

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET

Miroslav M. Novaković

Izolovanje i identifikacija diarilheptanoida iz
biljnih vrsta crna jova (*Alnus glutinosa* (L.)
Gaertn.) i zelena jova (*Alnus viridis* (Chaix)
DC. subsp. *viridis*) i njihova biološka
aktivnost

Doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY

Miroslav M. Novaković

Isolation and identification of
diarylheptanoids from plant species black
alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) and
green alder (*Alnus viridis* (Chaix) DC.
subsp. *viridis*) and their biological activity

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

MENTORI:

Dr Vele Tešević
vanredni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Dr Snežana Trifunović
viši naučni saradnik Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Vlatka Vajs
naučni savetnik Centra za hemiju IHTM Univerziteta u Beogradu
i redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Dr Nina Todorović
naučni savetnik Centra za hemiju IHTM Univerziteta u Beogradu

Dr Milica Pešić
viši naučni saradnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša
Stanković“ Univerziteta u Beogradu

Beograd, 2014.

Ova doktorska disertacija je urađena u okviru projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivima „Sekundarni metaboliti samoniklih, lekovitih biljaka: izolovanje, karakterizacija i biološka aktivnost” (142053) i „Bioaktivni prirodni proizvodi samoniklih, gajenih i jestivih biljaka: određivanje strukture i aktivnosti” (172053). Veći njen deo odrađen je u laboratorijama Odeljenja za instrumentalnu analizu Hemijskog fakulteta i Centra za hemiju IHTM Univerziteta u Beogradu, a manji na Institutu Vinča i Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković” Univerziteta u Beogradu.

Mentoru prof. dr Veleću Teševiću, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta u Beogradu, zahvaljujem se na izboru aktuelne i interesantne teme kao i na korisnim sugestijama tokom pisanja teze, a mentoru dr Snežani Trifunović, višem naučnom saradniku Hemijskog fakulteta, na velikoj podršci, pomoći i korisnim savetima prilikom izrade naučnih radova proizašlih iz ove disertacije i izrade same teze. Dr Ivanu Vučkoviću se zahvaljujem na korisnim savetima i pomoći prilikom interpretacije spektara, a dr Nini Todorović, naučnom savetniku IHTM-a, na snimljenim i kvalitetno obrađenim NMR spektrima, kao i na sugestijama koje su učinile ovu tezu mnogo konciznijom i boljom. Prof. dr Vlatki Vajs, naučnom savetniku IHTM-a i akademiku prof. dr Slobodanu Milosavljeviću, dopisnom članu SANU, zahvaljujem se na korisnim savetima, pomoći i podršci. Čast mi je bila i zadovoljstvo da učim od svih njih i da sa njima saradujem.

Kolegama iz Centra za instrumentalnu analizu, Dejanu Vučetiću, dr Milki Jadranin, dr Ljubodragu Vujisiću, dr Iris Đorđević, doktorantima Bobanu Anđelkoviću i Nedi Đorđević, mr Borisu Mandiću, dr Borisu Pejinu, dr Dejanu Gođevcu i Marini Todosijević se zahvaljujem na pomoći koju su mi pružili u vidu snimanja spektara i korisnih sugestija. Svima njima, zajedno sa doktorantima Gordanom Krstić, Marijanom Živković, Mirjanom Cvetković, Jovanom Stanković, kao i kolegincama Danicom Bajić i Dragicom Pavličević, zahvaljujem se na radnoj i veseloj atmosferi u kojoj je ova disertacija nastala.

Zahvaljujem se nekadašnjim diplomcima, a sadašnjim diplomiranim hemičarima Aleksandri Mrkonji, Aleksandru Nešiću i Milanu Jankoviću koji su učestvovali u eksperimentalnom radu u okviru ovog doktorskog rada.

Koleginici doktorantu Danijeli Apostolović iz laboratorije prof. dr Tanje Ćirković i kolegi Tomi Tostiju iz laboratorije prof. dr Živoslava Tešića se zahvaljujem na pomoći u snimanju CD spektara, odnosno analizi monosaharida novih jedinjenja.

Dr Miroslavi Stanković, dr Milici Pešić i dr Ireni Novaković i njihovim saradnicima se zahvaljujem na dobroj saradnji i odrađenim eksperimentima za ispitivanje bioloških aktivnosti, čime su izolovanje i identifikacija prirodnih proizvoda iz ove teze dobili i praktični smisao.

Zahvaljujem se porodici, supruzi Ireni i sinu Dimitriju na podršci i razumevanju.

Ovu disertaciju posvećujem dragim roditeljima Mladenu i Jeleni koji su u vrlo teškim vremenima s kraja prošlog i početka ovog veka uspeli da me odškoluju i pomognu da uplivam u naučne vode ove divne nauke.

Autor

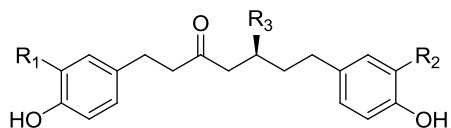
Izolovanje i identifikacija diarilheptanoida iz biljnih vrsta crna jova (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) i zelena jova (*Alnus viridis* (Chaix) DC. subsp. *viridis*) i njihova biološka aktivnost

IZVOD

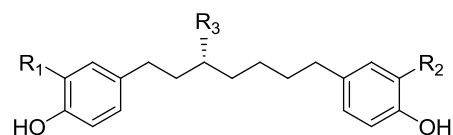
Rod *Alnus* Mill. (jove), sa više od 30 vrsta, pripada familiji Betulaceae. *Alnus* vrste koje rastu u Srbiji su *A. glutinosa* (crna jova), *A. viridis* subsp. *viridis* (zelena jova) i *A. incana* (siva jova). U ovom radu izolovani su i okarakterisani diarilheptanoidi iz kore crne jove i zelene jove i određena je njihova biološka aktivnost.

Biljke ovog roda su u tradicionalnoj medicini korišćene u brojne svrhe, kao alterativi, astringenti, purgativi, emetici, antipiretici, hemostatici, antiparazitici i antihelmintici, za lečenje različitih bolesti, uključujući tumor. Jedinjenja izolovana iz jova poseduju širok spektar bioloških aktivnosti, a najvažnija su citotoksična, antitumorska, antivirusna, anti-inflamatorna, antimikrobna i antiparazitska.

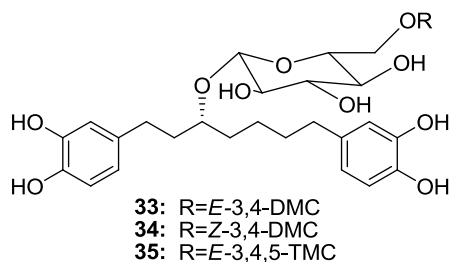
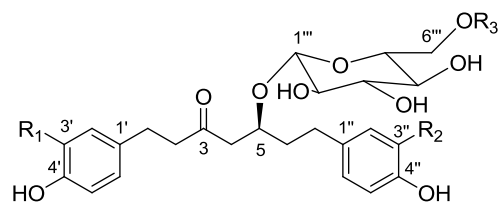
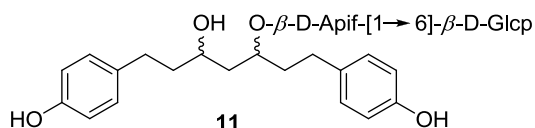
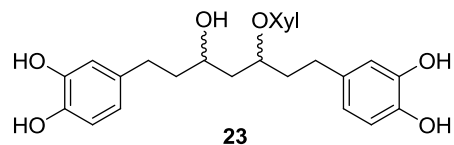
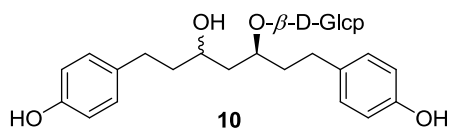
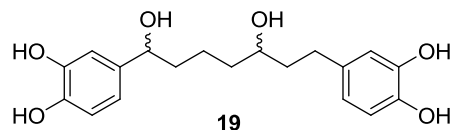
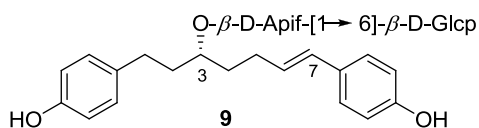
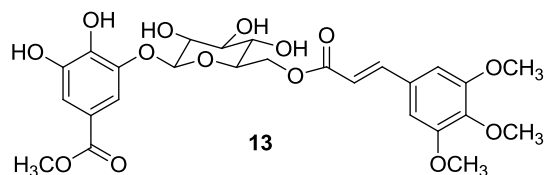
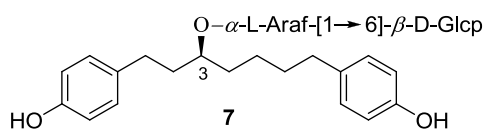
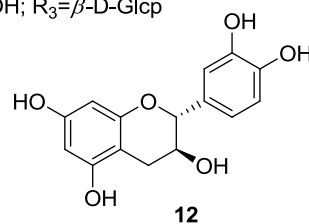
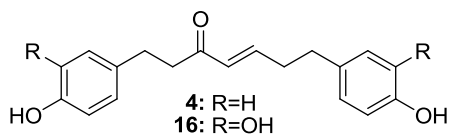
Vrste roda *Alnus* su bogat izvor diarilheptanoida. Oni se u biljci prvenstveno nalaze u kori i lišću, kao prosti, glikozidi ili složeni - diarilheptanoid glikozidi esterifikovani različitim fenolnim kiselinama, najčešće cinamičnim. U okviru ove disertacije iz kora zelene i crne jove izolovano je i okarakterisano 39 jedinjenja, od kojih je 19 novih prirodnih proizvoda. Iz zelene jove izolovano je 13 jedinjenja (**1-13**), a iz crne 28 (**1, 5, 14-39**), pri čemu su diarilheptanoidi platifilozid (**1**) i acerozid VII (**5**) izolovani iz obe biljne vrste. Od 13 jedinjenja izolovanih iz zelene jove, 11 pripada grupi diarilheptanoida (**1-11**), od kojih je 6 novih prirodnih proizvoda (**3, 7, 8, 9, 11 i 13**). Svih 28 jedinjenja izolovanih iz crne jove su diarilheptanoidi, a 13 (**19, 27, 29-39**) je novih. Strukturne karakteristike diarilheptanoida zelene jove su da isključivo imaju *p*-hidroksifenil grupe kao aromatične sisteme i da se, pored prostih, sreću glikozidi koji se sastoje iz mono- i disaharida. Složeni diarilheptanoidi su retki, izolovan je samo jedan sa galnom kiselinom (**3**). Za većinu diarilheptanoida crne jove karakteristično je da imaju bar jednu kateholnu grupu. Od glikozida su zastupljeni isključivo oni sa monosaharidnom jedinicom, prvenstveno glukozidi i ksilozidi. Za crnu jovu su karakteristični složeni diarilheptanoidi sa različitim cinamičnim kiselinama, pretežno onim sa metoksi grupama.



- 1: $R_1=R_2=H$; $R_3=\beta\text{-D-Glcp}$
 2: $R_1=R_2=H$; $R_3=\beta\text{-D-Apif-[1}\rightarrow\text{6]-}\beta\text{-D-Glcp}$
 3: $R_1=R_2=H$; $R_3=\beta\text{-D-Glcp-6-Gall}$
 14: $R_1=R_2=R_3=OH$
 15: $R_1=R_2=OH$; $R_3=OCH_3$
 17: $R_1=R_2=OH$; $R_3=\beta\text{-D-Xylp}$
 18: $R_1=R_2=OH$; $R_3=\beta\text{-D-Glcp}$
 24: $R_1=R_2=H$; $R_3=\beta\text{-D-Xylp}$
 25: $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=\beta\text{-D-Xylp}$
 26: $R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=\beta\text{-D-Xylp}$
 27: $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=\beta\text{-D-Glcp}$

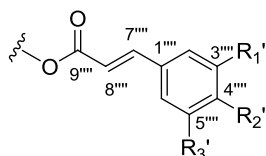


- 5: $R_1=R_2=H$; $R_3=\beta\text{-D-Glcp}$
 6: $R_1=R_2=H$; $R_3=\beta\text{-D-Apif-[1}\rightarrow\text{6]-}\beta\text{-D-Glcp}$
 8: $R_1=R_2=H$; $R_3=\alpha\text{-L-Araf-[1}\rightarrow\text{6]-}\beta\text{-D-Glcp}$
 20: $R_1=R_2=OH$; $R_3=OH$
 21: $R_1=R_2=OH$; $R_3=\beta\text{-D-Xyl}$
 22: $R_1=R_2=OH$; $R_3=\beta\text{-D-Glcp}$
 28: $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=\beta\text{-D-Glcp}$

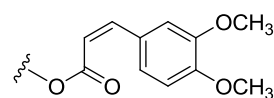


- 29: $R_1=R_2=OH$; $R_3=E\text{-}3,4\text{-DMC}$
 30: $R_1=R_2=OH$; $R_3=Z\text{-}3,4\text{-DMC}$
 31: $R_1=R_2=OH$; $R_3=pC$
 32: $R_1=R_2=OH$; $R_3=E\text{-}3,4,5\text{-TMC}$
 36: $R_1=R_2=H$; $R_3=E\text{-}3,4\text{-DMC}$
 37: $R_1=R_2=H$; $R_3=pC$
 38: $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=E\text{-}3,4\text{-DMC}$
 39: $R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=Z\text{-}3,4\text{-DMC}$

pC : $R_1=R_3=H$; $R_2=OH$
E-3,4-DMC: $R_1=R_2=OCH_3$; $R_3=H$
E-3,4,5-TMC: $R_1=R_2=R_3=OCH_3$



Z-3,4-DMC:



Sposobnost diarilheptanoida da *in vitro* inhibiraju rast senzitivih i rezistentnih ćelijskih linija humanog karcinoma pluća (NCI-H460 i njene višestruko rezistentne varijante NCI-H460/R) ispitivana je pomoću sulforodamin B (SRB) testa. Kao kontrolna supstanca korišćen je kurkumin, diarilheptanoid širokog spektra bioloških aktivnosti, uključujući i antitumorsku. Od ukupno dvadeset četiri ispitana diarilheptanoida, deset jedinjenja se pokazalo aktivnijim od kurkumina, a 5(*S*)-platifilonol-5-*O*- β -D-ksilopiranozid (**24**), alnuzid B (**26**) i hirsutenon (**16**) su pokazali najizraženiji citotoksični efekat na NCI-H460 ćelije sa IC₅₀ vrednostima u opsegu 14,9 – 19,2 μ M. Kurkumin je pokazao aktivnost sa IC₅₀ vrednošću od 38,4 μ M. Novi diarilheptanoidi **37** i **31** su bili aktivniji na obe tumorske ćelijske linije u poređenju sa kurkuminom. Oni su takođe pokazali dobru selektivnost sa SI indeksima od 1,6, odnosno 2,7. Značajnu aktivnost, a najbolju selektivnost pokazao je 5(*S*)-*O*-metilhirsutanonol (**15**) sa SI vrednošću 4,8.

Ispitivanjem odnosa struktura/citotoksična aktivnost utvrđene su dve osnovne pravilnosti. Prva je da prisustvo keto grupe u položaju 3 pojačava citotoksičnu aktivnost testiranih diarilheptanoida. Druga je da prisustvo hidroksilnih grupa u položajima 3' i 3'' negativno utiče na citotoksičnu aktivnost, ali u manjem stepenu nego što to čini odsustvo 3-keto grupe.

Acerozid VII (**5**), 5(*S*)-*O*-metilhirsutanonol (**15**), rubranol (**20**), alnuzid A (**25**) i nova jedinjenja **31**, **35** i **36** su, zajedno sa pozitivnom kontrolom kurkuminom, pokazali nižu citotoksičnu aktivnost ka ćelijama višestruko rezistentnim na lekove (MDR ćelijama) NCI-H460/R. Znajući da kurkumin moduliše MDR inhibirajući aktivnost P-glikoproteina (P-gp) ispitano je da li izolovani diarilheptanoidi interaguju sa P-gp koji je prekomerno eksprimiran u membrani NCI-H460/R ćelija. Samo za jedinjenja 5(*S*)-*O*-metilhirsutanonol (**15**) i alnuzid A (**25**) je utvrđeno da su inhibirala funkciju P-gp. Njihova sposobnost da povećaju akumulaciju P-gp supstrata doksorubicina je uporediva sa delovanjem kurkumina.

Ćelijska smrt NCI-H460 ćelija koje su tretirane kurkuminom, platifilozidom (**1**) i novim jedinjenjem **37** je procenjena pomoću dvostrukog bojenja aneksinom V (AV) i propidijum iodidom (PI). Jedinjenje **37** je odabrano jer je bilo najaktivnije među novim jedinjenjima, a platifilozid (**1**) je njemu odgovarajući diarilheptanoid bez *p*-kumaroil grupe. Dobijeni rezultati su pokazali da je 50 μ M kurkumin indukovao apoptozu u skoro

svim ćelijama, 50 μ M platifilozid (**1**) je indukovao nekrozu u 50% ćelija, dok je 50 μ M novo jedinjenje **37** indukovalo u 50% ćelija apoptozu i u 50% ćelija nekrozu. Ovi rezultati dovode do zaključka da *p*-kumaroil grupa značajno doprinosi povećanju smrtnosti NCI-H460 tumorskih ćelija.

In vitro protektivni efekat nekih od izolovanih jedinjenja na DNK humanih limfocita određen je mikronukleus testom pri blokadi ćelijske deobe (CBMN esej). Ispitano je 13 jedinjenja iz crne i 11 jedinjenja iz zelene jove u dva odvojena eksperimenta. Najaktivniji iz crne jove bili su platifilozid (**1**), hirsutanonol (**14**), hirsutenon (**16**), oregonin (**17**) i nova jedinjenja **27** i **29**, pokazujući jaču aktivnost od standarda amifostina. Nova jedinjenja **3**, **8** i **13** iz zelene jove pokazala su jaču aktivnost od ostalih, ali i od standarda.

Antimikrobna aktivnost 15 izolovanih jedinjenja je ispitana prema 5 sojeva gram-negativnih i 7 sojeva gram-pozitivnih bakterijskih vrsta, kao i na 8 sojeva gljivica. Od ispitanih diarilheptanoida, platifilenon (**4**), hirsutenon (**16**) i oregonin (**17**) su pokazali najjaču aktivnost, kako prema ispitivanim bakterijskim, tako i prema gljivičnim vrstama. Samo određene kombinacije strukturnih parametara - Δ^4 dvostruka veza, 3-keto grupa, obe kateholske grupe i 5-ksilanozna funkcija su se pokazale kao strukturni elementi neophodni za antimikrobnu aktivnost. Platifilenon (**4**) i hirsutenon (**16**) su pokazali visoku antifungalnu aktivnost prema 5, odnosno 3 gljivične vrste, više od oba izabrana standarda antimikotika, nistatina i flukonazola.

Ključne reči: *Alnus glutinosa*, *Alnus viridis*, Betulaceae, Izolovanje, Identifikacija, Diarilheptanoidi, Antitumorska aktivnost, DNK protektivna aktivnost, Antimikrobna aktivnost

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Organska hemija

UDK broj: 547

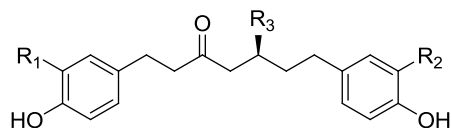
Isolation and identification of diarylheptanoids from plant species black alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) and green alder (*Alnus viridis* (Chaix) DC. subsp. *viridis*) and their biological activity

ABSTRACT

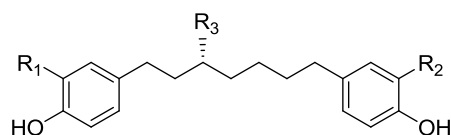
The genus *Alnus* Mill. (Alder), with more than 30 species, belongs to the Betulaceae family. *Alnus* species growing in Serbia are *A. glutinosa* (black alder), *A. viridis* subsp. *viridis* (green alder) and *A. incana* (gray alder). In this work, diarylheptanoids from the bark of black alder and green alder were isolated and characterized, and their biological activity was determined.

Plants of this genus have been traditionally used for numerous purposes, e.g. as an alterative, astringent, cathartic, emetic, febrifuge, hemostatic, parasiticide, vermifuge, in the treatment of various diseases, including tumors. Compounds isolated from the Alder species possess a wide spectrum of biological activities and the most important are cytotoxic, antitumoral, antiviral, anti-inflammatory, antimicrobial and antiparasitic.

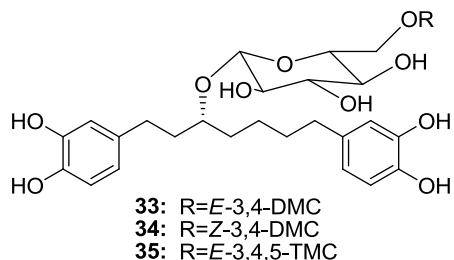
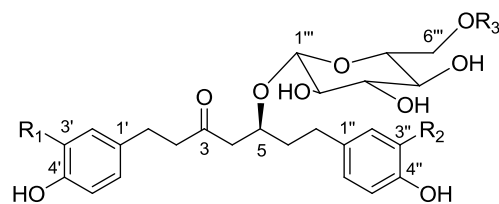
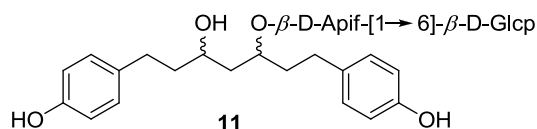
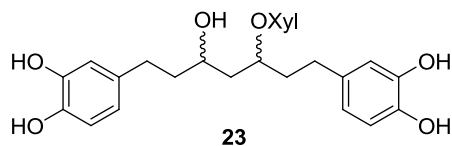
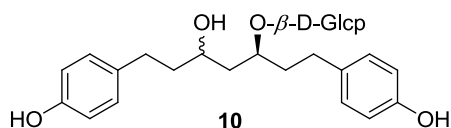
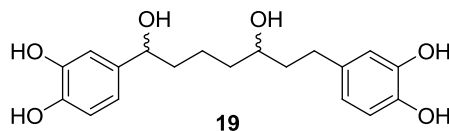
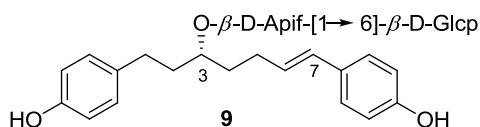
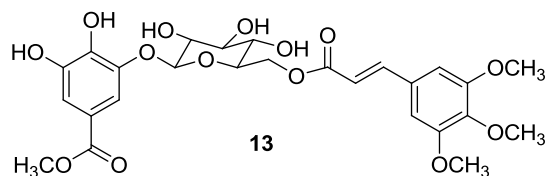
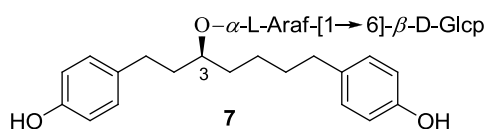
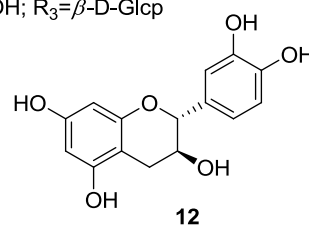
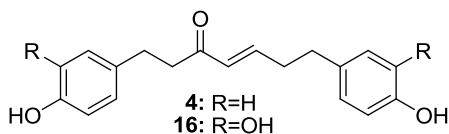
Alnus species are a rich source of diarylheptanoids. These are predominantly found in the bark and leaves as simple diarylheptanoids, glycosides and complex diarylheptanoids – diarylheptanoid glycosides esterified with some phenolic acid, most commonly with some cinnamic acid. In this work, 39 compounds were isolated and characterized from the barks of green and black alder, of which 19 are new natural products. Thirteen compounds were isolated from green alder (**1-13**), and 28 from black alder (**1, 5, 14-39**), of which diarylheptanoids platyphylloside (**1**) and aceroside VII (**5**) were isolated from both species. Of the 13 compounds isolated from green alder, 11 belong to diarylheptanoids (**1-11**) from which 6 are new natural products (**3, 7, 8, 9, 11, and 13**). All 28 compounds isolated from black alder are diarylheptanoids and 13 (**19, 27, 29-39**) are new. The structural characteristics of the diarylheptanoids isolated from green alder are that they have only *p*-hydroxyphenyl groups as aromatic systems and that besides simple diarylheptanoids, diarylheptanoid glycosides are found which consist of mono- and disaccharides. Complex diarylheptanoids are rare and only one was isolated with gallic acid (**3**). For the most diarylheptanoids isolated from black alder the presence of at least one catechol moiety as an aromatic component is characteristic.



- 1: $R_1=R_2=H$; $R_3=\beta$ -D-Glcp
 2: $R_1=R_2=H$; $R_3=\beta$ -D-Apif-[1→6]- β -D-Glcp
 3: $R_1=R_2=H$; $R_3=\beta$ -D-Glcp-6-Gall
 14: $R_1=R_2=R_3=OH$
 15: $R_1=R_2=OH$; $R_3=OCH_3$
 17: $R_1=R_2=OH$; $R_3=\beta$ -D-Xylp
 18: $R_1=R_2=OH$; $R_3=\beta$ -D-Glcp
 24: $R_1=R_2=H$; $R_3=\beta$ -D-Xylp
 25: $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=\beta$ -D-Xylp
 26: $R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=\beta$ -D-Xylp
 27: $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=\beta$ -D-Glcp

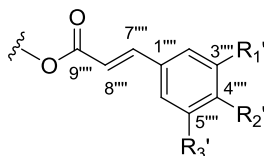


- 5: $R_1=R_2=H$; $R_3=\beta$ -D-Glcp
 6: $R_1=R_2=H$; $R_3=\beta$ -D-Apif-[1→6]- β -D-Glcp
 8: $R_1=R_2=H$; $R_3=\alpha$ -L-Araf-[1→6]- β -D-Glcp
 20: $R_1=R_2=OH$; $R_3=OH$
 21: $R_1=R_2=OH$; $R_3=\beta$ -D-Xyl
 22: $R_1=R_2=OH$; $R_3=\beta$ -D-Glcp
 28: $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=\beta$ -D-Glcp

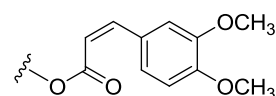


- 29: $R_1=R_2=OH$; $R_3=E$ -3,4-DMC
 30: $R_1=R_2=OH$; $R_3=Z$ -3,4-DMC
 31: $R_1=R_2=OH$; $R_3=pC$
 32: $R_1=R_2=OH$; $R_3=E$ -3,4,5-TMC
 36: $R_1=R_2=H$; $R_3=E$ -3,4-DMC
 37: $R_1=R_2=H$; $R_3=pC$
 38: $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=E$ -3,4-DMC
 39: $R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=Z$ -3,4-DMC

pC : $R_1=R_3'=H$; $R_2'=OH$
E-3,4-DMC: $R_1'=R_2'=OCH_3$; $R_3'=H$
E-3,4,5-TMC: $R_1'=R_2'=R_3'=OCH_3$



Z-3,4-DMC:



Among diarylheptanoid glycosides, only monosaccharides are present, primarily glucosides and xylosides. Complex diarylheptanoids are characteristic for black alder and the phenolic acids present in their structure are different cinnamic acids with predominantly methoxy groups.

The ability of diarylheptanoids to inhibit *in vitro* the growth of sensitive human NSCLC cells (NCI-H460 and its corresponding MDR variant NCI-H460/R) were investigated by the Sulforhodamine B (SRB) assay. Curcumin, a diarylheptanoid with a wide range of different biological activities, including an antitumor effect, served as a positive control. From a total of 24 investigated diarylheptanoids, 10 compounds were more potent than curcumin, with 5(*S*)-platyphyllonol-5-*O*- β -D-xylopiranoside (**24**), alnuside B (**26**) and hirsutenone (**16**) exhibiting the strongest cytotoxic activity on NCI-H460 cells with IC₅₀ values of 14.9-19.2 μ M. The IC₅₀ of curcumin was 38.4 μ M. The new diarylheptanoids **37** and **31** were more potent than curcumin on both tumor cell lines. They also showed good selectivity, with SI indices of 1.6 and 2.7, respectively. Significant activity and the best selectivity were exhibited by 5(*S*)-*O*-methylhirsutanonol (**15**) with an SI value of 4.8.

In the course of the examination of the structure/cytotoxic activity relationship, two main rules emerged. The first is that the presence of a carbonyl group at position 3 enhanced the cytotoxic activity of the tested diarylheptanoids. The second is that the presence of hydroxyl groups at positions 3' and 3'' suppressed the activity of the diarylheptanoids, but to a lesser extent than the absence of a carbonyl group.

Aceroside VII (**5**), 5(*S*)-*O*-methylhirsutanonol (**15**), rubranol (**20**), alnuside A (**25**) and the new compounds **31**, **35** and **36**, together with the positive control curcumin, exhibited lower cytotoxic activity against the MDR cancer cell line NCI-H460/R. Considering that curcumin modulates MDR by inhibiting P-glycoprotein (P-gp) activity, we investigated whether the diarylheptanoids interact with P-gp that is overexpressed in the membrane of NCI-H460/R cells. Only alnuside A (**25**) and 5(*S*)-*O*-methylhirsutanonol (**15**) suppressed P-gp functioning. Their ability to increase the accumulation of the P-gp substrate doxorubicin was comparable with that of curcumin.

The death of NCI-H460 cells that were treated with curcumin and compounds **1** and **37** was evaluated by annexin V (AV) propidium iodide (PI) staining. These compounds were chosen because **37** is the most active among the new compounds and

platyphylloside (**1**) is a corresponding diarylheptanoid without a *p*-coumaroyl group. The obtained results revealed that 50 μ M of curcumin induced apoptosis in almost all cells; treatment with 50 μ M of platyphylloside (**1**) induced necrosis in 50% of the cells; treatment with 50 μ M of compound **37** induced apoptosis and necrosis in 50% of the cells, respectively. These results indicate that the *p*-coumaroyl group significantly contributes to the death of NCI-H460 tumor cells.

The *in vitro* protective effect of some of the isolated compounds on the human lymphocytes DNA was analyzed by the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay. In two experiments, 13 compounds isolated from black alder and 11 from green alder were investigated. Platyphylloside (**1**), hirsutanonol (**14**), hirsutenone (**16**), oregonin (**17**) and new compounds **27** and **29** from black alder showed significantly higher activity than the standard amifostine. The new compounds **3**, **8** and **13** from green alder showed higher activities than the others, and were also higher than the standard.

The antimicrobial activity of 15 isolated compounds was investigated against 5 Gram negative and 7 Gram positive bacterial strains, as well as 8 fungal strains. Among the investigated diarylheptanoids, platyphyllenone (**4**), hirsutenone (**16**) and oregonin (**17**) exhibited the highest activities against both bacterial and fungal strains. Only certain combinations of structural parameters, such as Δ^4 double bond, 3-keto group, both the catechol and 5-xylopyranosyl group, emerged as structural elements required for antimicrobial activity. Platyphyllenone (**4**) and hirsutenone (**16**) displayed notable antifungal activities against 5 and 3 fungal species, respectively, higher than the used antifungal standards, nystatin and fluconazole.

