

## NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU HEMIJSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj 12. septembra 2013. godine, imenovani smo za članove Komisije za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata mr Borisa Mandića, diplomiranog hemičara, asistenta Hemijskog fakulteta, pod naslovom: **”Optimizacija postupka za izolovanje i određivanje pirolizidinskih alkaloida u biljnom materijalu”**. Komisija je pregledala doktorsku disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću sledeći

### IZVEŠTAJ

#### A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija mr Borisa Mandića sadrži 113 strana teksta sa 51 slikom i 14 tabela i čine je: Uvod (3 strane), Opšti deo (39), Eksperimentalni deo (9), Rezultati i diskusija (40), Zaključak (3), Literatura (19) sa 151 navodom. Disertacija ima Rezime na srpskom i engleskom jeziku, Listu skraćenica, Sadržaj i Biografiju autora.

U **Uvodu** Kandidat ukazuje na veliku rasprostranjenost pirolizidinskih alkaloida (PA) u biljnom svetu i na toksičnost mnogih PA ispoljenu kod ljudi i životinja, što je dovelo da izolovanje, određivanje strukture, biološke aktivnosti i sadržaja PA bude predmet istraživanja u različitim naučnim disciplinama (fitohemija, farmacija, toksikologija, botanika, taksonomija, ekologija i entomologija). Zatim, Kandidat ističe da je cilj ove doktorske teze optimizacija svih faza postupka za izolovanje pirolizidinskih alkaloida iz biljnog materijala, tako da se ova jedinjenja sa značajnim strukturnim razlikama izoluju sa maksimalnim prinosom. Ovo je značajno za pripremu uzoraka za određivanje sadržaja često veoma toksičnih PA nekom od instrumentalnih metoda, ali i za izolovanje PA u cilju određivanja njihove strukture i biološke aktivnosti. Za optimizacije postupka izolovanja izabrana je biljna vrsta *Rindera umbellata* Bunge iz koje su izolovani PA čije su strukture određene.

U **Opštem delu** teze prikazana su strukturna svojstva, podela i biosinteza PA. Posebna pažnja posvećena je njihovim toksičnim dejstvima (hepatotoksičnosti, genotoksičnosti, mutagenosti i tumorogenosti), njihovom metabolizmu, odnosno reakcijama biotransformacije koje dovode do bioaktivacije i detoksikacije ovih jedinjenja. Dat je pregled prisustva i rasprostranjenosti pirolizidinskih alkaloida u biljnim vrstama i opis biljne vrste *R. umbellata* Bunge. Pored toga, dat je kratak pregled analitičkih metoda i tehnika za izolovanje, razdvajanje, određivanje i karakterizaciju pirolizidinskih alkaloida iz biljnog materijala.

U **Eksperimentalnom delu** navedeni su podaci o instrumentima, hemikalijama i eksperimentalnim tehnikama primenjenim tokom izolovanja pirolizidinskih alkaloida, podaci o biljnom materijalu. Prikazani su takođe spektroskopski podaci za izolovane pirolizidinske alkaloide.

Poglavlje **Rezultati i diskusija** se sastoji iz dva dela. U prvom delu prikazani su rezultati izolovanja i određivanja strukture pirolizidinskih alkaloida iz biljne vrste *R. umbellata* Bunge. Struktura izolovanih alkaloda određena je primenom savremenih spektrometrijskih i spektroskopskih metoda: masene spektrometrije i NMR spektroskopije. U drugom delu prikazani su rezultati dobiveni pri optimizaciji pojedinačnih koraka izolovanja strukturno okarakterisanih PA iz biljnog materijala, odnosno rezultati dobiveni ispitivanjem različitih uslova i tehnika izolovanja: vreme trajanja ekstrakcije maceracijom u metanolu; ekstrakcije metanolom, etanolom i rastvorom sumporne kiseline - poređenje efikasnosti; ekstrakcija sumpornom kiselinom (koncentracija i zapremina sumporne kiseline i vreme trajanja ekstrakcije); ekstrakcija PA primenom različitih tehnika (maceracija na sobnoj temperaturi, ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija pomoću rotacionog miksera), poređenje njihovih efikasnosti; pH vrednost za alkalnu ekstrakciju PA iz vodenog rastvora sa metilen-hloridom, broj ponovljenih ekstrakcija PA metilen-hloridom iz alkalnog rastvora.

U **Zaključku** Kandidat sumira dobijene rezultate i njihovu diskusiju.

U poglavlju **Literatura** (151 citat) navedeni su radovi iz oblasti istraživanja koji iscrpno pokrivaju sve delove disertacije.

