	RI, MS
1538	Изопентил-салицилат	O	0,1	tr		–	RI, MS
1564	2-Метилпентадекан	ANE			tr	–	RI, MS
1566	Неролидол	SO	0,1		tr	+	RI, MS
1571	(Z)-Хекс-3-ен-1-ил-бензоат	OL		tr	0,5	+	RI, MS
1577	Пентил-салицилат	O	0,4	tr		–	RI, MS
1583	(E)-Хекс-2-ен-1-ил-бензоат	OL			0,1	+	RI, MS

наставак табеле 4.2.1.

РИ ^а	Састојак	Класа ^б	Узорак ^в			Лит. ^г	Идентиф. ^д
			СРБ1	УК	СРБ2		
1587	Кариофилен-оксид	SO	0,1	0,3	0,1	–	RI, MS
1600	Хексадекан	ANE	0,1		0,3	+	RI, MS, CoI
1606	α -Кедрол	SO	0,1	Tr		–	RI, MS
1609	Тетрадеканал (миристалдехид)	FAD-AL	0,5	0,2	0,4	+	RI, MS, CoI
1613	Хумулен-епоксид II	SO		Tr		–	RI, MS
1630	Бензофенон	O		Tr		–	RI, MS
1656	<i>цис</i> -Метил-дихидројасмонат	FAD	0,1	Tr		–	RI, MS
1660	α -Кадинол	SO	0,1		0,5	–	RI, MS
1664	2-Метилхексадекан	ANE			0,3	–	RI, MS
1677	Тетрадекан-1-ол	FAD-OL	1,3	0,8	0,8	+	RI, MS
1697	<i>N</i> -Бензилиден-метил-изолеуцинат (31)	O	tr			–	RI, MS, CoI
1700	Хептадекан	ANE	tr	0,2	1,2	+	RI, MS, CoI
1712	Пентадеканал	FAD-AL	0,9	0,8	1,1	+	RI, MS, CoI
1723	(2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i>)-Фарнезол	SO	tr			–	RI, MS
1726	(2 <i>Z</i> ,6 <i>E</i>)-Фарнезол	SO	0,2			–	RI, MS
1745	Мента-сулфид	S(O)	0,1			–	RI, MS
1761	Тетрадеканска киселина	FA	tr			+	RI, MS, CoI
1762	2-Метилхептадекан	ANE			tr	–	RI, MS
1769	Бензил-бензоат	O	tr			+	RI, MS
1781	(<i>E</i>)-Октадец-7-ен	ENE	0,2			–	RI, MS, DMDS
1782	Фенантрен	O	tr			–	RI, MS
1800	Октадекан	ANE	0,1	Tr	1,5	+	RI, MS, CoI
1805	(<i>E</i>)-Октадец-2-ен	ENE	tr			–	RI, MS
1809	Тетрадецил-ацетат	FAD-E	0,2			–	RI, MS
1818	Хексадеканал (палмиталдехид)	FAD-AL	0,7	0,1	1,1	+	RI, MS
1847	Хексахидрофарнезилацетон	C	0,5	0,4	3,1	+	RI, MS
1851	6,10,14-Триметилпентадекан-2-ол	C	0,1			–	RI, MS

наставак табеле 4.2.1.

РИ ^а	Састојак	Класа ^б	Узорак ^в			Лит. ^г	Идентиф. ^д
			СРБ1	УК	СРБ2		
1874	Бензил-салицилат	O	0,7	0,5		–	RI, MS
1876	(E)-Нонадец-9-ен	ENE	0,5	0,1	0,3	–	RI, MS, DMDS
1881	(E)-Нонадец-7-ен	ENE	0,2	Tr	0,1	+	RI, MS, DMDS
1891	Нонадец-1-ен	ENE		0,5		+	RI, MS, DMDS
1900	Нонадекан	ANE	1,9	2,3	7,0	+	RI, MS, CoI
1921	(5E,9E)-Фарнезилацетон	C	0,1	Tr		+	RI, MS
1927	Метил-хексадеканоат	FAD-E	tr	Tr	1,0	+	RI, MS
1964	2-Метилнонакозан	ANE			tr	–	RI, MS
1974	Хексадеканска киселина	FA	3,5	1,0	tr	+	RI, MS, CoI
2000	Еикозан	ANE	0,8	0,5	5,1	+	RI, MS, CoI
2011	Хексадецил-ацетат	FAD-E	tr			–	RI, MS
2022	Октадеканал (стеаралдехид)	FAD-AL	0,4	Tr	0,8	+	RI, MS
2033	(E,E)-Гераниллиналоол	DO	0,1	0,1	0,7	+	RI, MS
2038	Тетрадецил-3-метилбутаноат	FAD-E	tr			–	RI, MS
2049	Каурен	DH	0,1			–	RI, MS
2074	(E)-Хенеикоз-9-ен	ENE	0,1	0,1	0,5	+	RI, MS, DMDS
2081	(E)-Хенеикоз-7-ен	ENE	1,3	0,6	3,3	+	RI, MS, DMDS
2092	Хенеикоз-1-ен	ENE	0,5	Tr	0,3	–	RI, MS, DMDS
2096	Метил-линолеат	FAD-E	0,1		tr	–	RI, MS
2100	Хенеикозан	ANE	13,9	7,7	17,5	+	RI, MS, CoI
2111	(E)-Фитол	DO	0,2	Tr		+	RI, MS
2125	Нонадеканал	FAD-AL	tr		tr	–	RI, MS
2129	Метил-октадеканоат (метил-стеарат)	FAD-E	tr	Tr		–	RI, MS
2146	Олеинска киселина	FA	1,4			+	RI, MS
2153	Линолна киселина	FA	0,2		tr	+	RI, MS
2157	Етил-линолеат	FAD-E			0,3	–	RI, MS
2164	Етил-линоленат	FAD-E			0,3	–	RI, MS
2166	Октадеканска киселина	FA	0,1			+	RI, MS

наставак табеле 4.2.1.

РИ ^а	Састојак	Класа ^б	Узорак ^в			Лит. ^г	Идентиф. ^д
			СРБ1	УК	СРБ2		
2175	(E)-Докоз-9-ен	ENE			0,1	+	RI, MS, DMDS
2181	(E)-Докоз-7-ен	ENE	tr		0,1	-	RI, MS, DMDS
2196	Геранилгераниол	DO	0,1	Tr		-	RI, MS
2200	Докозан	ANE	4,4	1,5	2,3	+	RI, MS, CoI
2212	Октадецил-ацетат	FAD-E	tr			-	RI, MS
2227	Еикозанал	FAD-AL	0,2	Tr	0,3	+	RI, MS
2275	(E)-Трикоз-9-ен	ENE	0,7	0,2	0,8	+	RI, MS, DMDS
2281	(E)-Трикоз-7-ен	ENE	1,0	0,2		+	RI, MS, DMDS
2291	Трикоз-1-ен	ENE	0,2		1,0	-	RI, MS, DMDS
2300	Трикозан	ANE	23,1	7,7	9,3	+	RI, MS, CoI
2312	Тридецил-бензоат	FAD-E			tr	-	RI, MS
2330	Метил-еикозаноат (метил-арахидат)	FAD-E	tr		tr	+	RI, MS
2357	4,8,12,16-Тетраметилхептадекан-4-олид	FAD-E	0,1			-	RI, MS
2375	(E)-Тетракоз-9-ен	ENE	tr		tr	+	RI, MS, DMDS
2377	(Z)-Хекс-3-ен-1-ил-хексадеканоат ((Z)-хекс-3-ен-1-ил-палмитат)	FAD-E			tr	-	RI, MS
2393	Тетракоз-1-ен	ENE	tr			-	RI, MS, DMDS
2400	Тетракозан	ANE	3,1	0,8	0,8	+	RI, MS, CoI
2412	Тетрадецил-бензоат	FAD-E	tr		tr	-	RI, MS
2431	Докозанал	FAD-AL	0,2		0,1	+	RI, MS
2477	(E)-Пентакоз-9-ен	ENE	2,2		1,5	+	RI, MS, DMDS
2482	(E)-Пентакоз-7-ен	ENE	0,4	0,4	0,3	+	RI, MS, DMDS
2493	Пентакоз-1-ен	ENE	0,5	Tr	tr	-	RI, MS, DMDS
2500	Пентакозан	ANE	1,0	3,0	3,6	+	RI, MS, CoI
2520	Пентадецил-бензоат	FAD-E			tr	-	RI, MS
2533	Метил-докозаноат (метил-бехенат)	FAD-E	0,2	Tr	0,1	+	RI, MS
2573	3-Метилпентакозан	ANE	0,1			-	RI, MS

наставак табеле 4.2.1.

РИ ^a	Састојак	Класа ^b	Узорак ^c			Лит. ^e	Идентиф. ^d
			СРБ1	УК	СРБ2		
2576	(Z)-Хекс-3-ен-1-ил-октадеcanoат ((Z)-хекс-3-ен-1-ил-стеарат)	FAD-E			tr	–	RI, MS
2593	Хексакоз-1-ен	ENE	0,1		tr	–	RI, MS, DMDS
2600	Хексакозан	ANE	0,6	0,2	0,3	+	RI, MS, CoI
2612	Докозил-ацетат	FAD-E	0,2		0,1	–	RI, MS
2632	Метил-трикозаноат	FAD-E	tr	Tr	tr	+	RI, MS
2634	Тетракозанал	FAD-AL	0,1		tr	–	RI, MS
2640	Еикозил-3-метилбутаноат	FAD-E	tr	Tr	tr	–	RI, MS
2664	2-Метилхексакозан	ANE	tr		tr	–	RI, MS
2677	(E)-Хептакоз-9-ен	ENE	0,4	0,1	0,3	+	RI, MS, DMDS
2683	(E)-Хептакоз-7-ен	ENE	0,1	Tr	0,3	+	RI, MS, DMDS
2700	Хептакозан	ANE	0,1	1,5	1,1	+	RI, MS, CoI
2708	Цитронелил-хексадеcanoат (цитронелил-палмитат)	MO			tr	–	RI, MS
2720	Геранил-хексадеcanoат (геранил-палмитат)	MO			tr	–	RI, MS
2733	Метил-тетракозаноат (метил-лигноцерат)	FAD-E	0,4	0,2	0,1	+	RI, MS
2774	3-Метилхептакозан	ANE	tr			–	RI, MS
2786	(Z)-Хекс-3-ен-1-ил-еикозаноат ((Z)-хекс-3-ен-1-ил-арахидат, 24)*	FAD-E	tr		tr	–	RI, MS, CoI
2800	Октакозан	ANE	0,2	Tr	0,1	–	RI, MS, CoI
2814	Тетракозил-ацетат	FAD-E	tr		tr	–	RI, MS
2833	(све-E)-Сквален	T	1,7	0,3	1,1	+	RI, MS
2842	Докозил-3-метилбутаноат	FAD-E	0,2	Tr	0,1	–	RI, MS
2878	(E)-Нонакоз-9-ен	ENE	0,1	Tr	0,1	+	RI, MS, DMDS
2884	(E)-Нонакоз-7-ен	ENE	tr		tr	–	RI, MS, DMDS
2900	Нонакозан	ANE	1,3	0,4	0,4	+	RI, MS, CoI
2907	Цитронелил-октадеcanoат (цитронелил-стеарат)	MO			tr	–	RI, MS
2934	Метил-хексакозаноат (метил-церотат)	FAD-E	0,1	Tr	0,1	+	RI, MS

наставак табеле 4.2.1.

РИ ^а	Састојак	Класа ^б	Узорак ^в			Лит. ^г	Идентиф. ^д
			СРБ1	УК	СРБ2		
2936	Геранил-октадеcanoат (геранил-стеарат)	МО			tr	–	RI, MS
2987	(Z)-Хекс-3-ен-1-ил-докозаноат ((Z)-хекс-3-ен-1-ил-бехенат, 25)*	FAD-E	tr		tr	–	RI, MS, CoI
3000	Триаконтан	ANE	tr		tr	+	RI, MS, CoI
3042	Тетракозил-3-метилбутаноат	FAD-E	tr		tr	–	RI, MS
3100	Хентриаконтан	ANE	0,2	Tr	0,1	+	RI, MS, CoI
3244	Геранил-хенеикозаноат (26)*	МО			tr	–	RI, MS, CoI
3247	Докозил-бензоат	FAD-E	tr		tr	+	RI, MS
3300	Тритриаконтан	ANE	tr		tr	–	RI, MS, CoI
	Укупно [%]		90,0	93,0	89,0		
	Алкани	ANE	51,1	25,8	51,2		
	Алкени	ENE	8,5	2,2	9,0		
	Каротеноиди	C	1,8	1,4	4,6		
	Дитерпеноиди (угљоводоници)	DH	0,1				
	Дитерпеноиди (оксигеновани)	DO	0,4	0,1	0,7		
	Масне киселине	FA	5,2	1,0	tr		
	Деривати масних киселина	FAD	1,0	0,4	0,1		
	Деривати масних киселина – алкохоли	FAD-OL	1,7	1,0	0,8		
	Деривати масних киселина – алдехиди	FAD-AL	3,0	3,1	3,8		
	Деривати масних киселина – естри	FAD-E	1,5	0,2	2,1		
	Хемитерпеноиди	HT	tr	Tr	0,1		
	Монотерпеноиди (угљоводоници)	MH			0,1		
	Монотерпеноиди (оксигеновани)	MO	5,7	28,9	7,8		
	Друге класе једињења	O	5,3	17,1	3,5		
	Оксиплипини	OL	1,3	10,3	2,4		
	Сесквитерпени (угљоводоници)	SH	0,5	0,8	1,1		
	Сесквитерпени (оксигеновани)	SO	0,7	0,3	0,6		

наставка табеле 4.2.1.

РИ ^a	Састојак	Класа ^b	Узорак ^c			Лит. ^e	Идентиф. ^d
			СРБ1	УК	СРБ2		
	Тритерпеноиди	Т	1,7	0,3	1,1		
	Неидентификовани састојци		0,5	2,1			

^aRI = ретенциони индекс је одређен у односу на хомологу серију *n*-алкана (C₇–C₃₃) на DB-5MS колони.

^bВидети крај табеле за значења скраћеница класа једињења.

^cВидети Резултате и дискусију за локалитете с којих је сакупљен материјал; tr = присутно у траговима (< 0,05%).