Keywords: *Alnus glutinosa*, *Alnus viridis*, Betulaceae, Isolation, Identification, Diarylheptanoids, Antitumor activity, DNA protective activity, Antimicrobial activity

Academic Expertise: Chemistry

Field of Academic Expertise: Organic Chemistry

UDK number: 547

SADRŽAJ

Spisak simbola i skraćenica.....	xi
UVOD.....	1
1. OPŠTI DEO.....	2
1.1. Familija Betulaceae.....	2
1.2. Rod <i>Alnus</i> Mill. – opšte botaničke osobine.....	2
1.3. <i>A. viridis</i> (Chaix) DC. subsp. <i>viridis</i> – zelena jova.....	3
1.4. <i>A. glutinosa</i> (L.) Gaertn. – crna jova.....	4
1.5. Tradicionalna upotreba biljnih vrsta roda <i>Alnus</i> u medicini.....	8
1.6. Diarilheptanoidi.....	8
1.7. Biosinteza diarilheptanoida.....	14
1.8. Biološke aktivnosti diarilheptanoida.....	16
2. NAŠI RADOVI.....	18
2.1. Jedinjenja izolovana iz kore zelene jove (<i>A. viridis</i>).....	20
2.1.1. Heptanonolska grupa diarilheptanoida.....	21
2.1.2. Heptanolska grupa diarilheptanoida.....	41
2.1.3. Ostala jedinjenja.....	80
2.2. Jedinjenja izolovana iz kore crne jove (<i>A. glutinosa</i>).....	89
2.2.1. Strukturno određivanje prostih diarilheptanoida i diarilheptanoid glikozida kore crne jove.....	91
2.2.1.1. Prosti diarilheptanoidi i diarilheptanoid glikozidi sa dve kateholske grupe.....	91
2.2.1.2. Diarilheptanoid glikozidi sa dve <i>p</i> -hidroksifenil grupe.....	128
2.2.1.3. Diarilheptanoid glikozidi sa jednom <i>p</i> -hidroksifenil i jednom kateholskom grupom.....	134
2.2.2. Strukturno određivanje složenih diarilheptanoida crne jove.....	152
2.2.2.1. Složeni diarilheptanoidi sa dve kateholske grupe u osnovnom skeletu.....	152
2.2.2.2. Složeni diarilheptanoidi sa dve <i>p</i> -hidroksifenil grupe u osnovnom skeletu.....	190
2.2.2.3. Složeni diarilheptanoidi sa jednom <i>p</i> -hidroksifenil grupom i jednom kateholskom grupom u osnovnom skeletu.....	200
2.3. Strukturne karakteristike diarilheptanoida izolovanih iz zelene i crne jove.....	216

2.4. Biološke aktivnosti.....	218
2.4.1. Citotoksična aktivnost prema NCI-H460 ćelijskoj liniji kancera pluća.....	218
2.4.2. Protektivni efekat na DNK humanih limfocita.....	225
2.4.2.1. Protektivni efekat diarilheptanoida crne jove na DNK humanih limfocita.....	228
2.4.2.2. Protektivni efekat diarilheptanoida zelene jove na DNK humanih limfocita.....	230
2.4.3. Antimikrobna aktivnost.....	233
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	241
3.1. Aparati i hemikalije.....	241
3.2. Biljni materijal i postupak frakcionisanja ekstrakata.....	243
3.2.1. Biljni materijal.....	243
3.2.2. Ekstrakcija i frakcionisanje ekstrakta kore zelene jove.....	243
3.2.3. Ekstrakcija i frakcionisanje ekstrakta kore crne jove.....	244
3.3. Izolovanje čistih jedinjenja.....	246
3.3.1. Razdvajanje frakcija ekstrakata zelene i crne jove.....	246
3.3.2. Dokazivanje D-glukoze u složenim diarilheptanoidima crne jove.....	250
3.3.3. Spektroskopski podaci za nova jedinjenja.....	251
3.4. Biološke aktivnosti.....	256
3.4.1. Citotoksična aktivnost prema NCI-H460 ćelijskoj liniji kancera pluća.....	256
3.4.1.1. Ćelije i ćelijske kulture.....	256
3.4.1.2. Određivanje hemosenzitivnosti pomoću sulforodamina B (SRB).....	257
3.4.1.3. Određivanje inhibicije aktivnosti P-gp-a testom akumulacije doksorubicina.....	258
3.4.1.4. Određivanje tipa ćelijske smrti.....	258
3.4.1.5. Statistička analiza ispitivanja odnosa stuktura/citotoksična aktivnost.....	259
3.4.2. Protektivni efekat na DNK humanih limfocita.....	259
3.4.3. Antimikrobna aktivnost.....	261
LITERATURA.....	263
BIOGRAFIJA.....	275

Spisak simbola i skraćenica

TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
UV	<i>Ultraviolet</i> (ultraljubičasta spektroskopija)
^1H NMR	^1H nuklearno magnetno rezonantna (spektroskopija)
^{13}C NMR	^{13}C nuklearno magnetno rezonantna (spektroskopija)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
CD	cirkularni dihiroizam
IR	<i>Infrared</i> (infracrvena spektroskopija)
HR-ESI-MS	<i>High Resolution Electron Spray Ionization Mass (Chromatography)</i>
δ_{H}	hemijsko pomeranje u ^1H NMR spektru
δ_{C}	hemijsko pomeranje u ^{13}C NMR spektru
$\Delta\delta_{\text{H}}$	razlika u hemijskim pomeranjima u ^1H NMR spektru
$\Delta\delta_{\text{C}}$	razlika u hemijskim pomeranjima u ^{13}C NMR spektru
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
$[\text{M-H}]^-$	kvazimolekularni jon dobijen odlaskom atoma vodonika
$J_{x,y}$	konstanta sprežanja protona X i Y (u Hz)
$[\alpha]_{\text{D}}$	specifična rotacija
Δ	položaj dvostruke veze
Glc p	glukopiranozil grupa
Gall	galoil grupa
Apiof	apiofuranozil grupa
Arabf	arabinofuranozil grupa
MGall	metil-galoil grupa
CD $_3$ OD	deuterisani metanol
CDCl $_3$	deuterisani hloroform
Xyl p	ksilopiranozil grupa
DMC	dimetoksicinamoil grupa
$p\text{C}$	<i>para</i> kumaroil grupa
TMC	trimetoksicinamoil grupa
GlcDMC	glukozildimetoksicinamoil grupa
NCI-H460	ćelije humanog ne-sitnoćelijskog karcinoma pluća
MDR	<i>Multi-Drug Resistant</i>
HaCaT	ćelije normalnih humanih keratinocita
P-gp	P-glikoprotein
AV	aneksin V
PI	propidijum jodid
BN	binuklearne ćelije
MN	mikronukleus
CBMN	<i>Cytokinesis Block Micronucleus Assay</i>
SRB	sulforodamin B
MMC	mitomicin C
DAD	<i>Diode Array Detection</i>
CC	kolonska hromatografija

UVOD

Ova teza je urađena na Odeljenju za instrumentalnu analizu Centra za hemiju IHTM i Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Ona predstavlja nastavak fitohemijskog proučavanja drvenastih biljnih vrsta započetog magistrskim radom i vrstom *Cotinus coggygria* Scop. Predmet ove disertacije je izolovanje i strukturno određivanje diarilheptanoida dve biljne vrste roda *Alnus* (familija Betulaceae), *Alnus viridis* (Chaix) DC. subsp. *viridis* – zelene jove i *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. – crne jove, kao i ispitivanje njihove biološke aktivnosti. Cilj je bio da se na jednom mestu prikaže postupak izolovanja diarilheptanoida, spektroskopski podaci neophodni za određivanje njihove strukture, kao i da se ukaže na biološke aktivnosti ovih jedinjenja i na deo strukture koji je odgovoran za ove aktivnosti.

U **OPŠTEM DELU** ovog rada dati su osnovni podaci o rodu *Alnus* Mill. (jova), sa kratkim opisom karakteristika roda i ispitivanih biljnih vrsta. Navedena je tradicionalna primena biljaka iz roda jova kako u medicinske svrhe tako i u opšte namenske svrhe. Opisane su strukturne osobine i podela diarilheptanoida, njihova biosinteza i navedene su najvažnije biološke aktivnosti ove grupe prirodnih proizvoda.

U delu **NAŠI RADOVI** prikazan je detaljan postupak određivanja strukture izolovanih jedinjenja primenom savremenih spektrometrijskih i spektroskopskih metoda: masene spektrometrije visokog razlaganja (HR-ESI-MS), 1D i 2D NMR spektroskopije (^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC), UV, IR i CD spektroskopije i polarimetrije, a zatim su analizirani rezultati bioloških testova i u okviru svakog je data analiza odnosa strukture izolovanih jedinjenja i njihove biološke aktivnosti.

U **EKSPERIMENTALNOM DELU** date su informacije o instrumentima, hemikalijama i eksperimentalnim tehnikama korišćenim tokom izolovanja i ispitivanja bioloških aktivnosti, podaci o biljnom materijalu, kao i spektroskopski podaci za nova jedinjenja.

1. OPŠTI DEO

1.1. Familija Betulaceae

Familija Betulaceae sadrži šest rodova listopadnog drveća i žbunja sa orašastim plodovima: *Alnus* (jove), *Betula* (breze), *Carpinus* (grabovi), *Corylus* (lešnici), *Ostrya* (crni grabovi) i *Ostryopsis*, brojeći oko 130 vrsta.¹ Njihovo stanište je pretežno severna hemisfera, sa nekoliko vrsta koje se mogu naći na južnoj hemisferi, na Andima u Južnoj Americi. Rod *Alnus* je, uz rod *Betula*, rod sa najvećim brojem vrsta ove familije. Rodovi *Alnus*, *Betula*, *Corylus*, *Carpinus* i *Ostrya* se sreću u Srbiji.² Rod *Ostryopsis* se može naći samo u Kini i Mongoliji.³

1.2. Rod *Alnus* Mill. – opšte botaničke osobine

U ovaj rod spada jednodomo drveće i žbunje sa mladim grančicama i srži, obično trouglastom u preseku. Lišće je spiralno raspoređeno. Muški cvetovi su u trocvetnim dihazijama koje su sjedinjene u viseće rese; cvet je sa 4 prašnika i 4 režnjića perigona. Ženski cvetovi su bez perigona, po 2 u dihazijama (bez srednjeg), stoje u vrlo zbijenim cvastima, sličnim šišaricama; 4 pricvetna listića i pokrovna ljuspa jedne dihazije srašćuju u drvenastu ljuspu; ljuspe ne otpadaju sa zrele, prividne šišarice. Plod je dvokrilna ili spljoštena orašica.²

Rod *Alnus* ima oko 30 vrsta koje rastu u hladnoj i umerenoj zoni severne hemisfere, a podeljene su u tri podroda: *Alnus*, *Chletropsis* i *Alnobetula*. Podrod *Alnus* je najbrojniji sa najpoznatijim vrstama: *A. japonica*, *A. glutinosa*, *A. firma*, *A. incana*, *A. nepalensis*, *A. rubra* i *A. cordata*. Podrod *Chletropsis* ima samo tri člana: *A. formosana*, *A. maritima* i *A. nitida*, a u podrod *Alnobetula* spada samo *A. viridis* sa svoje četiri podvrste: subsp. *viridis*, *maximowiczii*, *crispa*, *sinuata*. Vrsta *A. viridis* subsp. *viridis* je rasprostranjena na području Evrope i Azije, *A. viridis* subsp. *maximowiczii* na tlu Japana, *A. viridis* subsp. *crispa* na području Severne Amerike i *A. viridis* subsp. *sinuata*

na području Sibira i Severne Amerike. U Srbiji postoje tri samonikle vrste: *A. viridis* (zelena jova), *A. glutinosa* (crna jova) i *A. incana* (siva jova).^{1,2,3}

1.3. *A. viridis* (Chaix) DC. subsp. *viridis* – zelena jova

A. viridis subsp. *viridis* je endemska vrsta za područje centralne Evrope i Balkanskog poluostrva.⁴ To je žbun visok do 3 m, gusto razgranat, glatke kore (**Slika 1.1**). Mlade grančice su samo u početku sa dlačicama, sa srži okruglom u preseku i pupoljcima bez drške. Lišće je jajasto, 3-6 cm dugo, na peteljci, oštro dvostruko testerasto, odraslo obično manje-više golo, na licu tamnozeleno, na naličju svetlije (**Slika 1.2**). Muške rese su do 6 cm duge, javljaju se u jesen po 3-5 zajedno (**Slika 1.2**). Perigon je četvoro- ili petodelni, sa 4 prašnika. Ženske cvasti prezimljuju u pupoljcima, javljaju se listanjem oko maja. Šišarice duge 10-15 mm su u početku razvijanja zelene i lepljive, kasnije svetlosmeđe. Plod je dug 1,5 mm, sa širokim kožastim kriocetom (slično brezama).²



Slika 1.1. *Alnus viridis* (Chaix) DC. – zelena jova (www.commons.wikimedia.org)



Slika 1.2. Lišće zelene jove sa ženskim (levo) i muškim resama (desno) (www.treenames.net i www.gobotany-dev.newenglandwild.org)

Zelena jova je visokoplaninska vrsta graničnih regiona šume. Raste pretežno na silikatnim stenama i svežem zemljištu. Na Staroj planini raste u fitocenozi *Saliceto-Alnetum viridis* (Ćol i dr. 1963). Često se nalazi oko izvorišta planinskih potoka i uskih uvala na kojima se dugo zadržava sneg, na severnim i severozapadnim padinama, na nadmorskoj visini od 1300-2100 m. Raste na Alpima, Karpatima, planinama Balkanskog poluostrva - Šar-planina, Stara planina, Vitoša, Rila, Zapadni Rodopi. U Srbiji se nalazi na Staroj planini ispod Krvavih Bara, Tri čuke i Koprena (Pančić, 1884). Značajna je u sprečavanju erozije pošto u vidu zaštitnih šumica učvršćuje zemljište, sprečava njegovo spiranje i odnošenje na strmim nagibima.²

1.4. *A. glutinosa* (L.) Gaertn. – crna jova

A. glutinosa je drvo koje dostiže visinu i preko 20 m, sa vitkim deblom, koje se proteže do vrha krošnje, i horizontalnim granama (**Slika 1.3**). Krošnja je jajastokupasta, zimi podseća na četinare. Kora je u početku glatka, kasnije uzdužno i poprečno ispucala u ljuspe, tamnosmeđa (**Slika 1.4**). Mlade grančice su lepljive, kao i pupoljci, koji stoje na peteljci, pokriveni sa dve ljuspe. Srž grančica je trouglasta. Mlad list je sa lica lepljiv (**Slika 1.4**), kao i mlade grančice, odakle potiče i latinski naziv biljke (*glutinosus* - lepljiv). Odrastao list je na peteljci dugoj 1,5-2 cm, objajast, zaobljen, tup ili usečen na vrhu.



Slika 1.3. *A. glutinosa* (L.) Gaertn. – crna jova (www.en.wikipedia.org)



Slika 1.4. Stablo i lišće crne jove (www.illinoiswildflowers.info i www.treesandhedging.co.uk)

Pri osnovi je klinast i celog oboda, a iznad osnove sitno režnjevito testerast, dug 4-10 cm, širok 3-7 cm. Muške rese duge 6-12 cm, po nekoliko zajedno, se formiraju u jesen

(Slika 1.5). Cvetanje je rano, pre listanja, u periodu februar - mart. Ženske rese (šišarice) su jajastog oblika i imaju izdužene drške. Duge su 1-2 cm, a zriju u ranu jesen (Slika 1.5). Plod je spljošten, opkoljen plutastim omotačem, dug 2-4 mm.²

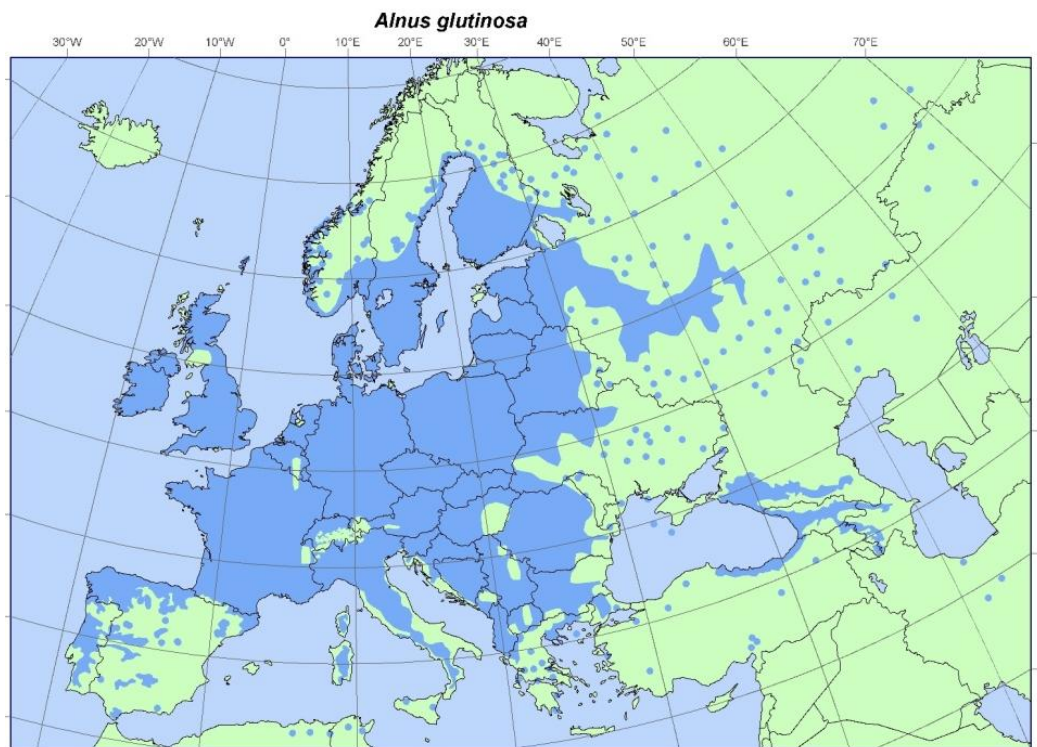


Slika 1.5. Muške i ženske rese crne jove u proleće (levo) i u jesen (desno) (www.watercress.org i www.commonswikimedia.org)

Crna jova se obično nalazi oko nizijskih i brdskih reka i potoka, na naplavnim zemljištima do nadmorske visine od oko 1000 m. Javlja se sa drugim higrofilnim vrstama kao što su *Fraxinus angustifolia* (poljski jasen), *Ulmus laevis* (brest vez), *Populus alba* (bela topola), *Quercus robur* (hrast lužnjak), *Salix alba* (bela vrba), *Salix cinerea* (iva), *Rhamnus frangula* (pasje grožđe) i *Viburnum opulus* (snežna grudva).²

Zemljište pod crnom jovom je obično vrlo vlažno, ponekad peskovito sa vodom na priličnoj dubini, uvek pokretnom. Pored nekih vrba, crna jova je naša najhigrofilnija vrsta drveća.² Kao i druge jove i crna ima na svome korenju izraštaje (nodule) oblika i veličine oraha koji potiču od *Frankia alni*, bakterije azotofiksatora, koja u ovoj simbiotskoj zajednici biljci (jovi) obezbeđuje azot neophodan u izgradnji aminokiselina, dok biljka bakteriji daje ugljenik u vidu glukoze (proizvedene fotosintezom). One zahvaljujući enzimu nitrogenazi pretvaraju atmosferski azot u amonijak koji se potom zahvaljujući enzimima glutamin sintetazi i glutamat sintazi prevodi u glutamin, odnosno glutamat. Ova simbiotska zajednica povećava plodnost zemljišta na kojem se nalaze jove i čini jovu jednom od pionira ekološkog nasleđa – vrste koje se prve kolonizuju na područja oštećenog ekosistema i koje služe za njegov oporavak. Crna jova je najrasprostranjenija *Alnus* vrsta u Evropi. Ona je zastupljena u centralnoj i severnoj

Evropi, Sredozemlju, na Kavkazu i u drugim oblastima. Ima je i na severnoameričkom kontinentu kao i u jugozapadnoj Aziji i zapadnom Sibiru (slika 1.6).^{3,5,6}



Slika 1.6. Rasprostranjenost crne jove u Evropi (www.euforgen.org)

Drvo crne jove je meko, belo na svežem preseku, a svetlo crveno pri dužem stajanju. Čvorovi su sa lepim šarama. Pod vodom je drvo veoma postojano i izdržljivo usled čega se koristi u vodogradnji i rudarstvu za izradu drvenih potpornih stubova - šipova - dubokih drvenih temelja zgrada, mostova, pilana i brana. Tako su drveni potporni stubovi Rialto mosta u Veneciji kao i mnogih građevina na vodi u Amsterdamu izrađeni od jove. Jovovo drvo je izuzetno za obradu i koristi se u izradi nameštaja, nekada drvenih kolskih točkova, danas stolica, kašika, kutlača, posuda-čanaka, bačvi, ali i gitara, klompi, drvenih potpetica, kutija za cigare i olovki. Posebno je popularno u Škotskoj i zato ga zovu „Škotski mahagoni”.⁶⁻⁸ Kora drveta se koristi za štavljenje kože.² Crna jova je, kao i zelena, značajna zbog sprečavanja erozije pošto brzo raste, učvršćuje zemljište, sprečava njegovo spiranje i odnošenje na strmim nagibima, a posebno na rečnim obalama.^{2,8}

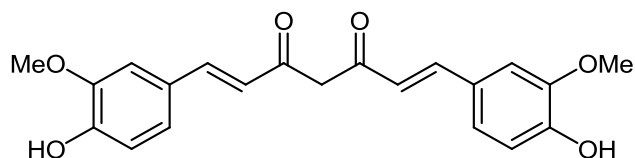
1.5. Tradicionalna upotreba biljnih vrsta roda *Alnus* u medicini

Biljke roda *Alnus* su dobro poznate po svojim tradicionalnim medicinskim vrednostima. Korišćene su kao alterativi (sredstva za čišćenje krvi), astringenti, purgativi, emetici, antipiretici, hemostatici, antiparazitici, antihelmintici, sredstva za stimulaciju mlečnih žlezda i dr, kao i za lečenje različitih bolesti, uključujući i tumor. Ekstrakti stabla vrste *A. glutinosa* su poznati po alterativim, astringentim, purgativnim, antipiretičkim svojstvima i služila su za ispiranja pri različitim upalama u usnoj duplji.⁸ Sirćetni ekstrakti unutrašnje kore biljke korišćeni su kao sredstvo protiv vaški i različitih kožnih problema kao što su šuga i razne kraste.⁹⁻¹¹ Lišće, koren i kora *A. nepalensis* su korišćeni u lečenju dizenterije, dijareje i drugih stomačnih problema u indijskom medicinskom sistemu (Ayurveda).¹² Esencija korena *A. nepalensis* je korišćena u lečenju dijareje, a pasta od lišća se stavljala na rane i posekotine kao hemostatik.¹³ Smeša lišća *A. jorullensis* i grančica *Polylepis racemosa* R. et P je korišćena u lečenju upale uterusa, raka materice, ali i reumatizma.¹⁴ Tako se suvo lišće dodavalo u postelje, jorgane i dušeke, kod ljudi koji su imali reumatske tegobe.¹⁵ *A. japonica* je popularna u narodnoj medicini u Koreji u lečenju raka i hepatitisa.¹⁶ Kora vrste *A. hirsuta* je korišćena u korejskoj i kineskoj tradicionalnoj medicini kao lek za groznicu, krvarenje, alkoholizam i dijareju.^{17,18} Esencija kore *A. glutinosa* je korišćena za lečenje otoka, upala i reumatizma.⁸ Isto tako se koristi kao astringent, biter, emetik i hemostatik, kao i za lečenje gušobolje i faringitisa.^{19,20} Savremeni domorodački iscelitelji severnoameričkog kontinenta koriste koru i drvo vrste *A. rubra* u različitim medicinskim čajevima.^{21,22}

1.6. Diarilheptanoidi

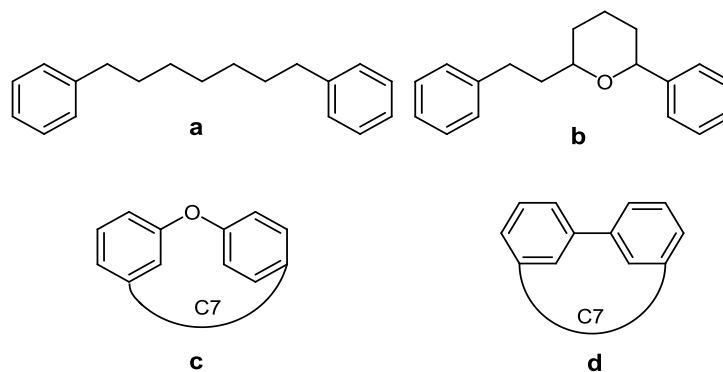
A. japonica je hemijski najviše istražena vrsta ovog roda, zajedno sa vrstama *A. hirsuta* i *A. rubra*. Vrste *A. glutinosa* i *A. viridis* su do danas malo hemijski ispitane i samo nekoliko radova o njihovom hemijskom sastavu se može naći u literaturi.²³⁻²⁷ Biljke roda *Alnus* sadrže različite tipove sekundarnih metabolita. Iz ispitanih vrsta roda *Alnus* je izolovan veliki broj prirodnih proizvoda uključujući diarilheptanoide, terpene,

flavonoide, fenole, sterole i druge.²⁸ Diarilheptanoidi su karakteristična klasa jedinjenja za ovaj rod, ali i za rodove *Alpinia*, *Zingiber*, *Curcuma* i *Betula*. U poslednjih dvadeset godina postali su jedna od najatraktivnijih tema u oblasti istraživanja prirodnih proizvoda zahvaljujući svojim izrazitim biološkim aktivnostima, pre svih, anti-kancerogenom, antiemetičnom, estrogenom, antimikrobnom i antioksidativnom. Najpoznatiji među diarilheptanoidima je kurkumin (**Slika 1.7**) koji je otkriven sredinom XIX veka i čija je struktura određena 1910. godine.^{29,30} Njegove različite pozitivne biološke aktivnosti su redom otkrivane, posebno krajem prošlog i početkom ovog veka da bi do 2011. bilo objavljeno preko 4000 radova u vezi sa različitim biološkim aktivnostima kurkumina, registrovanih u bazi podataka Američkog nacionalnog instituta za zdravlje.²⁹



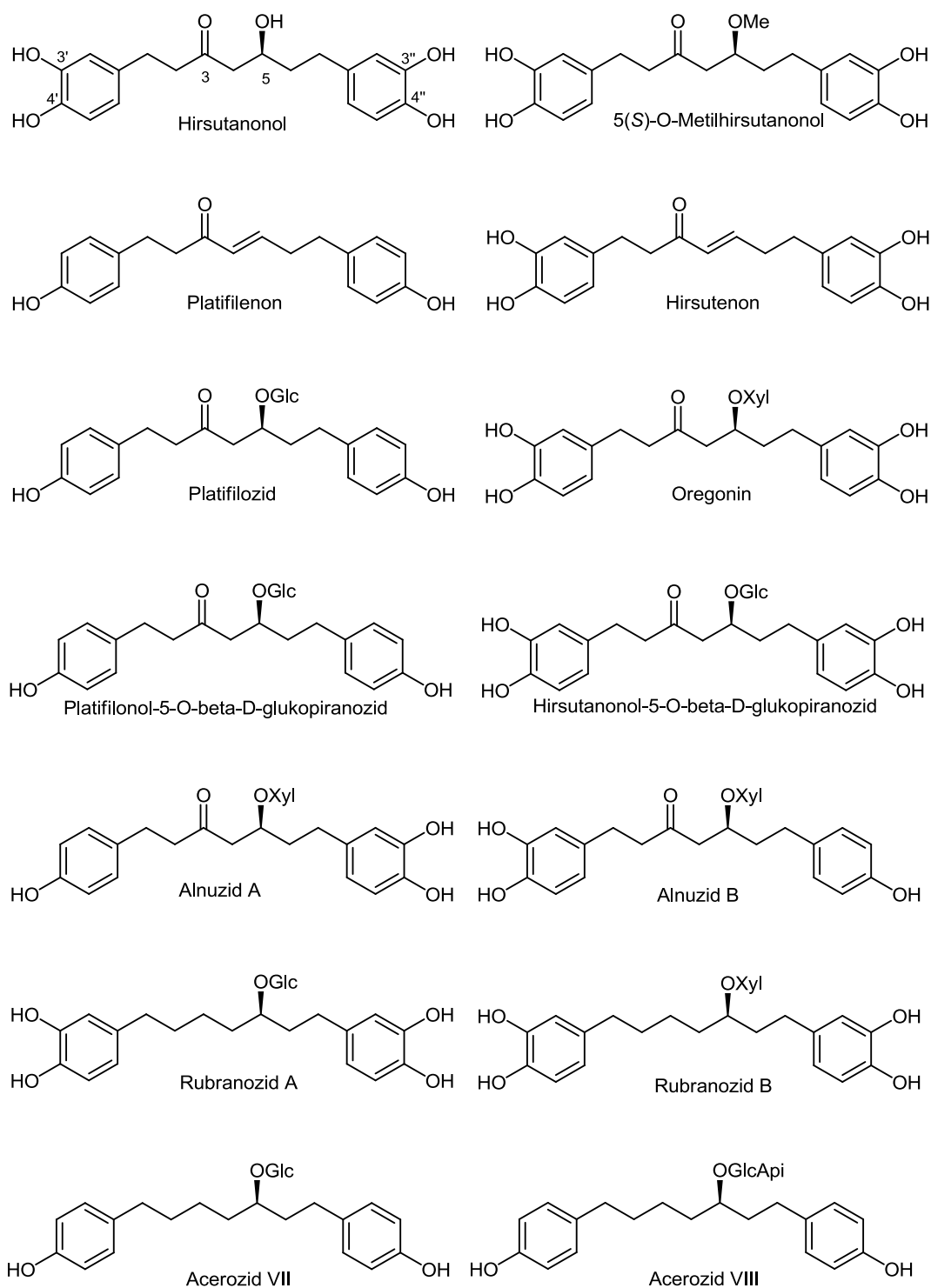
Slika 1.7. Kurkumin

Diarylheptanoidi su jedinjenja sa difenil heptanskim skeletom. Mogu biti aciklični-linearni (**Slika 1.8a**) i ciklični, pri čemu su ovi drugi znatno ređi. Ciklični potiču od linearnih i nastali su njihovim oksidativnim kuplovanjem. U zavisnosti od načina ciklizacije, ciklični su podeljeni na tetrahidropiranske (nastale ciklizacijom u okviru heptanskog niza, **Slika 1.8b**) i ciklofane. Ciklofani su nastali ciklizacijama ili preko kiseonika vezanog za neki od aromatičnih prstenova (*meta-para* difenil etri; **Slika 1.8c**) ili direktnim C-C vezama aromatičnih ugljenika dva prstena diarylheptanoida (*meta-meta* bifenili, **Slika 1.8d**).

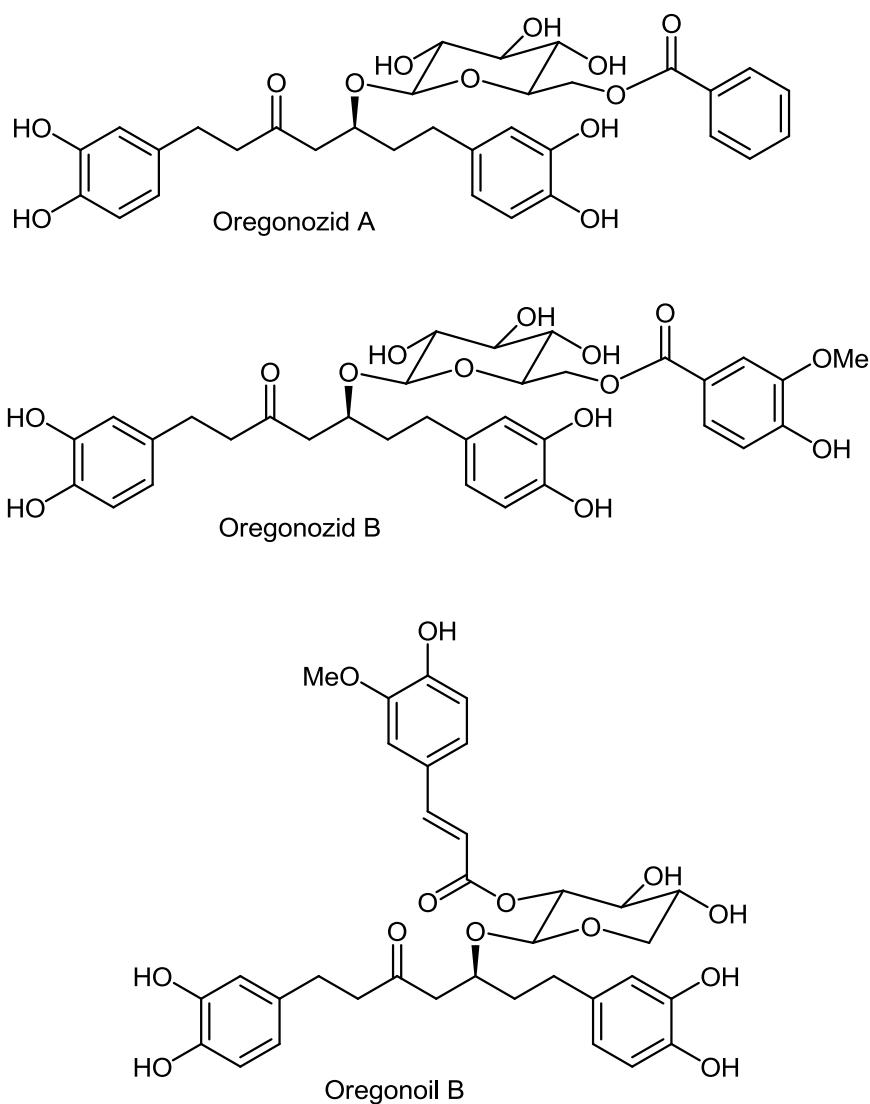


Slika 1.8. Diarilheptanoidi: **a**-linearni; **b**-tetrahidropiranski; **c**-*meta-para* difenil etri; **d**-*meta-meta* bifenili

Na kraju, treba pomenuti i kompleksne diarilheptanoide koji uz osnovni skelet sadrže vezan i neki drugi molekul npr. halkan, flavon ili fenolnu kiselinu.³¹ Primeri lineranih diarilheptanoida su oni iz roda *Alnus* koji obično imaju jednu ili dve hidroksilne ili metoksi grupe na svakom aromatičnom prstenu i najčešće u položajima 3' i 4', odnosno 3'' i 4'' (**Slika 1.9**). Supstituenti na heptanskom nizu se najčešće nalaze u položajima 3 i 5. To su obično hidroksilna ili metoksi grupa, neka monosaharidna jedinica (najčešće D-glukoza, D-ksiloza, D-apioza, ređe L-arabinoza), disaharidna jedinica (kombinacija pomenutih monosaharida gde je najčešća D-glukoza) kao i kombinacija monosaharida i neke fenolne kiseline (neke od benzoevih ili cinamičnih). Neretko je u položaju 3 keto grupa, a sreće se povremeno i dvostruka veza, najčešće konjugovana sa keto grupom, u položaju 4,5, kao što je to slučaj sa platifilenonom i hirsutenonom (**Slika 1.9**). Pored njih, na **Slici 1.9** dati su primeri linearnih diarilheptanoida i nekih njihovih glikozida sa trivijalnim imenima, izolovanih iz biljaka roda *Alnus*. Na **Slici 1.10** predstavljeni su složeni diarilheptanoidi sa fenolnim kiselinama estarski vezanim za monosaharidne grupe; oregonozidi A i B, izolovani iz crvene jove (*Alnus rubra*), imaju benzoeve kiseline vezane za glukozu, a oregonoil B, izolovan iz japanske jove (*Alnus japonica*) ima feruličnu kiselinu vezanu za glukozu.