## B. KRATKI OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Uprkos brojnih predloženih postupaka za izolovanje i prečišćavanje pirolizidinskih alkaloida, zbog raznolikosti njihovih struktura i hemijskih svojstava, ni jedan od njih nije našao široku primenu u praksi. Stoga je cilj ove doktorske teze bio optimizacija svih faza postupka za izolovanje pirolizidinskih alkaloida iz biljnog materijala, tako da se više strukturno različitih jedinjenja mogu istovremeno izolovati sa maksimalnim prinosisima. Kao model-sistem upotrebljena je biljna vrsta *R. umbellata* Bunge. Da bi se optimizacija postupka izolovanja mogla pratiti, u prvom koraku bilo je neophodno izolovati i prečistiti više alkaloida iz pomenute biljne vrste, i odrediti njihovu strukturu. Izolovano je i strukturno okarakterisano šest PA (7-angeloilheliotridan, 7-angeloilheliotridin, lindelofin, 7-angeloilrinderin, punktanezin i heliosupin).

Tokom optimizacije postupka za izolovanje praćeni su prinosi svih šest okarakterisanih alkaloida. Sadržaj i prinos pirolizidinskih alkaloida u izolovanim i prečišćenim smešama praćen je pomoću GC-MS/FID. Za praćenje prinosa upotrebljavan je pentakozan kao inertni standard.

Pri ekstrakciji PA iz osušenog, usitnjenog i homogenizovanog biljnog materijala maceracijom u metanolu, na sobnoj temperaturi, za svih šest praćenih pirolizidinskih alkaloida najveći prinosi dobiveni su posle četiri dana maceracije. Efikasnost primene rastvarača (metanola, etanola) i rastvora sumporne kiseline za ekstrakciju okarakterisanih PA ispitana je pri

maceraciji u trajanju od četiri dana, na sobnoj temperaturi i na tamnom mestu. Prinosi alkaloida ekstrahovanih etanolom i sumpornom kiselinom nisu se značajno razlikovali. Kako pri izolovanju PA ekstrakcija etanolom uključuje tri koraka (maceracija, uklanjanje etanola i rastvaranje ostatka u sumpornoj kiselini), a ekstrakcija sumpornom kiselinom samo jedan (što je veoma značajno za laboratorijsku praksu), predložena je upotreba rastvora sumporne kiseline za ekstrakciju PA iz biljnog materijala. Pored toga, ekstrakcija rastvorom sumporne kiseline omogućava izolovanje većeg broja različitih pirolizidinskih alkaloida u odnosu na ekstrakcije etanolom i metanolom.

Ispitivanje koncentracije rastvora sumporne kiseline za ekstrakciju strukturno različitih PA iz biljnog materijala pokazalo je da je za većinu PA optimalna koncentracija 1 mol/L. Primenom različitih tehnika za ekstrakciju PA (maceracija na tamnom mestu, ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija pomoću rotacionog miksera) i različitih vremena trajanja ekstrakcije utvrđeno je da je optimalno vreme ekstrakcije za svih šest praćenih alkaloida četiri dana za maceraciju biljnog materijala, tri dana za ultrazvučnu ekstrakciju i za ekstrakciju pomoću rotacionog miksera. Poređenjem prinosa svih šest alkaloida, koji su dobiveni pri optimalnim vremenima ekstrakcije, nađeno je da je ekstrakcija pomoću rotacionog miksera najefikasnija. Prinosi alkaloida dobiveni ovom tehnikom su 1,5 do 3 puta veći u odnosu na prinose dobivene ultrazvučnom ekstrakcijom, odnosno 3 do 20 puta veći u odnosu na maceraciju biljnog materijala. Kada se polazi od 1,00 g suvog, sprasenog i homogenizovanog biljnog materijala, za ekstrakciju pirolizidinskih alkaloida optimalno je upotrebiti 30 ml rastvora sumporne kiseline koncentracije 1 mol/L (uz primenu rotacionog miksera, u trajanju tri dana).

Posle ekstrakcije biljnog materijala rastvorom sumporne kiseline koncentracije 1 mol/L, odvajanja kiselog ekstrakta od ostatka biljnog materijala, uklanjanja jedinjenja koja su nepolarnija od alkaloida metilen-hloridom, prečišćeni kiseli rastvori se zaalkališu i alkaloidi ekstrahuju metilen-hloridom. Optimalna pH vrednost baznog rastvora za izolovanje većine strukturno različitih PA sa maksimalnim prinosom iznosi 9, a optimalni broj ponovljenih ekstrakcija sa po 30 ml metilen-hlorida je četiri.