^eЛит. = '+' значи да је једињење претходно наведено као испарљиви састојак цветова *S. nigra*, '-' значи да се једињење наводи по први пут.

^dИдентиф. = начин идентификације; RI = за састојак се подудара РИ с вредношћу из литературе или експериментално добијеном вредношћу, MS = масени спектар састојка се подудара са спектром из Wiley 11, NIST17, MassFinder 2.3 или лабораторијске базе масених спектра, CoI = присуство састојка потврђено ГЦ-коинјекцијом стандарда, NMR = структура састојка етарског уља је потврђена 1Д и 2Д НМР-анализом фракција уља добијених хроматографијом, DMDS = идентификација дериватизацијом диметил-дисулфидом.

^bНепознат састојак: МС (EI), *m/z* (%) 97 (10), 96 (100), 95 (51), 81 (12), 71 (45), 68 (8), 67 (21), 66 (4), 65 (10), 55 (8), 53 (7), 51 (4), 43 (35), 41 (20).

^eРелативна стереохемија није установљена.

*Нови природни производ.

Већина састојака етарског уља лако се могла идентификовати поређењем ретенционих индекса и масених спектра са подацима из литературе и/или ГЦ–МС података из комерцијалних база података, као и коинјекционим експериментима. Положај двоструке везе у неразгранатим алкенима дугог низа одређен је дериватизацијом диметил-дисулфидом. Ово је довело до успешне идентификације 135 једињења у три узорка која су већ наведена у литератури као испарљиви састојци цветова зове, као и 108 познатих природних производа који су у цветовима црне зове пронађени по први пут. Упркос малој заступљености у цветовима, састав етарског уља зове је врло комплексан, а на његов састав изгледа имају утицај локалитет, време скупљања и сезона.^[157,168] Највећи садржај монотерпена пронађен је у уљу добијеном из цветова са севера Енглеске. Сва три узорка имала су значајан садржај алкана. Како су алкани свеprisутни састојци воскова цветова, њихов висок садржај у етарским уљима указује на малу количину неугљоводоничних испарљивих једињења. Узимајући у обзир да цветови зове одају снажан и карактеристичан мирис било је неопходно подробније испитати састав уља. С овим на уму, одлучили смо се да идентификујемо што је могуће више састојака/пикова у хроматограму. Структуру читавог низа једињења није било могуће установити ослањајући се само на претходно наведене методе. Идућим напорима идентификовано је још осам засад непознатих састојака етарског уља, **24–31**. Свих осам једињења садржало је естарску функционалну групу.

Три пика која касно елуирају (РИ = 2786, 2987 и 3244) није било могуће упарити с масеним спектрима депонованим у базама података, али је уочена фрагментација у масеном спектру сугерисала да одговарају дуголанчаним естрима хекс-3-ен-1-ола, односно гераниола или нерола. Молекулски јони били су у потпуности одсутни. У прва два пика најзаступљенији јони били су на m/z 82 ($C_6H_{10}^+$, Меклафертијево премештање са алкилокси-стране), праћени m/z 69 ($C_5H_9^+$) и 55 ($C_4H_7^+$). Масени спектар другог пика такође је показивао слаб али уочљив ацилијум-јон на m/z 323. Најзаступљенији јон у масеном спектру трећег пика био је на m/z 69 ($C_5H_9^+$), али је геранил- или нерил-остатак био очигледан због m/z 136 ($C_{10}H_{16}^+$, Меклафертијево премештање). Претпостављено је да су ово највероватније естри (*Z*)-хекс-3-ен-1-ола и гераниола, јер се ова два алкохола јављају у сва три узорка у значајним количинама (1,0–8,3%, односно 0,5–0,8%), док су њихови дијастереомери или значајно мање заступљени или у потпуности одсутни. Овакви естри су познати природни производи,^[204–206] али ниједна од литературних вредности РИ није одговарала,^[207] што је сугерисало да су у етарском уљу цветова зове заправо присутни нови хомолози. Према вредностима РИ претпостављено је да се ради о (*Z*)-хекс-3-ен-1-ил-еикозаноату (**24**), (*Z*)-хекс-3-ен-1-ил-докозаноату (**25**) и геранил-хенеикозаноату (**26**), те су ова једињења синтетисана поступком Штеглихове естерификације. Валидност наше претпоставке потврђена је конијекцијама узорака чистих једињења са етарским уљима.

Нарочито интересантан састојак уља налазио се на РИ = 1409. Упркос значајном варирању заступљености бројних других састојака, ово једињење се непрестано појављивало у свим узорцима етарских уља зове које смо анализирали. У ова три узорка, његова заступљеност кретала се у интервалу 1,5–2,5%. Масени спектар овог једињења нажалост није био информативан због недостатка карактеристичних фрагментација, те је врло мало информација било доступно о његовој структури. Ово је значило да се структура једињења могла утврдити једино изоловањем. Како је релативна заступљеност овог једињења ниска, а принос етарског уља зове изузетно низак, било је неопходно сакупити што је могуће више биљног материјала. Како су популације црне зове бројне на локалитетима с којих су сакупљени узорци **СРБ1** и **СРБ2**, 323 kg свежих цветова зове је узбрано, што је дало 38 kg материјала по сушењу. Дестилација воденом паром ове количине цветова изведена је у полуиндустријској апаратури. Како се у прихватном суду није одвојио засебан слој етарског уља, добијени хидролат је екстрахован етром, а по уклањању растварача добијено је 6,8 g жућкастог екстракта дестилационе воде. Овај екстракт је фракционисан колонском драјфлеш-хроматографијом на силика-гелу. За девету добијену фракцију установљено је да садржи чисто једињење **27**, бензил-изосенециоат (бензил-3-метилбут-3-еноат) и да су РИ вредност и масени спектар идентични непознатом једињењу. Структура једињења **27** одређена је НМР спектроскопијом (табела 4.2.2, слика 4.2.3), ИР спектроскопијом и масеном спектрометријом високе резолуције. Ово једињење представља нови природни производ, јер је досад једино припремљено синтетски.^[208,209] Спектроскопски подаци били су у складу са литературним вредностима. Изосенециоати (3-метилбут-3-еноати) зацело су ретки у природи. Неки су откривени у инсектима^[210,211], неки

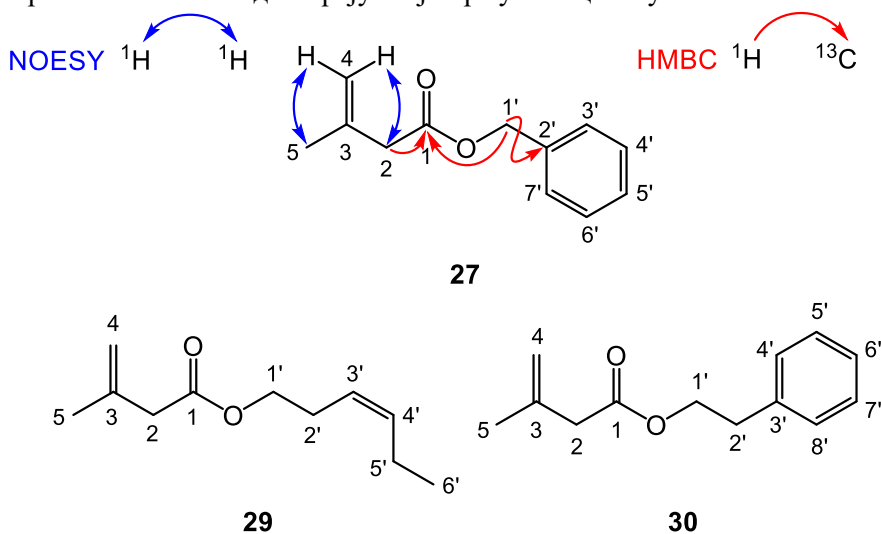
у бактеријама,^[212] а ми верујемо да је ово први пример изосенециоата који је откривен у биљном царству. Изопентенил-пирофосфат и аминокиселине разгранатог бочног ланца попут леуцина предложени су као биосинтетски прекурсори изосенециоата.^[212]

Табела 4.2.2. ¹H и ¹³C NMR спектрални подаци за изосенециоате **27**, **29** и **30** у CDCl₃ (¹H на 400 MHz, ¹³C на 101 MHz).

27			29			30		
#	¹ H ^a	¹³ C	#	¹ H ^a	¹³ C	#	¹ H ^a	¹³ C
1	/	171,3	1	/	171,5	1	/	171,6
2	3,09 dqd (1,1, 0,3, 0,2)	43,4	2	3,03 dqd (1,1, 0,2, 0,2)	43,5	2	3,01 (1,2, 0,2, 0,2)	43,5
3	/	138,4	3	/	138,6	3	/	138,5
4	pro- <i>E</i> : 4,92 dqt (1,8, 1,4, 0,2) pro- <i>Z</i> : 4,86 dtq (1,8, 1,1, 0,9)	114,9	4	pro- <i>E</i> : 4,91 dqt (1,8, 1,4, 0,2) pro- <i>Z</i> : 4,85 dtq (1,8, 1,1, 0,8)	114,7	4	pro- <i>E</i> : 4,90 dqt (1,8, 1,4, 0,2) pro- <i>Z</i> : 4,83 dtq (1,8, 1,2, 0,9)	114,8
5	1,81 ddt (1,4, 0,9, 0,3)	22,5	5	1,81 ddt (1,4, 0,8, 0,2)	22,5	5	1,76 (1,4, 0,9, 0,2)	22,4
1'	5,14 br s	66,5	1'	4,08 ^б	64,2	1'	4,30 ^б	65,1
2'	/	135,9	2'	2,39 ^б	26,7	2'	2,95 ^б	35,1
3', 7'	/	128,2	3'	5,50 ^б	134,6	3'	/	166,7 ^б
4', 6'	7,32–7,38, 5H	128,6	4'	5,34 ^б	123,7	4', 8'	7,19–7,32,	128,5 ^б
5'	/	128,3	5'	2,06 ^б	20,6 ^б	5', 7'	5H ^б	130,0 ^б
			6'	0,97 ^б	13,7	6'		126,5 ^б

^aКонстанте спрежања у Hz дате су у заградама.

^бСигнал је изохрон са сигналом одговарајућег језгра у сенециоату.



Слика 4.2.3. Нумерације коришћене за НМР асигнацију естара **27**, **29** и **30**. Важније 2Д НМР-корелације приказане су за једињење **27**.

Каснија (тридесетдруга) хроматографска фракција екстракта дестилационе воде садржала је, како је установљено поређењем РИ и МС, *транс*-хотриенол, што је касније доказано и НМР-анализом. Овај полинезасићени монотерпенски терцијарни алкохол открили су истраживачи радећи при компанији Takasago Perfumery Company као минорни састојак етарског уља лишћа камфоровог дрвета (*Cinnamomum camphora* (L.) J.Presl, Lauraceae).^[213] Мириси енантиомера овог једињења се разликују, али оба имају пријатне цветне ноте.^[214] *транс*-Хотриенол су први пут у етарском уљу зове пронашли Тулемонд и Ришар.^[163] Како у литератури није била доступна комплетна интерпретација сложених резонанци које постоје у ¹Н НМР спектру овог нестабилног једињења, искористили смо прилику да спроведемо потпуну спинску анализу његовог ¹Н спектра, а резултати су приказани у табели 4.2.3. Слично је урађено и за *транс*-ходиендиол, сродно једињење које се јавља у уљима која садрже линалоол и *транс*-хотриенол,^[165] а које је испрано са колоне у четрдесетдругој фракцији.

Табела 4.2.3. ¹Н и ¹³С НМР спектрални подаци за *транс*-хотриенол и *транс*-ходиендиол (CDCl₃, ¹Н на 400 MHz, ¹³С на 101 MHz).

#	<i>транс</i> -хотриенол	<i>транс</i> -ходиендиол		
	¹ Н ^a	¹³ С	¹ Н ^a	¹³ С
1	pro-E: 5,22 dd (17,3, 1,3) pro-Z: 5,07	112,1	1,31 dd (0,6, -0,3)	29,8/29,7
2	5,95 dd (10,7, 1,3)	144,7	/	72,8
3	/	72,9	5,70 ddddq (15,6, -0,9, -0,7, 0,6, 0,6, 0,2)	142,5
4	2,39 ddd (-13,6, 8,2, 1,2) 2,33 ddd (-13,6, 6,9, 1,4)	45,8	5,62 ddd (15,6, 8,1, 6,8)	121,7
5	5,62 dddd (15,8, 8,2, 6,9, 0,6, 0,6)	124,9	2,23 ddddq (-13,9, 8,1, -0,7, -0,3, -0,3) 2,28 dddd (-13,9, 6,8, -0,9, -0,4)	45,0
6	6,22 ddddq (15,8, 1,4, 1,2, -1,1, -0,9)	137,1	/	70,7
7	/	141,8	5,92 ddddq (17,3, 10,8, -0,4, -0,3, 0,1)	144,8
8	pro-E: 4,93 ddqd (2,1, -1,1, -0,9, 0,6) pro-Z: 4,92 ddqd (2,1, -1,0, -0,9, 0,6)	115,7	pro-Z: 5,06 dd (10,8, 1,3) pro-E: 5,20 (17,3, 1,3)	112,0
3-CH ₃	1,30 s	27,5	-	-
7-CH ₃	1,84 ddd (-1,0, -0,9, 0,4)	18,7	-	-
2-CH ₃	-	-	1,31 dq (0,2, -0,2)	29,7/29,8
6-CH ₃	-	-	1,28 d (-0,3)	27,4
ОН	1,75 br s	/	2,69 br s, 2H	/

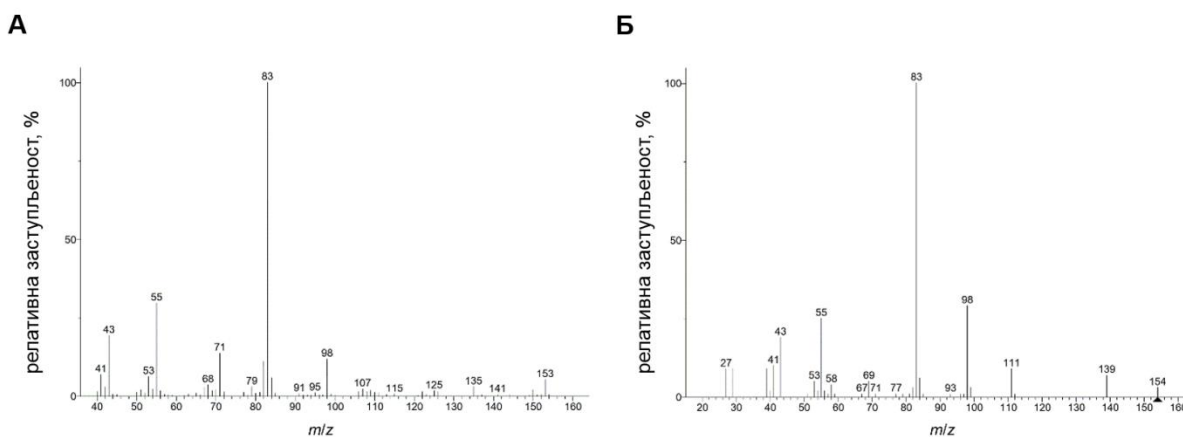
^aКонстанте спрезања у Hz дате су у заградама.