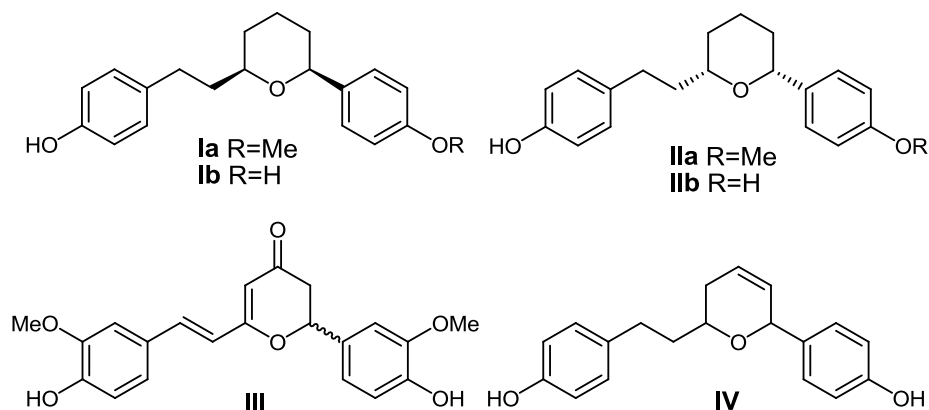


Slika 1.9. Primeri jednostavnih linearnih diarilheptanoida i njihovih glikozida



Slika 1.10. Primeri diarilheptanoid glikozida sa benzoevim kiselinama (oregonozidi A i B) i feruličnom kiselinom (oregonoil B)

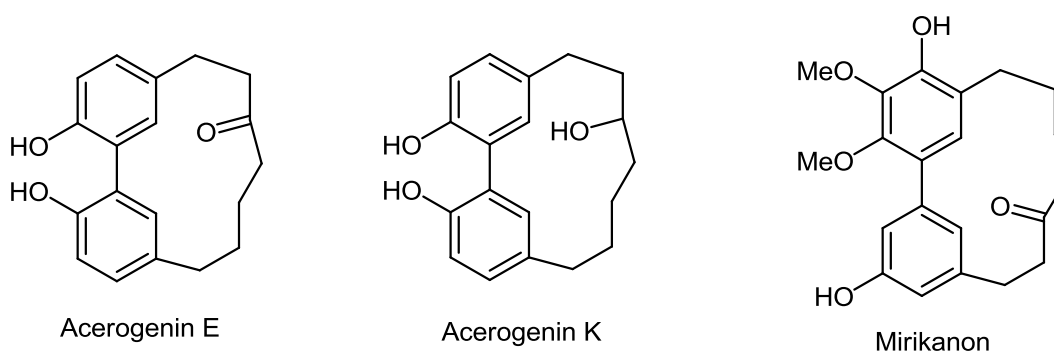
Primeri tetrahidropiranskih cikličnih diarilheptanoida sreću se kod biljaka roda *Centrolobium*. Levorotatorni enantiomeri (-)-**Ia** i (-)-**Ib** su izolovani iz *C. paraense*, *C. sclerophyllum* and *C. tomentosum*, dok su dekstrorotatorni enantiomeri (+)-**IIa** i (+)-**IIb** konstituenti *C. robustum* (**Slika 1.11**). Centrolobin **Ia** poseduje izrazitu antibakterijsku aktivnost.³²



Slika 1.11. Piranski ciklični diarilheptanoidi

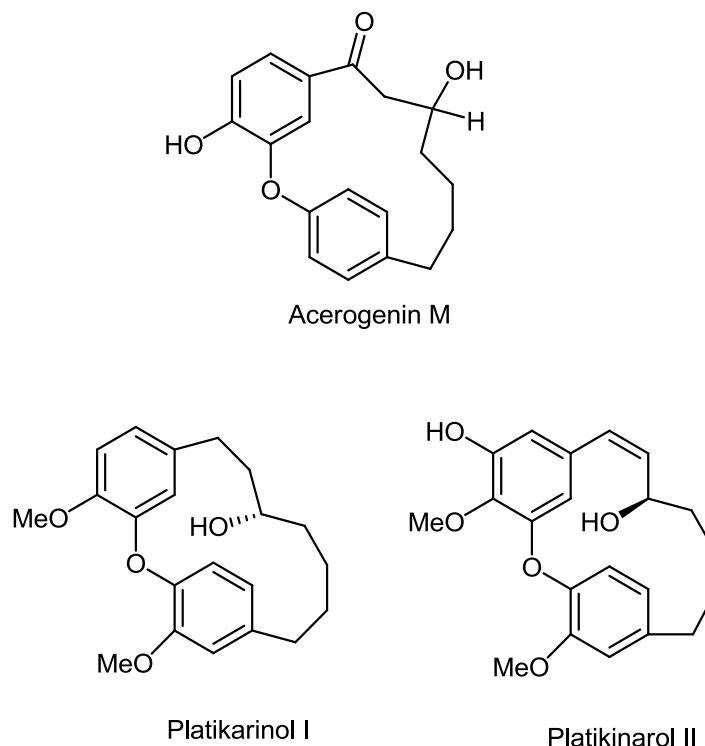
Još dva primera piranskih cikličnih diarilheptanoida su ciklokurkumin **III** izolovan iz aktivne frakcije (antifungalna aktivnost) biljke *Curcuma longa*³³ i diarilheptanoid **IV** (Slika 1.11), izolovan iz *Centrolobium sclerophyllum*, sa antiparazitskom aktivnošću prema vrstama roda *Leishmania*.³⁴

Acerogenin E je primer *meta-meta* bifenilnog diarilheptanoida izolovanog iz *Acer nikoense* (Aceraceae)³⁵ i *Betula platyphylla* (Betulaceae).³⁶ Njegov redukovani analog, acerogenin K takođe je izolovan iz *A. nikoense*³⁷ (Slika 1.12), biljke karakteristične za područje Japana, čiji su se ekstrakti koristili u narodnoj medicini za lečenje poremećaja vezanih za jetru, kao i za ispiranje očiju. Ciklični diarilheptanoid mirikanon iz grupe bifenila (Slika 1.12) izolovan je iz biljke *Myrica rubra* (Myricaceae) i pokazao se kao najbolji antitumorni agens među cikličnim diarilheptanoidima.³⁸



Slika 1.12. Ciklični diarilheptanoidi iz grupe *meta-meta* bifenila

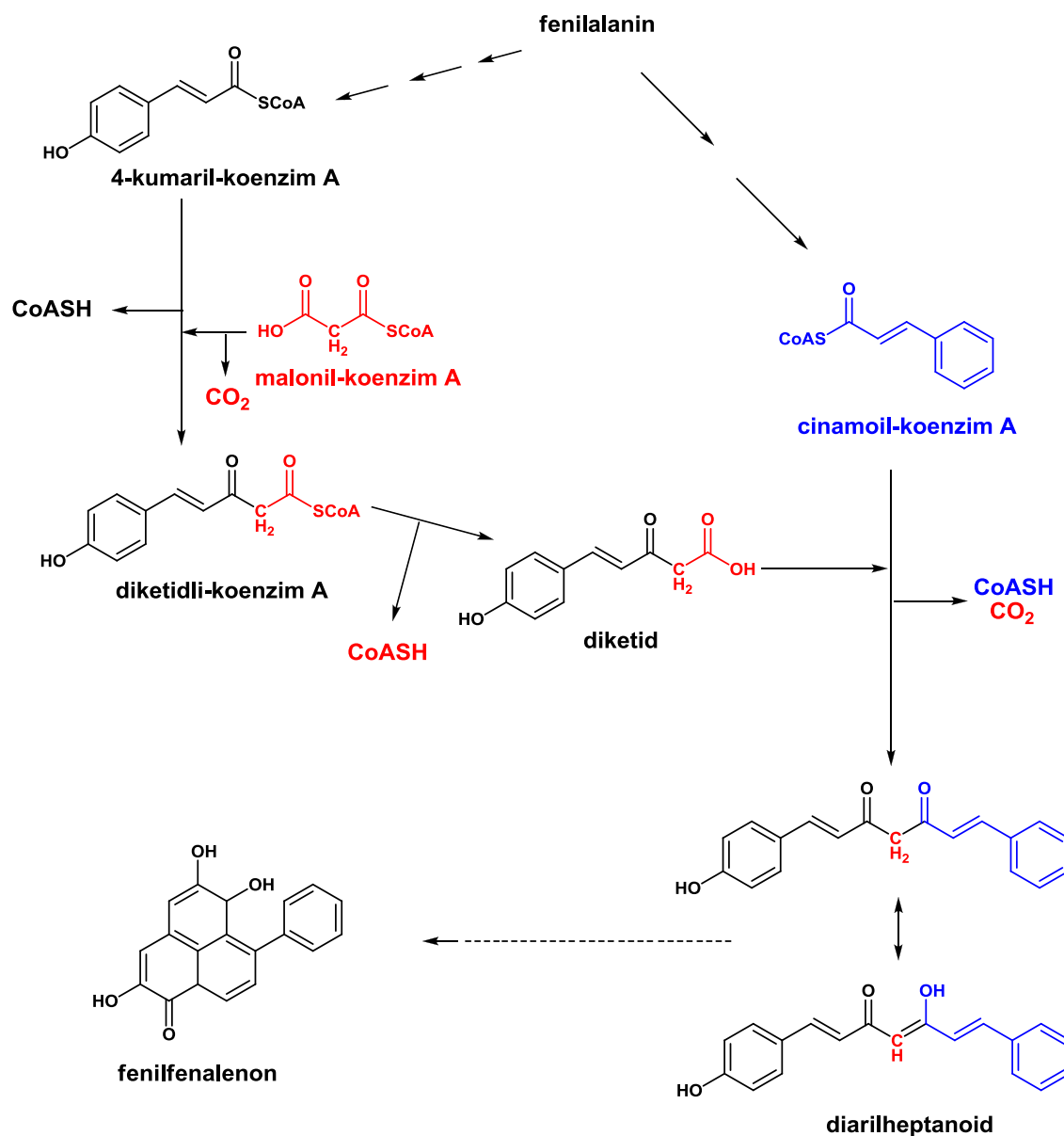
Iz *A. nikoense* (Aceraceae) je izolovan i acerogenin M (Slika 1.13), diarilheptanoid iz grupe difenil etara poznat po svojoj anti-inflamatornoj i drugim aktivnostima.³⁹ Platikarinoli I i II, koji su izolovani iz biljnih vrsta *Platycarya strobilacea*⁴⁰ (Juglandaceae) i iz unutrašnjeg dela kore *Betula platyphylla*³⁶ takođe pripadaju grupi cikličnih diarilheptanoida (Slika 1.13).



Slika 1.13. Ciklični diarilheptanoidi iz grupe *meta-para* difenil etara

1.7. Biosinteza diarilheptanoida

Biosintetski, diarilheptanoidi su izvedeni iz dva C6-C3 bloka, povezanih dodatnim C-atomom iz malonil-CoA.^{41,42} Mada još nisu poznati svi detalji, diarilheptanoidi su, zajedno sa fenilfenalenonima, izvedeni iz fenilpropanoidnog biosintetskog puta (Slika 1.14). Na osnovu prisustva diarilheptanoida i fenilfenalena na različitim aril grupama u terminalnim položajima heptanskog skeleta, grananje u ranoj fazi biosinteze ostaje kao pretpostavka.



Slika 1.14. Biosinteza diarilheptanoida

Na jednoj grani, cinamična kiselina je modifikovana hidroksilacijom, čemu sledi nastanak CoA estra. Sledeći korak obuhvata produženje lanca za dva C atoma pomoću malonil-CoA, dovodeći do diketidil-CoA intermedijera. Diketid potom podleže kondenzaciji sa fenilpropanoid-CoA jedinicom izvedenom iz druge biosintetske grane. Svi detalji još nisu u potpunosti jasni, ali reakcija (ili više njih) koja dovodi do nastanka diarilheptanoida uključuje uklanjanje terminalne karboksilne grupe diketidil intermedijera.⁴¹

1.8. Biološke aktivnosti diarilheptanoida

Diarilheptanoidi su jedinjenja sa širokim spektrom bioloških aktivnosti od kojih su samo neke: antivirusna aktivnost protiv KBNP-0028 (H9N2) virusa ptičijeg gripa³¹, citotoksična prema različitim humanim tumorskim ćelijskim linijama kao što su SNU-1 (tumor želuca), SNU-354 (tumor jetre), SNU-4 (tumor debelog creva)⁴³, A-549 (adenokarcinom pluća), DLD-1 (adenokarcinom debelog creva)⁴⁴, Caco-2 (adenokarcinom debelog creva), PC3 (adenokarcinom prostate), MCF7 (adenokarcinom mlečnih žlezda)⁴⁵, hepatoprotektivna aktivnost prema D-GalN indukovanoj citotoksičnosti u hepatocitima pacova^{46,47}, aktivnost prema *t*-BHP indukovanoj citotoksičnosti u humanim HepG2 ćelijama⁴⁸, povećanje osetljivosti hemorezistentnog tumora jajnika ka cisplatinu⁴⁹, antioksidativna aktivnost^{46,50-53}, neuroprotektivna aktivnost⁵⁴, anti-*Helicobacter pylori* aktivnost⁵⁵, antiparazitska aktivnost prema crvima *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* i *Brugia timori* koji izazivaju limfnu filarijazu (u koju spada i elefantijaza)⁵⁶, anti-inflamatorna aktivnost^{51,57-59}, inhibicija produkcije prostaglandina E₂⁴⁵, inhibitorna aktivnost ka sintezi NO⁶⁰, inhibicija ekspresije ciklooksigenaze 2⁶¹, inhibitorna aktivnost ka farnezil protein transferazi⁶², inhibicija diacilglicerol aciltransferaze⁶³ i mnoge druge.

Diarilheptanoidi koji su pokazali izuzetno delovanje u različitim testovima biološke aktivnosti su, pored kurkumina (**Slika 1.7**), hirsutanonol, 5(*S*)-*O*-metilhirsutanonol, hirsutenon, platifilozid i oregonin (**Slika 1.9**). Hirsutanonol je pokazao značajnu antioksidativnu⁵⁰, anti-inflamatornu⁵⁹ i citotoksičnu aktivnost.⁴³ 5(*S*)-*O*-metilhirsutanonol je pokazao značajnu antioksidativnu⁵⁰ i anti-inflamatornu aktivnost.⁵¹ Hirsutenon je pokazao, između ostalih, antioksidativnu⁵⁰ i citotoksičnu aktivnost⁴³, i efekat pojačanja apoptoze tumorskih ćelija.⁶⁴ Platifilozid je, između ostalih, pokazao snažno antioksidativno dejstvo⁵³, izuzetno citotoksično dejstvo^{43,44} i neuroprotektivnu aktivnost.⁵⁴ Oregonin je pokazao izuzetnu antioksidativnu^{50,52,53}, antitumorsku i anti-inflamatornu aktivnost^{58,65}, pozitivno dejstvo u tretmanu atopijskog dermatitisa kod miševa⁶⁶ kao i mnoge druge aktivnosti. Ovi diarilheptanoidi su izolovani i okarakterisani i u ovom radu iz vrste *A. glutinosa*. Testirani su na biološke aktivnosti koje do sada na njima nisu ispitivane i pokazali su značajne rezultate.

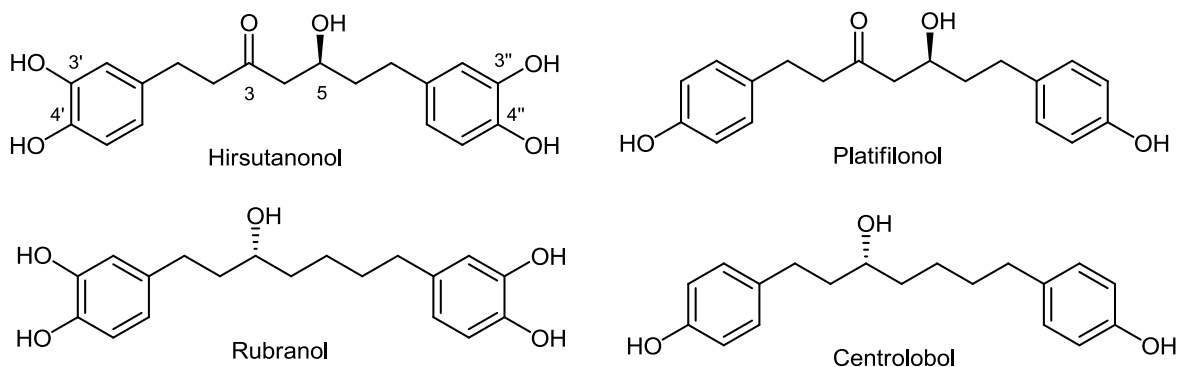
Interesantna je i primena ostatka kore posle izolovanja polifenolnih jedinjenja u ekološke svrhe – uklanjanju uljastih supstanci sa površine vode zahvaljujući visoko adhezivnim svojstvima.⁵²

2. NAŠI RADOVI

Cilj ovog rada bio je da se ispita sastav sekundarnih metabolita kore zelene (*A. viridis*) i crne jove (*A. glutinosa*), prvenstveno diarilheptanoida kao glavne i karakteristične grupe prirodnih proizvoda roda *Alnus*, kao i da se odredi biološka aktivnost izolovanih jedinjenja. Ove dve biljne vrste su vrlo malo hemijski ispitivane i u literaturi je do sada objavljeno samo nekoliko radova u kojima su ispitani njihovi sekundarni metaboliti.²³⁻²⁷

Obe biljne vrste su analizirane na isti način: osušena kora je samlevena u blenderu do finog praha i ekstrahovana sistemom rastvarača srednje do veće polarnosti. Ekstrakti su razdvajani na frakcije hromatografijom na koloni silika gela, a dobijene frakcije su posle spajanja sličnih na osnovu TLC analiza, prečišćavane semipreparativnom reversno-faznom tečnom hromatografijom uz DAD (UV) detekciju. Određivanje strukture izolovanih jedinjenja vršeno je 1D (¹H i ¹³C) i 2D NMR (HSQC i HMBC), UV IR i CD spektroskopijom, masenom spektrometrijom (HR-ESI-MS) i polarimetrijom. Maseni spektri su snimani u pozitivnom ili negativnom modu, a koji mod je korišćen za dato jedinjenje vidi se na osnovu naelektrisanja jona u datom spektru. Određivanje stereochemije na C-3 ili C-5 atomu za nova jedinjenja je, pored snimanja CD spektara i poređenja sa CD spektrima sličnih jedinjenja poznatih konfiguracija, obuhvatalo i primenu tzv. „pravila ¹³C glikozidacionog pomeranja“. Prema tom pravilu ustanovljenom za sekundarne alkohole sa po jednom metilenskom grupom oko ugljenika na kojem se određuje konfiguracija, utvrđuju se razlike u hemijskim pomeranjima metilenskih C-atoma iste numeracije u glikozidu i aglikonu, za oba C-atoma susedna saharidnoj/hidroksilnoj grupi. Ako se vrši određivanje konfiguracije na C-5 atomu diarilheptanoid glikozida koji imaju keto grupu u položaju 3 i saharidni supstituent u položaju 5, konfiguracija na C-5 je *S* ako je $\Delta\delta_{C4} > \Delta\delta_{C6}$. S druge strane, za diarilheptanoide kojima je jedini supstituent na heptanskom nizu saharidni supstituent u položaju 3, konfiguracija će biti *R* kada je $\Delta\delta_{C4} > \Delta\delta_{C2}$.^{67,68} Ovo pravilo je primenjeno u daljem radu i za utvrđivanje ili potvrđivanje apsolutne konfiguracije izolovanih glikozida. Pošto ¹³C NMR podaci za platifilonol i centrololol (aglikone diarilheptanoid glikozida izolovanih iz zelene jove) nisu bili dostupni, korišćeni su ¹³C

NMR podaci hirsutanonola i rubranola (**Slika 2.1.1**). Dodatne OH grupe u položajima 3' i 3'' u hirsutanonolu u odnosu na platifilonol, i u rubranolu u odnosu na centrolobol, ne utiču na vrednosti δ_{C2} , δ_{C4} i δ_{C6} .



Slika 2.1.1. Strukture hirsutanonola, platifilonola, rubranola i centrolobola

U ovom odeljku su, uz tumačenje struktura, prikazani NMR spektri i date $[\alpha]_D$ vrednosti i MS podaci svih izolovanih jedinjenja. HR-ESI-MS spektri su priloženi samo za nove prirodne proizvode. Ostali spektroskopski podaci su dati u Eksperimentalnom delu (poglavlje **3.3.3**). U pojedinim NMR spektrima pored signala odgovarajućih C/H atoma, obeleženi su i signali koji potiču od rastvarača („R^c”), nečistoća („N^c”), artefakata („A^c”) i HSQC satelita („S^c”).

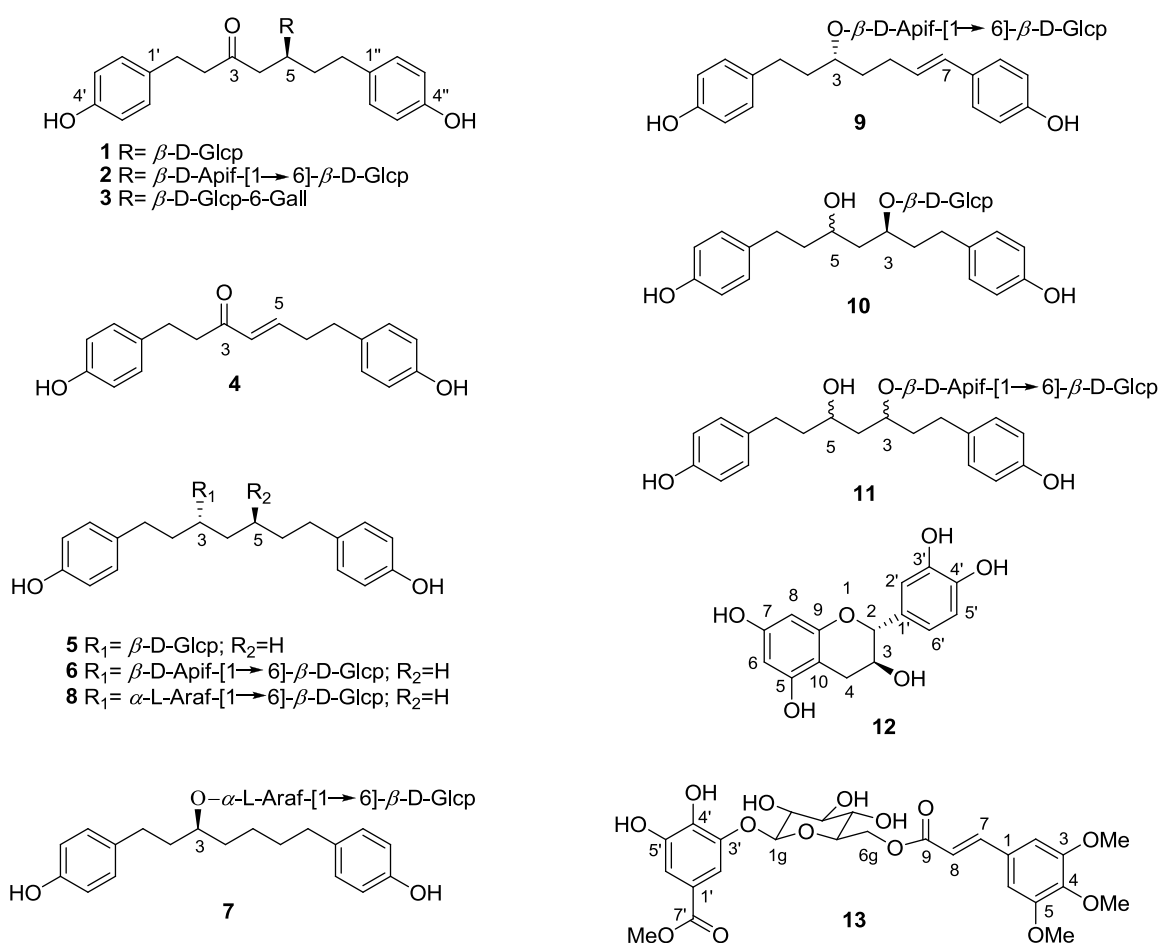
Izolovani diarilheptanoidi su, radi lakše interpretacije spektara, podeljeni na:

- i. proste - sadrže samo diarilheptanoidnu jedinicu
- ii. diarilheptanoid glikozide - pored diarilheptanoidne sadrže i mono- ili disaharidnu jedinicu
- iii. složene - sadrže diarilheptanoidnu, saharidnu i fenolno-kiselinsku jedinicu.

Odabrana jedinjenja su testirana na antitumorsku aktivnost prema senzitivnim i rezistentnim ćelijama raka pluća, na protektivnu aktivnost prema DNK humanih limfocita i na antimikrobnu aktivnost prema izabranim sojevima bakterija i gljivica.

2.1. Jedinjenja izolovana iz kore zelene jove (*A. viridis*)

Iz hloroformsko-metanolnog ekstrakta (1:1) kore zelene jove razdvajanjem kolonskom hromatografijom na silika gelu i semipreparativnom reversno-faznom HPLC hromatografijom izolovano je ukupno 13 jedinjenja među kojima je 6 novih. Strukture ovih jedinjenja date su na **Slici 2.1.2**, a detaljan postupak njihovog izolovanja opisan je u Eksperimentalnom delu. U ovom delu prikazani su i interpretirani spektri svih izolovanih jedinjenja iz kore zelene jove na osnovu kojih je određena njihova struktura.

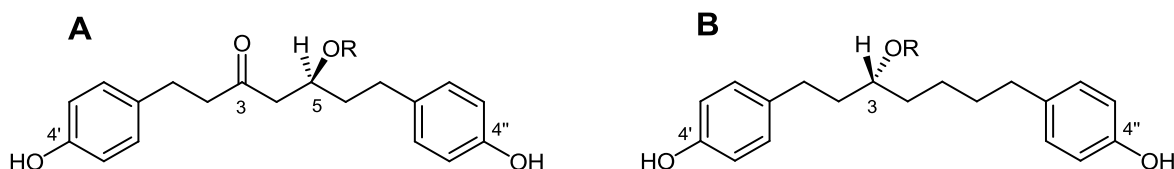


Slika 2.1.2. Strukturne formule jedinjenja izolovanih iz kore zelene jove

Zajednička strukturna karakteristika svih diarilheptanoida izolovanih iz kore zelene jove je prisustvo isključivo *p*-hidroksifenil grupa u položajima 1 i 7 heptanskog skeleta, što se u ¹H NMR spektrima manifestuje pojavom signala karakterističnih

AA'BB' spinskih sistema u aromatičnoj oblasti, na 6,6-7,1 ppm, a u ^{13}C NMR spektrima simetričnim signalima na ~ 116 ppm (C-3', C-3'', C-5' i C-5''), ~ 130 ppm (C-2', C-2'', C-6' i C-6''), ~ 134 ppm (C-1' i C-1'') i ~ 156 ppm (C-4' i C-4''). Diarilheptanoidi izolovani iz drugih biljnih vrsta roda *Alnus* pored *p*-hidroksifenil grupa imaju i kateolske ili kombinacije ove dve grupe.^{50,57,69}

Na osnovu sličnosti u strukturi, a radi lakše interpretacije spektroskopskih podataka, izvršena je podela izolovanih diarilheptanoida zelene jove u dve grupe. U prvu, heptanonolsku grupu, svrstani su oni koji imaju keto grupu u položaju 3 (signal na preko 200 ppm u ^{13}C NMR spektru) i kiseonični supstituent u položaju 5, a u drugu, heptanolsku, oni samo sa kiseoničnim supstituentom u položaju 3 (**Slika 2.1.3**). Na kraju ovog poglavlja date su i spektroskopske karakteristike i tumačenje strukture dva izolovana jedinjenja koja ne pripadaju grupi diarilheptanoida.

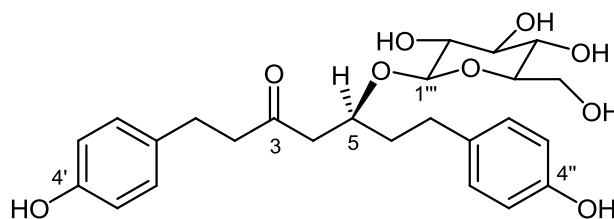


Slika 2.1.3. Heptanonolska (A) i heptanolska (B) grupa diarilheptanoida zelene jove

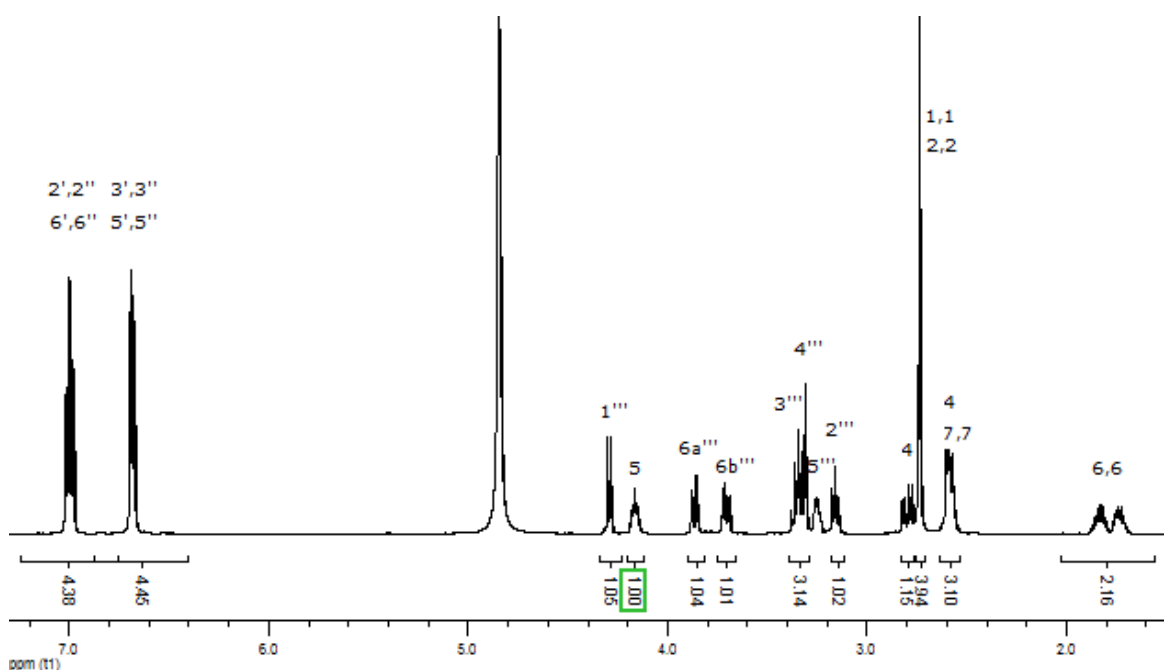
2.1.1. Heptanonolska grupa diarilheptanoida

Prvi član ove grupe je jedinjenje **1** (**Slike 2.1.2** i **2.1.4**). Ono je izolovano u količini od 54 mg. U ^1H NMR spektru ovog jedinjenja je, pored signala AA'BB' spinskih sistema *p*-hidroksifenil grupa, uočen i singlet od 4 protona na $\sim 2,7$ ppm (**Slika 2.1.5**). On potiče od slučajno izohronih protona H₂-1 i H₂-2 diarilheptanoida koji imaju *p*-hidroksifenil grupu u položaju 1 i nekonjugovanu keto grupu u položaju 3 heptanskog niza. Ovo zapažanje je pri kasnijim strukturnim određivanjima vezanim za diarilheptanoide crne jove bilo od značaja jer je olakšavalo rešavanje struktura izolovanih jedinjenja posebno u slučajevima gde je jedan aromatični sistem bio kateolski, a drugi *p*-hidroksifenil. Analizom signala u saharidnoj oblasti ^1H i ^{13}C NMR spektara (**Slike 2.1.5** i **2.1.6**), kao i HSQC i HMBC spektara (**Slike 2.1.7-2.1.10**), došlo se do zaključka da je monosaharidna grupa vezana za diarilheptanoidni skelet β -D-glukopiranoza. β -

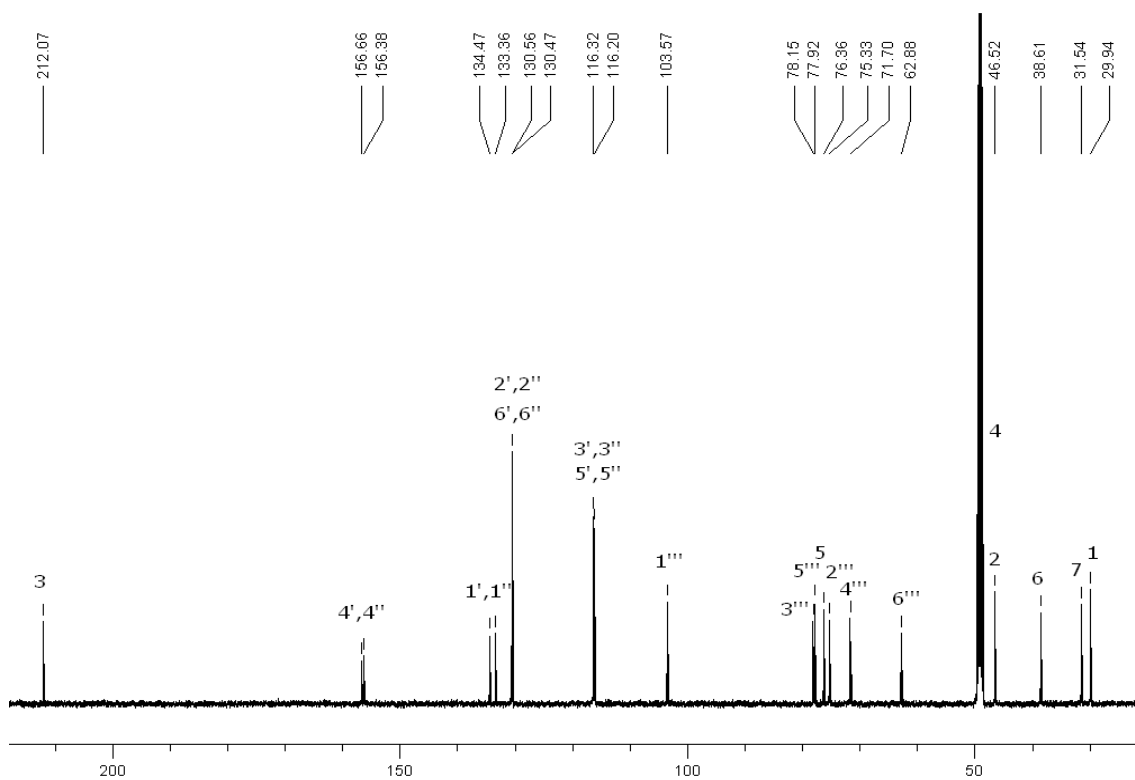
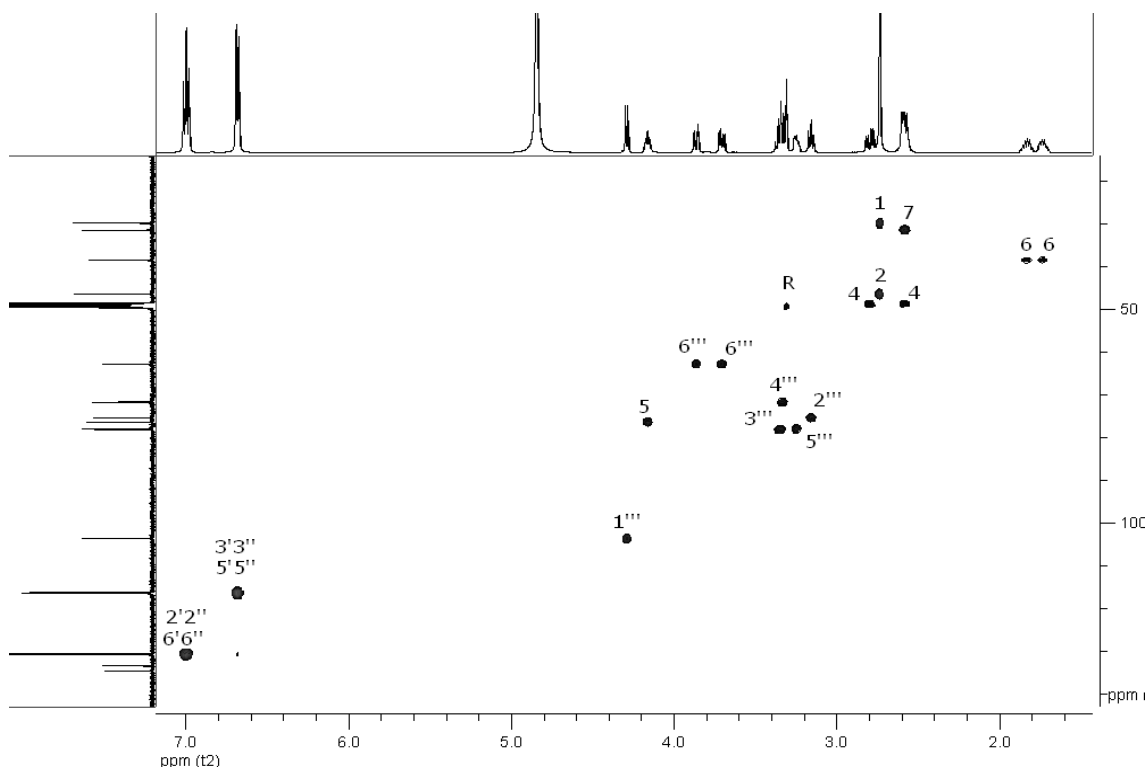
Konfiguracija je ustanovljena na osnovu konstante spreznja od 7,5 Hz za anomerni proton na 4,29 ppm. Položaj β -D-glukopiranoze (C-5) utvrđen je HMBC korelacijama H-5/C-1''' i H-1'''/C-5 (**Slika 2.1.9**). Podatak o masi jona $[M-H]^-$ na m/z 475,2002 ukazao je na molekulsku formulu $C_{25}H_{32}O_9$, a *S* konfiguracija je ustanovljena na osnovu slaganja eksperimentalne $[\alpha]_D$ vrednosti -12,0 sa literaturnom -8,6⁶⁹ i primenom pravila ¹³C glikozidacionog pomeranja. Kako ¹³C NMR podaci za aglikon platifilonol nisu bili dostupni, poređeni su ¹³C NMR spektri jedinjenja **1** i hirsutanonola (izolovanog iz crne jove kao jedinjenje **14**; **Slike 2.1.1** i **2.2.2**, **Tabele 2.1.1** i **2.2.1**), jedinjenja sličnog platifilonolu. Nađeno je da je $\Delta\delta_{C4} > \Delta\delta_{C6}$ (2,7 > 2,0), što je potvrdilo *S* konfiguraciju na C-5. Dobijeni spektroskopski podaci su u saglasnosti sa literaturnim.^{69,70} Trivijalno ime ovog diarilheptanoid glikozida je platifilozid.