Optimizovani postupak omogućava da se u svakoj fazi izolovanja za većinu okarakterisanih pirolizidinskih alkaloida (7-angeloilheliotridan, 7-angeloilheliotridin, lindelofin, 7-angeloilrinderin, punktanečin i heliosupin) iz *R. umbellata* Bunge (model-sistem biljnog materijala) postignu maksimalni prinosi, što je od velikog značaja za izolovanje i karakterizaciju pirolizidinskih alkaloida, za ispitivanje njihove biološke aktivnosti, ali i za pripremu uzoraka biljnog materijala u cilju pouzdanog određivanja njihovog sadržaja.

### **C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA KANDIDATA SA REZULTATIMA IZ LITERATURE**

Pirolizidinski alkaloidi su velika grupa sekundarnih metabolita veoma rasprostranjenih u biljnom svetu. Više stotina PA i njihovih derivata N-oksida identifikovano je u preko 6000 biljaka, koje pripadaju nepovezanim botaničkim familijama Asteraceae, Boraginaceae, Fabaceae,

Apiaceae, Convolvulaceae, Celestraceae, Proteaceae, Santalaceae, Sapotaceae, Ranunculaceae, Euphorbiaceae, Orchidaceae, Scrophulariaceae i Poaceae. Najviše su zastupljeni u biljnim vrstama iz familija Asteraceae, Boraginaceae i Fabaceae. Biljna vrsta *R. umbellata* (ispitivana u ovom radu) pripada familiji Boraginaceae, koja je zastupljena u Srbiji sa 17 rodova i 56 vrsta. Prema necinskim bazama PA se mogu klasifikovati u četiri tipa: heliotridinski, platinecinski, otonecinski i retronecinski tip. Retronecine i heliotridine (enantiomeri na C7 položaju) su, pored otonecinskog tipa PA, privukli mnogo pažnje zbog njihove rasprostranjenosti i velike toksičnosti. Ispitivanje raspodele PA u okviru familija je pokazalo da je otonecinski tip PA glavni predstavnik u familiji Asteraceae, a heliotridinski u familiji Boraginaceae. Retronecinski tip PA se može naći u biljnim vrstama iz familija Fabaceae, Asteraceae i Boraginaceae species. U ovoj tezi većina izolovanih PA iz *R. umbellata* Bunge (7-angeloilheliotridan, 7-angeloilheliotridin, lindelofin, 7-angeloilrinderin, punktancin i heliosupin) pripadaju heliotridinskom tipu. Slično ovom nalazu nađeno je da su PA heliotridinskog tipa dominantni u prethodno ispitivanim *Rindera* vrstama: *R. austroechinata*, *R. baldschuanica*, *R. cyclodonta*, *R. echanata* i *R. oblongifolia*.

Mnoge biljke bogate pirolizidinskim alkaloidima koriste se u tradicionalnoj medicini u Aziji i Africi. Sa druge strane, neki PA su veoma toksični za ljude i životinje. Akutno trovanje sa PA dovodi do oštećenja jetre, dok dugotrajna izloženost subletalnim dozama dovodi do kumulativnih oštećenja, do ispoljavanja neurotoksičnih, mutagenih i karcinogenih efekata. Zbog ispoljenih toksičnih dejstava PA na ljudima i životinjama, od strane „United Nations Environment Programme“, „International Labor Organization“ i „World Health Organization“ istaknut je značaj istraživanja PA, a od strane „European Food Safety Authority“ neophodnost razvoja analitičkih metoda za određivanje pojedinačnih i ukupnih pirolizidinskih alkaloida u biljnom materijalu. Dakle, uprkos tome što su PA bili cilj naučnog istraživanja već mnogo godina, interes za novim analitičkim metodama za njihovo izolovanje, karakterizaciju i određivanje iz biljnog materijala i dalje postoji. Zbog različitosti u strukturi PA još uvek nije ustanovljena metoda kojom bi se svi tipovi alkaloida tačno, reproduktivno i brzo određivali. Najčešće primenjivane metode za identifikaciju i određivanje pirolizidinskih alkaloida su GC-MS i HPLC-MS, ali svaka od njih ima prednosti i ograničenja koja su uzrokovana različitom prirodom strukturno različitih alkaloida.

Izolovanje pirolizidinskih alkaloida iz biljnog materija, sa ciljem dobivanja prečišćene smeše alkaloida, čiji se sadržaj dalje može određivati nekom od instrumentalnih metoda, ili sa ciljem izolovanja čistih alkaloida kako bi se odredila njihova struktura ili biološka aktivnost, je najbitniji korak. Za primarnu ekstrakciju pirolizidinskih alkaloida iz biljnog materijala u literaturi upotrebljavani su različiti rastvarači (metanol, etanol, kiselina/metanol, hloroform/metanol, voda i rastvori sumporne, hlorovodonične i limunske kiseline). Najmanji prinosi dobiveni su sa vodom (pH 7). Prilikom upotrebe rastvora hlorovodonične kiseline i hloroforma (u kome je hlorovodonična kiselina prisutna u tragovima) dolazilo je do reakcije između hlorovodonične kiseline i alkaloida sa epoksidnom grupom. Ni jedan od njih nije našao široku primenu u praksi,

jer za pripremu uzoraka za određivanje ukupnih i pojedinačnih PA iz biljnog materijala postupak pripreme uzorka treba da omogući dobivanje maksimalnih prinosa svih PA.