Откриће изосенециоатног естра у етарском уљу навело нас је да међу преосталим неидентификованим састојцима потражимо још оваквих молекула. Претрага m/z 83 јонске струје (ацилијум-јон $C_5H_7O^+$) довела нас је до идентификације (*Z*)-хекс-3-ен-1-ил-сенециоата (**28**), и срећним сплетом околности још два изосенециоата, (*Z*)-хекс-3-ен-1-ола (**29**) и фенетил-алкохола (**30**). Приликом литературног прегледа покушаја да се синтетишу сенециоатни и тиглатни естри привукла нам је пажњу једна занимљива особина катализатора познатог као DMAP (4-(диметиламино)пиридин).^[215–217] Наиме, примећено је да је у реакцијама у којима се DMAP користио као катализатор долазило до делимичне деконјугације, односно изомеризације α,β -незасићеног естра до β,γ -незасићеног естра. Иако овај процес омета синтезу естара конјугованих киселина, управо ова споредна реакција показала се као врло корисна у овим истраживањима, јер омогућава настајање смеша сенециоата и изосенециоата из којих се могу сакупити сви релевантни аналитички подаци. С тим на уму, извели смо Штеглихову (*Z*)-хекс-3-ен-1-ола и фенетил-алкохола са сенецио-киселином. У овим условима настајали су и сенециоатни и изосенециоатни естри, мада су изосенециоати били значајно мање заступљени. Од четири овако добијена естра, фенетил-сенециоат, није нађен у етарском уљу сувих цветова зове, али је познати састојак етарског уља иглица врсте *Pinus pinaster* Ait. (Pinaceae)^[218] и метаболит гљивице *Puccinia* (Pucciniaceae).^[219] За (*Z*)-хекс-3-ен-1-ил-сенециоат (**28**) једина доступна литература био је патент фирме Taiyo Perfumery Company који описује његову синтезу,^[220] па је и ово једињење нови природни производ. Изосенециоатни естри били су још два нова природна производа. Фенетил-изосенециоат (**29**) синтетисан је користећи новоразвијено карбониловање алилних алкохола алифатичним алкохолима катализовано паладијумом,^[221] а литературних података за (*Z*)-хекс-3-ен-1-ил-изосенециоат (**30**) није било. НМР-подаци за изосенециоате сумирани су у табели 4.2.2. Како су 2Д-технике указале на то да су протони алкохолних остатака изосенециоата **29** и **30** практично изохрони са протонима доминантнијих сенециоата, у табели су наведена хемијска померања сигнала сенециоата. Ови подаци су доследни са претходно објављеним вредностима за изосенециоате,^[210,222] али се уочавају мање разлике када се пореде са спектром фенетил-изосенециоата који је добијен карбониловањем. Тренутно немамо објашњење зашто је то тако, али истичемо да се пажљивијим погледом на слику 1H НМР спектра једињења **30** откривају трагови манипулације спектром.^[221]

Још једна специфичност цветова *S. nigra* је у томе што садрже испарљиве деривате аминокиселина. Жулен је први открио ова једињења у цветовима зове,^[165] а касније су и други истраживачи пронашли метил-естре валина, леуцина и изолеуцина међу испарљивим једињењима цветова помоћу HSPME технике,^[157,223] али није било нових идентификација имиона естара аминокиселина. Њихово одсуство у етарским уљима је очекивано, јер оваква једињења лако хидролизују и није вероватно да могу претрпети услове хидродестилације или дестилације воденом паром. У једном узорку етарског уља ипак смо идентификовали малу количину једног имиона, *N*-бензилиден-метил-изолеуцината (**31**). Чини се да су можда имиони бензалдехида нешто отпорнији према хидролизи. Пик који је елуирао на $RI = 1697$

дао је разумно подударање са масеним спектром *N*-бензилиден-метил-леуцината. Како се очекује да леуцинати и изолеуцинати дају врло сличне масене спектре и вредности РИ, ово само по себи није могло бити довољно за дефинитивну идентификацију. Нисмо располагали масеним спектром одговарајућег изолеуцината, а како је у литератури за њега доступна само РИ вредност за колону другачије поларности^[224] сматрали смо да је најбоље синтетисати оба једињења. Добијени подаци за РИ и МС, као и експерименти коинјекције, потврдили су идентификацију једињења **31** у етарском уљу. Ово једињење је досад пронађено као природни производ само као испарљиви састојак цветова врсте *Padus avium* Mill (Rosaceae).^[224]

Још један интересантан састојак етарског уља цветова зове елуирао је на РИ = 1215 (DB-5MS колоне). Масени спектар овог једињења био је прилично сличан спектру 2-метилнон-2-ен-4-она, којег претрага базе NIST даје као најподударнији (слика 4.2.4). За ово једињење се уистину наводи и скоро идентична вредност ретенционог индекса, и то за колону исте поларности.^[225]

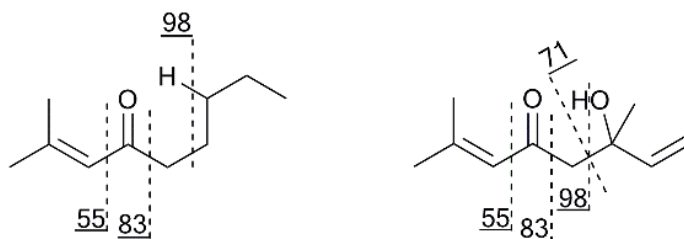


Слика 4.2.4. МС спектри (електронска јонизација) састојка који елуира на РИ = 1215 (А) и 2-метилнон-2-ен-4-она (NIST, Б).

Наше искуство је, међутим, сугерисало да је оволика вредност ретенционог индекса превелик за енон од десет угљеникових атома. Како ово једињење није комерцијално доступно, одлучили смо се да га добијемо на непрепаративан начин користећи укрштenu алдолну кондензацију ацетона и хептан-2-она, како би се на брз и ефикасан начин проверила валидност наше претпоставке о ретенционом индексу. Очекивано, производи алдолне реакције били су бројни. Међу разним производима самоадиције и самокондензације налазила су се и два пика која су одговарала адицији, односно кондензацији, ацетона и хептан-2-она. Ретенциони индекс 2-метилнон-2-ен-4-она био је исувише низак (1180) да би се ово једињење могло разматрати за идентификацију нечега што елуира на РИ = 1215. Одговарајући производ алдолне адиције јављао се на РИ = 1196. Од структурних изомера 2-метилнон-2-ен-4-она очекивало би се да испољавају још слабију

ретенцију на неполарним колонама, што је потврђено још једном укрштеном алдолном реакцијом, овога пута 5-метилхепт-2-она са ацетоном; 2,7-диметилоктан-4-он јављао се на РИ = 1146 и показивао врло сличне фрагментације као и 2-метилнон-2-ен-4-он.

Овај резултат указивао је на потребу предлога нове структуре за непознато једињење. За етарско уље листова врсте *Canella winterana* (L.) Gaertn. (Canellaceae) наведено је да садржи 2,6-диметилокт-2-ен-4-он (без РИ вредности),^[226] још један изомер 2-метилнон-2-ен-4-она, али су се кораци у овом смеру чинили погрешним због претходно установљених РИ вредности. Чињеница да производи алдолне адиције имају веће ретенционе индексе од кондензационих производа навела нас је да размотримо могућност да у једињењу заправо постоји још једна оксигенација. Биосинтетски разумна претпоставка била би да се ради о структурно сродном оксигенованом монотерпену. Масени спектар непознатог једињења садржао је пик на m/z 71, што се често среће код монотерпена попут линалоола, а одговара јону $[C_4H_7O]^+$, фрагменту терцијарног алкохола. После разматрања неколико могућности, закључили смо да је највероватнија 5-оксо-дериват линалоола (6-хидрокси-2,6-диметилокта-2,7-диен-4-он). Оваква структура би заиста објаснила постојање пика на m/z 71, који је прилично заступљен у масеном спектру непознатог једињења, али је једва видљив у масеном спектру 2-метилнон-2-ен-4-она (Слика 4.2.5). Такође су очекивани и фрагментни јони на m/z 83, 55 и 98.



Слика 4.2.5. Претпостављена фрагментација 2-метилнон-2-ен-4-она (лево) и 5-оксолиналоола (десно).

Овај дериват линалоола је први пут као синтетски интермедијер направио Парк (Park) са сарадницима 1977. године,^[227] и то у реакцији кинетичког енолата мезитил-оксида припремљеног помоћу литијум-диизопропиламида на -78 °C и метил-винил-кетона. Недуго затим га је Китахара (Kitahara) пронашао као испарљиви састојак врсте *Citrus junos* Siebold ex Такаха (Rutaceae).^[182] У овом раду се такође може наћи и масени спектар 5-оксолиналоола из којег се види присуство m/z 71 јона. Затим је ово једињење у цветовима зове пронашао и Жулен.^[165] Уверени да је непознато једињење заиста 5-оксолиналоол, поновили смо Китахарину синтезу овог једињења како бисмо добили аутентични узорак.

Масени спектар добијеног узорка показивао је одличну подударност са масеним спектром непознатог једињења, а ретенциони индекс 5-оксолиналоола износио је 1215, те је присуство овог једињења у етарском уљу цветова зове дефинитивно потврђено огледом коинјекције. Имајући ово на уму, може се рећи да су све претходне идентификације 2-метилнон-2-ен-4-она на РИ вредностима у интервалу 1210–1220 погрешне, и да се у свим

овим случајевима заправо ради о 5-оксилиналоолу. Све литературне идентификације дате су у табели 4.2.4. Иако прва идентификација која се среће у литератури не даје вредност ретенционог индекса, наведено је да је она учињена на основу корелације масеног спектра са спектром који је депонован у ранијој верзији базе NIST.^[228] Друга идентификација је начињена у етарском уљу *Marubium vulgare* L. (Lamiaceae) и то искључиво на основу подударности масеног спектра, што је у раду јасно наведено.^[229] Ни овде није наведена вредност, али се по редоследу елуирања може закључити да је око 1210. Рад Ђекаринија (Ceccarini) и сарадника први јасно наводи 2-метилнон-2-ен-4-он на РИ = 1215.^[225] Иако основа за идентификацију није експлицитно наведена, врло је вероватно да је начињена искључиво на основу подударности масених спектра, и то користећи NIST98 базу. Управо ће ова РИ вредност касније бити инкорпорирана у новије верзије NIST база масених спектра.^[207] Управо као последица овога Мијазава (Miyazawa) и сарадници у етарском уљу *E. laetevirens* проналазе 2-метилнон-2-ен-4-он на РИ = 1212 и наводе да је идентификација учињена на основу подударности масених спектра и ретенционих индекса.^[230] Од тад па надаље већи број радова погрешно идентификује овај енон на блиским вредностима РИ.^[231-241] Два значајна изузетка су испитивања испарљивих састојака у меду врста из рода *Elatostema laetevirens* (Urticaceae)^[242] и соку од *Citrus × sinensis* (Rutaceae),^[243] јер се према РИ вредностима чини да је у ова два случаја идентификација учињена исправно. Два рада наводе 2-метилнон-2-ен-4-он на РИ = 1136;^[244,245] иако је ово немогуће и засигурно погрешна идентификација, не располажемо с довољно информација да претпоставимо шта је заправо ово испарљиво једињење.

Табела 4.2.4. Литературне идентификације 2-метилнон-2-ен-4-она помоћу ГЦ и/или ГЦ-МС.

Година	Аутори	Извор једињења	РИ (колона)
1992.	Buchbauer & Jirovetz ^[228]	етарско уље <i>Passiflora incarnata</i> L., Passifloraceae	није наведен (RSL-200)
1999.	Weel et al. ^[229]	етарско уље <i>Marrubium vulgare</i> L., Lamiaceae	1210 ^a (BP-5)
2004.	Ceccarini et al. ^[225]	етарско уље листова <i>Helianthus annuus</i> L., Asteraceae	1215 (HP-5)
2005.	Pino et al. ^[246]	етарско уље листова <i>Potomorphe umbellata</i> (L.) Miq., Piperaceae	1215 (DB-5)
2009.	Baldini et al. ^[247]	етарско уље цветова <i>Melittis melissophyllum</i> L., Lamiaceae	1215 (DB-5)

наставак табеле 4.2.4.