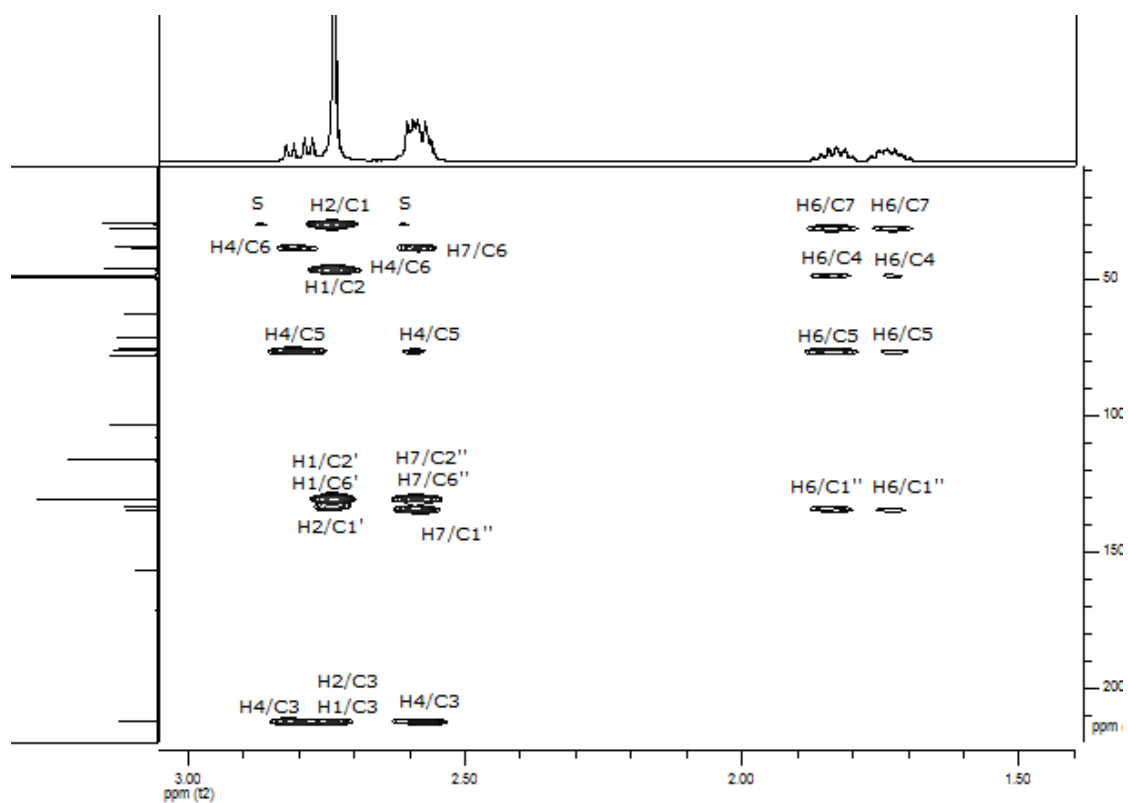
Slika 2.1.4. Strukturna formula platifilozida (**1**)



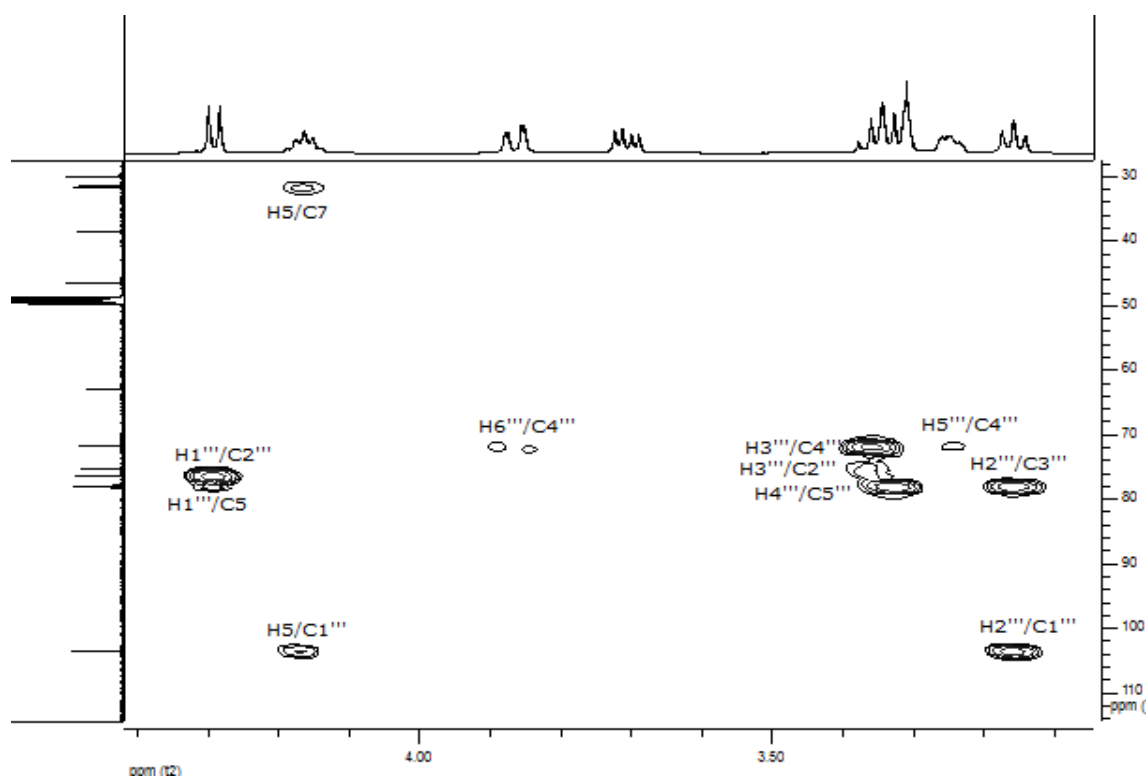
Slika 2.1.5. ¹H NMR spektar platifilozida (**1**)

Slika 2.1.6. ^{13}C NMR spektar platifilozida (1)

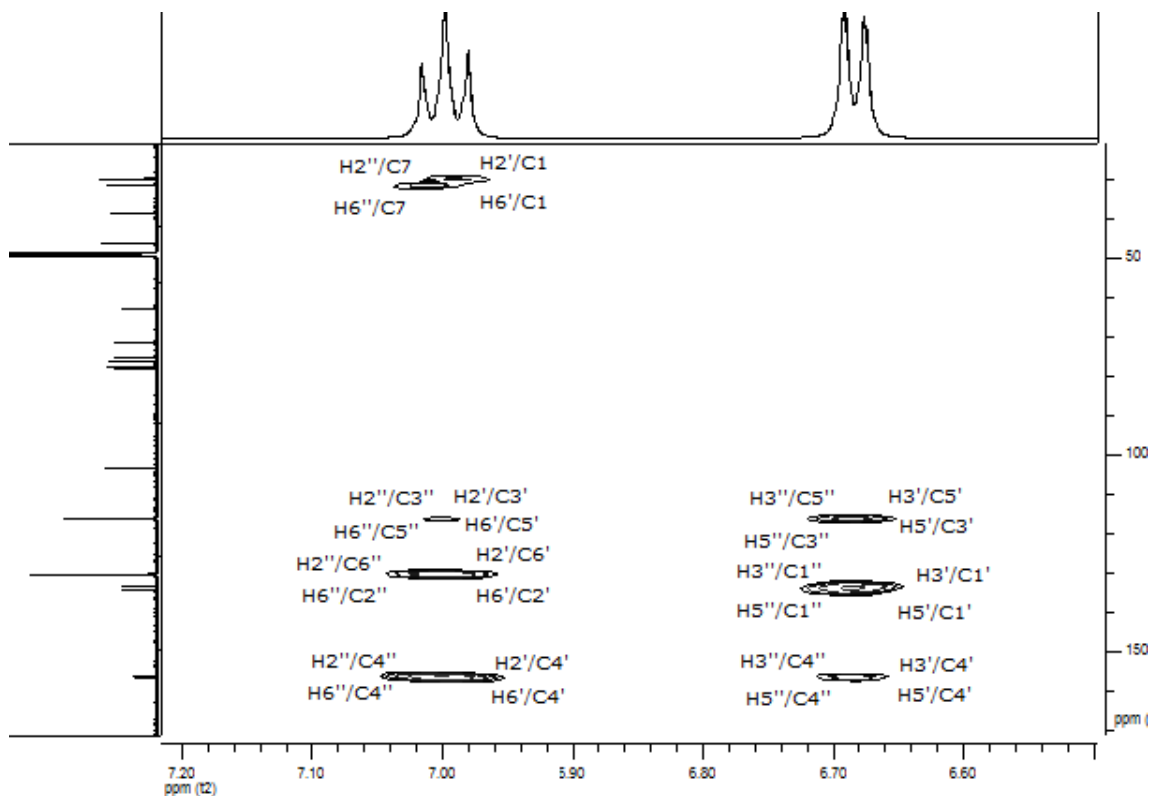
Slika 2.1.7. HSQC spektar platifilozida (1)



Slika 2.1.8. HMBC korelacije heptanoidnih protona (bez H-5) platifilozida (1)



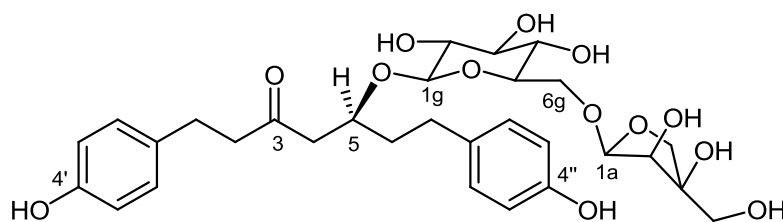
Slika 2.1.9. HMBC korelacije saharidnih i H-5 protona platifilozida (1)



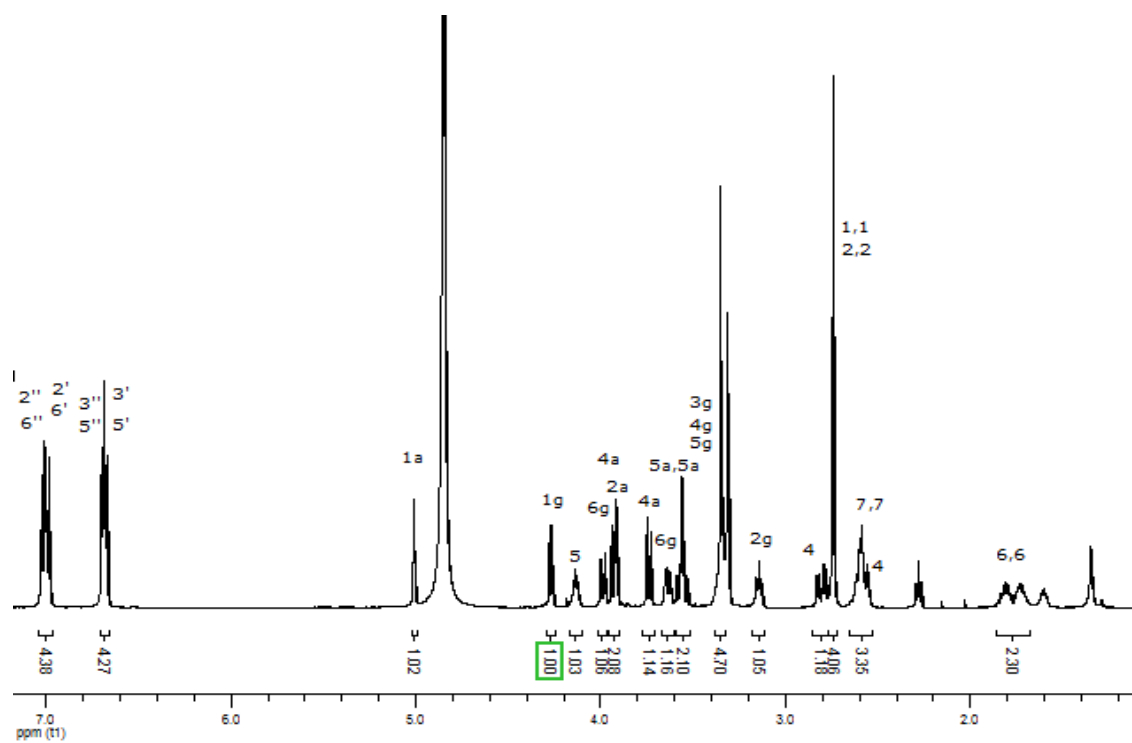
Slika 2.1.10. HMBC korelacije aromatičnih protona platifilozida (**1**)

Jedinjenje **2** (Slike 2.1.2 i 2.1.11) je izolovano u količini od 32 mg. U saharidnim oblastima ^1H i ^{13}C NMR spektara (Slike 2.1.13 i 2.1.15) uočen je znatno veći broj signala nego što je to bio slučaj sa platifilozidom (**1**), što je uputilo na dve monosaharidne jedinice. Analizom ^{13}C NMR i HSQC spektara (Slike 2.1.14 - 2.1.16), zaključeno je da 5 signala u oblasti ispod 40 ppm potiče od 5 metilenskih grupa heptanskog niza. Ovo je ukazalo na postojanje jednog supstituenta na heptanskom nizu (pored keto grupe), što je dalje uputilo na to da su dve monosaharidne jedinice vezane u jednu disaharidnu. Dvanaest signala u saharidnoj oblasti ^{13}C NMR spektra pripada jednoj pentoznoj i jednoj heksoznoj jedinici, uključujući i jedan metinski ugljenik (C-5) za koji je vezana disaharidna jedinica preko kiseonikovog atoma. Konstantu sprežanja od 2,0 Hz dubleta anomernog vodonika na 5,01 ppm daje β -konfiguracija pentoze, a konstantu sprežanja od 8,0 Hz dubleta drugog anomernog vodonika na 4,27 ppm β -konfiguracija heksozne jedinice (Slika 2.1.13). Kako se pored D-glukopiranoze u diarilheptanoidima izolovanim iz roda *Alnus* najčešće javljaju D-ksilopiranoza i D-apiofuranoza, lako su prepoznati signali D-apiofuranoze, a odlično slaganje sa literaturnim podacima pokazalo je da je disaharidna jedinica β -D-apiofuranozil- β -D-

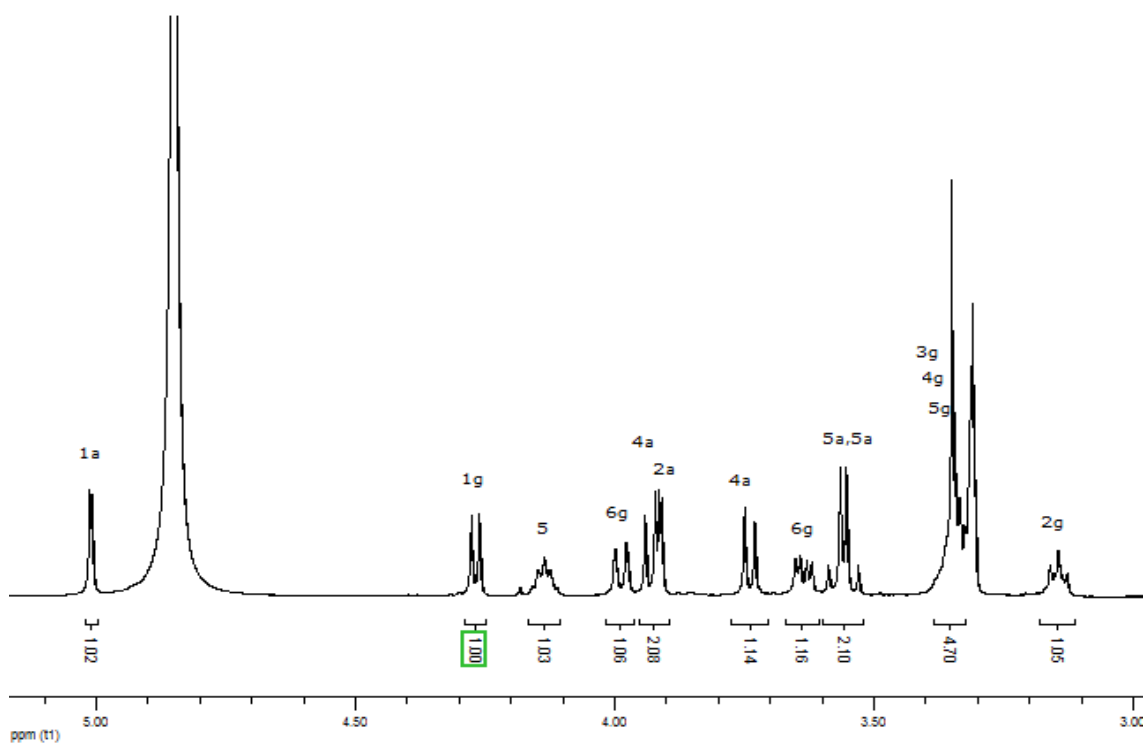
glukopiranoza.^{36,70} HMBC korelacije H-1g/C-5 i H-1a/C-6g (**Slika 2.1.18**) ukazale su na to da je D-apioza vezana svojim C-1a za C-6g D-glukoze, a da je D-glukoza vezana svojim C-1g za C-5 heptanskog niza. Kvazimolekulski joni u HR-ESI-MS spektru bili su $[M+NH_4]^+$ na m/z 626,2797, $[M+Na]^+$ na m/z 631,2353 i $[M+K]^+$ na m/z 647,2095 i uputili su na molekulsku formulu $C_{40}H_{30}O_{13}$ koja odgovara strukturi prikazanoj na **Slici 2.1.11**. Položaj keto grupe potvrđen je HMBC korelacijama H-2,H-4/C-3 i H-4/C-5 (**Slika 2.1.17**). Ostale korelacije iz HSQC i HMBC spektara (**Slike 2.1.16-2.1.19**) su potvrdile pretpostavljenu strukturu. S konfiguracija je određena primenom pravila ^{13}C glikozidacionog pomeranja, jer je analizom ^{13}C NMR spektara jedinjenja **2** i hirsutanonola (**14**) (**Slika 2.2.2, Tabele 2.1.1 i 2.2.1**) uočeno da je $\Delta\delta_{C4} > \Delta\delta_{C6}$ (2,4 > 1,8). $[\alpha]_D$ vrednost za ovo jedinjenje iznosi -47,0 (literaturna nije pronađena). NMR podaci su u saglasnosti sa literaturnim.⁷⁰



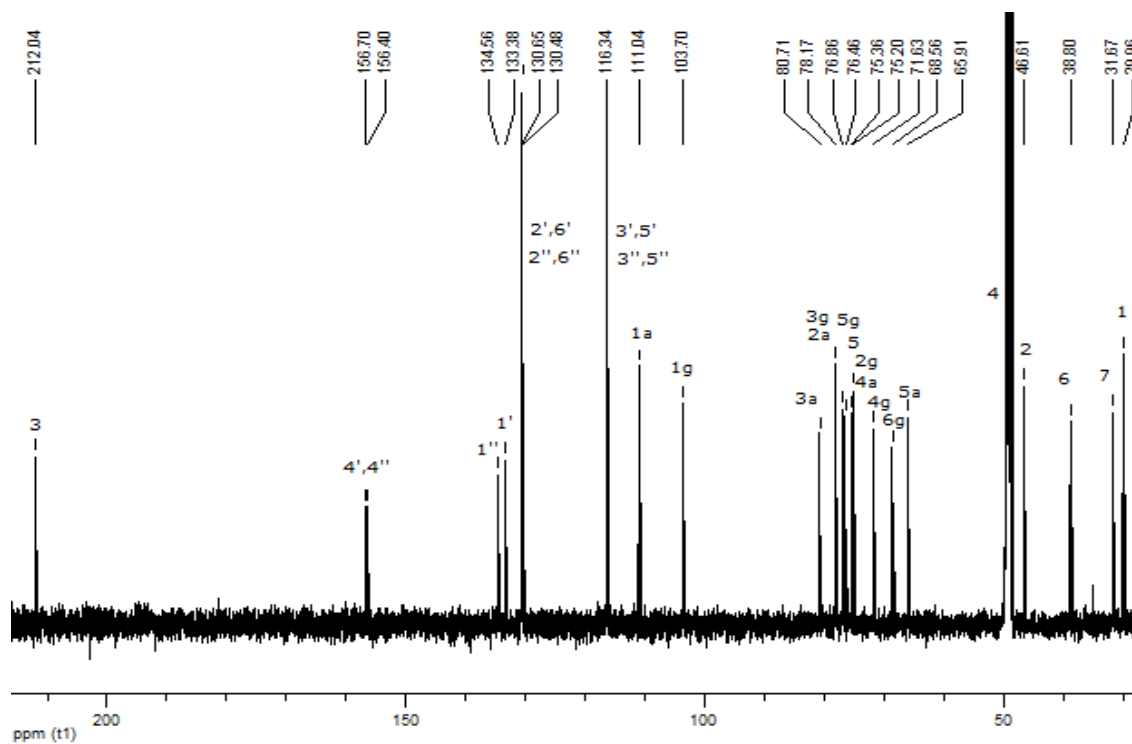
Slika 2.1.11. Strukturna formula jedinjenja **2**



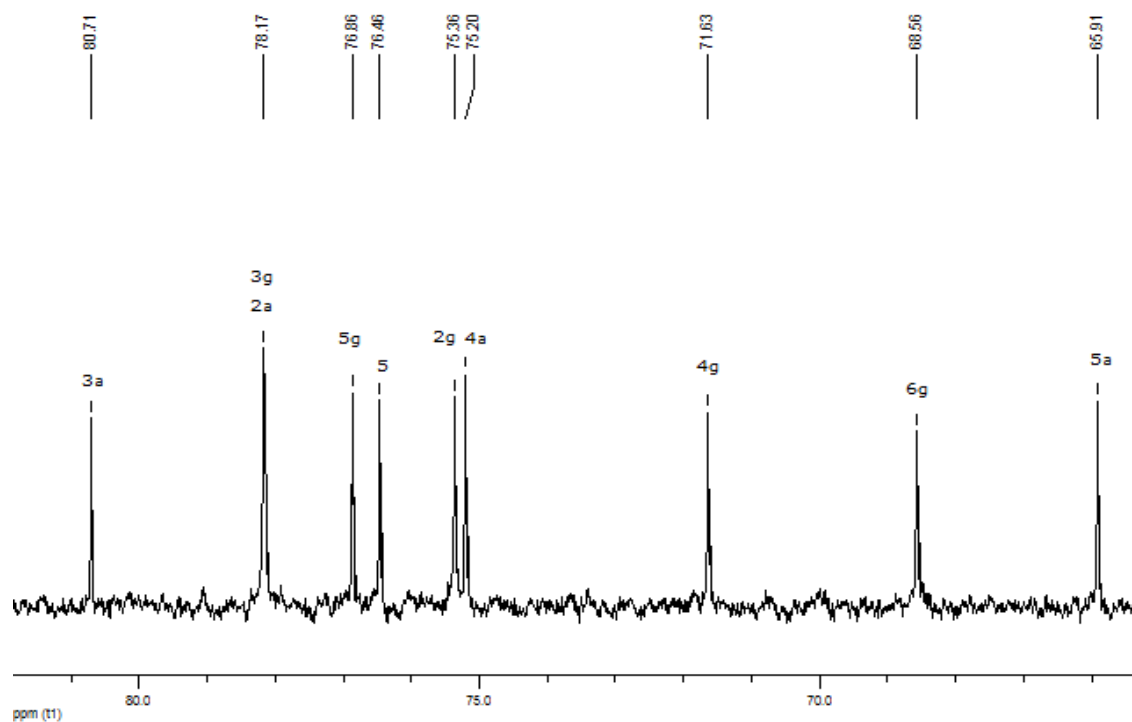
Slika 2.1.12. ^1H NMR spektar jedinjenja 2



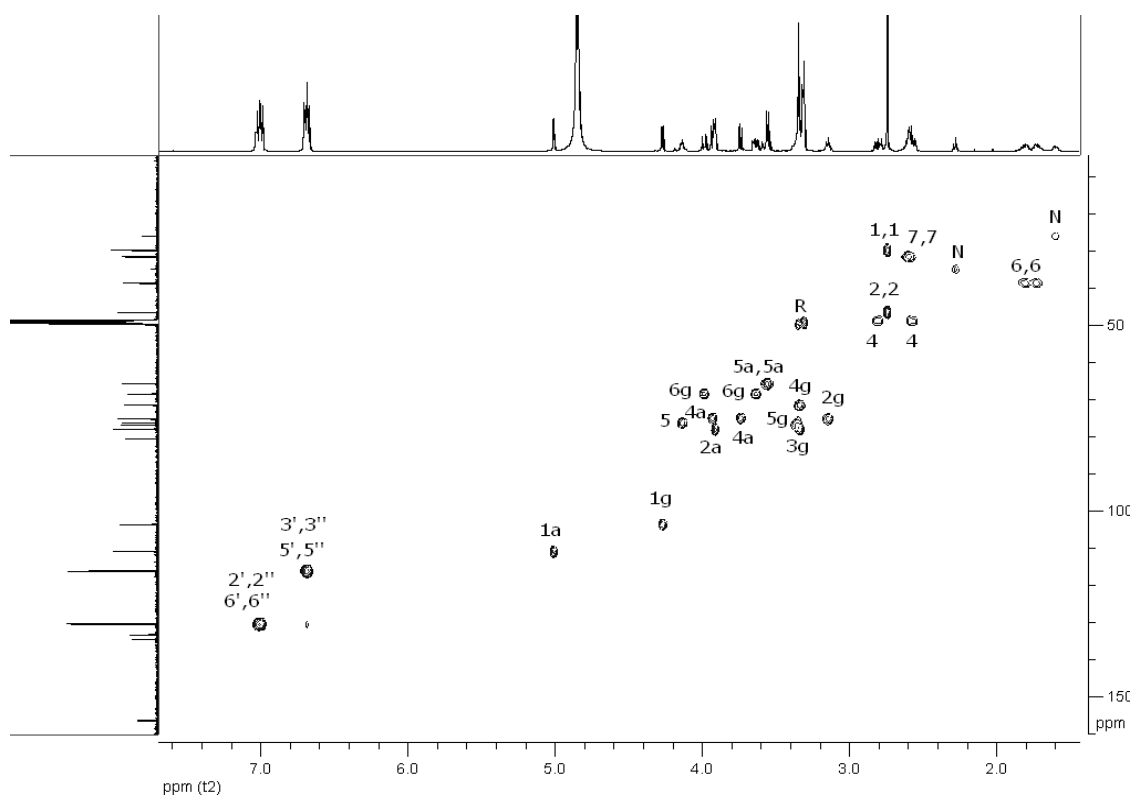
Slika 2.1.13. Signali saharidnih i H-5 protona u ^1H NMR spektru jedinjenja 2



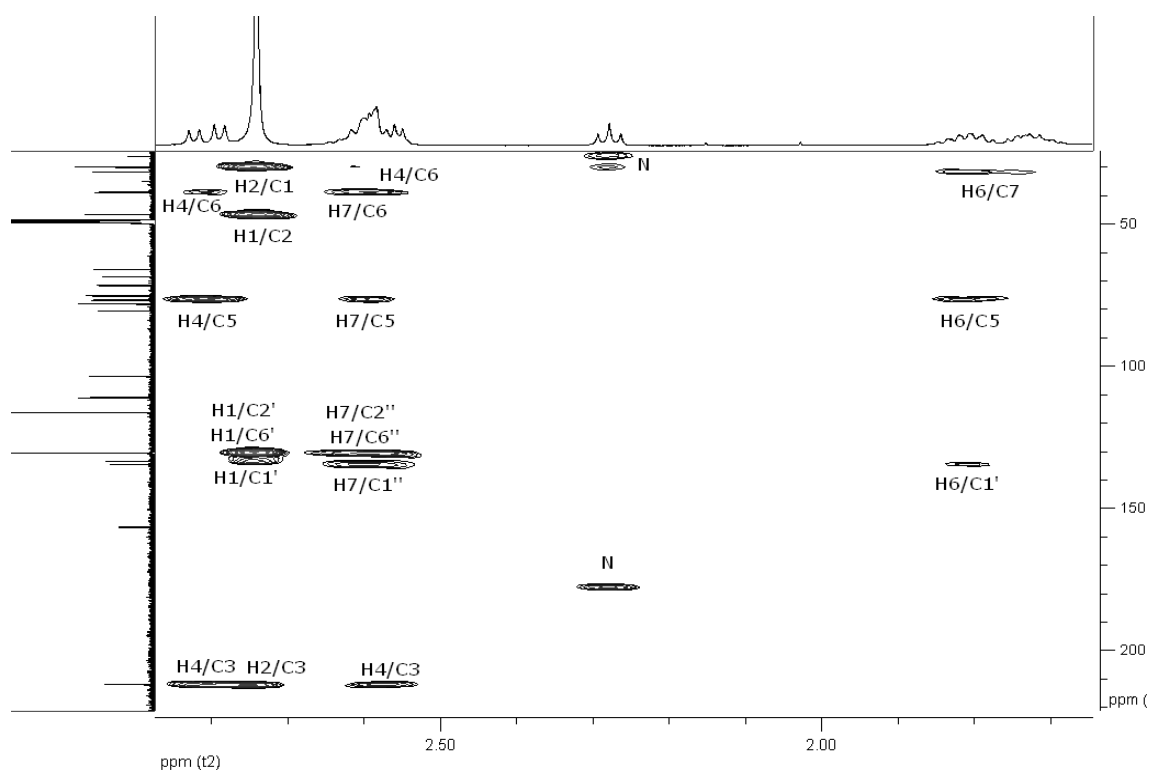
Slika 2.1.14. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 2