U ovoj tezi optimizovane su sve faze postupka za izolovanje PA iz biljnog materijala (uslovi i tehnika izolovanja) tako da je omogućeno dobivanje smeše PA sa maksimalnim prinosom prešićenih pirolizidinskih alkaloida. Najbolji rezultati za većinu od šest strukturno okarakterisanih i pri izolovanju praćenih alkaloda su dobiveni kada je ekstrakcija rađena rastvorom sumporne kiseline koncentracije 1 mol/L (30 ml na 1.00 g suvog, usitnjenog i homogenizovanog uzorka biljnog materijala), pomoću rotacionog miksera u toku tri dana na sobnoj temperaturi. Optimalna pH vrednost za alkalnu ekstrakciju PA metilen-hloridom je 9, a ekstrakciju je potrebno raditi sa 4 porcije od po 30 ml metilen-hlorida. Optimizovani postupak može se primenjivati za pripremu uzoraka biljnog materijala prilikom određivanja pirolizidinskih alkaloida (LC, GC-MS-om i HPLC-MS-om) ili za dobivanje prečišćene smeše alkaloida, koja može biti dalje razdvajana radi utvrđivanja strukture i biološke aktivnosti pojedinačnih alkaloida.

## **D. OBJAVLJENI RADOVI I SAOPŠTENJA KOJA ČINE DEO DISERTACIJE**

### **Rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M<sub>22</sub>)**

1. Mandić, B.M.\*; Simić, M.R.; Vučković, I.M.; Vujisić, L.V.; Novaković, M.M.; Trifunović, S.S.; Nikolić-Mandić, S.D.; Tešević, V.V.; Vajs, V.V.; Milosavljević, S.M. Pyrrolizidine Alkaloids and Fatty Acids from the Endemic Plant Species *Rindera umbellata* and the Effect of Lindelofine-N-oxide on Tubulin Polymerization. *Molecules* 18, 10694-10706 (2013).

### **Rad u međunarodnom časopu (M<sub>23</sub>)**

1. Boris M. Mandić\*, Marina D. Vlajić, Snežana S. Trifunović, Milena R. Simić, Ljubodrag V. Vujisić, Ivan M. Vučković, Miroslav M. Novaković, Snežana D. Nikolić-Mandić, Vele V. Tešević, Vlatka V. Vajs and Slobodan M. Milosavljević. Optimization of Isolation Procedure for Pyrrolizidine Alkaloids from *Rindera umbellata* Bunge. *Natural Product Research* (2014) DOI broj: 10.1080/14786419.2014.991929

## **E. ZAKLJUČAK KOMISIJE**

Na osnovu svega izloženog, može se zaključiti da je u podnetoj disertaciji, kandidat mr Boris Mandić uspešno odgovorio na postavljene zadatke koji se odnose na optimizaciju postupaka koji omogućavaju da se u svakoj fazi izolovanja iz biljnog materijala za većinu pirolizidinskih alkaloida različitih struktura i hemijskih svojstava postignu maksimalni prinosi. Ovo je značajno za izolovanje pirolizidinskih alkaloida u cilju njihove karakterizacije, ali i za analitiku pirolizidinskih alkaloida, odnosno pripremu uzoraka biljnog materijala u cilju

pouzdanog određivanja njihovog sadržaja. Ispitivanja su urađena sa biljnom vrstom *Rindera umbellata* Bunge kao model–sistemom.

Rezultati istraživanja, proistekli iz ove doktorske disertacije, objavljeni su u jednom radu štampanom u istaknutom međunarodnom časopisu kategorije M<sub>22</sub> i jednom radu štampanom u međunarodnom časopisu kategorije M<sub>23</sub>. Rezultati ove teze imaju fundamentalni hemijski značaj, ali i fitohemijski i taksonomski značaj.

Na osnovu svega izloženog Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, da podnetu doktorsku disertaciju mr Borisa Mandića pod naslovom "**Optimizacija postupka za izolovanje i određivanje pirolizidinskih alkaloida u biljnom materijalu**" prihvati i odobri njenu odbranu za sticanje akademskog zvanja doktora hemijskih nauka.

U Beogradu, 11.12.2014.

Komisija:

Dr Snežana Nikolić-Mandić, mentor  
redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Dr Vele Tešević, mentor  
vanredni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Dr Vlatka Vajs,  
naučni savetnik IHTM-a, Univerziteta u Beogradu