Година	Аутори	Извор једињења	РИ (колона)
2009.	Miyazawa et al. ^[230]	етарско уље <i>Elatostema laetevirens</i> Makino, Urticaceae	1212 (HP-5MS)
2011.	Amira et al. ^[231]	етарско уље плодова <i>Phoenix dactylifera</i> L., Arecaceae	1215 (DB-5MS)
2012.	Radulović et al. ^[232]	етарско уље <i>Geranium</i> <i>sanguineum</i> L., Geraniaceae	1217 (HP5-MS)
2015.	Moronkola et al. ^[244]	етарско уље листова <i>Ruellia tuberosa</i> L., Acanthaceae	1136 (HP-5MS)
2016.	Gbadamosi & Aboaba ^[245]	етарско уље корена <i>Mondia whitei</i> (Hook. F.) Skeels, Aporocynaceae	1136 (HP-5MS)
2016.	Đorđević et al. ^[234]	етарско уље <i>Ballota</i> <i>macedonica</i> Vandas, Lamiaceae	1216 (HP-5MS)
2018.	Sampaio & Da Costa ^[235]	етарско уље листова <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A.Gray, Asteraceae	1211 (DB-5MS)
2019.	Mitić et al. ^[236]	етарско уље стабљике <i>Xanthium italicum</i> Moretti, Asteraceae	1215 (HP-5MS)
2019.	Zribi et al. ^[237]	етарско уље <i>Borago</i> <i>officinalis</i> L., Boraginaceae	1216 (Rtx-5MS)
2020.	Liu et al. ^[238]	етарско уље <i>Viola</i> <i>diffusa</i> Ging., Violaceae	1214 (HP-5MS)
2020.	Hanuš & Hod ^[239]	етарско уље цветова <i>Cannabis sativa</i> L., Cannabaceae	1215 (HP-5MS)
2021.	Rodríguez-Flores et al. ^[242]	мед врста рода <i>Erica</i> , Ericaceae	1178 (DB-5MS)

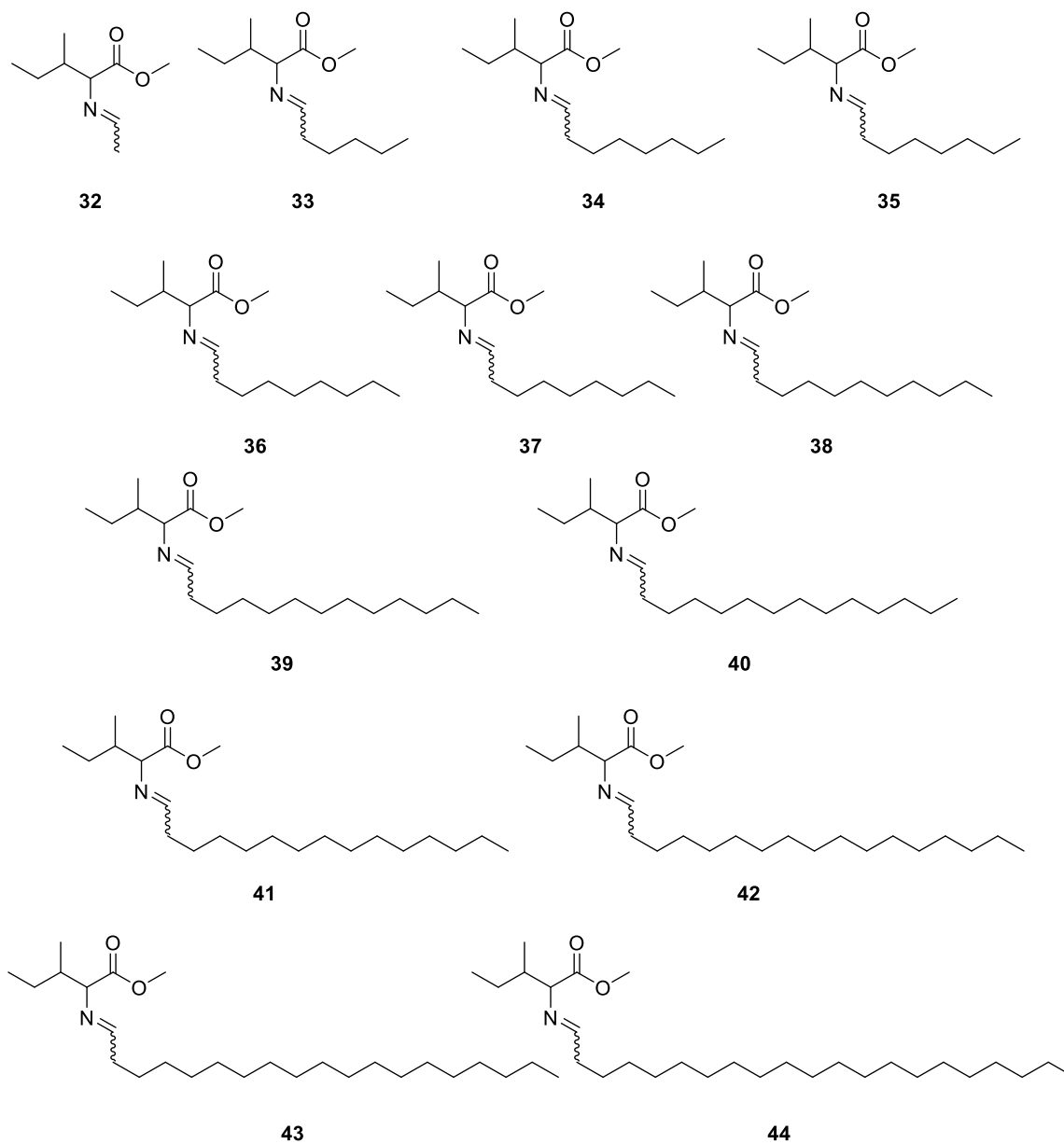
наставак табеле 4.2.4.

Година	Аутори	Извор једињења	РИ (колона)
2022.	Sun et al. ^[243]	сок од <i>Citrus</i> × <i>sinensis</i> , Rutaceae	1189 (TG-5MS)
2022.	Varčauskaitė et al. ^[240]	етарско уље цветова <i>Cannabis sativa</i> L., Cannabaceae	1215 (ZB-5 MSI)
2022.	Onanuga & Okpala ^[241]	етарско уље листова <i>Morinda citrifolia</i> L., Rubiaceae	1210 ^a (HP-5MS)
2022.	Qin et al. ^[233]	етарско уље <i>Justicia</i> <i>procumbens</i> L., Acanthaceae	1213 (HP-5MS)

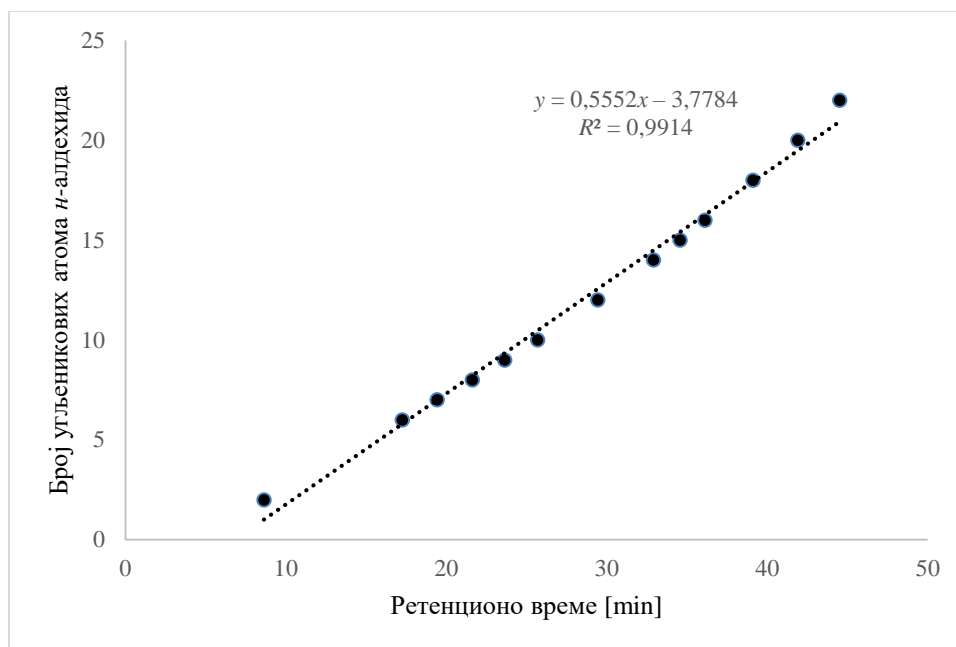
^a – Индекс није дат у раду, али је направљена процена према редоследу елуирања.

Вреди напоменути да се мала заступљеност 5-оксолиналоола у свим анализираним етарским уљима, укључујући уље *S. nigra*, може објаснити β-кетолном структуром овог једињења, одакле се елиминацијом воде добија оцименонски систем, такође заступљен у етарском уљу цветова зове. Још једна могућност је да 5-оксолиналоол подлеже ретро-алдолним процесима током дестилације.

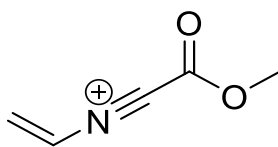
С циљем идентификације испарљивих једињења која су подложна деградацији у условима дестилације, припремљен је диетил-етарски испирак свежих цветова. Његова гаснохроматографска анализа открила је присуство серије једињења чији се основни пик налазио на m/z 112, а чија ретенциона времена су испољавала линеарну корелацију. Најиспарљивије од ових једињења (РИ = 1127) било је могуће идентификовати по масеном спектру као имин метил-естра изолеуцина и ацеталдехида (**32**, слика 4.2.6), којег је претходно у цветовима зове пронашао Жулен.^[165] Међутим, у диетил-етарском испирку очигледно је била присутна читава хомолога серија имиња метил-естра ове аминокиселине са алифатичним *n*-алдехидима (**33–44**, слика 4.2.6). Зависност њиховог ретенционог времена на DB5-MS колони од броја угљеникових атома алдехида дата је на слици 4.2.7. Карактеристичан јон ове серије m/z 112 вероватно настаје премештања праћених фрагментацијом алифатичног низа и приказан је на слици 4.2.8.



Слика 4.2 6. Структуре једињења **32–44** присутних у диетил-етарском испирку цветова *S. nigra*.



Слика 4.2.7. Зависност ретенционог времена једињења **32–44** на DB5-MS колони од броја угљеникових атома *n*-алдехида од којих су изграђени.



Слика 4.2.8. Претпостављена структура основног јона (m/z 112) уоченог у масеним спектрима једињења **32–44**.

5. ЗАКЉУЧАК

У оквиру првог правца истраживања ове докторске дисертације синтетисани су и карактеризовани нови конјугати фероцена са стероидима естра-1,3,5(10)-триенског, андростанског и прегнанског скелета. У реакцијама алкиловања помоћу (фероценилметил)триметиламонијум-јодида добијени су конјугати **2–6**, где је однос производа *O*- и *S*-алкиловања био различити у зависности од употребљеног растварача, где је употреба апротичног растварача давала искључиво производе *O*-алкиловања, а протичног и *O*- и *S*-алкиловања. Док је уочено антипролиферативно дејство ових конјугата на различите канцерске ћелијске линије, једињење **3** са IC_{50} вредношћу од 0,34 μ M на ћелије хормон-зависног канцера дојке имало је наглашенију цитотоксичност од доксорубицина, као и од свих других познатих конјугата стероида са фероценом. Није уочена токсичност конјугата **2–6** на неканцерске ћелије. Покушај да се припреми конјугат у истој стероидној серији, а у чијој структури се фенолна група налази унутар истог конјугованог π -система као и фероцен, изнедрио је нестабилно једињење **8**, добијено кондензацијом 2-формилестрадиола и ацетилфероцена. Иако није било могуће изоловати овај конјугат, добијен је и окарактерисан његов 3-моноестар **9** и 3,17-диестар **10**.

У андростанској серији, Клајзен-Шмитовом кондензацијом фероценкарбалдехида и тестостерона добијени су (*E*)- (**11**) и (*Z*)-2-(фероценилметилен)-деривати (**12**), где је *Z*-изомер био доминантан, а истом реакцијом на дихидротестостерону добијен је (*E*)-2-(фероценилметилен)-дериват **13** као једини производ, чија је структура потврђена и рендгеноструктурном анализом. Иако је једињење **12** било познато одраније, у овом раду је по први пут недвосмислено утврђена његова структура одређивањем конфигурације егзоцикличне двоструке везе NOESY-експериментима, а једињење **11** је изоловано као нови производ претходно описане реакције. Каталитичким хидрогеновањем једињења **13** у присуству паладијума на угљенику добијена су два производа, *S*-3 деоксигеновано једињење **14** и 2 α -(фероценилметил)-дериват **15**. Једињења **11–15** испољавала су антипролиферативну активност на ћелије хормон-независног (PC-3) и хормон-зависног (LNCaP) канцера простате у микромоларном опсегу IC_{50} вредности, али је сличан ниво активности за сва три једињења уочен и на нормалним фибробластима плућа фетуса, неканцерској ћелијској линији.

Једињења **16–23** добијена су кондензационим реакцијама пет различитих прегнан-20-она (прогестерона, 16 α ,17-епоксипрогестерона, 16-дехидропрегненолона, 16 α ,17-епоксипрегненолона и епиалопрегненолона) и фероценкарбалдехида. Иако су у свим случајевима добијени 21-(фероценилметилен)-деривати, на 16-ен-20-он систему 16-дехидропрегненолона уочено је и одвијање конјуговане адиције алкоксида када је реакција спровођена у метанолу или етанолу, али не и када су растварачи били изопропил-алкохол или *n*-бутил-алкохол (настајање 16 α -алокси-производа **18** и **20**). Такође, епимеризација бочног низа на *C*-17 одвијала се у случају епиалопрегненолона као супстрата, и то највероватније преко термодинамичког енолата, те је као производ ове реакције изолована смеша 17 α - и 17 β -епимера **22** и **23**, у којој је доминантан био 17 β -изомер **22** чија је структура

потврђена и рендгеноструктурном анализом. Другачији исход реакције у случају прогестерона и прегненолона може се приписати конформацијоној трансмисији. Испитан је имуномодулаторни потенцијал ових једињења *in vitro* на моделу спленоцита пацова. Сва једињења инхибирала су пролиферацију спленоцита који су стимулирани липополисахаридом, а ово дејство било је најнаглашеније у случају једињења **2** и **6**. У већини случајева уочена активност конјугата била је снажнија у односу на полазна стероидна једињења.

У оквиру другог правца истраживања, извршена је идентификација 252 једињења као састојка етарског уља сувих цветова црне зове (*Sambucus nigra* L.), од којих је 115 по први пут пронађено у овој биљној врсти, што представља 89–93% садржаја етарског уља. Седам једињења (**24–30**) били су потпуно нови природни производи. Наша истраживања указују на значајну заступљеност (*Z*)-хекс-3-ен-1-ола и његових естара у овом етарском уљу, као и присуство барем три естра у природи ретке изосенецио-киселине. По први пут као испарљиви састојак зове идентификован је и имин метил-естра изолеуцина са бензалдехидом (**31**), као и читава хомолога серија имиња овог естра са алифатичним *n*-алдехидима (**32–44**). Извршена је и потпуна спинска анализа ¹H НМР-спектра *транс*-хотриенола и *транс*-ходиендиола. Ови резултати такође сведоче у прилог богатог хемијског састава етарског уља зове, јер је овом дисертацијом број једињења идентификованх као испарљиви састојци цветова зове порастао на преко 300.