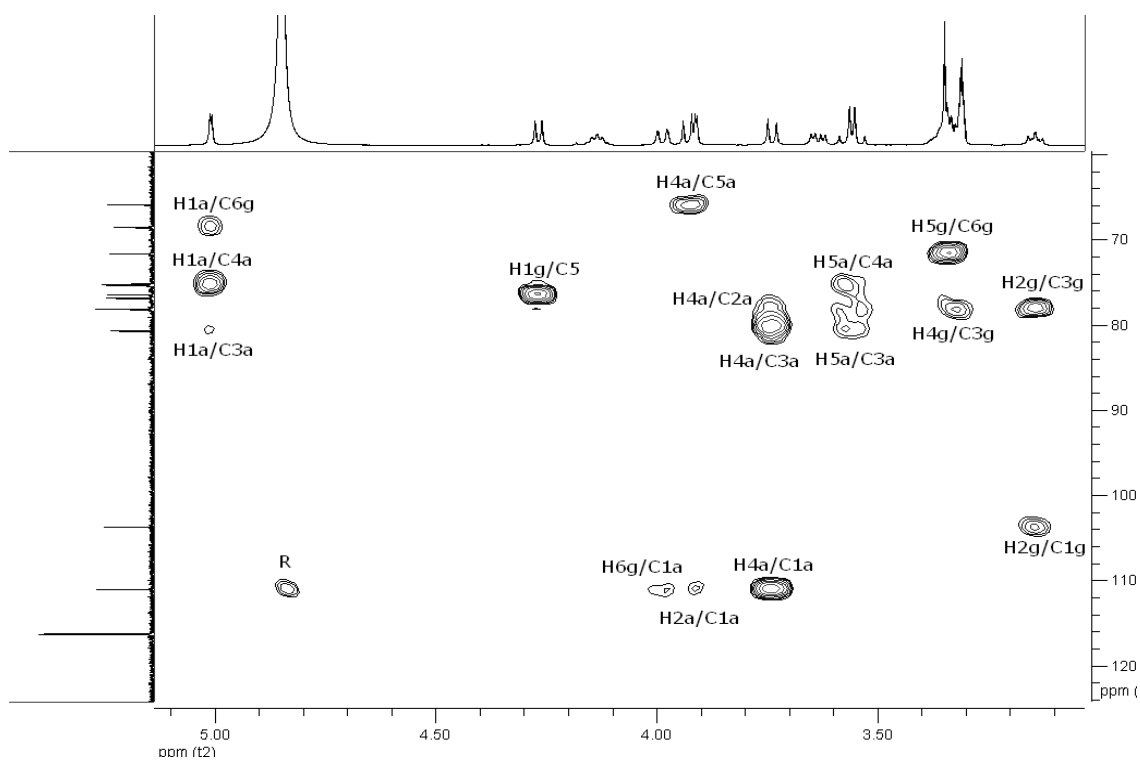
Slika 2.1.15. Signali saharidnih ugljenika (bez anomernih) u ^{13}C NMR spektru jedinjenja 2



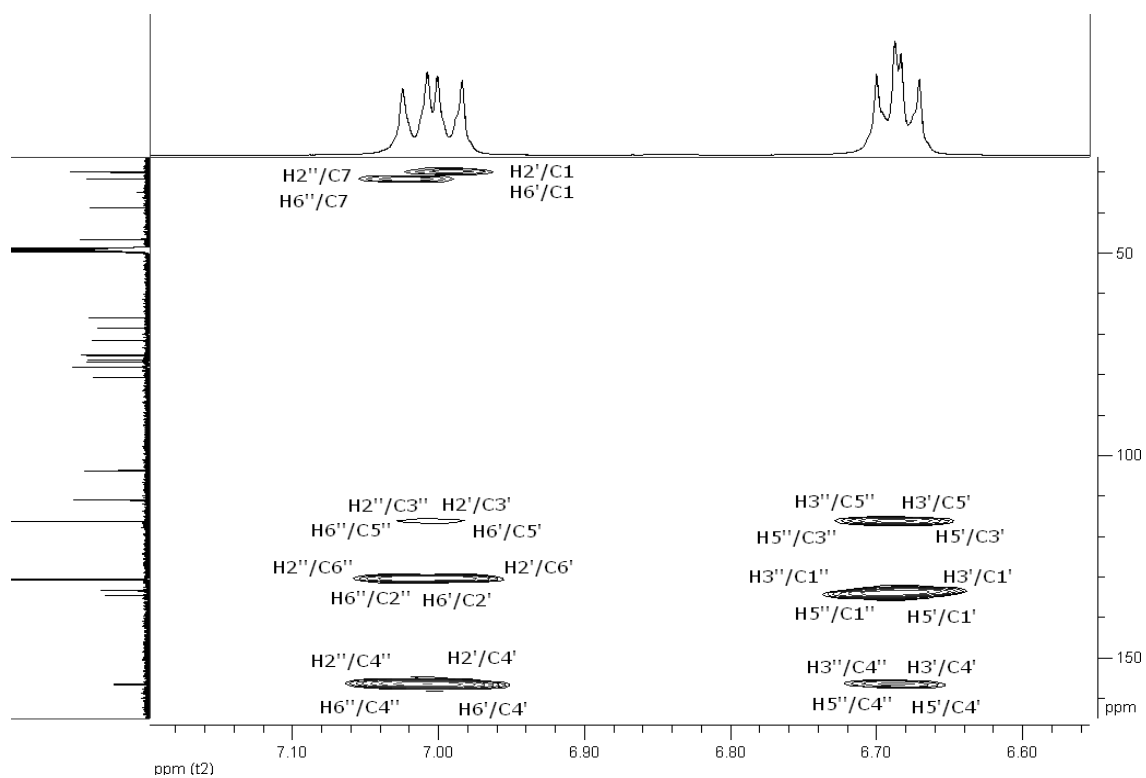
Slika 2.1.16. HSQC spektar jedinjenja 2



Slika 2.1.17. HMBC korelacije heptanoidnih protona (bez H-5) jedinjenja 2



Slika 2.1.18. HMBC korelacije saharidnih protona jedinjenja 2



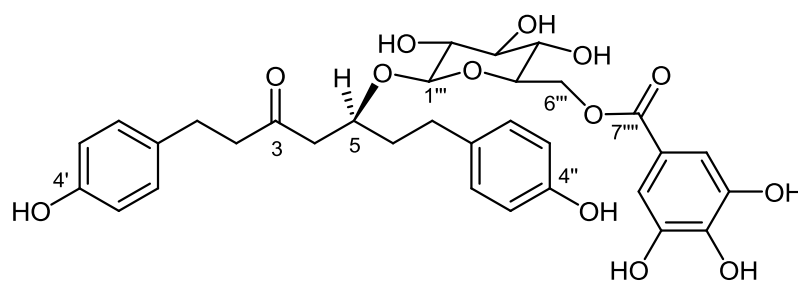
Slika 2.1.19. HMBC korelacije aromatičnih protona jedinjenja 2

Tabela 2.1.1. ^{13}C i ^1H NMR podaci za jedinjenja **1** i **2**

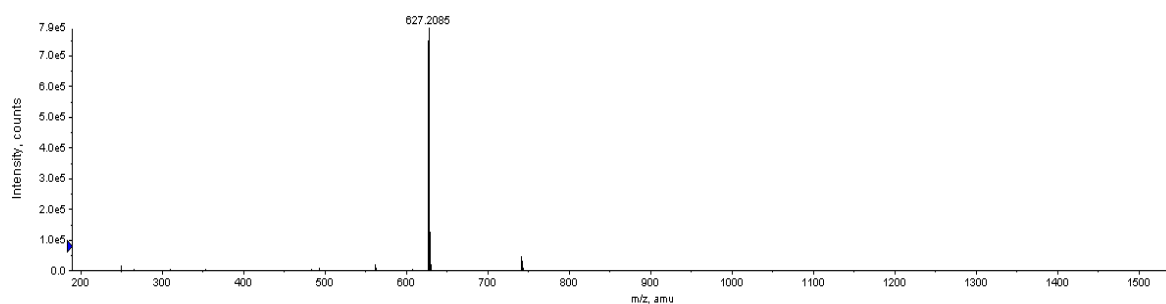
C/H	Platifilozid (1)		2	
	δ_{C} , tip	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C} , tip	δ_{H} (J u Hz)
1	30,0; CH ₂	2,74 brs	30,0; CH ₂	2,74 brs
2	46,5; CH ₂	2,74 brs	46,6; CH ₂	2,74 brs
3	212,1; C	-	212,0; C	-
4	48,7; CH ₂ ^a	2,59 dd (16,5; 5,5) 2,80 dd (16,5; 7,0)	48,8; CH ₂ ^a	2,57 dd (16,5; 5,0) 2,81 dd (16,5; 7,0)
5	76,4; CH	4,16 qui	76,5; CH	4,14 qui
6	38,6; CH ₂	1,74 m; 1,83 m	38,8; CH ₂	1,73m; 1,80 m
7	31,5; CH ₂	2,48 m	31,7; CH ₂	2,59 m
1'	133,4; C	-	133,4; C	-
2'	130,5; CH	6,99 d (8,0)	130,5; CH	6,99 d (8,5)
3'	116,2; CH ^b	6,68 d (8,0)	116,3; CH	6,68 d (8,5)
4'	156,7; C	-	156,4; C	-
5'	116,2; CH ^b	6,68 d (8,0)	116,3; CH	6,68 d (8,5)
6'	130,5; CH	6,99 d (8,0)	130,5; CH	6,99 d (8,5)
1''	134,5; C	-	134,6; C	-
2''	130,6; CH	7,00 d (8,0)	130,7; CH	7,02 d (8,5)
3''	116,3; CH ^b	6,68 d (8,0)	116,3; CH	6,69 d (8,5)
4''	156,4; C	-	156,7; C	-
5''	116,3; CH ^b	6,68 d (8,0)	116,3; CH	6,69 d (8,5)
6''	130,6; CH	7,00 d (8,0)	130,7; CH	7,02 d (8,5)
	GlcP		GlcP	
1g	103,6; CH	4,29 d (7,5)	103,7; CH	4,27 d (8,0)
2g	75,3; CH	3,16 t (8,5)	75,4; CH	3, 14 t (8,5)
3g	78,2; CH	3,34 t (8,5)	78,2; CH	3,35 m ^a
4g	71,7; CH	3,31 qui	71,6; CH	3,35 m ^a
5g	77,9; CH	3,25 m	76,9; CH	3,34 m ^a
6g	62,9; CH ₂	3,71 dd (12,0; 5,5) 3,87 dd (12,0; 2,0)	68,6; CH ₂	3,64 dd (11,5; 5,0) 3,87 dd (11,5; 2,0)
	Apiof		Apiof	
1a	-	-	111,0; CH	5,01 d (2,0)
2a	-	-	78,2; CH	3,91 d (2,0)
3a	-	-	80,7; C	-
4a	-	-	75,2; CH ₂	3,74 d (10,0) 3,93 d (10,0)
5a	-	-	65,9; CH ₂	3,56 Abq (11,5); $\Delta\delta$ 6,71

GlcP – glukopiranozil grupa; **Apiof** – apiofuranozil grupa; ^a vrednost dobijena iz HSQC spektra (signal preklop-ljen signalom rastvarača u ^{13}C NMR spektru); ^b signali mogu biti međusobno zamenjeni

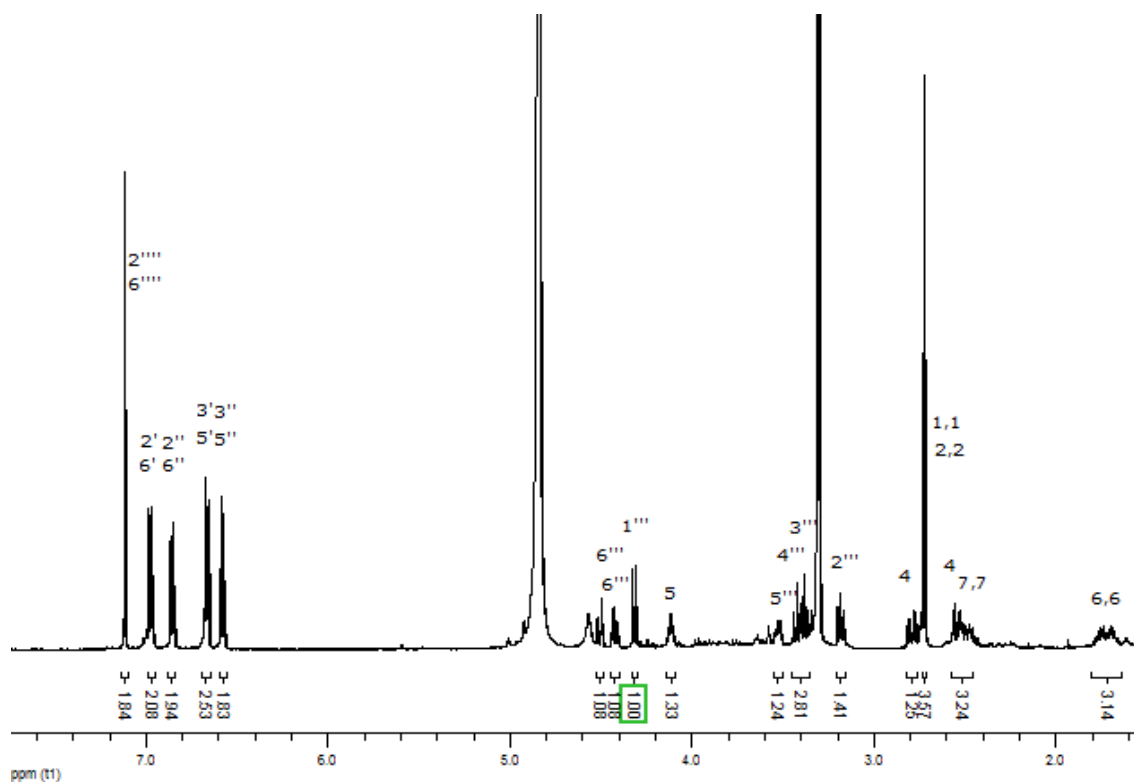
Jedinjenje **3** (**Slika 2.1.20**) je izolovano u količini od 4 mg. Molekulska formula $C_{32}H_{36}O_{13}$ je određena na osnovu kvazimolekuskog jona $[M-H]^-$ na m/z 627,2085 iz HR-ESI-MS spektra (**Slika 2.1.21**). U aromatičnom delu 1H NMR spektra (**Slika 2.1.22**) je, pored signala dva AA'BB' spinska sistema *p*-hidroksifenil grupa, uočen i singlet od dva protona na 7,12 ppm u 1H NMR spektru za koji je pretpostavljeno da potiče od dva aromatična protona galne kiseline. Na ovu pretpostavku naveli su signali na 103,7, 110,4, 140,0, 146,7 i 168,6 ppm u ^{13}C NMR spektru (**Slika 2.1.23**) koji nisu karakteristični za osnovni diarilheptanoidni skelet kao i razlika molekulske mase dobijene iz HR-ESI-MS spektra snimljenog u negativnom modu (**Slika 2.1.21**) i zbiru mase D-glukoze i 1,7-di(4-hidroksifenil)heptan-3-ona, prepoznatih delova molekula. D-Glukopiranoza je prepoznata na osnovu NMR podataka. Povećano hemijsko pomeranje za ~ 0,6 ppm za oba H-6''' protona i za 0,22 ppm za H-5''' u 1H -NMR spektru u poređenju sa platifilozidom (**1**) (**Slike 2.1.4, 2.1.5 i 2.1.22**) uzrokovano je esterifikacijom C-6'''-OH grupe. Sličan efekat je zapažen za C-6''' i C-5''' u ^{13}C -NMR spektru: povećano pomeranje za 2,0 ppm za C-6''' i smanjeno za 2,4 ppm za C-5''' u poređenju sa D-glukopiranozom u platifilozidu (**Slike 2.1.6 i 2.1.23**). HMBC korelacija H-1'''/C-5 ukazuje da je D-glukopiranoza vezana za C-5 heptanskog niza preko kiseonika OH grupe sa C-1''' (**Slika 2.1.26**). HMBC korelacija H-6''' sa karbonilom C-7''' iz galne kiseline (**Slika 2.1.27**) je potvrda da je galna kiselina estarski vezana za C-6''' D-glukoze. Strukture diarilheptanoida sa D-glukozom esterifikovanom galnom kiselinom u položaju C-6''' su ranije već objavljeni.⁷¹ Ostale HMBC korelacije (**Slike 2.1.25-2.1.28**) kao i HSQC podaci (**Slika 2.1.24**) su u saglasnosti sa pretpostavljenom strukturom (**Slika 2.1.20**). Konfiguracija na C-5 je određena kao *S* na osnovu CD spektra koji je sličan CD spektru platifilozida (**1**) (ima *S* konfiguraciju) i na osnovu pravila ^{13}C glikozidacionog pomeranja, jer je analizom ^{13}C NMR spektara jedinjenja **3** i hirsutanonola (**14**) (**Slika 2.2.2, Tabele 2.1.2 i 2.2.1**) uočeno da je $\Delta\delta_{C4} > \Delta\delta_{C6}$ (2,4 > 1,9 ppm). $[\alpha]_D$ vrednost određena za ovo jedinjenje iznosi -38,0. Kako u literaturi nema podataka o ovom jedinjenju, ono se smatra novim prirodnim proizvodom.

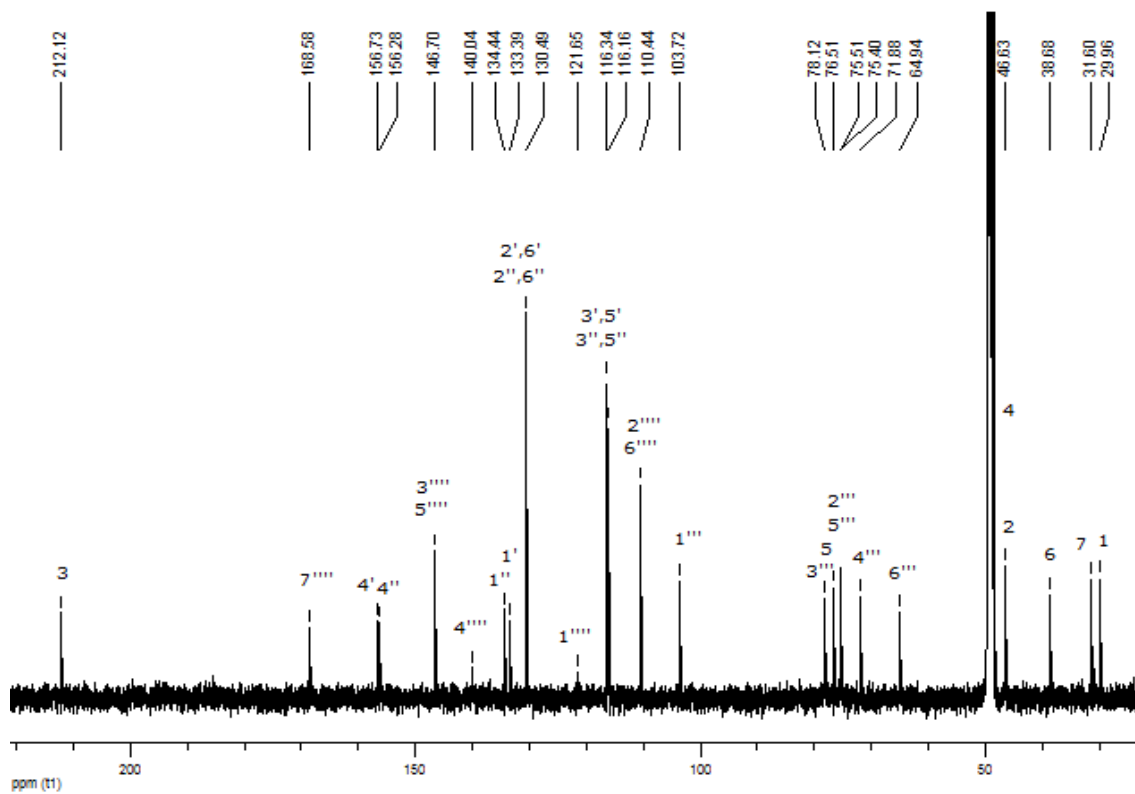
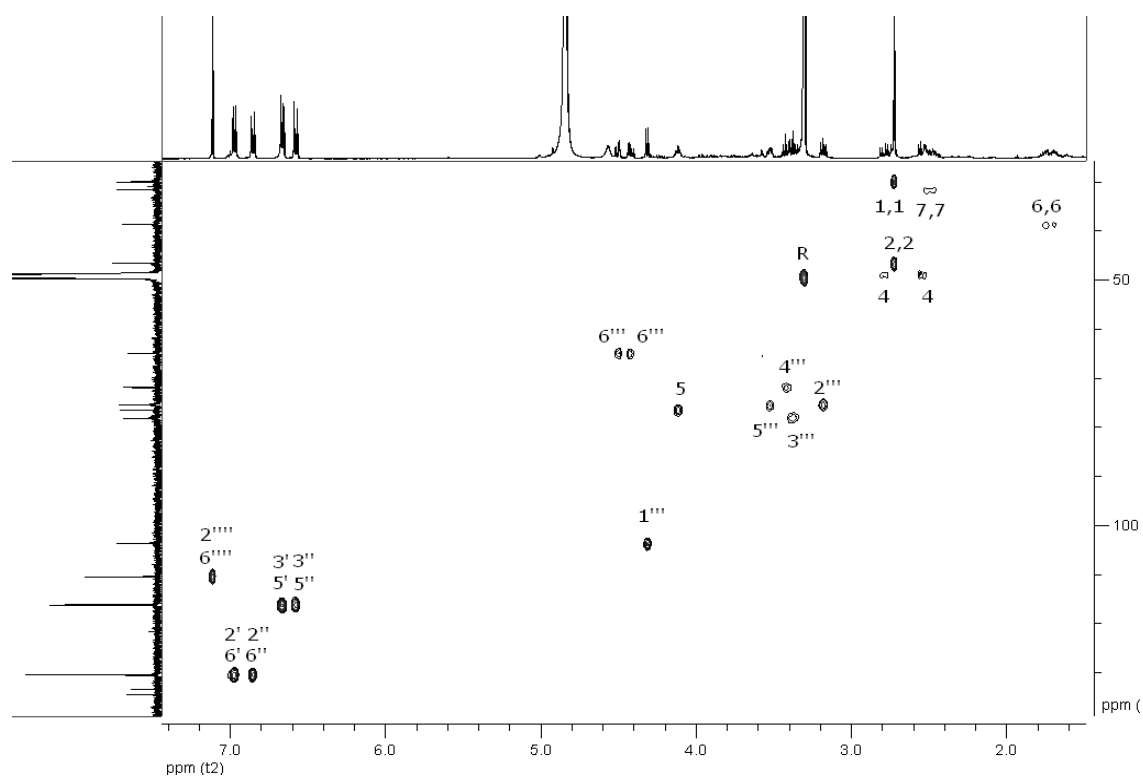


Slika 2.1.20. Strukturna formula jedinjenja 3

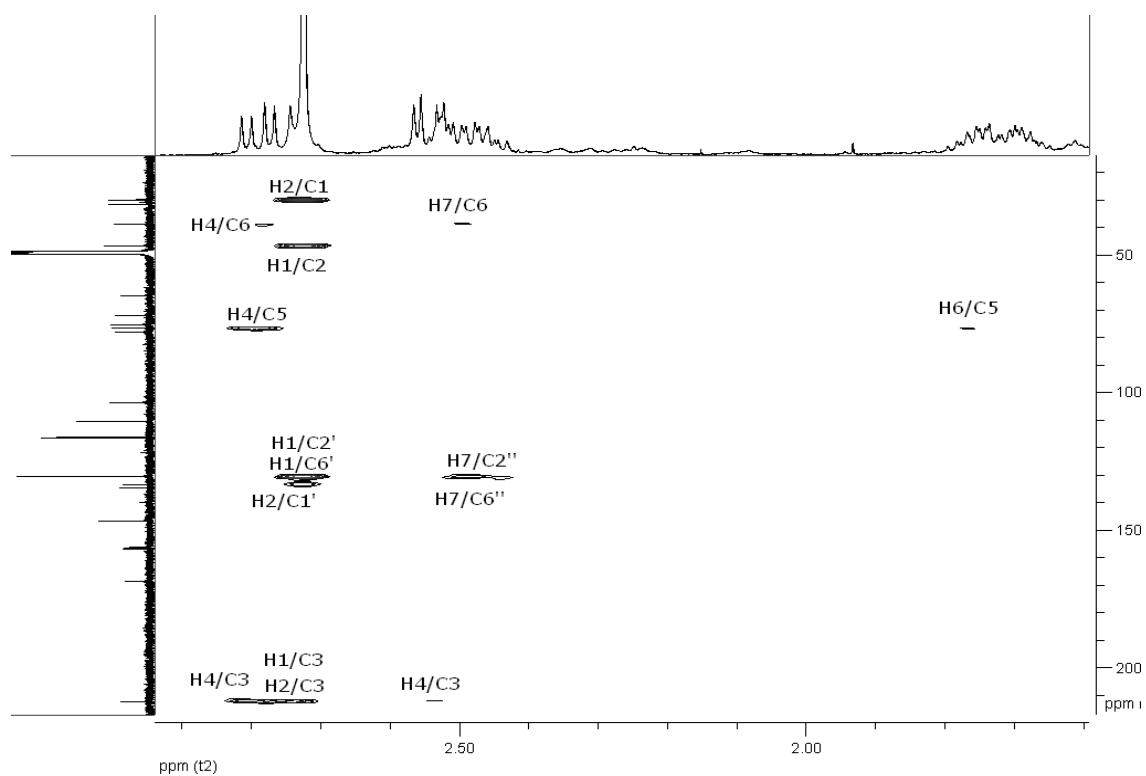


Slika 2.1.21. HR-ESI-MS spektar jedinjenja 3 snimljenog u negativnom modu

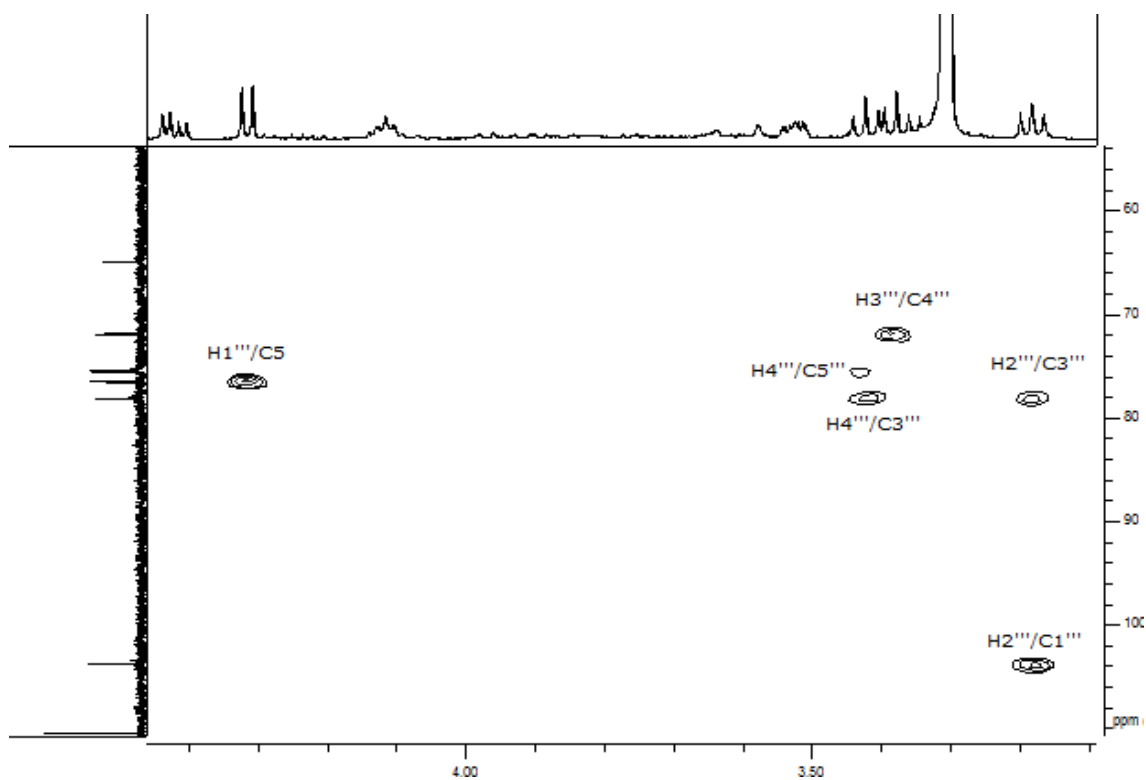
Slika 2.1.22. ^1H NMR spektar jedinjenja 3

Slika 2.1.23. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 3

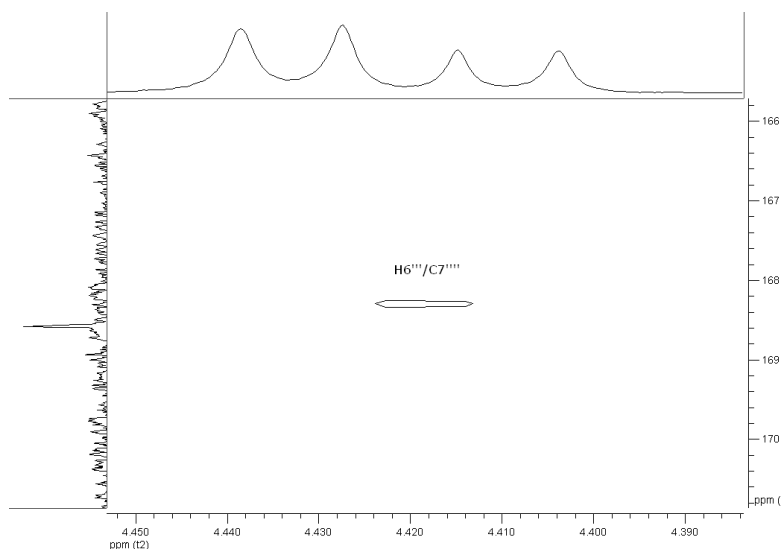
Slika 2.1.24. HSQC spektar jedinjenja 3



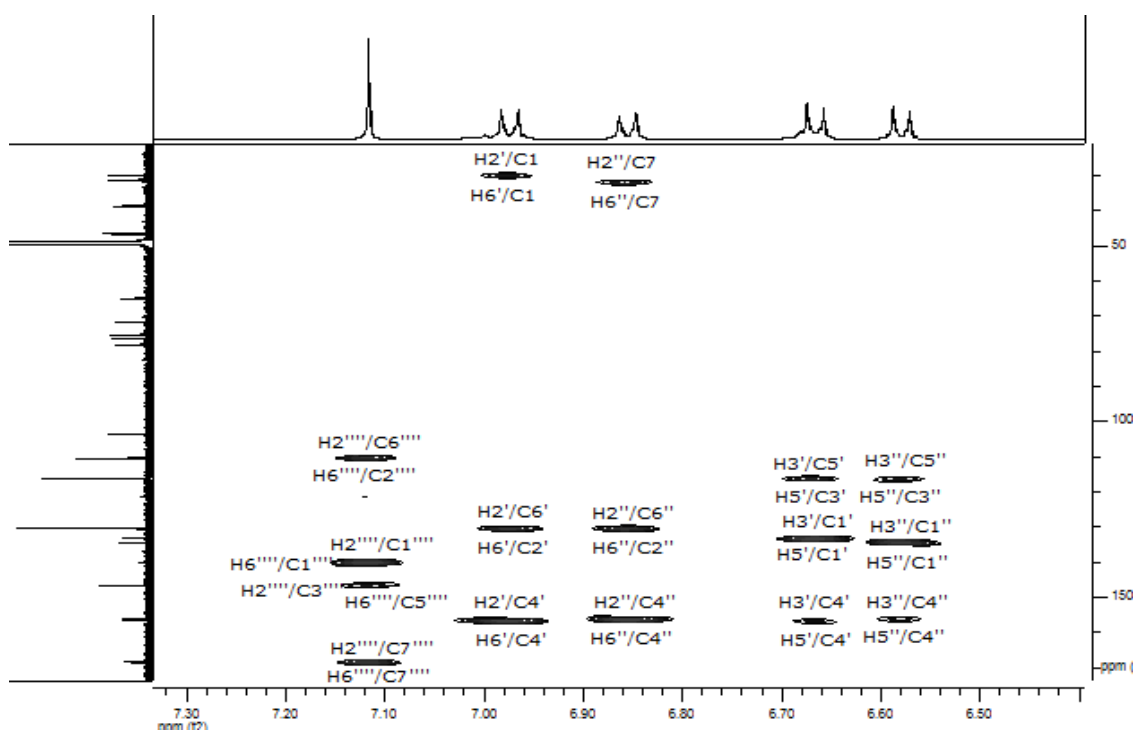
Slika 2.1.25. HMBC korelacije heptanoidnih protona (bez H-5) jedinjenja 3



Slika 2.1.26. HMBC korelacije saharidnih protona jedinjenja 3

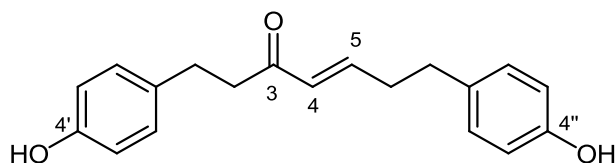


Slika 2.1.27. Jedna od ključnih korelacija u HMBC spektru jedinjenja 3

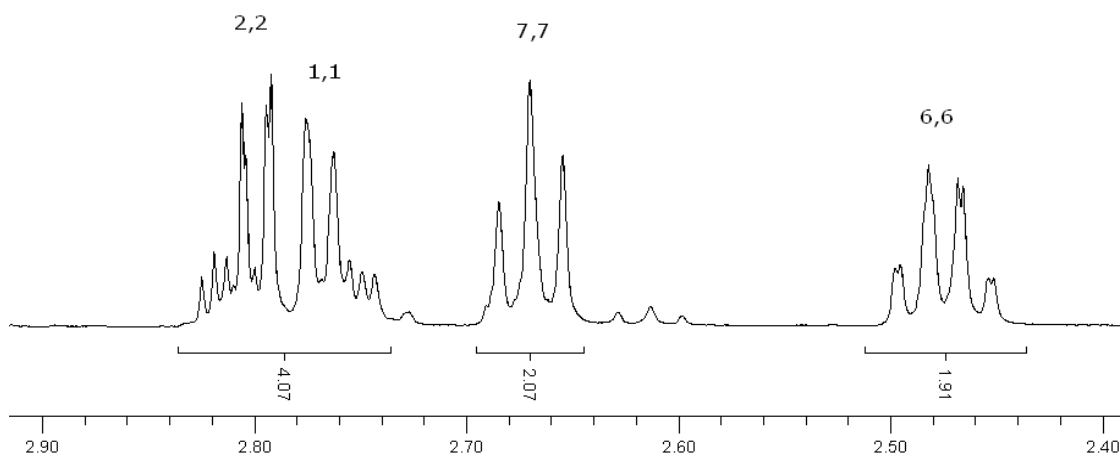


Slika 2.1.28. HMBC korelacije aromatičnih protona jedinjenja 3

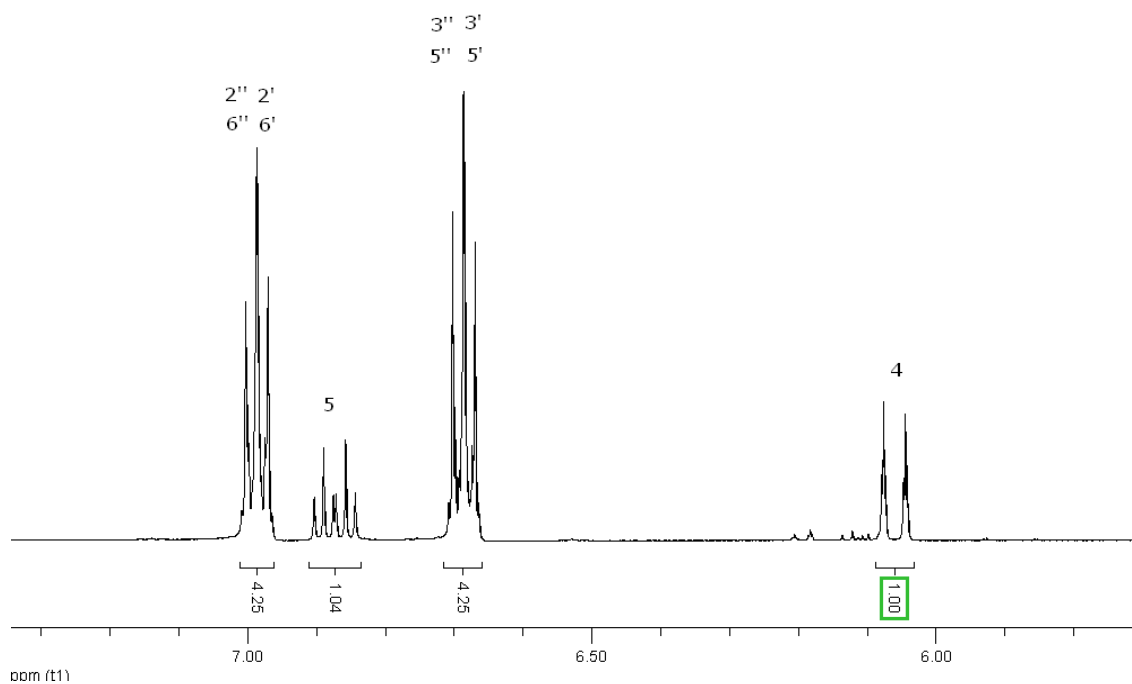
Jedinjenje **4** (Slika 2.1.29) je izolovano u količini od 9 mg. Analizom ^1H i ^{13}C NMR spektara (Slike 2.1.30-2.1.32) zaključeno je da se radi o diarilheptanoidu bez monosaharidnih jedinica (nema signala u saharidnoj oblasti ^{13}C NMR spektra – 60-110 ppm). Hemijsko pomeranje za karbonilni ugljenik od 203 ppm, niže od vrednosti od 212 ppm koja je uočena kod već izolovanih ketonskih diarilheptanoida (Slika 2.1.32), uputilo je na konjugaciju keto grupe dvostrukom vezom. Dubleti tripleta u ^1H NMR spektru (Slika 2.1.31) na 6,08, odnosno 6,88 ppm, sa vicinalnom konstantom sprežanja od 16,0 Hz, ukazali su na *E* konfiguraciju dvostruke veze. HMBC korelacije H-4,H-5/C-3 (Slika 2.1.34) su potvrdile postojanje enonske strukture i položaj dvostruke veze (Δ^4). Ostale korelacije iz HMBC i HSQC spektara (Slike 2.1.33 i 2.1.34), kao i HR-ESI-MS spektar ovog jedinjenja sa kvazimolekulskim jonima $[\text{M}-\text{H}]^-$ na m/z 295,1340 i $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ na m/z 331,1102, ukazali su na strukturu platifilenona, što su potvrdili i literaturni podaci.^{36,72}



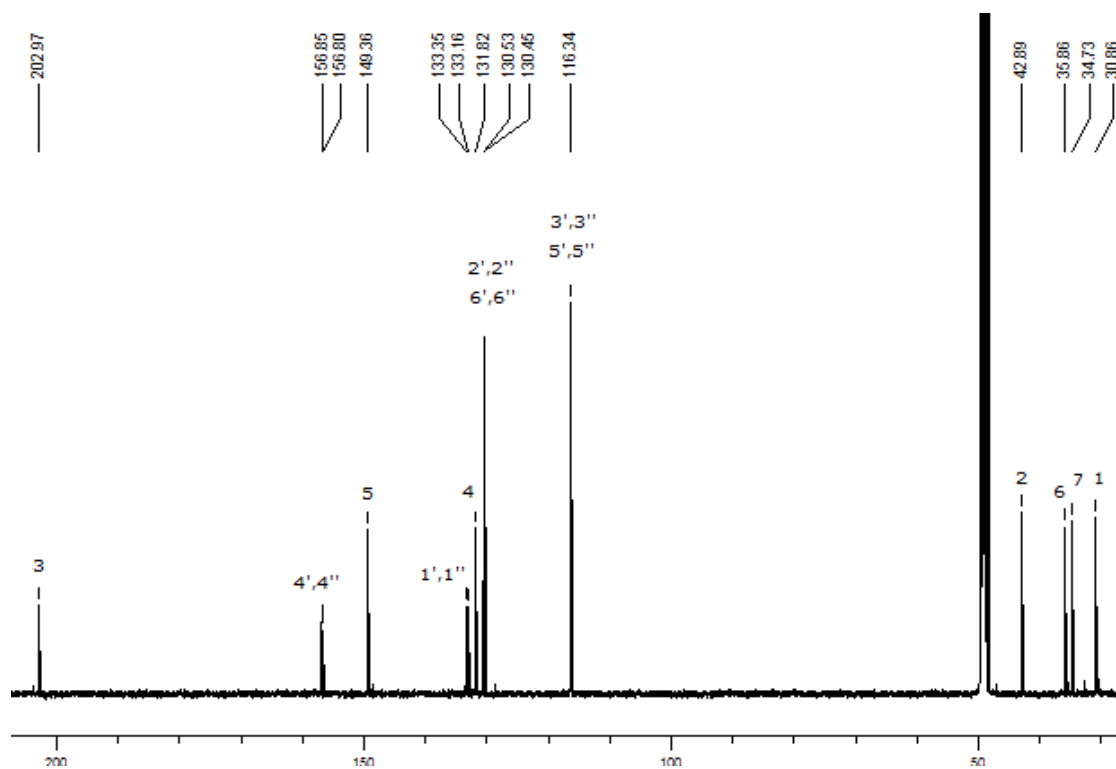
Slika 2.1.29. Strukturna formula platifilenona (**4**)



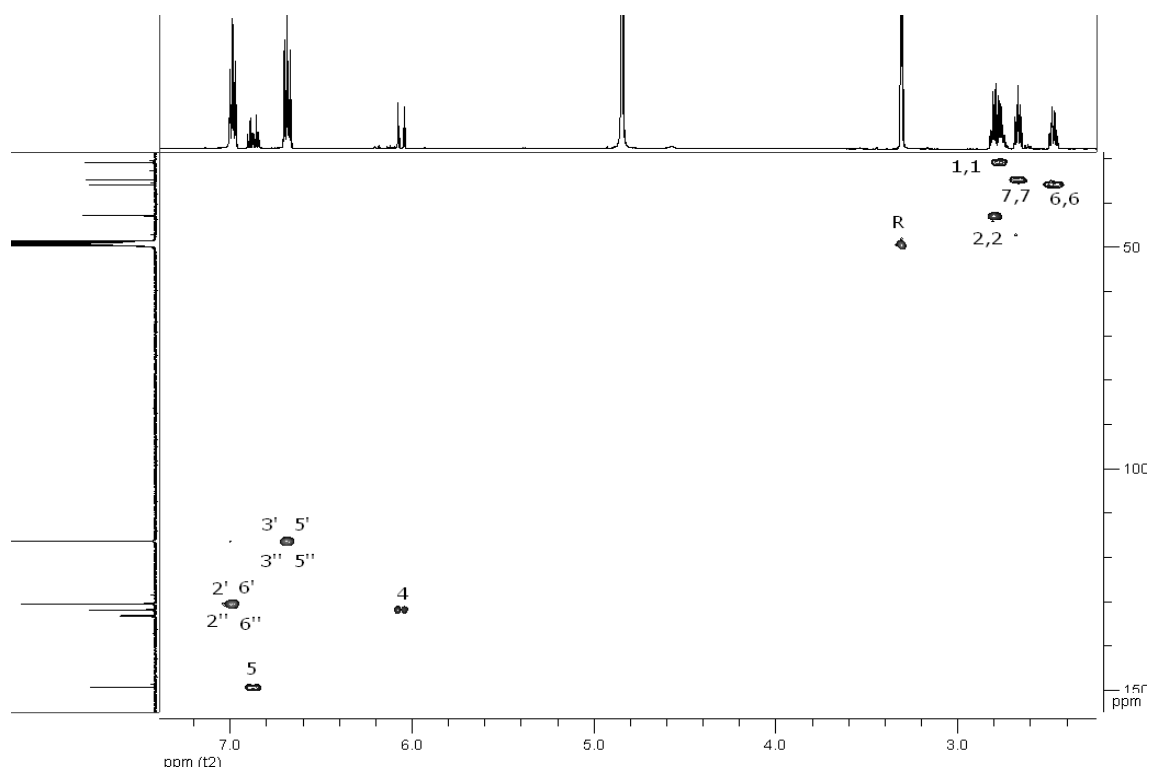
Slika 2.1.30. Signali heptanoidnih protona (bez H-4 i H-5) u ^1H NMR spektru platifilenona (**4**)



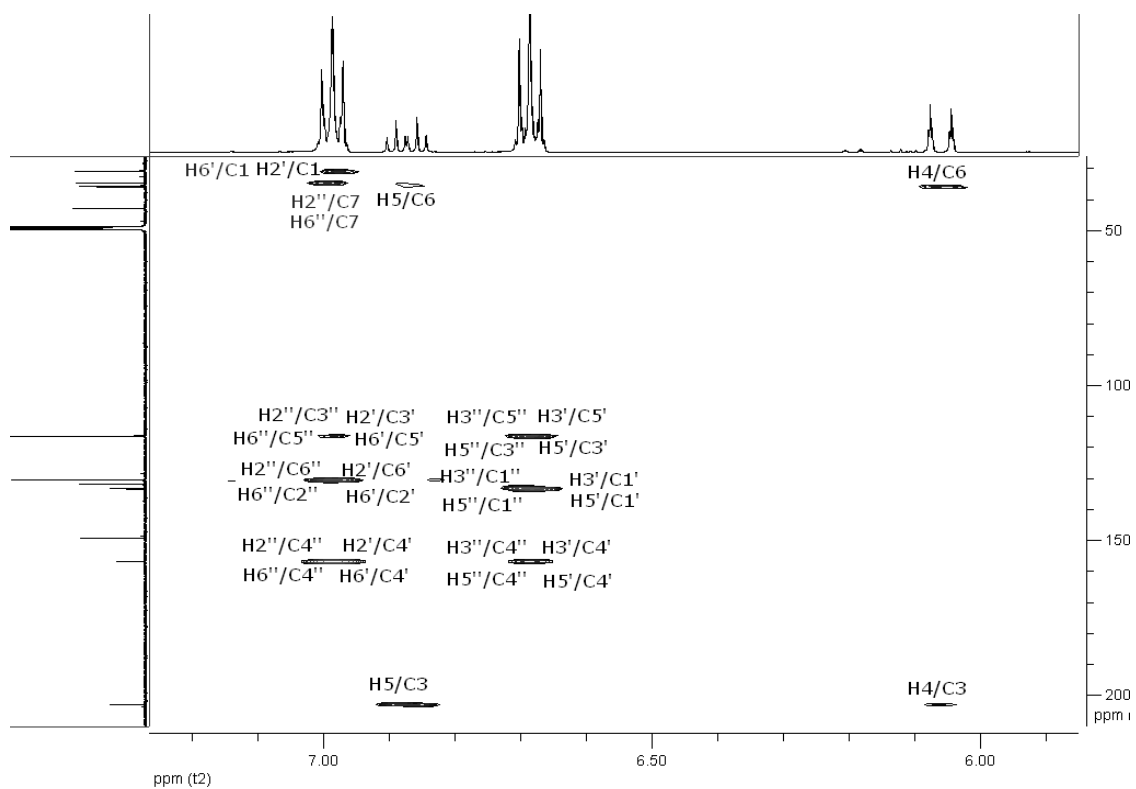
Slika 2.1.31. Signali aromatičnih, H-4 i H-5 protona u ^1H NMR spektru platifilenona (4)



Slika 2.1.32. ^{13}C NMR spektar platifilenona (4)



Slika 2.1.33. HSQC spektar platifenona (4)



Slika 2.1.34. HMBC korelacije aromatičnih, H-4 i H-5 protona platifenona (4)

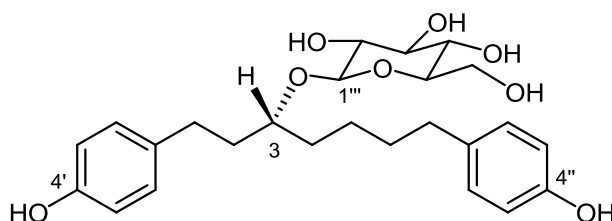
Tabela 2.1.2. ^{13}C i ^1H NMR podaci za jedinjenja 3 i 4

C/H	3		Platifilenon (4)	
	δ_{C} , tip	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C} , tip	δ_{H} (J u Hz)
1	30,0; CH ₂	2,73 s	30,9; CH ₂	2,77 A ₂ B ₂
2	46,6; CH ₂	2,73 s	42,9; CH ₂	2,80 A ₂ B ₂
3	212,1; C	-	203,0; C	-
4	49,0; CH ₂ ^a	2,54 dd (16,5; 5,5) 2,79 dd (16,5; 7,0)	131,8; CH	6,06 dt (16,0; 1,5)
5	76,5; CH	4,12 m	149,4; CH	6,87 dt (16,0; 6,5)
6	38,9; CH ₂	1,69 m; 1,75 m	35,9; CH ₂	2,48 q
7	31,6; CH ₂	2,50 m	34,7; CH ₂	2,67 t (7,5)
1'	133,4; C	-	133,4; C	-
2'	130,5; CH	6,97 d (8,5)	130,5; CH	6,98 d (8,0)
3'	116,3; CH ^b	6,66 d (8,5)	116,3; CH	6,68 d (8,0)
4'	156,7; C	-	156,7; C	-
5'	116,3; CH ^b	6,66 d (8,5)	116,3; CH	6,68 d (8,0)
6'	130,5; CH	6,97 d (8,5)	130,5; CH	6,98 d (8,0)
1''	134,4; C	-	133,2; C	-
2''	130,5; CH	6,86 d (8,5)	130,5; CH	6,99 d (8,0)
3''	116,2; CH ^b	6,58 d (8,5)	116,3; CH	6,69 d (8,0)
4''	156,3; C	-	156,3; C	-
5''	116,2; CH ^b	6,58 d (8,5)	116,3; CH	6,69 d (8,0)
6''	130,5; CH	6,86 d (8,5)	130,5; CH	6,99 d (8,0)
	Glc		-	
1g	103,7; CH	4,32 d (8,0)	-	-
2g	75,4; CH ^c	3,18 t (8,0)	-	-
3g	78,1; CH	3,38 t (9,0)	-	-
4g	71,9; CH	3,42 t (9,0)	-	-
5g	75,5; CH ^c	3,53 m	-	-
6g	64,9; CH ₂	4,42 dd (12,0; 5,5) 4,51 dd (12,0; 2,5)	-	-
	Gall		-	
1'''	121,9; C	-	-	-
2'''	110,4; CH	7,11 s	-	-
3'''	146,7; C	-	-	-
4'''	140,0; C	-	-	-
5'''	146,7; C	-	-	-
6'''	110,4; CH	7,11 s	-	-
7'''	168,6; C	-	-	-

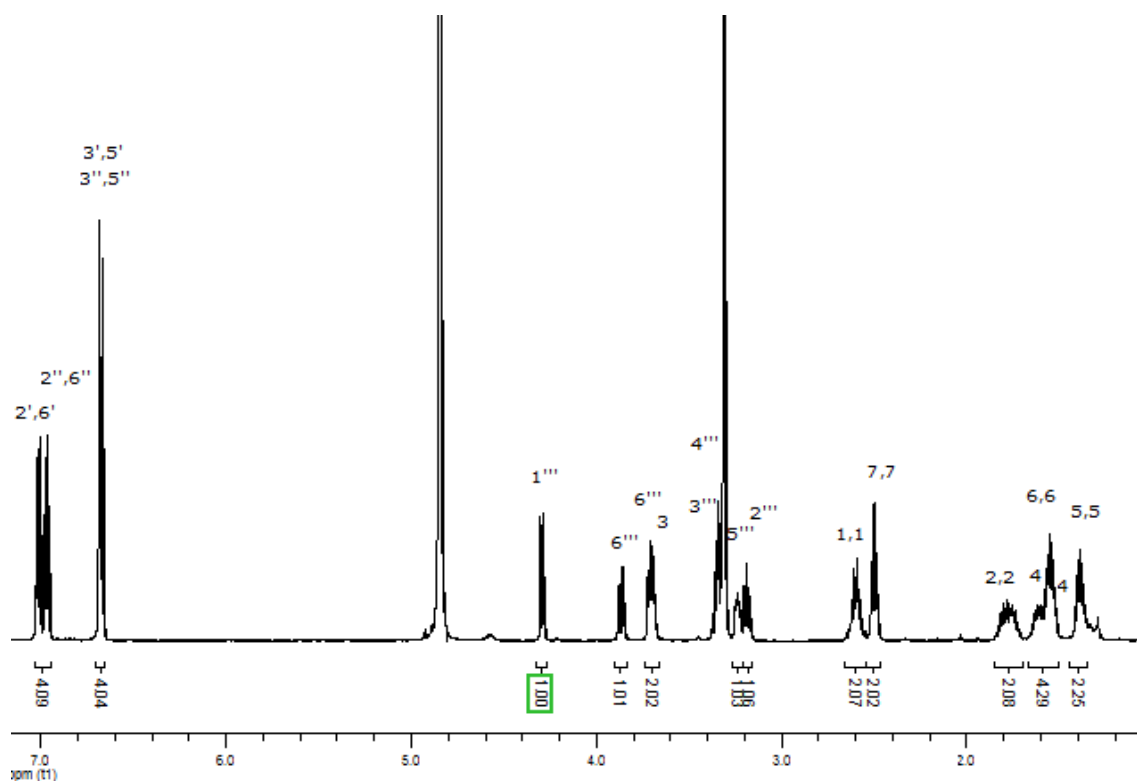
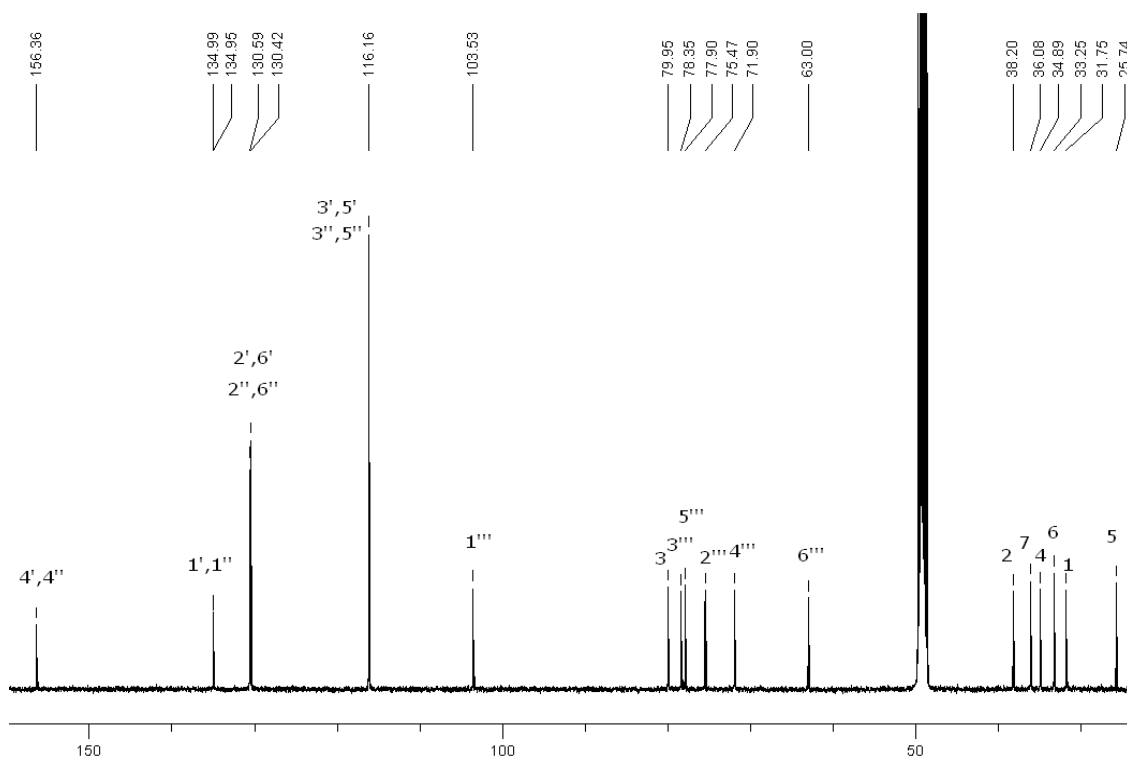
Glc – glukopiranozil grupa; **Gall** – galoil grupa; ^a vrednost dobijena iz HSQC spektra (signal preklapljen signalom rastvarača u ^{13}C NMR spektru); ^{b,c} signali mogu biti međusobno zamenjeni

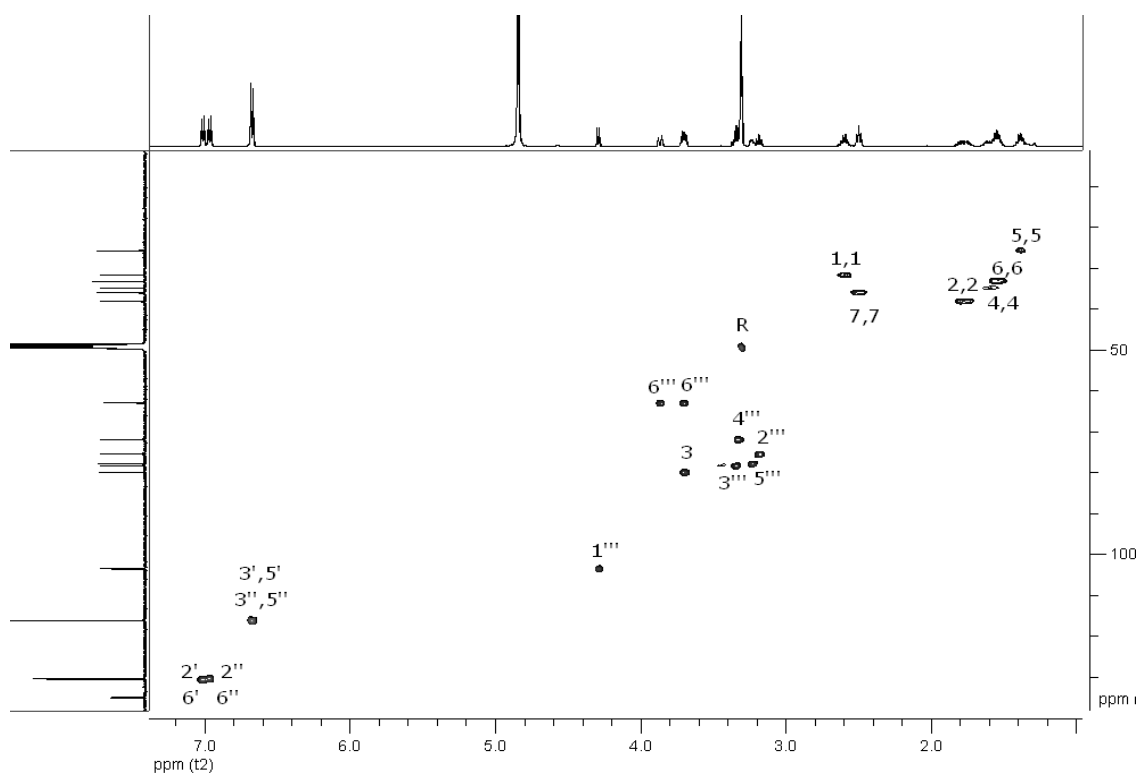
2.1.2. Heptanolska grupa diarilheptanoida

Jedinjenje **5** (Slika 2.1.35) je izolovano u količini od 6 mg i prvo je jedinjenje u ovom radu iz heptanolske grupe diarilheptanoida (Slika 2.1.3). ^{13}C NMR spektar ovog jedinjenja (Slika 2.1.37) je ukazao na diarilheptanoidnu strukturu bez keto grupe u položaju 3 (izostanak signala na $\delta_{\text{C}} > 200$ ppm). U saharidnoj i aromatičnoj oblasti ^1H i ^{13}C NMR spektara (Slike 2.1.36 i 2.1.37) uočeni su signali na skoro istim hemijskim pomeranjima kao kod platifilozida (**1**) (Slike 2.1.5 i 2.1.6) što je ukazalo na β -D-glukopiranozu i *p*-hidroksifenil grupe. Međutim, na osnovu broja i položaja signala u heptanoidnim delovima ^1H i ^{13}C NMR spektara zaključeno je da se jedinjenje **5** razlikuje od platifilozida (**1**) samo po tome što nema keto grupu u položaju 3 već metinsku. Podatak o masi jona $[\text{M}+\text{H}]^+$ na m/z 463,2317 ukazao je na molekulsku formulu $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_8$ i potvrdio je pretpostavljenu strukturu (Slika 2.1.35). HMBC korelacije H-1'''/C-3 i H-3/C-1''' (Slika 2.1.40) su ukazale na položaj β -D-glukopiranoze (C-3). Jedinjenje **5** je poznato od ranije i njegovo trivijalno ime je acerozid VII.³⁶ HSQC i ostale HMBC korelacije (Slike 2.1.38-2.1.41) su dodatno potvrdile strukturu ovog jedinjenja. *R* konfiguracija na C-3 atomu je ustanovljena na osnovu slaganja $[\alpha]_{\text{D}}$ vrednosti sa literaturnom (-12.0 eksp., -8.6 lit.)³⁶, a potvrđena je primenom pravila ^{13}C glikozidacionog pomeranja poređenjem hemijskih pomeranja za C-4 i C-2 atome jedinjenja **5** i rubranola.⁷¹ Rubranol je izolovan iz crne jove kao jedinjenje **20** (Slika 2.2.40, Tabele 2.1.3 i 2.2.3) i korišćen je za poređenje, pošto ^{13}C NMR podaci za aglikon jedinjenja **5** – centrolobol, nisu bili dostupni. Uočeno je da je $\Delta\delta_{\text{C}4} > \Delta\delta_{\text{C}2}$ (3,5 > 2,5), što je potvrda *R* konfiguracije.