Такође је разјашњен проблем погрешне гаснохроматографске идентификације 2-метилнон-2-ен-4-она, који је системски трајао скоро двадесет година, чиме је указано да је идентификације неопходно вршити поређењем РИ и МС одређених на аутентичним узорцима, те да је у одсуству таквих података неопходно приступити синтетским поступцима и експериментима коинјекције, односно изоловању непознатих једињења из смеше која се анализира.

6. СКРАЋЕНИЦЕ

Ac	Ацетил
br	широк сигнал
COSY	correlation spectroscopy, корелациона спектроскопија
d	Дублет
DCC	<i>N,N'</i> -дициклохексилкарбодимид
dd	дублет дублета
ddd	дублет дублета дублета
dddd	дублет дублета дублета дублета
ddddd	дублет дублета дублета дублета
dddddq	дублет дублета дублета дублета квартета
ddqd	дублет дублета квартета дублета
ddqdq	дублет дублета квартета дублета квартета
DMAP	4-(диметиламино)пиридин
DMAPP	диметилаллил-пирофосфат
DMDS	диметил-дисулфид
DMF	<i>N,N</i> -диметилформаид
DMSO	диметил-сулфоксид
DOX	доксорубицин
dq	дублет квартета
dqdd	дублет квартета дублета дублета
dqt	дублет квартета триплета
dtd	дублет триплета дублета
dtq	дублет триплета квартета
dt	дублет триплета триплета
dtq	дублет триплета триплета квартета
EI	electron impact ionization, електронска јонизација
eq	еквивалент
Et	етил
Fc	фероценил
FPP	фарнезил-пирофосфат
GC	gas chromatography, гасна хроматографија
GC-MS	gas chromatography–mass spectrometry, гасна хроматографија спрегнута са масеном спектрометријом
GPP	геранил-пирофосфат
HeLa	ћелијска линија канцера грлића материце
HESI	heated electrospray ionization, јонизација електроспрејом са грејањем
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation, хетеронуклеарна корелација кроз више веза
HPLC	high-performance liquid chromatography, течна хроматографија високих перформанси
HSQC	multiplicity-edited heteronuclear single bond correlation, хетеронуклеарна корелација кроз једну везу
IC ₅₀	полумаксимална инхибиторна концентрација
IPP	изопентенил-пирофосфат

<i>i</i> -Pr	изопропил
<i>J</i>	константа спрезања
LC-MS	liquid chromatography–mass spectrometry, течна хроматографија спрегнута са масеном спектрометријом
LNCaP	андроген-зависна ћелијска линија канцера простате
LPS	lypolysaccharide, липополисахарид
LRI	linear retention index, линеарни ретенциони индекс
<i>m</i>	мултиплет
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight, матрицом потпомогнута ласерска десорпција/јонизација–време лета
MCF-7	естроген-зависна ћелијска линија канцера дојке
MDA-MB-231	естроген-независна ћелијска линија канцера дојке
Me	метил
me-HSQC	multiplicity-edited heteronuclear single bond correlation, хетеронуклеарна корелација кроз једну везу измењена за мултиплетност
MTT	3-(4,5-диметилтијазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум-бромид
MC	масена спектрометрија
<i>n</i> -Bu	<i>n</i> -бутил
NOE	нуклеарни Оверхаузеров ефекат
NOESY	nuclear Overhauser effect spectroscopy, спектроскопија на бази нуклеарног Оверхаузеровог ефекта
PC-3	андроген-независна ћелијска линија канцера простате
Pr	пропил
qdd	квартет дублета дублета
R	органил-група
RBA	relative binding affinity, релативни афинитет везивања
RI	retention index, ретенциони индекс
RMPI	Roswell Park Memorial Institute medium, медијум за узгајање ћелија назван по установи „Roswell Park Memorial Institute”
RT	retention time, ретенционо време
<i>s</i>	синглет
S _N 1	мономолекулска нуклеофилна супституција
<i>t</i>	триплет
td	триплет дублета
tdq	триплет дублета квартета
THF	тетрахидрофуран
TIC	total ion chromatogram, укупни јонски хроматограм
tqqt	триплет квартета квартета триплета
tqt	триплет квартета триплета
tt	триплет триплета
ТЛЦ	thin-layer chromatography, танкослојна хроматографија
δ	хемијско померање изражено по δ -скали
AP	андрогени рецептор
ГЦ	гасна хроматографија
ГЦ-МС	гасна хроматографија спрегнута са масеном спектрометријом

ГЦ-ФИД	гасна хроматографија са пламено-јонизационим детектором
ER α	α -изоформа естрогеног рецептора
ER β	β -изоформа естрогеног рецептора
ИР	инфрацрвена спектроскопија
ЛЦ-МС	течна хроматографија спрегнута са масеном спектрометријом
НМР	нуклеарна магнетно-резонантна спектроскопија
РИ	ретенциони индекс
УВ-Вис	ultraviolet-visible spectrophotometry, ултраљубичаста-видљива спектрофотометрија
ХРМС	high-resolution mass spectrometry, масена спектрометрија високе резољације

7. ЛИТЕРАТУРА

- [1] J. G. Lombardino, J. A. Lowe, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 853–862.
- [2] A. G. Atanasov, S. B. Zotchev, V. M. Dirsch, I. E. Orhan, M. Banach, J. M. Rollinger, D. Barreca, W. Weckwerth, R. Bauer, E. A. Bayer, et al., *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 200–216.
- [3] D. A. Dias, S. Urban, U. Roessner, *Metabolites* **2012**, *2*, 303–336.
- [4] M. C. Chifiriuc, R. Filip, M. Constantin, G. G. Pircalabioru, C. Bleotu, L. Burlibasa, E. Ionica, N. Corcionivoschi, G. Mihaescu, *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 1–12.
- [5] M. S. Butler, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 2141–2153.
- [6] G. D. Wright, *Microb. Biotechnol.* **2019**, *12*, 55–57.
- [7] S. Hanessian, *Natural Products in Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2014**.
- [8] P. Nagorny, N. Cichowicz, in *Strategies and Tactics in Organic Synthesis, Volume 12*, Elsevier, Amsterdam, **2016**, pp. 237–267
- [9] A. Kasal, in *Steroid Analysis* (Eds.: H.L.J. Makin, D.B. Gower), Springer, New York, **2010**, pp. 1–26.
- [10] G. P. Moss, *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 1783–1822.
- [11] D. Lednicer, *Steroid Chemistry at a Glance*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, England, **2011**.
- [12] M. A. T. Zullo, L. Kohout, *Plant Growth Regul.* **2004**, *42*, 15–28.
- [13] K. J. Hamilton, S. C. Hewitt, Y. Arao, K. S. Korach, *Curr. Top. Dev. Biol.* **2017**, *125*, 109–146.
- [14] M. Alemany, *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*.
- [15] S. Taraborrelli, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **2015**, *94*, 8–16.
- [16] M. Beato, S. Chávez, M. Truss, *Steroids* **1996**, *61*, 240–251.
- [17] M. Wilkinson, R. E. Brown, Cambridge University Press, Cambridge, **2015**, pp. 192–235.
- [18] P. Borah, B. K. Banik, in *Green Approaches in Medicinal Chemistry for Sustainable Drug Design* (Ed.: B.K. Banik), Elsevier, Amsterdam, **2020**, pp. 449–490.
- [19] L. Nahar, S. Sarker, A. Turner, *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 1349–1370.
- [20] J. A. R. Salvador, J. F. S. Carvalho, M. A. C. Neves, S. M. Silvestre, A. J. Leitão, M. M. C. Silva, M. L. Sá E Melo, *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 324–374.
- [21] A. Gupta, B. Sathish Kumar, A. S. Negi, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2013**, *137*, 242–

- 270.
- [22] P. L. Pauson, *J. Organomet. Chem.* **2001**, 639, 3–6.
- [23] H. Werner, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2012**, 51, 6052–6058.
- [24] J. Okuda, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, 2017, 217–219.
- [25] V. Raičević, N. Radulović, M. Sakač, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2022**, 2022, 40–46.
- [26] A. J. Deeming, in *Comprehensive Organometallic Chemistry, Volume 4* (Eds.: G. Wilkinson, F. Gordon, A. Stone), Pergamon, New York, **1982**, pp. 475–480.
- [27] G. Wilkinson, M. Rosenblum, M. C. Whiting, R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 2125–2126.
- [28] F. A. Cotton, G. Wilkinson, C. A. Murillo, M. Bochmann, *Advanced Inorganic Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, **1999**.
- [29] A. Togni, T. Hayashi, Eds., *Ferrocenes: Homogeneous Catalysis, Organic Synthesis, Materials Science*, VCH, New York, **1995**.
- [30] E. W. Neuse, *J. Inorg. Organomet. Polym.* **2005**, 15, 3–32.
- [31] P. Štěpnička, Ed., *Ferrocenes: Ligands, Materials and Biomolecules*, John Wiley & Sons, Ltd, **2008**.
- [32] N. Metzler-Nolte, M. Salmain, in *Ferrocenes: Ligands, Materials and Biomolecules* (Ed.: P. Štěpnička), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, England, **2008**, pp. 499–639.
- [33] M. F. R. Fouda, M. M. Abd-Elzaher, R. A. Abdelsamaia, A. A. Labib, *Appl. Organomet. Chem.* **2007**, 21, 613–625.
- [34] D. R. van Staveren, N. Metzler-Nolte, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 5931–5985.
- [35] N. S. Radulović, M. G. Nikolić, M. Ž. Mladenović, P. Ranđelović, N. M. Stojanović, Z. Stojanović-Radić, L. Jovanović, *Appl. Organomet. Chem.* **2021**, DOI 10.1002/aoc.6514.
- [36] J. Aksic, M. Gencic, N. Radulovic, *Facta Univ. - Ser. Physics, Chem. Technol.* **2020**, 18, 1–37.
- [37] A. Pejović, I. Damljanović, D. Stevanović, M. Vukićević, S. B. Novaković, G. A. Bogdanović, N. Radulović, R. D. Vukićević, *Polyhedron* **2012**, 31, 789–795.
- [38] K. Schlotter, F. Boeckler, H. Hübner, P. Gmeiner, *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 3628–3635.
- [39] L. V. Snegur, *Inorganics* **2022**, 10, DOI 10.3390/inorganics10120226.
- [40] G. Jaouen, A. Vessières, S. Top, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 8802–8817.
- [41] C. Biot, F. Nosten, L. Fraisse, D. Ter-Minassian, J. Khalife, D. Dive, *Parasite* **2011**, 18, 207–214.

- [42] S. Sarkar, G. Horn, K. Moulton, A. Oza, S. Byler, S. Kokolus, M. Longacre, *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 21087–21113.
- [43] S. Kim, *Cancer Manag. Res.* **2015**, *7*, 225–239.
- [44] B. W. Stewart, C. P. Wild (Eds.), *World Cancer Report 2014*, Lyon, France, **2014**.
- [45] M. A. Jakupec, M. Galanski, V. B. Arion, C. G. Hartinger, B. K. Keppler, *Dalt. Trans.* **2008**, 183–194.
- [46] P. J. Dyson, G. Sava, *Dalt. Trans.* **2006**, 1929–1933.
- [47] P. T. Schumacker, *Cancer Cell* **2006**, *10*, 175–176.
- [48] B. Halliwell, *Biochem. J.* **2007**, *401*, 1–11.
- [49] R. A. Yeary, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1969**, *15*, 666–676.
- [50] P. Kopf-Maier, H. Kopf, E. W. Neuse, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1984**, *108*, 336–340.
- [51] P. Kopf-Maier, H. Kopf, E. W. Neuse, *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1984**, *23*, 456–457.
- [52] E. W. Neuse, M. G. Meirim, N. F. Blom, *Organometallics* **1988**, *7*, 2562–2565.
- [53] E. W. Neuse, F. Kanzawa, *Appl. Organomet. Chem.* **1990**, *4*, 19–26.
- [54] C.-W. Ong, J.-Y. Jeng, S.-S. Juang, C.-F. Chen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 929–932.
- [55] H. Tamura, M. Miwa, *Chem. Lett.* **1997**, 1177–1178.
- [56] G. Tabbì, C. Cassino, G. Cavigliolo, D. Colangelo, A. Ghiglia, I. Viano, D. Osella, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5786–5796.
- [57] Y. N. Vashisht Gopal, D. Jayaraju, A. K. Kondapi, *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *376*, 229–235.
- [58] B. E. Henderson, H. S. Feigelson, *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 427–433.
- [59] M. Ulm, A. V. Ramesh, K. M. McNamara, S. Ponnusamy, H. Sasano, R. Narayanan, *Endocr. Connect.* **2019**, *8*, R10–R26.
- [60] E. A. Hillard, A. Vessières, G. Jaouen, in *Medicinal Organometallic Chemistry* (Eds.: G. Jaouen, N. Metzler-Nolte), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2010**, pp. 81–117.
- [61] M. Patra, G. Gasser, *Nat. Rev. Chem.* **2017**, *1*, 66.
- [62] D. Heydenhauss, G. Jaenecke, H. Schubert, *Zeitschrift für Chemie* **2010**, *13*, 295–295.
- [63] K. R. Barnes, A. Kutikov, S. J. Lippard, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 557–564.

- [64] B. Riesselmann, M. Wenzel, *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiol. Chemie* **1977**, 358, 1353–1358.
- [65] M. Cais, S. Dani, Y. Eden, O. Gandolfi, M. Horn, E. E. Isaacs, Y. Josephy, Y. Saar, E. Slovin, L. Snarsky, *Nature* **1977**, 270, 534–535.
- [66] K. Hoffmann, B. Rießelmann, M. Wenzel, *Liebigs Ann. der Chemie* **1980**, 1980, 1181–1185.
- [67] M. Wenzel, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1992**, 31, 641–650.
- [68] M. Cais, E. Slovin, L. Snarsky, *J. Organomet. Chem.* **1978**, 160, 223–230.
- [69] K. Shimada, S. Oril, M. Tanaka, T. Nambara, *J. Chromatogr. A* **1986**, 352, 329–335.
- [70] K. Shimada, E. Nagashima, S. Orii, T. Nambara, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1987**, 5, 361–368.
- [71] T. Higashi, K. Shimada, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 378, 875–882.
- [72] A. Vessières, C. Vaillant, M. Gruselle, D. Vichard, G. Jaouen, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 837–839.
- [73] D. Osella, O. Gambino, G. C. Dutto, C. Nervi, G. Jaouen, A. Vessières, *Inorganica Chim. Acta* **1994**, 218, 207–210.
- [74] D. Vichard, M. Gruselle, G. Jaouen, M. N. Nefedova, I. A. Mamedyarova, V. I. Sokolov, J. Vaissermann, *J. Organomet. Chem.* **1994**, 484, 1–8.
- [75] M. Wenzel, C. Klinge, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1994**, 34, 981–987.
- [76] K. Wang, S. Muñoz, L. Zhang, R. Castro, A. E. Kaifer, G. W. Gokel, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 6707–6715.
- [77] D. Osella, C. Nervi, F. Galeotti, G. Cavigiolio, A. Vessières, G. Jaouen, *Helv. Chim. Acta* **2001**, 84, 3289–3298.
- [78] A. Vessières, D. Spera, S. Top, B. Misterkiewicz, J.-M. Heldt, E. Hillard, M. Huché, M.-A. Plamont, E. Napolitano, R. Fiaschi, et al., *ChemMedChem* **2006**, 1, 1275–1281.
- [79] J. Balogh, V. Zsoldos-Mády, D. Frigyes, A. C. Bényei, R. Skoda-Földes, P. Sohár, *J. Organomet. Chem.* **2007**, 692, 1614–1618.
- [80] E. Szánti-Pintér, J. Balogh, Z. Csók, L. Kollár, Á. Gömör, R. Skoda-Földes, *Steroids* **2011**, 76, 1377–1382.
- [81] J. Balogh, R. Skoda-Földes, K. Vazdar, I. Habuš, *J. Organomet. Chem.* **2012**, 703, 51–55.
- [82] E. Szánti-Pintér, Z. Csók, L. Kollár, K. Vékey, R. Skoda-Földes, *J. Organomet. Chem.* **2012**, 718, 105–107.
- [83] F. Le Bideau, S. Dagorne, *Chem. Rev.* **2013**, 113, 7793–7850.

- [84] B. E. Herman, J. Gardi, J. Julesz, C. Tömböly, E. Szánti-Pintér, K. Fehér, R. Skoda-Földes, M. Szécsi, *Biol. Futur.* **2020**, *71*, 249–264.
- [85] J. Manosroi, K. Rueanto, K. Boonpisuttinant, W. Manosroi, C. Biot, H. Akazawa, T. Akihisa, W. Issarangporn, A. Manosroi, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3937.
- [86] J. Vera, L. M. Gao, A. Santana, J. Matta, E. Meléndez, *Dalt. Trans.* **2011**, *40*, 9557–9565.
- [87] F. Hessler, I. Císařová, D. Sedlák, P. Bartůňek, M. Kotora, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 5515–5518.
- [88] J. A. Carmona-Negrón, A. Santana, A. L. Rheingold, E. Meléndez, *Dalt. Trans.* **2019**, *48*, 5952–5964.
- [89] J. A. Carmona-Negrón, J. M. Liboy-Lugo, A. Santana, E. Meléndez, *Appl. Organomet. Chem.* **2020**, *34*, 1–13.
- [90] S. Top, C. Thibaudeau, A. Vessières, E. Brulé, F. Le Bideau, J.-M. Joerger, M.-A. Plamont, S. Samreth, A. Edgar, J. Marrot, et al., *Organometallics* **2009**, *28*, 1414–1424.
- [91] X. Narváez-Pita, A. L. Rheingold, E. Meléndez, *J. Organomet. Chem.* **2017**, *846*, 113–120.
- [92] X. Narváez-Pita, E. Meléndez, *Appl. Organomet. Chem.* **2021**, *35*, 1–9.
- [93] J. C. Medina, I. Gay, Z. Chen, L. Echegoyen, G. W. Gokel, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 365–366.
- [94] E. Coutouli-Argyropoulou, M. Tsitabani, G. Petrantonakis, A. Terzis, C. Raptopoulou, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 1382–1388.
- [95] J. Liu, P. He, J. Yan, X. Fang, J. Peng, K. Liu, Y. Fang, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 2508–2511.
- [96] *European Pharmacopoeia*, The European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), Strasbourg, **2010**.
- [97] C. Bicchi, D. Joulain, *Flavour Fragr. J.* **2018**, *33*, 133–134.
- [98] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 446–475.
- [99] K. A. Hammer, C. F. Carson, in *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents* (Ed.: H. Thormar), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, England, **2011**.
- [100] A. Gurib-Fakim, *Mol. Aspects Med.* **2006**, *27*, 1–93.
- [101] W. S. Brud, in *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications* (Eds.: K.H.C. Baser, G. Buchbauer), CRC Press, Boca Raton, FL, **2010**, pp. 843–853.
- [102] Н. Ковачевић, *Основи фармакогнозије*, Српска школска књига, Београд, **2004**.
- [103] E. Pichersky, T. D. Sharkey, J. Gershenzon, *Trends Plant Sci.* **2006**, *11*, 421–421.

- [104] K. H. C. Baser, F. Demirci, in *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability* (Ed.: R.G. Berger), Springer, New York, **2010**, pp. 43–86.
- [105] R. Kant, A. Kumar, *Sustain. Chem. Pharm.* **2022**, *30*, 100829.
- [106] J. F. Clevenger, *J. Am. Pharm. Assoc.* **1928**, *17*, 345–349.
- [107] P. Tongnuanchan, S. Benjakul, *J. Food Sci.* **2014**, *79*, 1231–1249.
- [108] C. Bicchi, in *Encyclopedia of Separation Science, Level III: Practical Applications* (Ed.: I. D. Wilson), Academic Press, Oxford, **2000**, pp. 2744–2755.
- [109] S. T. Likens, G. B. Nickerson, *Proceedings. Annu. Meet. - Am. Soc. Brew. Chem.* **1964**, *22*, 5–13.
- [110] J. Novaković, N. Rajčević, N. Garcia-Jacas, A. Susanna, P. D. Marin, P. Janačković, *Biochem. Syst. Ecol.* **2019**, *83*, 83–90.
- [111] B. S. Ribeiro, M. de F. Ferreira, J. L. Moreira, L. Santos, *Cosmetics* **2021**, *8*, 1–10.
- [112] W. N. Setzer, L. Duong, T. Pham, A. Poudel, C. Nguyen, S. R. Mentreddy, *Plants* **2021**, *10*, 1397.
- [113] М. Гашић, *Етарска уља*, Институт за хемију, технологију и металургију, Београд, **1985**.
- [114] Z. Zebec, J. Wilkes, A. J. Jervis, N. S. Scrutton, E. Takano, R. Breitling, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, *34*, 37–43.
- [115] R. Rehman, M. A. Hanif, Z. Mushtaq, A. M. Al-Sadi, *Food Rev. Int.* **2016**, *32*, 117–160.
- [116] K. Koch, W. Barthlott, *Nat. Prod. Commun.* **2006**, *1*, 1067–1072.
- [117] V. V. Zeisler-Diehl, W. Barthlott, L. Schreiber, *Hydrocarbons, Oils and Lipids: Diversity, Origin, Chemistry and Fate*, Springer, New York, **2018**, 1–16.
- [118] R. Jetter, L. Kunst, A. L. Samuels, in: *Annual Plant Reviews, Volume 23: Biology of the Plant Cuticle*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, England, **2018**.
- [119] A. C. De Groot, E. Schmidt, *Dermatitis* **2016**, *27*, 161–169.
- [120] V. I. Babushok, P. J. Linstrom, I. G. Zenkevich, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **2011**, *40*, DOI 10.1063/1.3653552.
- [121] K.-H. Kubeczka, in *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications* (Eds.: K.H.C. Baser, G. Buchbauer), CRC Press, Boca Raton, FL, **2010**, pp. 3–37.
- [122] C. Bicchi, A. Chaintreau, D. Joulain, *Flavour Fragr. J.* **2018**, *33*, 201–202.
- [123] B. d'Acampora Zellner, P. Dugo, L. Dugo, L. Mondello, in *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications* (Eds.: K.H.C. Baser, G. Buchbauer), CRC Press, Boca Raton, FL, **2010**, pp. 151–183.

- [124] E. Kováts, *Helv. Chim. Acta* **1958**, *41*, 1915–1932.
- [125] H. van Den Dool, P. Dec. Kratz, *J. Chromatogr. A* **1963**, *11*, 463–471.
- [126] Analytical Methods Committee, *Analyst* **1981**, *106*, 448.
- [127] C. Bicchi, E. Liberto, M. Matteodo, B. Sgorbini, L. Mondello, B. d'Acampora Zellner, R. Costa, P. Rubiolo, *Flavour Fragr. J.* **2008**, *23*, 382–391.
- [128] N. J. Sadgrove, G. F. Padilla-González, M. Phumthum, *Plants* **2022**, *11*, DOI 10.3390/plants11060789.
- [129] J. Karlsen, *Nat. Volatiles Essent. Oils* **2019**, *6*, 1–17.
- [130] C. Franz, J. Novak, in *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications* (Eds.: K.H.C. Baser, G. Buchbauer), CRC Press, Boca Raton, FL, **2010**, pp. 39–81.
- [131] D. Joulain, *J. Essent. Oil Res.* **1999**, *11*, 527.
- [132] International Organization of the Flavour Industry, *Zeitschrift für Leb. und -forsch. A* **1997**, *204*, 400.
- [133] International Organization of the Flavour Industry, *Flavour Fragr. J.* **2006**, *21*, 185.
- [134] P. Zang, J. Qing, Q. Lu, *Guizhou Gongxueyuan Xuebao* **1996**, *25*, 82–85.
- [135] Y. Zhang, R. M. Woods, Z. S. Breitbach, D. W. Armstrong, *Drug Test. Anal.* **2012**, *4*, 986–990.
- [136] M. J. Eliason, A. Eichner, A. Cancio, L. Bestervelt, B. D. Adams, P. A. Deuster, *Mil. Med.* **2012**, *177*, 1455–1459.
- [137] N. S. Radulović, P. D. Blagojević, *Phytochem. Anal.* **2012**, *23*, 131–142.
- [138] D. Joulain, *Perfum. Flavorist* **1994**, *19*, 5–17.
- [139] M. D. Atkinson, E. Atkinson, *J. Ecol.* **2002**, *90*, 895–923.
- [140] J. Туцаков, *Лечење биљем: фитотерапија*, Култура, Београд, **1971**.
- [141] Č. Šilić, *Atlas drveća i grmlja*, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Sarajevo, **1990**.
- [142] D. Charlebois, P. L. Byers, C. E. Finn, A. L. Thomas, *Hortic. Rev. (Am. Soc. Hortic. Sci.)* **2010**, *37*, 213–280.
- [143] G. Fossum, *Assessment Report on Sambucus Nigra L., Fructus*, London, **2014**.
- [144] K. Kaack, L. P. Christensen, M. Hughes, R. Eder, *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, *223*, 57–70.
- [145] A. Khan, E. A. Abourashed, *NoLeung's Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs, and Cosmetics*, Wiley, Hoboken, NJ, **2010**.

- [146] V. Schmitzer, R. Veberic, F. Stampar, *Berries Prop. Consum. Nutr.* **2012**, 127–148.
- [147] C. E. Finn, A. L. Thomas, P. L. Byers, S. Serçe, *HortScience* **2008**, *43*, 1385–1391.
- [148] V. Horčinová Sedláčková, O. Grygorieva, O. Vergun, Y. Vinogradova, J. Brindza, *Biosyst. Divers.* **2019**, *27*, 56–61.
- [149] E. Strauß, R. Novak, *Obstbau-Praxis*, Österreichischer Agrarverlag, Wien, **1997**.
- [150] R. H. Engel, A. M. Evens, P. Data, *Cell* **2006**, 300–312.
- [151] B. Kiproviski, Đ. Malenčić, M. Ljubojević, V. Ognjanov, R. Veberić, M. Hudina, M. Mikulic-Petkovsek, *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **2021**, *277*, 109792.
- [152] E. Mratinić, M. Fotirić, *Genetika* **2007**, *39*, 305–314.
- [153] D. Bošnjaković, V. Ognjanov, M. Ljubojević, G. Barać, M. Predojević, E. Mladenović, J. Čukanović, *Genetika* **2012**, *44*, 81–90.
- [154] K. Młynarczyk, D. Walkowiak-Tomczak, G. P. Łysiak, *J. Funct. Foods* **2018**, *40*, 377–390.
- [155] S. S. Ferreira, A. M. Silva, F. M. Nunes, *Food Rev. Int.* **2020**, *00*, 1–29.
- [156] G. Willuhn, W. Richter, *Planta Med.* **1977**, *31*, 328–343.
- [157] T. Bajer, P. Bajerová, K. Ventura, *Nat. Prod. Commun.* **2017**, *12*, 1937–1942.
- [158] Â. C. Salvador, A. J. D. Silvestre, S. M. Rocha, *Food Chem.* **2017**, *229*, 276–285.
- [159] B. Najar, B. Ferri, P. L. Cioni, L. Pistelli, *Plant Biosyst.* **2021**, *155*, 721–729.
- [160] M. Szymański, M. Dudek-Makuch, E. Witkowska-Banaszczak, W. Bylka, A. Szymański, *Pharm. Chem. J.* **2020**, *54*, 496–503.
- [161] M. D. Vujanović, S. D. Đurović, M. M. Radojković, *Acta Period. Technol.* **2021**, *273*, 229–237.
- [162] J. Basas-Jaumandreu, F. X. C. de las Heras, *Phytochem. Lett.* **2019**, *30*, 107–115.
- [163] B. Toulemonde, H. M. J. Richard, *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 365–370.
- [164] M. R. Eberhardt, W. Pfannhauser, *Zeitschrift für Leb. und -forsch.* **1985**, 97–100.
- [165] D. Joulain, *Flavour Fragr. J.* **1987**, *2*, 149–155.
- [166] U. Jørgensen, M. Hansen, L. P. Christensen, K. Jensen, K. Kaack, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2376–2383.
- [167] K. Kaack, *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 375–390.
- [168] K. Kaack, L. P. Christensen, *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 1259–1273.