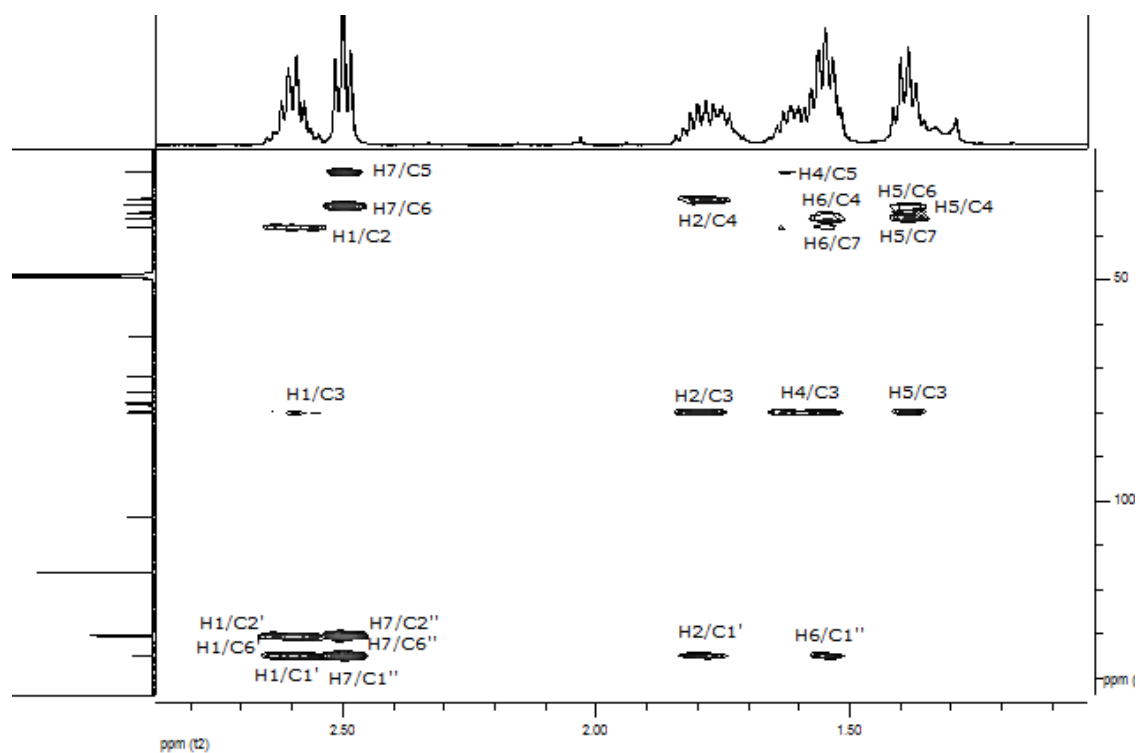


Slika 2.1.35. Strukturna formula acerozida VII (**5**)

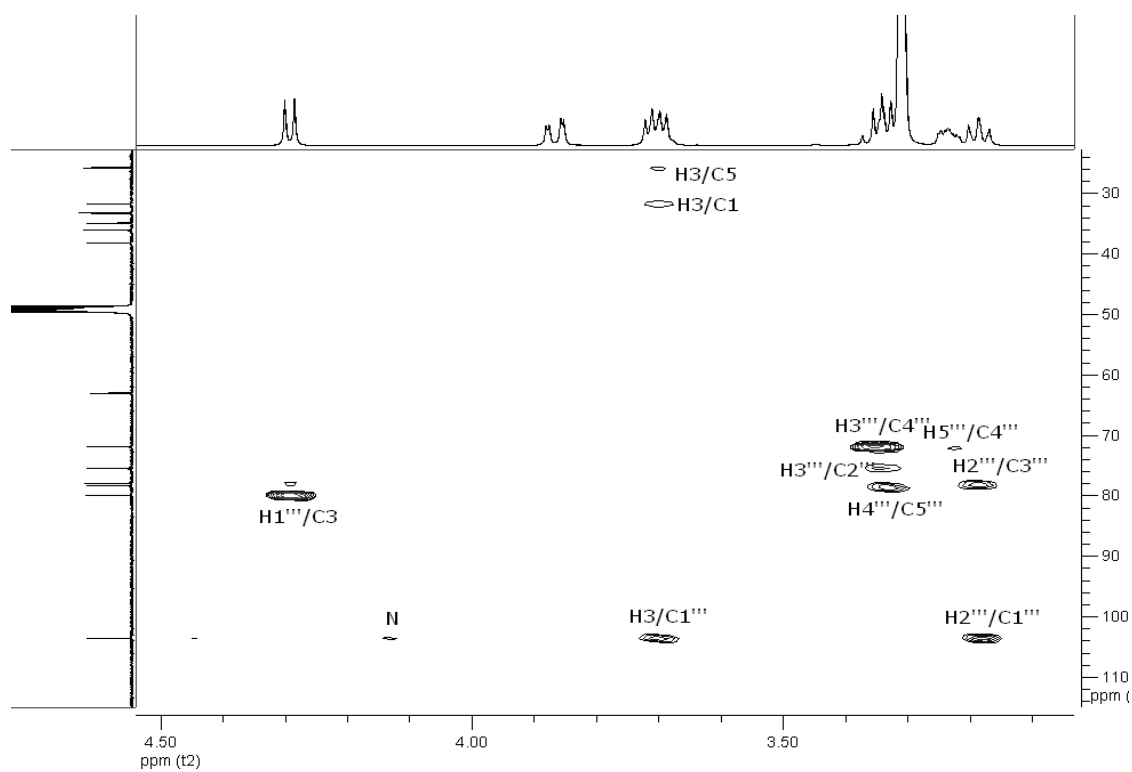
Slika 2.1.36. ^1H NMR spektar acerozida VII (5)Slika 2.1.37. ^{13}C NMR spektar acerozida VII (5)



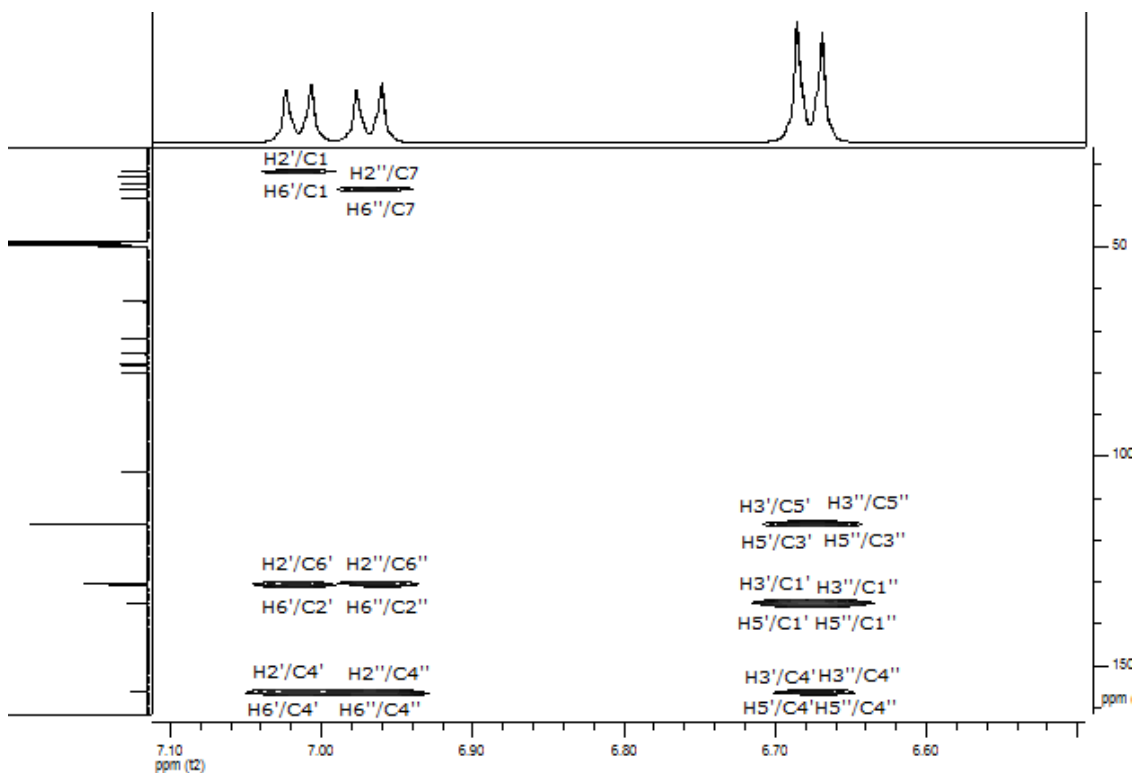
Slika 2.1.38. HSQC spektar acerozida VII (5)



Slika 2.1.39. HMBC korelacije heptanoidnih protona (bez H-3) acerozida VII (5)

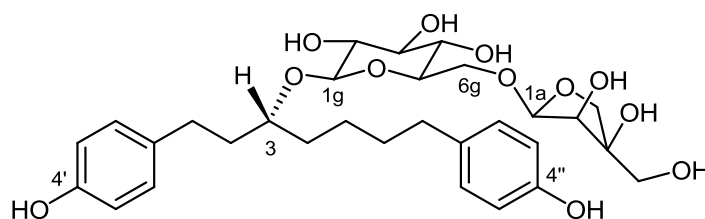


Slika 2.1.40. HMBC korelacije saharidnih i H-3 protona acerozida VII (5)

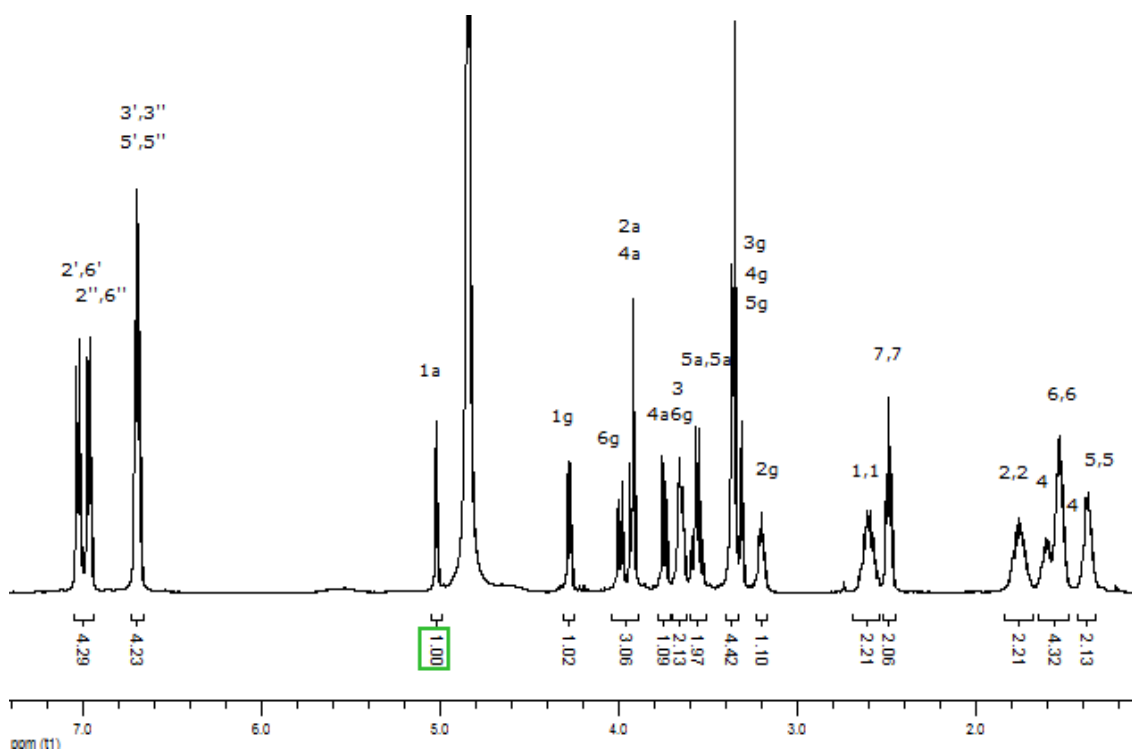


Slika 2.1.41. HMBC korelacije aromatičnih protona acerozida VII (5)

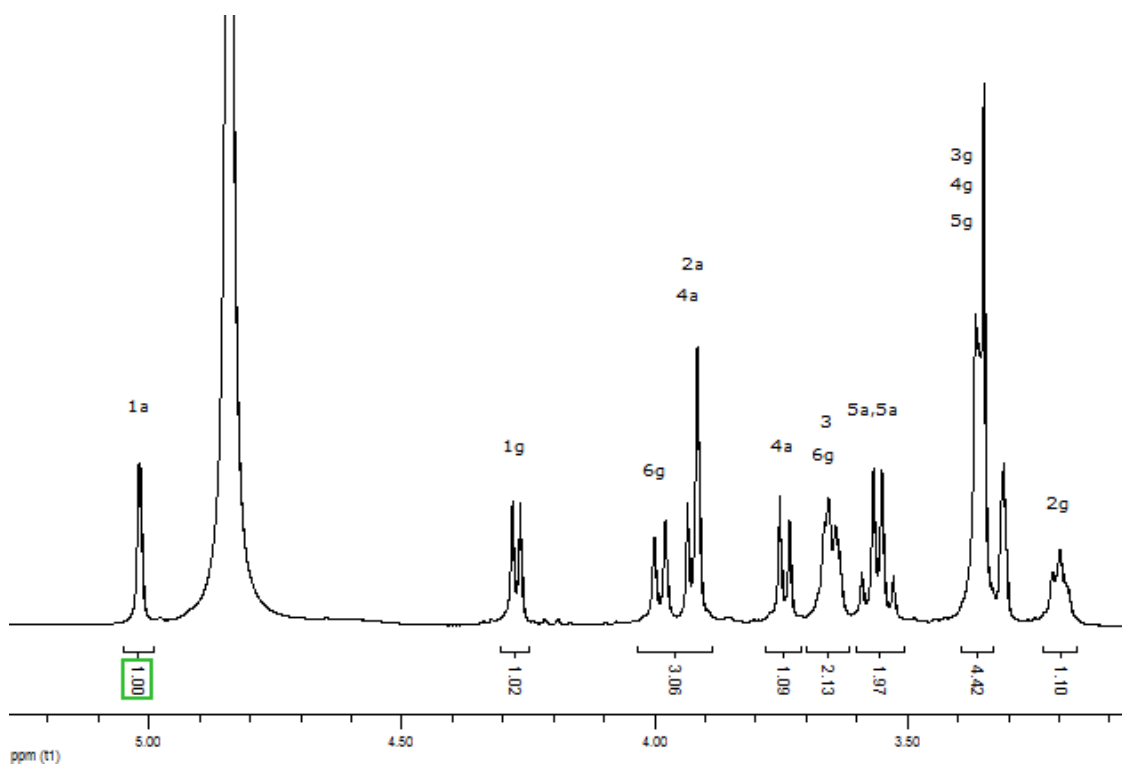
Jedinjenje **6** (Slika 2.1.42) je izolovano u količini od 28 mg. Analizom NMR spektara (Slike 2.1.43-2.1.50) zaključeno je da se radi o diarilheptanoid glikozidu sa dve monosaharidne jedinice. U ^{13}C NMR spektru (Slika 2.1.45), 6 signala u oblasti ispod 40 ppm potiče od 6 metilenskih grupa. Ovo je ukazalo na postojanje jednog supstituenta na heptanskom nizu, a to je dalje uputilo na to da su dve monosaharidne jedinice vezane u jednu disaharidnu. Dvanaest signala u saharidnoj oblasti ^{13}C NMR spektra odgovara jednoj pentoznoj i jednoj heksoznoj jedinici i jednom metinskom ugljeniku za koji je vezana disaharidna jedinica preko kiseonikovog atoma. Konstantu sprezanja od 2,0 Hz dubleta anomernog vodonika na 5,02 ppm daje β -konfiguracija pentoze, a konstantu sprezanja od 8,0 Hz dubleta drugog anomernog vodonika na 4,27 ppm β -konfiguracija heksozne jedinice. Poređenjem NMR podataka jedinjenja **6** i **2** (Slike 2.1.11 i 2.1.42, Tabele 2.1.1 i 2.1.3) utvrđeno je da je i u jedinjenju **6** prisutna disaharidna jedinica β -D-apiofuranozil- β -D-glukopiranoza. Korelacije H-1g/C-3 i H-1a/C-6g iz HMBC spektra (Slika 2.1.49) ukazale su na to da je apiozna jedinica vezana svojim C-1a za C-6g glukozne jedinice, a da je glukozna vezana svojim C-1g za C-3 heptanskog niza. HR-ESI-MS spektar je potvrdio molekulsku formulu $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}_{12}$ na bazi kvazimolekulskih jona $[\text{M}-\text{H}]^-$ na m/z 593,2597 i $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ na m/z 629,2367. *R* konfiguracija na C-3 određena je poređenjem CD spektra sa CD spektrom rubranola koji ima *R* konfiguraciju, kao i primenom pravila ^{13}C glikozidacionog pomeranja. Pošto je poređenjem ^{13}C NMR spektara jedinjenja **6** i rubranola (**20**)⁷¹ (Slika 2.2.40, Tabele 2.1.3 i 2.2.3) uočeno da je $\Delta\delta_{\text{C}4} > \Delta\delta_{\text{C}2}$ ($3,3 > 1,9$), konfiguracija na C-3 atomu je ustanovljena kao *R*. Poređenjem sa literaturnim podacima³⁶ zaključeno je da je jedinjenje **6** (3*R*)-1,7-di(4-hidroksifenil)-heptan-3-*O*- β -D-apiofuranozil(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopiranozid, poznato pod nazivom acerozid VIII.



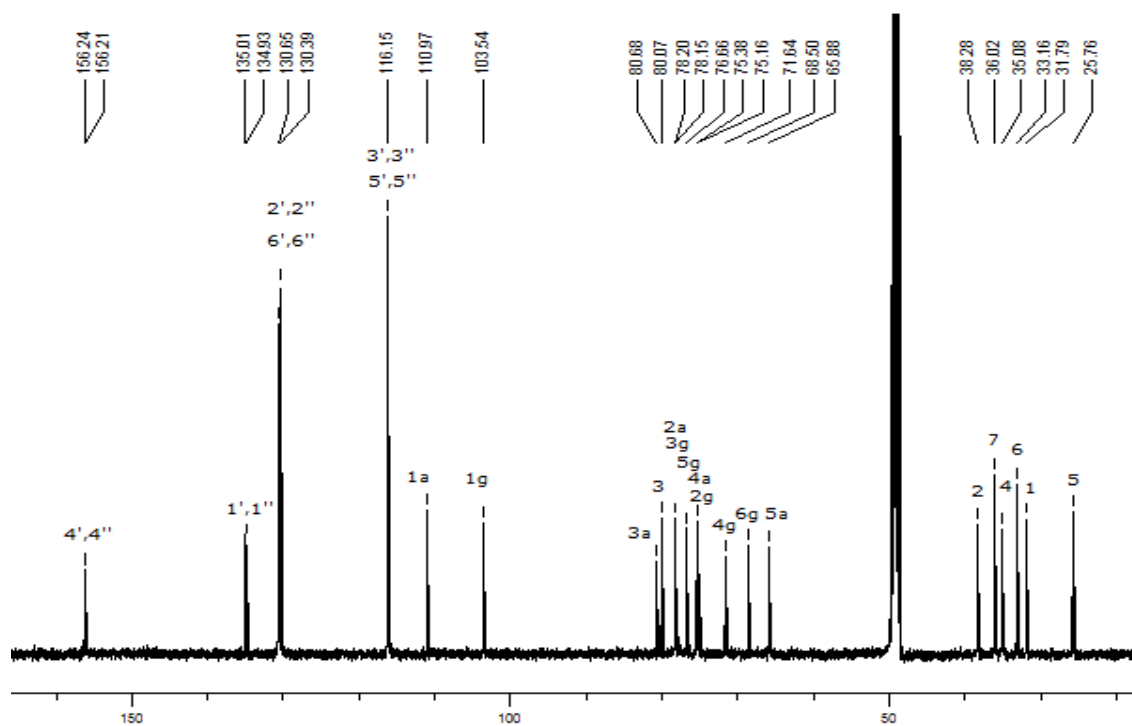
Slika 2.1.42. Strukturna formula acerozida VIII (**6**)



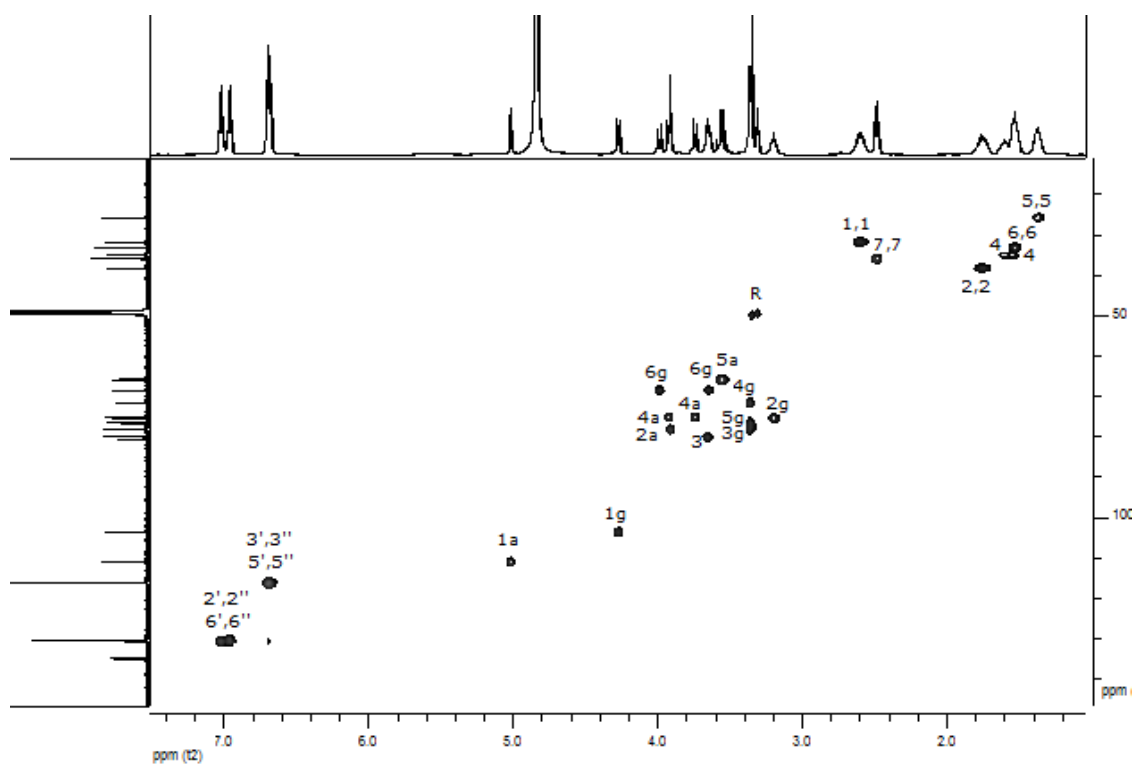
Slika 2.1.43. ^1H NMR spektar acerozida VIII (6)



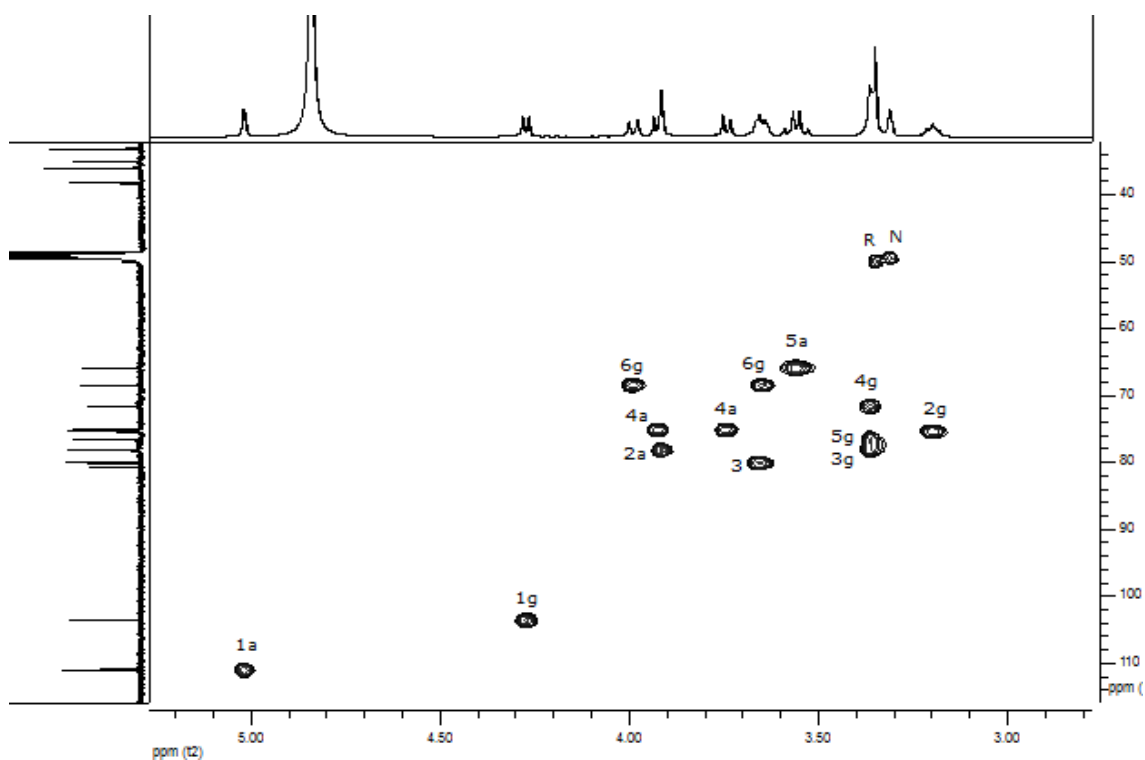
Slika 2.1.44. Signali saharidnih i H-3 protona u ^1H NMR spektru acerozida VIII (6)



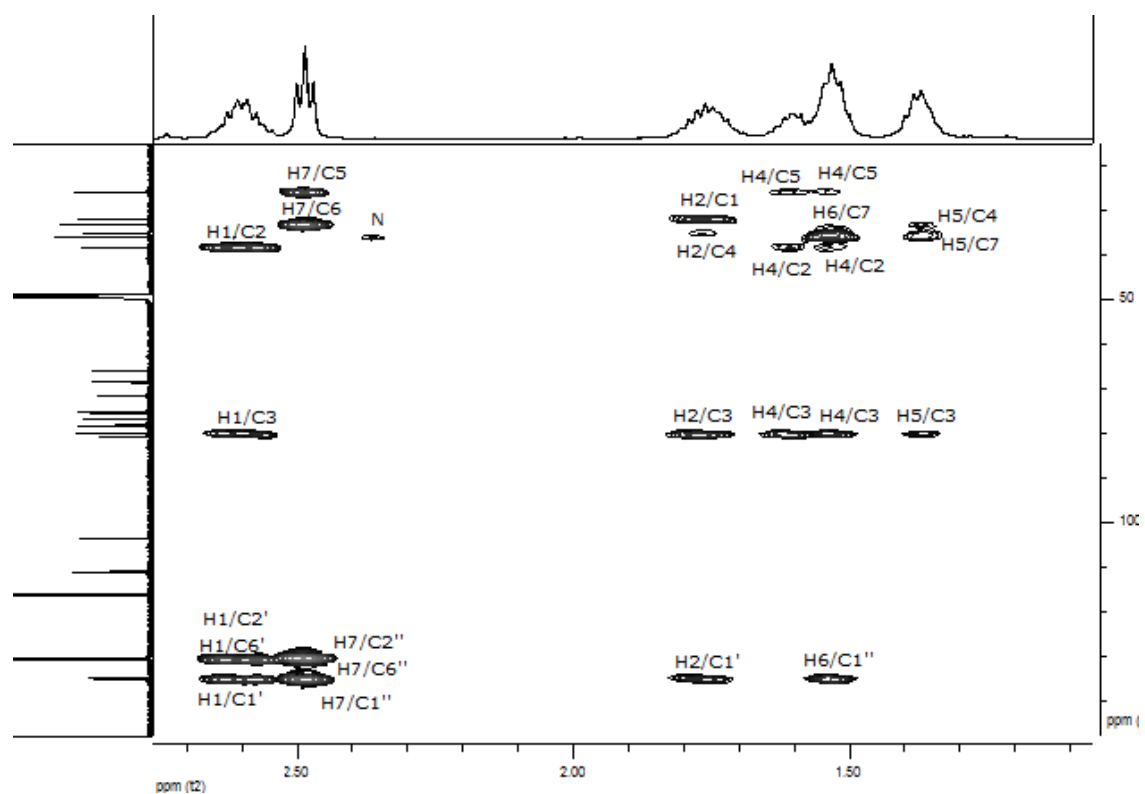
Slika 2.1.45. ^{13}C NMR spektar acerozida VIII (6)



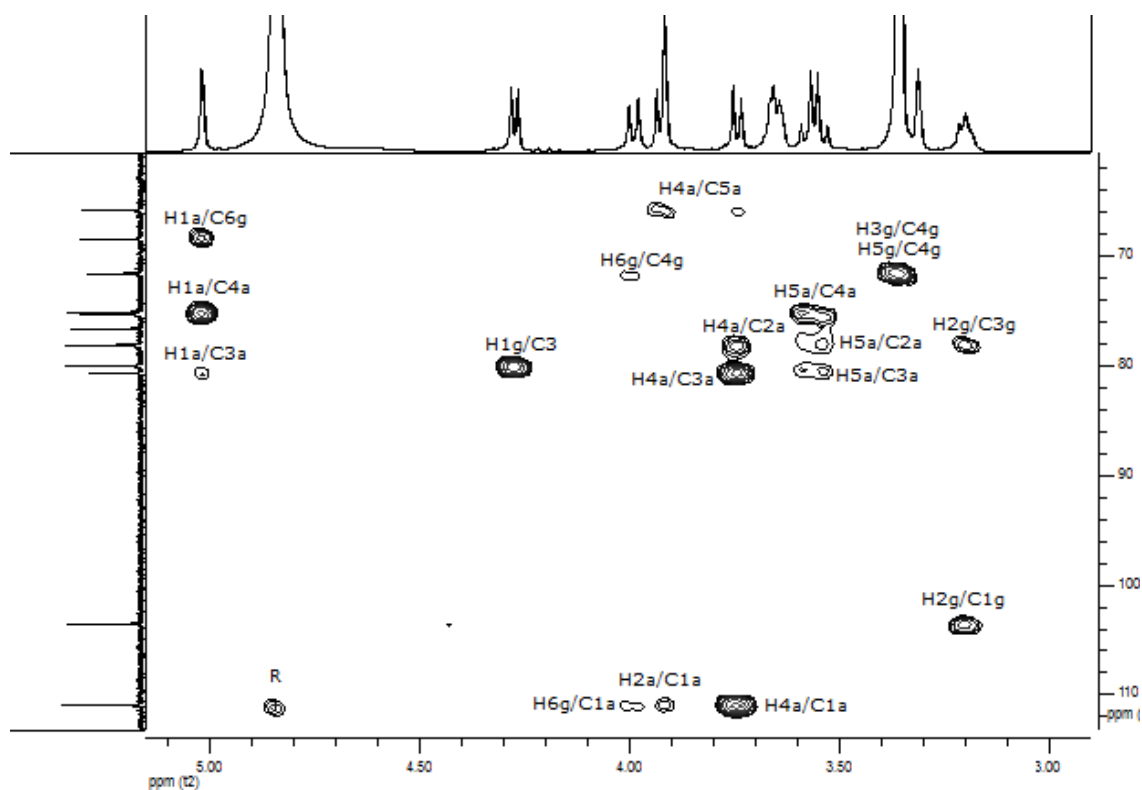
Slika 2.1.46. HSQC spektar acerozida VIII (6)



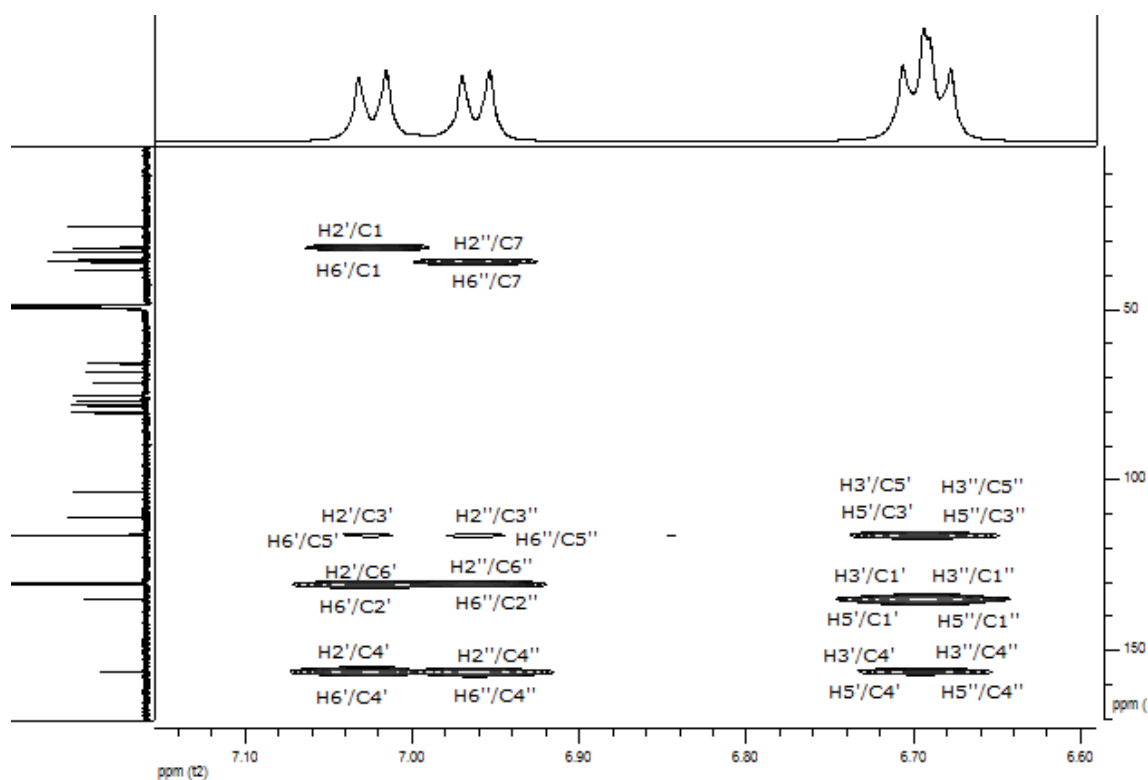
Slika 2.1.47. Saharidni deo HSQC spektra acerozida VIII (6)



Slika 2.1.48. HMBC korelacije heptanoidnih protona (bez H-3) acerozida VIII (6)



Slika 2.1.49. HMBC korelacije saharidnih protona acerosida VIII (6)



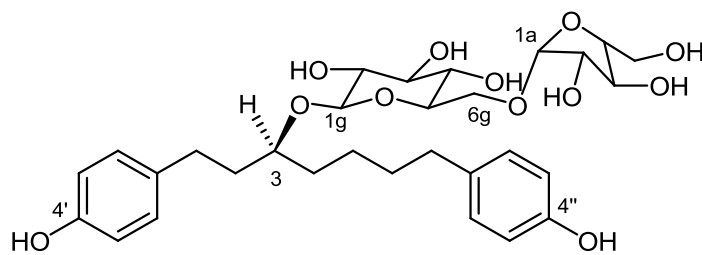
Slika 2.1.50. HMBC korelacije aromatičnih protona acerosida VIII (6)

Tabela 2.1.3. ^{13}C i ^1H NMR podaci za jedinjenja **5** i **6**

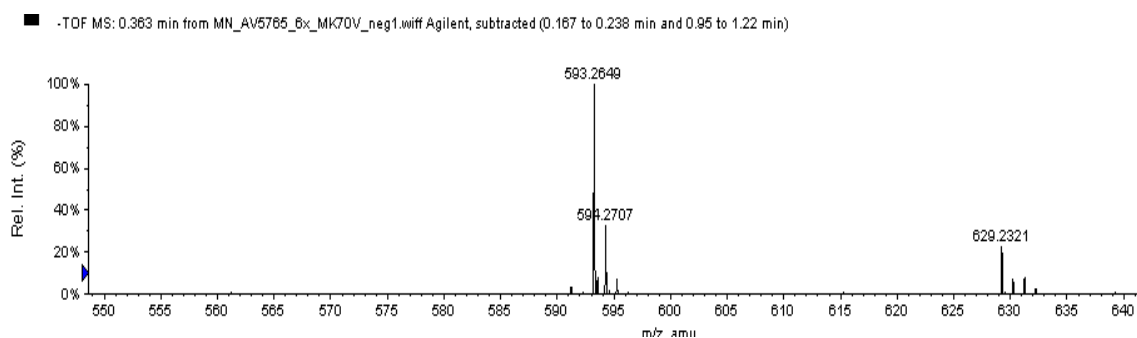
C/H	Acerozid VII (5)		Acerozid VIII (6)	
	δ_{C} , tip	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C} , tip	δ_{H} (J u Hz)
1	31,8; CH ₂	2,60 A ₂ B ₂	31,8; CH ₂	2,60 m
2	38,2; CH ₂	1,77 m	38,3; CH ₂	1,75 m
3	80,0; CH	3,71 m	80,1; CH	3,66 m
4	34,9; CH ₂	1,60 m	35,1; CH ₂	1,53 m; 1,60 m
5	25,7; CH ₂	1,39 q	25,6; CH ₂	1,37 m
6	33,3; CH ₂	1,55 qui	33,2; CH ₂	1,53 m
7	36,1; CH ₂	2,50 t (7,5)	36,0; CH ₂	2,49 t (7,5)
1'	135,0; C	-	135,0; C	-
2'	130,6; CH ^a	7,02 d (8,5)	130,7; CH	7,02 d (8,5)
3'	116,2; CH	6,68 d (8,5)	116,2; CH	6,70 d (8,5) ^a
4'	156,4; C	-	156,2; C	-
5'	116,2; CH	6,68 d (8,5)	116,2; CH	6,70 d (8,5) ^a
6'	130,6; CH ^a	7,02 d (8,5)	130,7; CH	7,02 d (8,5)
1''	135,0; C	-	134,9; C	-
2''	130,4; CH ^a	6,97 d (8,5)	130,4; CH	6,96 d (8,5)
3''	116,2; CH	6,68 d (8,5)	116,2; CH	6,69 d (8,5) ^a
4''	156,4; C	-	156,2; C	-
5''	116,2; CH	6,68 d (8,5)	116,2; CH	6,69 d (8,5) ^a
6''	130,4; CH ^a	6,97 d (8,5)	130,4; CH	6,96 d (8,5)
	Glep		Glep	
1g	103,5; CH	4,30 (8,0)	103,5; CH	4,27 d (8,0)
2g	75,5; CH	3,19 dd (9,0; 8,0)	75,4; CH	3,20 t (8,0)
3g	78,4; CH	3,34 m	78,2; CH	3,35 m ^b
4g	71,9; CH	3,33 m	71,6; CH	3,35 m ^b
5g	77,9; CH	3,24 m	76,7; CH	3,34 m ^b
6g	63,0; CH ₂	3,71 dd (12,0; 5,5) 3,87 dd (12,0; 2,0)	68,5; CH ₂	3,65 dd (11,0; 5,0) 3,99 dd (11,0; 2,0)
	Apiof		Apiof	
1a	-	-	111,0; CH	5,02 d (2,0)
2a	-	-	78,2; CH	3,92 d (2,0)
3a	-	-	80,7; C	-
4a	-	-	75,2; CH ₂	3,74 d (9,5) 3,93 d (9,5)
5a	-	-	65,9; CH ₂	3,56 ABq (11,5); $\Delta\delta$ 6,71