- [169] G. Farré-Armengol, I. Filella, J. Llusà, J. Peñuelas, *Biochem. Syst. Ecol.* **2015**, *61*, 44–53.
- [170] H. G. Ağalar, B. Demirci, F. Demirci, N. Kırimer, *Rec. Nat. Prod.* **2017**, *11*, 491–496.
- [171] V. Nagy, A. Agócs, E. Turcsi, J. Deli, *Phytochem. Anal.* **2009**, *20*, 143–148.
- [172] D. Lednicer, C. R. Hauser, *Org. Synth.* **1960**, *40*, 31.
- [173] Ø. W. Akselsen, T. V. Hansen, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 7738–7742.
- [174] M. D. Vukićević, Z. R. Ratković, A. V Teodorović, G. S. Stojanović, R. D. Vukićević, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 9001–9006.
- [175] A. A. van de Loosdrecht, R. H. J. Beelen, G. J. Ossenkoppele, M. G. Broekhoven, M. M. A. C. Langenhuijsen, *J. Immunol. Methods* **1994**, *174*, 311–320.
- [176] A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigro-Wolff, et al., *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 757–766.
- [177] N. M. Hamilton, M. Dawson, E. E. Fairweather, N. S. Hamilton, J. R. Hitchin, D. I. James, S. D. Jones, A. M. Jordan, A. J. Lyons, H. F. Small, et al., *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4431–4445.
- [178] P. L. Julian, E. W. Meyer, I. Ryden, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 367–370.
- [179] H. Li, J. Fang, J. Li, Y. Wang, X. Tian, Y. Xiang, *Res. Chem. Intermed.* **2013**, *39*, 3887–3893.
- [180] M. G. Acimović, M. T. Cvetković, J. M. Stanković Jeremić, L. L. Pezo, A. O. Varga, I. S. Čabarkapa, B. Kiproviski, *Flavour Fragr. J.* **2022**, *37*, 20–32.
- [181] C. Toniolo, *Biopolymers* **1971**, *10*, 1707–1717.
- [182] T. Kitahara, Y. Takagi, M. Matsui, *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 897–901.
- [183] B. Раичевић, Синтеза и физичко-хемијска карактеризација А-супституисаних фероценилметил естра-1,3,5(10)-триенских деривата, мастер рад, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, **2017**.
- [184] D. E. Bublitz, K. L. Rinehart Jr., *Org. React.* **2011**, 1–154.
- [185] V. I. Boev, L. V Snegur, V. N. Babin, Y. S. Nekrasov, *Russ. Chem. Rev.* **1997**, *66*, 613–636.
- [186] A. N. Nesmeyanov, E. G. Perevalova, L. S. Shilovtseva, Y. A. Ustynyuk, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **1959**, *124*, 331.
- [187] Y. Yamaguchi, W. Ding, C. T. Sanderson, M. L. Borden, M. J. Morgan, C. Kutal, *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 515–524.
- [188] P. Ciuffreda, P. Ferraboschi, E. Verza, A. Manzocchi, *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*,

- 648–650.
- [189] J. Guo, R. I. Duclos Jr, V. K. Vemuri, A. Makriyannis, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 3465–3469.
- [190] D. Cremer, J. A. Pople, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1354–1358.
- [191] D. G. Evans, J. C. A. Boeyens, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1989**, *45*, 581–590.
- [192] J. C. A. Boeyens, *J. Cryst. Mol. Struct.* **1978**, *8*, 317–320.
- [193] N. S. Radulović, M. Z. Mladenović, N. M. Stojanović, P. J. Randjelović, P. D. Blagojević, *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, 1874–1885.
- [194] K. Hayamizu, O. Kamo, *Magn. Reson. Chem.* **1990**, *28*, 250–256.
- [195] M. I. Levenberg, J. H. Richards, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 2634–2637.
- [196] D. N. Kirk, M. P. Hartshorn, *Steroid Reaction Mechanisms*, Elsevier Publishing Company, London, **1968**.
- [197] A. R. Daniel, C. R. Hagan, C. A. Lange, *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* **2011**, *6*, 359–369.
- [198] J. Kim, E. Chapman-Davis, *Semin. Reprod. Med.* **2010**, *28*, 081–090.
- [199] M. Banerjee, D. Robbins, T. Chen, *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 618–628.
- [200] S. Dubrac, A. Elentner, S. Ebner, J. Horejs-Hoeck, M. Schmuth, *J. Immunol.* **2010**, *184*, 2949–2957.
- [201] S. Motta, L. Callea, S. Giani Tagliabue, L. Bonati, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 16207.
- [202] P. A. Kollman, D. D. Giannini, W. L. Duax, S. Rothenberg, M. E. Wolff, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 2869–2873.
- [203] E.-L. Ma, D.-M. Zhao, Y.-C. Li, H. Cao, Q.-Y. Zhao, J.-C. Li, L.-X. Sun, *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2012**, *14*, 817–825.
- [204] A. Claude-Lafontaine, P. Raharivelomanana, J.-P. Bianchini, C. Schippa, M. Azzaro, A. Cambon, *J. Essent. Oil Res.* **1992**, *4*, 335–343.
- [205] S. Schulz, C. Estrada, S. Yildizhan, M. Boppré, L. E. Gilbert, *J. Chem. Ecol.* **2008**, *34*, 82–93.
- [206] P. Remy, E. Sarrazin, C. Pérès, J. Dugay, N. David, J. Vial, *Flavour Fragr. J.* **2022**, *37*, 133–143.
- [207] N. Andriamaharavo, *Retention Data*, NIST Mass Spectrometry Data Center, **2014**.
- [208] M. Taniguchi, K. Koga, S. Yamada, *Chem. Pharm. Bull.* **1972**, *20*, 1438–1444.

- [209] G. A. Molander, T. Barcellos, K. M. Traister, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3342–3345.
- [210] T. Arai, H. Sugie, S. Hiradate, S. Kuwahara, N. Itagaki, T. Nakahata, *J. Chem. Ecol.* **2003**, *29*, 2213–2223.
- [211] S. V. S. Akella, W. D. J. Kirk, Y. Lu, T. Murai, K. F. A. Walters, J. G. C. Hamilton, *PLoS One* **2014**, *9*, e103315.
- [212] C. A. Citron, P. Rabe, J. S. Dickschat, *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1765–1776.
- [213] T. Yoshida, S. Muraki, H. Kawamura, A. Komatsu, *Agric. Biol. Chem.* **1969**, *33*, 343–352.
- [214] S. Hashimoto, Y. Sakoya, S. Hayashi, Y. Ueyama, T. Giga, *Perfume Compositions Containing Dimethyloctatrienol Optical Isomers*, **2000**, JP2000192073.
- [215] S. Hatakeyama, Y. Matsui, M. Suzuki, K. Sakurai, S. Takano, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 6485–6488.
- [216] A. Srikrishna, K. Anebouselvy, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1031–1034.
- [217] D. M. Hinkens, J. S. McElfresh, J. G. Millar, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1619–1621.
- [218] G. Pauly, M. Gleizes, C. Bernard-Dagan, *Phytochemistry* **1973**, *12*, 1395–1398.
- [219] R. A. Raguso, B. A. Roy, *Mol. Ecol.* **1998**, *7*, 1127–1136.
- [220] H. Myawaki, C. Yugawa, *Senecioic Acid Esters with Unsaturated Alcohols*, **1984**, JP59020246.
- [221] Q. Liu, L. Wu, H. Jiao, X. Fang, R. Jackstell, M. Beller, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52*, 8064–8068.
- [222] G. R. Takeoka, R. G. Buttery, L. C. Ling, R. Y. Wong, L. T. Dao, R. H. Edwards, J. De J. Berrios, *LWT - Food Sci. Technol.* **1998**, *31*, 443–448.
- [223] N. Pabi, Sortendifferenzierung von Holunder über das Aroma der Blüten, Master's Thesis, Graz University of Technology, Graz, Austria, **2012**.
- [224] H. Surburg, M. Güntert, B. Schwarze, *J. Essent. Oil Res.* **1990**, *2*, 307–316.
- [225] L. Ceccarini, M. Macchia, G. Flamini, P. Cioni, C. Caponi, I. Morelli, *Ind. Crops Prod.* **2004**, *19*, 13–17.
- [226] J. Abaul, L. Udino, P. Bourgeois, J.-M. Bessièrè, *J. Essent. Oil Res.* **1995**, *7*, 681–683.
- [227] O. S. Park, Y. Grillasca, G. A. García, L. A. Maldonado, *Synth. Commun.* **1977**, *7*, 345–350.
- [228] G. Buchbauer, L. Jirovetz, *J. Essent. Oil Res.* **1992**, *4*, 329–334.
- [229] K. G. C. Weel, P. R. Venskutonis, A. Pukalskas, D. Gruzdiene, J. P. H. Linssen, *Lipid -*

- Fett* **1999**, *101*, 395–400.
- [230] M. Miyazawa, Y. Utsumi, J. Kawata, *J. Oleo Sci.* **2009**, *58*, 163–169.
- [231] E. A. Amira, F. Guido, S. E. Behija, I. Manel, Z. Nesrine, F. Ali, H. Mohamed, H. A. Noureddine, A. Lotfi, *Food Chem.* **2011**, *127*, 1744–1754.
- [232] N. Radulović, M. Dekić, Z. Stojanović-Radić, *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 601–615.
- [233] Y. Qin, Y. Y. Tang, M. Cai, X. Liu, *Chem. Nat. Compd.* **2022**, *58*, 553–555.
- [234] A. S. Đorđević, O. P. Jovanović, B. K. Zlatković, G. S. Stojanović, *Chem. Biodivers.* **2016**, 782–788.
- [235] B. L. Sampaio, F. B. Da Costa, *Rev. Bras. Farmacogn.* **2018**, *28*, 135–144.
- [236] V. D. Mitić, M. D. Ilić, O. Jovanović, V. P. Stankov-Jovanović, M. S. Marković, G. S. Stojanović, *Nat. Prod. Commun.* **2019**, *14*, 1–6.
- [237] I. Zribi, J. Bleton, F. Moussa, M. Abderrabba, *Ind. Crops Prod.* **2019**, *129*, 290–298.
- [238] B. C. Liu, R. L. Wang, L. N. Yang, P. X. Lai, X. Xing, *Chem. Nat. Compd.* **2020**, *56*, 1151–1153.
- [239] L. O. Hanuš, Y. Hod, *Med. Cannabis Cannabinoids* **2020**, *3*, 61–73.
- [240] K. Barčauskaitė, A. Bakšinskaitė, A. Szumny, V. Tilvikienė, *Ind. Crops Prod.* **2022**, *188*, DOI 10.1016/j.indcrop.2022.115570.
- [241] A. O. Onanuga, E. O. Okpala, *Biol. Med. Nat. Prod. Chem.* **2022**, *11*, 161–167.
- [242] M. S. Rodríguez-Flores, S. I. Falcão, O. Escuredo, M. C. Seijo, M. Vilas-Boas, *Food Chem.* **2021**, *336*, 127758.
- [243] R. Sun, R. Xing, J. Zhang, L. Wei, Y. Ge, T. Deng, W. Zhang, Y. Chen, *LWT* **2022**, *162*, 113504.
- [244] O. M. Dorcas, A. A. Sherifat, Iqbal, *J. Med. Plants Res.* **2015**, *9*, 1031–1037.
- [245] T. G. Idayat, A. A. Sherifat, *J. Pharmacogn. Phyther.* **2016**, *8*, 163–167.
- [246] J. A. Pino, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8419–8419.
- [247] R. Baldini, S. Maccioni, G. Bedini, G. Flamini, P. Cioni, *Atti Soc. tosc. Sci. nat., Mem., Ser. B* **2009**, *116*, 61–66.

8. БИОГРАФИЈА



Видак Раичевић рођен је 27. септембра 1993. у Новом Саду. Похађао је Основну школу „Ђура Даничић” и Гимназију „Исидора Секулић” у Новом Саду. Освајач је бронзане медаље на Међународној хемијској олимпијади у Вашингтону (САД) 2012. године, као члан првог тима Србије који је учествовао на том такмичењу.

У више наврата добијао је Изузетну награду Универзитета у Новом Саду за успех у току студија. Основне и мастер студије хемије завршио је на Природно-математичком факултету у Новом Саду са просечном оценом 10. Дипломирао је 2016. године одбравивши дипломски рад за који је добио награду фонда Ненада М. Костића за хемијске науке. Током основних и мастер студија на Природно-математичком факултету у Новом Саду био је стипендиста Министарства просвете и науке, као и Фонда за младе таленте. Освајач је првог места на такмичењу научних радова „Приматијада 2015” у области хемија и биохемија, трофеја такмичења „Cambridge Online Chemistry Challenge” у организацији Универзитета у Кембриџу (УК) у два наврата, 2014. и 2015. године, а финалиста је такмичења „Fourth International Organic Chemistry Competition” одржаног у Бејруту (Либан) у мају 2016. године. Добитник је Годишње награде Српског хемијског друштва 2016. године, када такође бива проглашен и за најбољег студента Природно-математичког факултета у школској 2015/2016. години и најбољег студента Универзитета у Новом Саду у школској 2015/2016. години. Мастерирао је 2017. године одбравивши мастер рад под називом „Синтеза и физичко-хемијска карактеризација А-супституисаних фeroценилметил естра-1,3,5(10)-триенских деривата”. У августу исте године под менторством проф. др Јаноша Чанадија учествује на десетој Међународној хемијској олимпијади за студенте одржаној у Техерану (Иран) и осваја дванаесто место.

Коаутор је четрнаест научних радова и четрнаест саопштења на научним скуповима. Коаутор је три научна рада категорије М21, четири научна рада категорије М22, четири научна рада категорије М23, једног научног рада категорије М52 и два научна рада категорије М53. Резултате истраживања кандидат је саопштио пет пута на међународним (М34) и девет пута на домаћим научним скуповима (М64). Добитник је награде за најбољу усмену презентацију на 26. Конференцији Српског кристалографског друштва 2019. године, као и треће награде за најбољу постерску презентацију на 49. Међународном симпозијуму о етарским уљима 2018. године. Такође, 2023. године додељена му је Пупинова награда Матице српске (прва награда) за рад који је објавио у часопису *Applied Organometallic Chemistry* 2020. године.

Похађао је научну праксу на Институту за органску хемију Технолошког универзитета у Грацу (Аустрија) под менторством проф. др Тање Вродниг. Поред

научноистраживачког рада, учествовао је и у организацији такмичења из хемије за основне и средње школе. Био је члан Републичке комисије за такмичење из хемије ученика средњих школа (2016–2021), као и председник Републичке комисије за такмичење из хемије ученика основних школа (2021) и њен члан (2019, 2020. и 2022).

У току школске 2021/2022. и 2022/2023. године предавао је хемију одељењима ученика с посебним способностима за биологију и хемију у Гимназији „Јован Јовановић Змај” у Новом Саду. Био је ментор више ученика који су освојили награде на међуокружним и републичким такмичењима, а добио је похвалницу Министарства просвете за успешну припрему ученика који је освојио прво место на републичком такмичењу. Био је ментор и на изради седам матурских радова из предмета хемија.

Члан је Српског хемијског друштва, Српског кристалографског друштва, Српског друштва за фитохемију и фитомедицину и Матице српске. Говори енглески и немачки језик.

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА²

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Видак Раичевић
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	др Марија Сакач, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду др Нико Радуловић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Нишу
Наслов рада:	Синтеза нових биолошки активних конјугата стероида са фероценом и идентификација нових природних производа из црне зове (<i>Sambucus nigra</i> L.)
Језик публикације (писмо):	српски (ћирилица)
Физички опис рада:	Унети број: Страница 133 Поглавља 8 Референци 247 Табела 17 Слика 51 Схема 10 Прилога 1 (CD)
Научна област:	Хемија
Ужа научна област (научна дисциплина):	органска хемија
Кључне речи / предметна одредница:	стероидна једињења, фероцен, конјугати стероида са фероценом, антипролиферативна активност, <i>Sambucus nigra</i> L., етарска уља, испарљива једињења биљака
Резиме на језику рада:	Конјугати стероида са фероценом чине класу једињења занимљивих за медицинску хемију с обзиром на спектар биолошких активности које испољавају. У овој докторској дисертацији синтетисани су нови конјугати естра-1,3,5(10)-триена (2–6 , 8–10), андростана (11–15) и прегнана (16–23), а поједина једињења испитана су <i>in vitro</i> на антипролиферативну и имуномодулаторну активност. У случају једињења добијених алкиловањем естрадиола и естрога (фероценилметил)триметиламонијум-јодидом (2–6), једињење 3 истакло се ниском IC ₅₀ вредношћу од 0,34 µM на ћелије хормон-зависног канцера дојке (MCF-7), чиме је оно постало конјугат стероида са фероценом са најизраженијим антипролиферативним дејством према туморским ћелијама добијен до сада. Једињење 8 , добијено кондензацијом 2-формилестрадиола и ацетилфероцена, показало се као превише нестабилно да би се изоловало, али је било могуће изоловати његов моноацетат (9) и диацетат (10). Установљено је да се кондензацијом тестостерона са фероценкарбалдехидом добијају геометријски изомери 11 и 12 , док се кондензацијом дихидротестостерона са овим алдехидом добија искључиво <i>E</i> -конфигурисани конјугат 13 , чијим каталитичким хидрогеновањем су добијена два производа, <i>C</i> -3 деоксигеновано

² Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штампане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штампаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

	<p>једињење 14 и 2α-(фероценилметил)-дериват 15. Једињења 11–15 испољавала су антипролиферативну активност на ћелије хормон-независног (PC-3) и хормон-зависног (LNCaP) канцера простате у микромоларном опсегу IC₅₀ вредности, али је сличан ниво активности за сва три једињења уочен и на нормалним фибробластима плућа фетуса (MRC-5), неканцерској ћелијској линији, што је доведено у везу с потенцијално малим афинитетом везивања ових једињења за андрогени рецептор. Коњугати прегнанских стероида са фероценом 16–23 добијени су кондензационим реакцијама пет различитих прегнан-20-она, а сва ова једињења инхибирала су пролиферацију спленоцита стимулираних бактеријским липополисахаридом. Извршена је и идентификација 252 једињења у етарском уљу сувих цветова црне зове (<i>Sambucus nigra</i> L.) гасном хроматографијом, потпомогнута изоловањем, синтетским поступцима и експериментима коинјекције. Седам ових једињења (24–30) представљала су нове природне производе. Примећена је значајна заступљеност (<i>Z</i>)-хекс-3-ен-1-ола и његових естара у овом етарском уљу, као и барем три естра изосенецио-киселине. По први пут у црној зови идентификован је имин метил-естра изолеуцина са бензалдехидом (31), као и хомолога серија имиња овог естра са алифатичним <i>n</i>-алдехидима (32–44) у диетил-етарском испирку свежих цветова ове биљне врсте. Извршена је и потпуна спинска анализа ¹H НМР спектра <i>транс</i>-хотриенола и <i>транс</i>-ходиендиола. Разјашњен је проблем систематски погрешне идентификације 2-метилнон-2-ен-4-она у различитим биљним врстама, а који је погрешно идентификован уместо 5-оксолиналоола услед сличног масеног спектра и погрешног литературног ретенционог индекса.</p>
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	28.12.2020.
Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	<p>Председник: др Душан Сладић, редовни професор, Хемијски факултет, Универзитет у Београду Члан: др Марија Сакач, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду Члан: др Нико Радуловић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Нишу Члан: др Срђан Бједов, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду</p>
Напомена:	–

KEY WORDS DOCUMENTATION³

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Vidak Raičević
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	dr. Marija Sakač, full professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad dr. Niko Radulović, full professor, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš
Thesis title:	Synthesis of new biologically active steroid–ferrocene conjugates and identification of new natural products from black elderberry flowers (<i>Sambucus nigra</i> L.)
Language of text (script):	Serbian (Cyrillic)
Physical description:	Number of: Pages 133 Chapters 8 References 247 Tables 17 Figures 51 Schemes 10 Appendices 1 (CD)
Scientific field:	chemistry
Scientific subfield (scientific discipline):	organic chemistry
Subject, keywords:	steroids, ferrocene, steroid–ferrocene conjugates, antiproliferative activity, <i>Sambucus nigra</i> L., essential oils, plant volatiles
Abstract in English:	Steroid–ferrocene conjugates are a class of compounds of interest in medicinal chemistry due to their diverse range of biological activities. This doctoral thesis focused on the synthesis of new conjugates of estra-1,3,5(10)-trienes (2–6 , 8–10), androstanes (11–15) and pregnanes (16–23), while selected compounds were tested <i>in vitro</i> to evaluate their antiproliferative and immunomodulatory effects. In the case of derivatives furnished by alkylating estradiol and estrone by (ferrocenylmethyl)trimethylammonium iodide (2–6), compound 3 stood out, as it was found to exhibit a significantly low IC ₅₀ value of 0.34 μM toward a hormone-dependent breast cancer cell line (MCF-7), which rendered this compound the most antiproliferative steroid–ferrocene conjugate known to date. Compound 8 , obtained by condensing 2-formylestradiol and acetylferrocene, was discovered to be unstable to such an extent that it was impossible to isolate it in pure form, while its monoacetate (9) and diacetate (10) could be isolated. It was concluded that the condensation of testosterone and ferrocenecarbaldehyde furnishes two geometric isomers 11 and 12 , while the condensation of dihydrotestosterone and this aldehyde gives the <i>E</i> -configured conjugate 13 as the sole product; the catalytic hydrogenation of this compound produced the C-3 deoxygenated compound 14 and the 2α-(ferrocenylmethyl) derivative 15 . Compounds 11–15 demonstrated antiproliferative activity against hormone-independent (PC-3) and hormone-dependent (LNCaP) prostate cancer cell lines in a micromolar range of IC ₅₀ values, but similar activities were also detected against normal fetal lung

³ The author of the doctoral dissertation has signed the following Statements:

56 – Statement on the authority,

5B – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included in the printed thesis.

	<p>fibroblasts (MRC-5), a noncancerous cell line, possibly relating this type of activity to a seemingly low affinity of these compounds for the androgen receptor. Conjugates of ferrocene with pregnane-series steroids 16–23 were obtained through condensation reactions involving five different pregnane-20-ones, and each of these compounds was found to inhibit the proliferation of splenocytes stimulated by bacterial lipopolysaccharide. Furthermore, a total of 252 compounds were identified in the essential oil of dry elder (<i>Sambucus nigra</i> L.) flowers using gas chromatography, along with isolation and synthesis procedures, and coinjection experiments. Among these compounds, seven (24–30) were identified as new natural products. An abundance of (Z)-hex-3-en-1-ol and its esters was noticed in the oil, along with at least three esters of isosenecioic acid. The imine of the isoleucine methyl ester with benzaldehyde (31) was found in elder for the first time, as well as a homologue series of imines of this ester with aliphatic <i>n</i>-aldehydes (32–44), which were detected in ethereal washings of fresh flowers. A full spin analysis of ¹H NMR spectra of trans-hotrienol and trans-hodiendiol was performed. A case of an ongoing misidentification of 2-methyl-2-en-4-one in various plant species was uncovered, as 5-oxolinalool was mistaken for this compound due to similar mass spectra and an erroneous literature statement regarding the retention index of this compound.</p>
Accepted by the Scientific Board on:	28th December 2020
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defense Board: (title, first name, last name, position, institution)	<p>President: dr. Dušan Sladić, full professor, Faculty of Chemistry, University of Belgrade Member: dr. Marija Sakač, full professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad Member: dr. Niko Radulović, full professor, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš Member: dr. Srđan Bjedov, assistant professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad</p>
Note:	

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Синтеза нових биолошки активних коњулата стероида са фероценом и идентификација нових природних производа из црне зове (<i>Sambucus nigra</i> L.)
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду б) Природно-математички факултет, Универзитет у Нишу
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Докторске академске студије хемије
1. Опис података
<p>1.1 Врста студије</p> <p><i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> <u>Докторска дисертација, експериментална студија</u></p>
<p>1.2 Врсте података</p> <p>а) квантитативни б) квалитативни</p>
<p>1.3. Начин прикупљања података</p> <p>а) анкете, упитници, тестови б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи в) генотипови: навести врсту _____ г) административни подаци: навести врсту _____ д) узорци ткива: навести врсту _____ ђ) снимци, фотографије: навести врсту _____ е) текст, навести врсту <u>преглед научне литературе</u> ж) мапа, навести врсту _____ з) остало: описати <u>инструменталне анализе</u></p>
<p>1.3 Формат података, употребљене скале, количина података</p> <p>1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:</p> <p>а) Excel фајл, датотека <u>.xlsx</u> б) SPSS фајл, датотека _____ в) PDF фајл, датотека <u>.pdf</u> г) Текст фајл, датотека _____ д) JPG фајл, датотека _____ е) Остало, датотека <u>.cdx, .mnova</u></p>
<p>1.3.2. Број записа (код квантитативних података)</p> <p>а) број варијабли <u>N/A</u> б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) <u>са. 500</u></p>
<p>1.3.3. Поновљена мерења</p> <p>а) да б) не</p>

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) временски размак између поновљених мера је зависио од инструменталне технике
- б) варијабле које се више пута мере односе се на гаснохроматографске анализе и колориметријски МТТ-тест
- в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као (сачуване су у истом фајлу)

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

- а) Да
- б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

- а) експеримент, навести тип огледи хемијске синтезе, анализе и испитивања биолошке активности
- б) корелационо истраживање, навести тип _____
- ц) анализа текста, навести тип преглед доступне научне литературе
- д) остало, навести шта _____

2.1.2 *Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).*

Тачке топлења одређене су на апарату Büchi B-540 (Büchi Labortechnik AG, Флавил, Швајцарска) и нису кориговане. ИР спектри снимљени су на уређају Spectrum Two (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) користећи калијум-бромидне плочице на које је помоћу халогенованих растварача нанет танак филм раствора супстанце, или на уређају Thermo Nicolet NEXUS 670 FTIR припремивши калијум-бромидне таблете или директно, користећи АТР технику. УВ-Вис спектри снимљени су користећи ацетонитрил као растварач, на Т80+ UV/Vis спектрофотометру (PG Instruments, Ltd., Латерворт, Уједињено Краљевство). Масена спектрометрија високе резолуције извршена је на MALDI-TOF уређају Micromass TofSpec 2E Time-of-Flight (Waters Corporation, Милфорд, САД) или на уређају LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific Inc., Бремен, Немачка). НМР спектри језгара снимљени су користећи Bruker Avance III спектрометар (Bruker, Феланден, Швајцарска, ^1H на 400 MHz, ^{13}C на 101 MHz), опремљен двојном $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ мерном главом од 5–11 mm која ради на собној температури или CryoProbe Prodigy мерном главом, у CDCl_3 или $\text{DMSO}-d_6$, са тетраметилсиланом као интерним стандардом, а хемијска померања изражена су у ppm (δ) у односу на тетраметилсилан. За снимање 2Д спектра (градијентни $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY, me-HSQC, HMBC, NOESY) и вишепулских спектра (DEPT90 и DEPT135) коришћене су уобичајене пулсне секвенце. Дифракциони подаци добијени су на дифрактометру Gemini S (Oxford Diffraction, Вроцлав, Пољска) опремљеним са Мо Ка извором зрачења и Sapphire CCD детектором.

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

- а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података? _____
- б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да **Не**
- в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

У појединим случајевима статистичком обрадом.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Извршена је провером методологије експерименталног рада и поређењем добијених података са научном литературом.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Заједничком порталу свих докторских дисертација и извештаја о њиховој оцени на универзитетима у Србији (NaRDUS) и у репозиторијуму докторских дисертација Универзитета у Новом Саду (CRIS).

3.1.2. URL адреса _____

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) **Да**

б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____

в) **Не**

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? Неограничено.

- 3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**
3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да **Не**
3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?
Да **Не**

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да **Не**

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња Медицинског факултета у Нишу (323-07-06862/2016-05/2) и етичке регулативе Републике Србије. Ово истраживање добило је одобрење републичке етичке комисије (323-07-06862/2016-05/2).

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да **Не**

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
- б) Подаци су анонимизирани
- ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

- а) јавно доступни
- б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области
- ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство – некомерцијално – без прераде

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Видак Раичевић, vidak.raicevic@dh.uns.ac.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Видак Раичевић, vidak.raicevic@dh.uns.ac.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Видак Раичевић, vidak.raicevic@dh.uns.ac.rs