Glep – glukopiranozil grupa; **Apiof** – apiofuranozil grupa; ^a signali mogu biti međusobno zamenjeni;
^b vrednost dobijena iz HSQC spektra (signal preklopjen signalom rastvarača u ^{13}C NMR spektru)

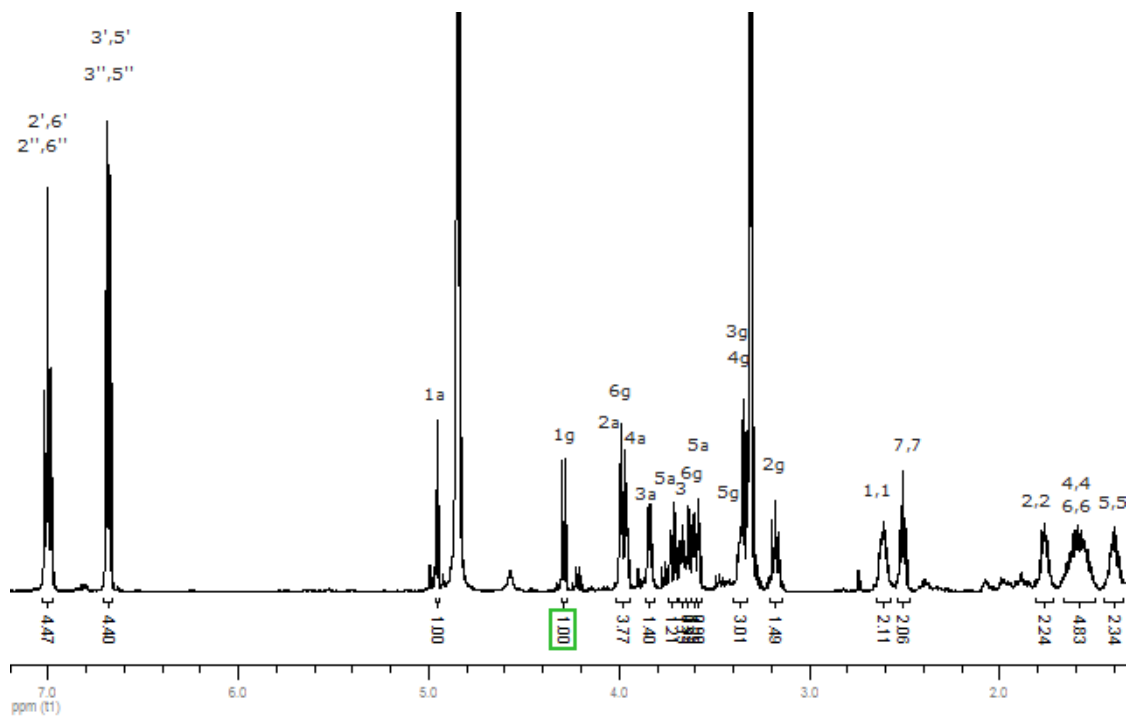
Jedinjenje **7** (**Slika 2.1.51**) je izolovano u količini od 6 mg. Na osnovu analize ^1H i ^{13}C NMR spektara (**Slike 2.1.53-2.1.58**) i poređenjem sa spektrima već izolovanih jedinjenja zaključeno je da se radi o diarilheptanoid glikozidu koji spada u grupu heptanola. Pored dve *p*-hidroksifenil grupe u položajima 1 i 7 heptanskog niza jedinjenje **7** ima i dve monosaharidne jedinice. Kao u slučaju acerozida VII (**5**) i acerozida VIII (**6**), u ^{13}C NMR spektru ovog jedinjenja (**Slika 2.1.57**), 6 signala u oblasti ispod 40 ppm potiče od 6 metilenskih grupa. Ovo je ukazalo na postojanje jednog supstituenta na heptanskom nizu, a to je dalje uputilo na to da su dve monosaharidne jedinice vezane u jednu disaharidnu, kao u slučaju acerozida VIII (**6**). Dvanaest signala u saharidnoj oblasti ^{13}C NMR spektra (**Slika 2.1.58**) odgovara jednoj pentoznoj i jednoj heksoznoj jedinici, a dodatni signal u istoj oblasti potiče od metinskog ugljenika za koji je vezana disaharidna jedinica preko kiseonikovog atoma. Međutim, uočene su razlike u odnosu na acerozid VIII (**6**). Iako je najčešća pentozna jedinica u diarilheptanoid glikozidima iz *Alnus* vrsta apioza, poređenjem NMR podataka utvrđeno je da to ovde nije slučaj, zbog izostanka dva metilenska vodonika (HSQC spektar, **Slika 2.1.59**). Konstantu sprezanja od 0,9 Hz dubleta anomernog vodonika na 4,97 ppm daje α konfiguracija pentozne jedinice, a konstantu sprezanja od 7,8 Hz dubleta drugog anomernog vodonika na 4,28 ppm β -konfiguracija heksozne jedinice. Korelacije H-1g/C-3 i H-1a/C-6g iz HMBC spektra (**Slika 2.1.60**) pokazale su da je pentozna jedinica vezana svojim C-1a za C-6g heksozne, a da je heksozna vezana svojim C-1g za C-3 heptanskog skeleta. Slaganje sa ^{13}C NMR literaturnim podacima^{44,46} pokazalo je da je disaharidna jedinica α -L-arabinofuranozil- β -D-glukopiranozid. HMBC korelacije aromatičnih protona su karakteristične za dve *p*-hidroksifenil grupe (**Slika 2.1.61**). Maseni spektar je na osnovu kvazimolekulskih jona $[\text{M}-\text{H}]^-$ na m/z 593,2649 i $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ na m/z 629,2321 ukazao na molekulsku formulu $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}_{12}$ i potvrdio strukturu 1,7-di(4-hidroksifenil)-heptan-3-*O*- α -L-arabinofuranozil- β -D-glukopiranozida. *S* konfiguracija na C-3 atomu je određena primenom pravila ^{13}C glikozidacionog pomeranja. Analizom ^{13}C NMR spektara jedinjenja **7** i rubranola (**20**) (**Slika 2.2.40**, **Tabele 2.1.4** i **2.2.3**) nađeno je da je $\Delta\delta_{\text{C}4} < \Delta\delta_{\text{C}2}$ ($2,4 < 3,1$), što upućuje na *S* konfiguraciju na C-3 atomu. $[\alpha]_{\text{D}}$ vrednost za ovo jedinjenje iznosi -51,0. Kako u literaturi nije do sada bilo podataka o ovom jedinjenju zaključeno je da se radi o novom prirodnom proizvodu.

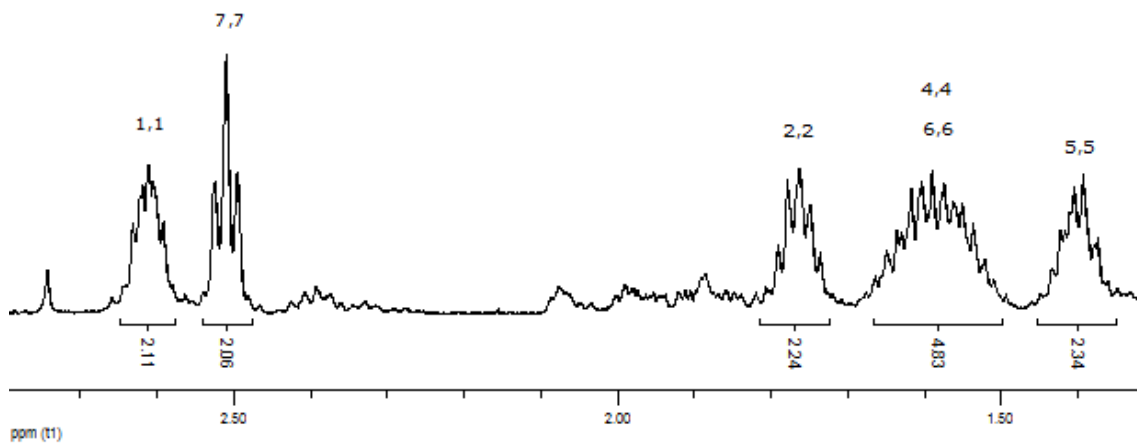


Slika 2.1.51. Strukturna formula jedinjenja 7

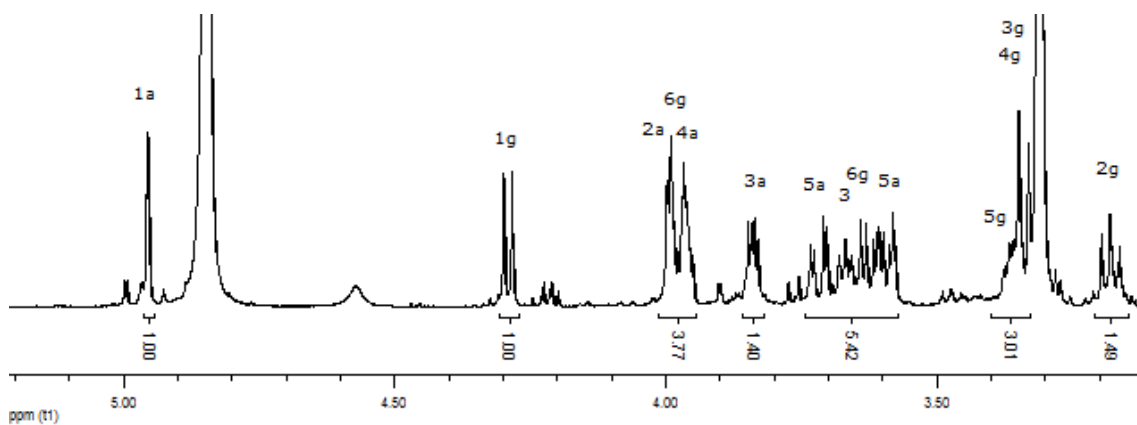


Slika 2.1.52. HR-ESI-MS spektar jedinjenja 7

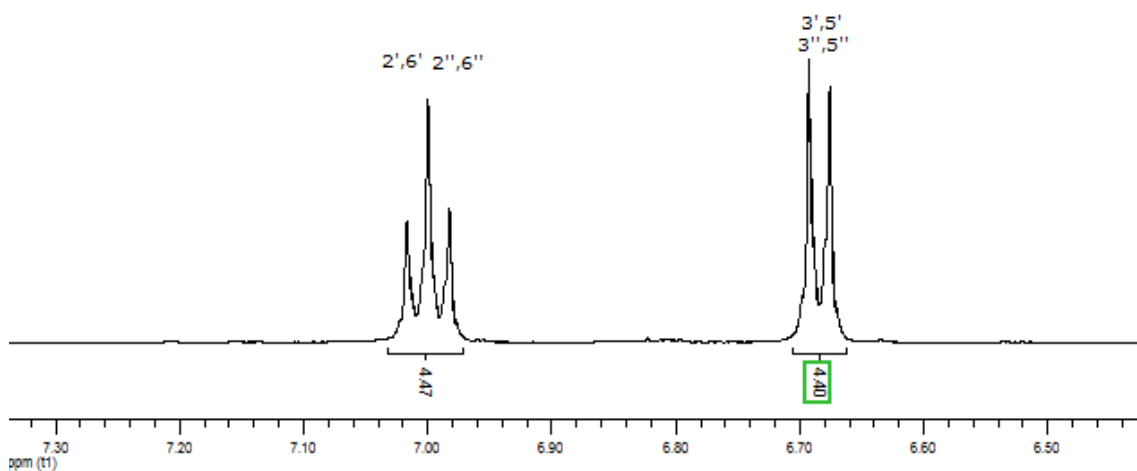
Slika 2.1.53. ^1H NMR spektar jedinjenja 7



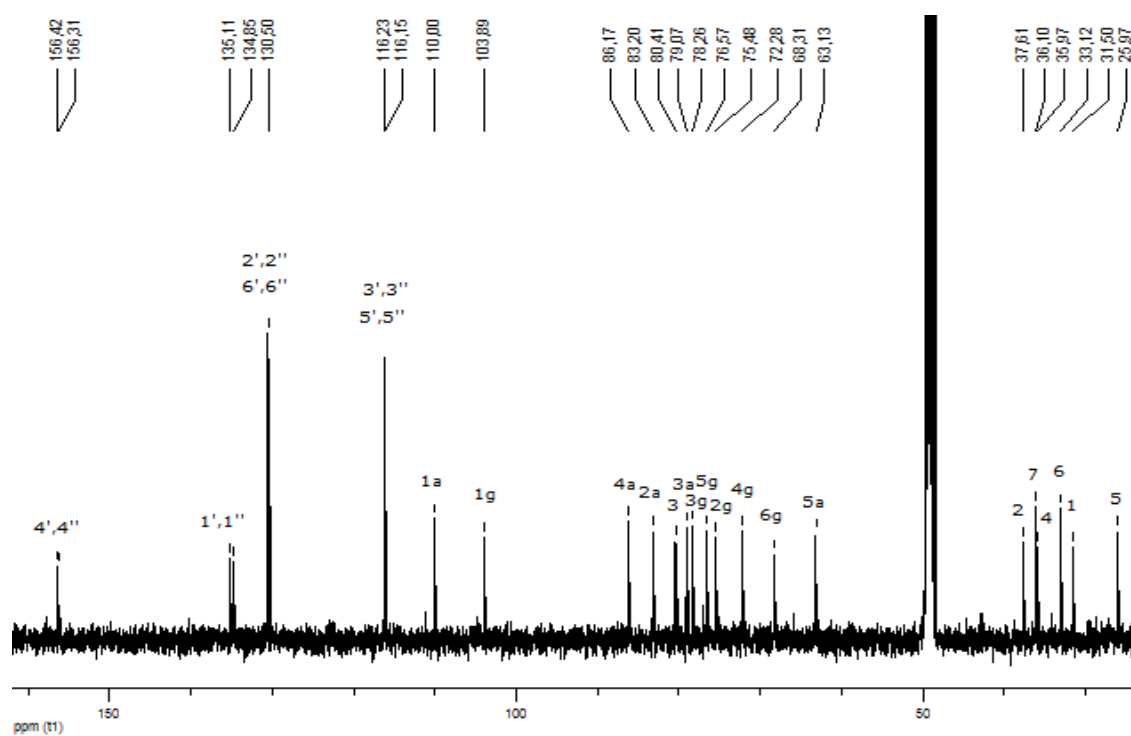
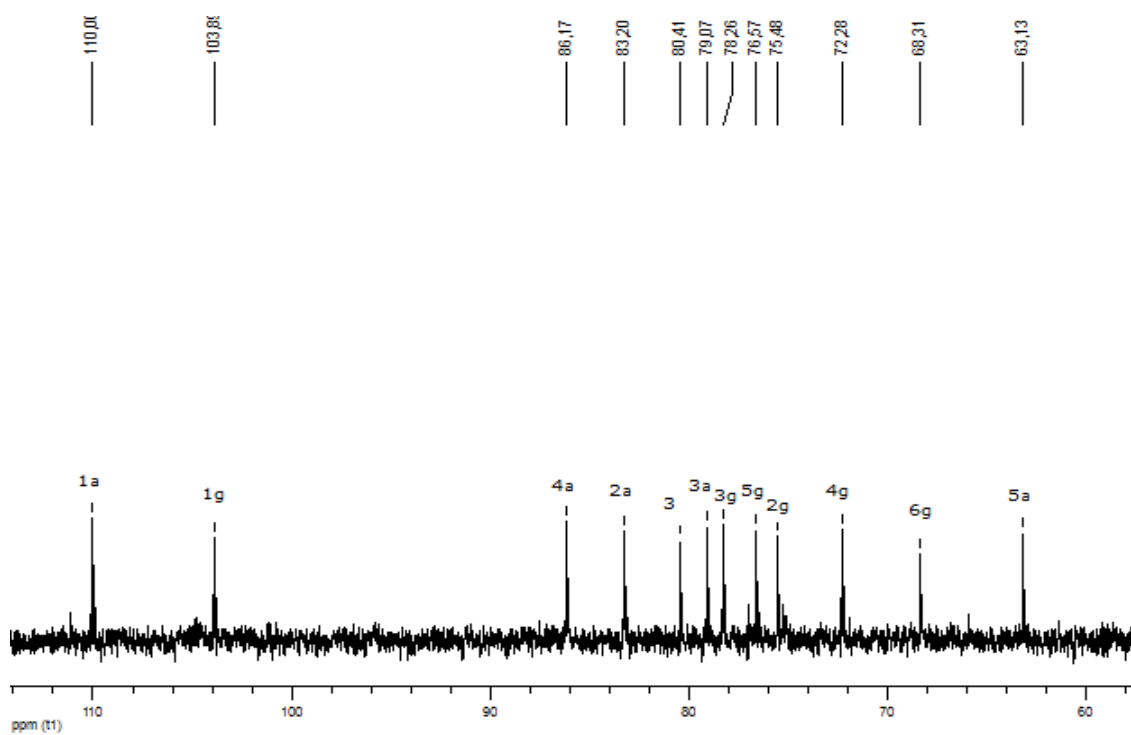
Slika 2.1.54. Signali heptanoidnih protona (bez H-3) u ^1H NMR spektru jedinjenja 7

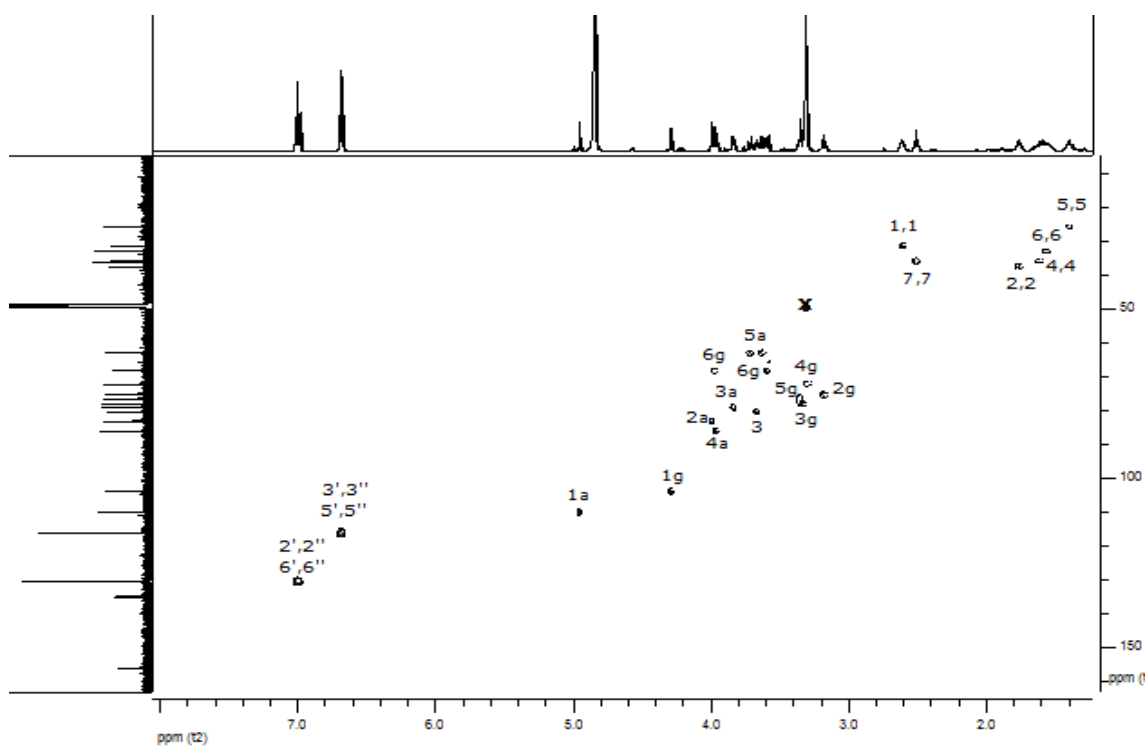


Slika 2.1.55. Signali saharidnih i H-3 protona u ^1H NMR spektru jedinjenja 7

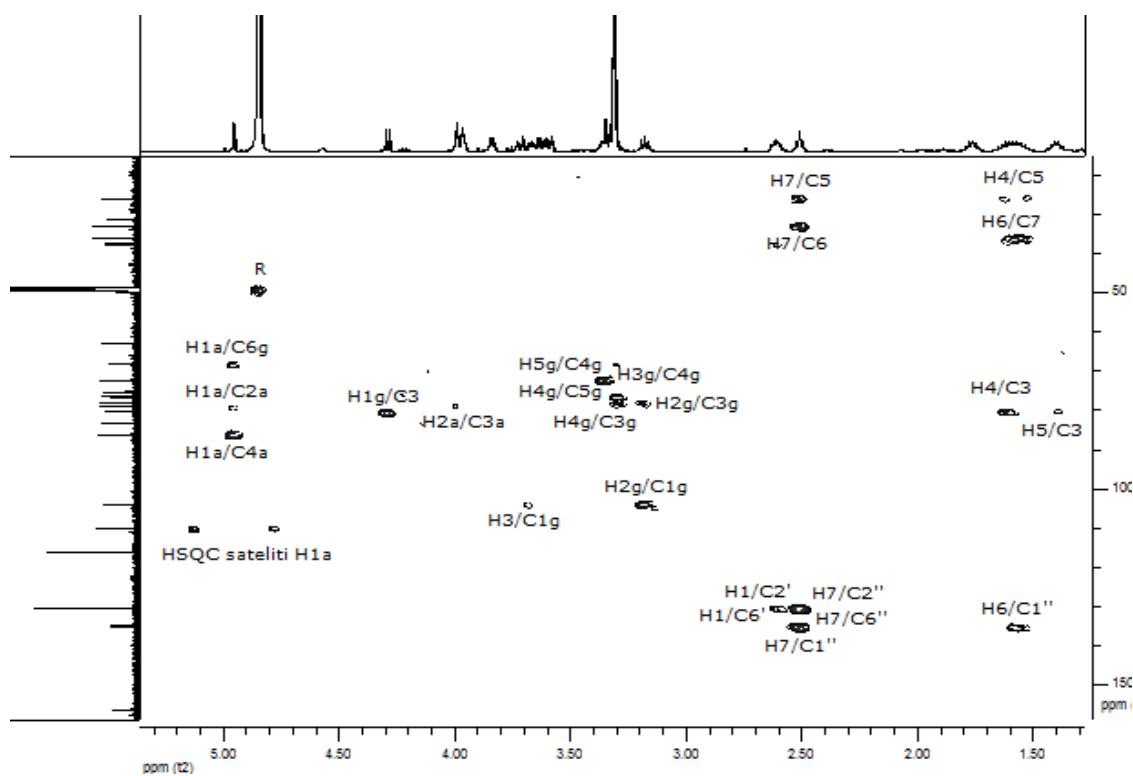


Slika 2.1.56. Signali aromatičnih protona u ^1H NMR spektru jedinjenja 7

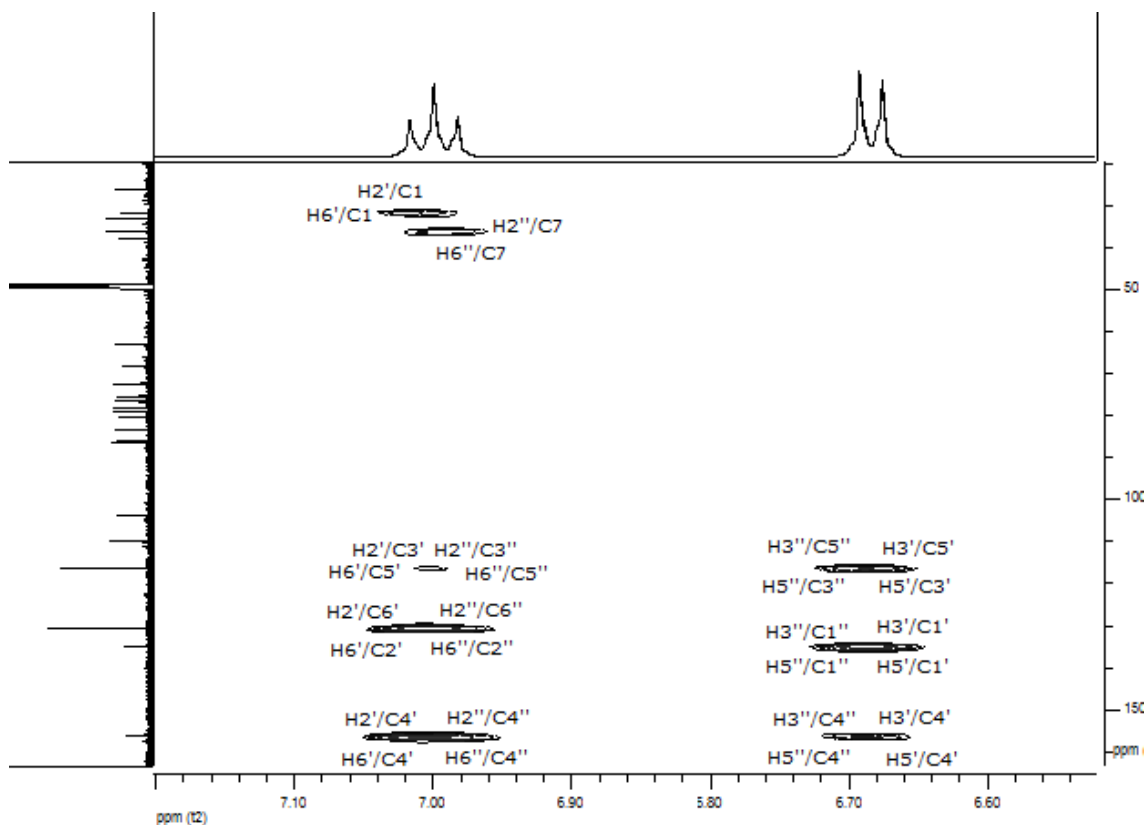
Slika 2.1.57. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 7Slika 2.1.58. Signali saharidnih i C-3 ugljenika u ^{13}C NMR spektru jedinjenja 7



Slika 2.1.59. HSQC spektar jedinjenja 7



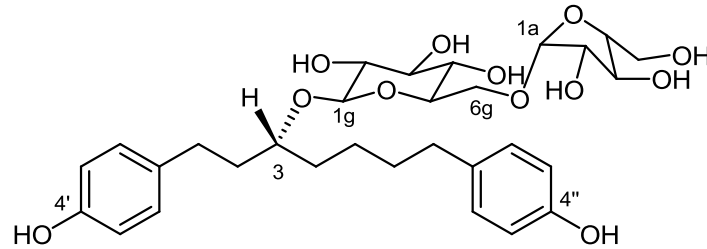
Slika 2.1.60. HMBC korelacije heptanoidnih i saharidnih protona jedinjenja 7



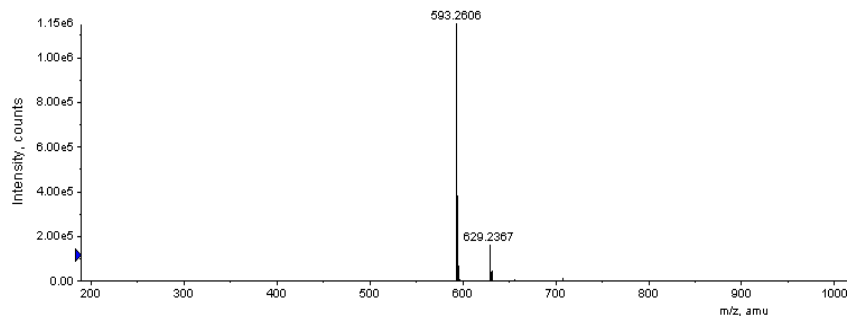
Slika 2.1.61. HMBC korelacije aromatičnih protona jedinjenja 7

Jedinjenje **8** (Slika 2.1.62) je izolovano u količini od 22 mg. Spektroskopski podaci su jako slični onima za jedinjenje 7 uz minimalne razlike u ^1H i ^{13}C NMR spektrima. NMR spektri jedinjenja 8 su dati na Slikama 2.1.64-2.1.72. Na Slikama 2.1.73 i 2.1.74 prikazana je razlika u heptanoidnom, odnosno aromatičnom delu ^{13}C NMR spektra u odnosu na jedinjenje 7. Za jedinjenje 8 je uočeno da je signal ugljenika C-2 pomećen ka višim, a ugljenika C-4 ka nižim vrednostima hemijskog pomeranja (Slike 2.1.67 i 2.1.73, Tabela 2.2.3). Ovako male razlike mogu se pripisati izomeriji tako da je za jedinjenje 8 pretpostavljeno da je 3*R* izomer jedinjenja 7. *R* konfiguracija određena je snimanjem CD spektra koji je bio sličan CD spektru rubranola (**20**) (po strukturi jako sličnom jedinjenju 8, Slika 2.1.1) koji ima *R* konfiguraciju, kao i primenom pravila ^{13}C glikozidacionog pomeranja; pri analizi ^{13}C NMR spektara jedinjenja 8 i rubranola (**20**) (Slika 2.2.40, Tabele 2.1.4 i 2.2.3) uočeno je da je $\Delta\delta_{\text{C}4} > \Delta\delta_{\text{C}2}$ (3,3 > 2,4). Kvazimolekulski joni $[\text{M}-\text{H}]^-$ na m/z 593,2606 i $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ na m/z 629,2367 (Slika 2.1.63) su potvrdili pretpostavljenu strukturu. $[\alpha]_{\text{D}}$ vrednost ovog jedinjenja iznosi -91,1.

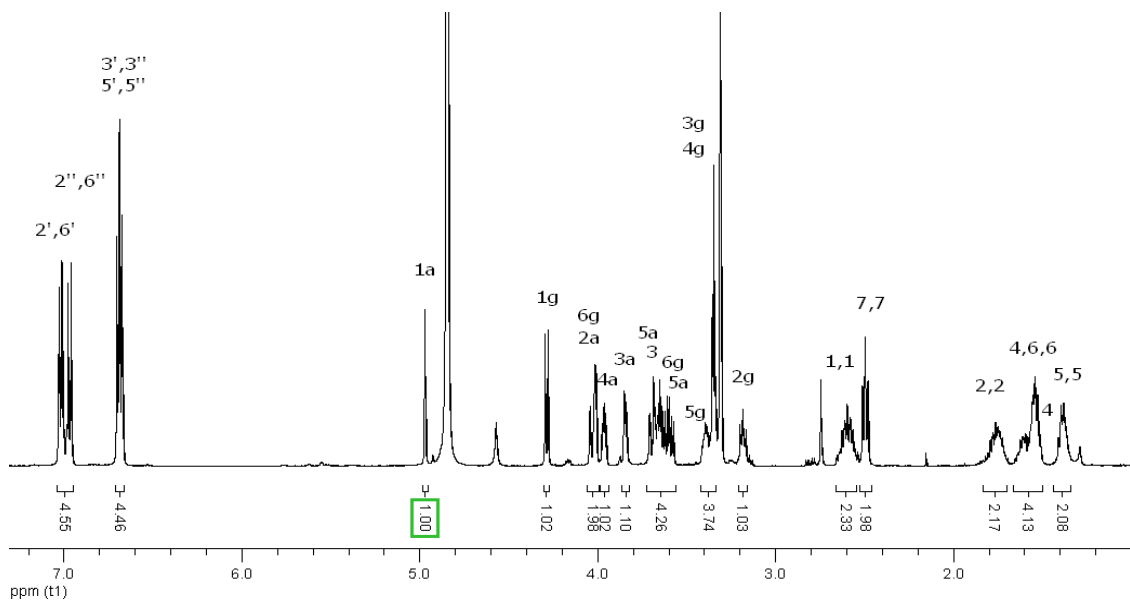
Kako u literaturi do sada nije bilo podataka o jedinjenju **8** zaključeno je da je reč o novom prirodnom proizvodu.



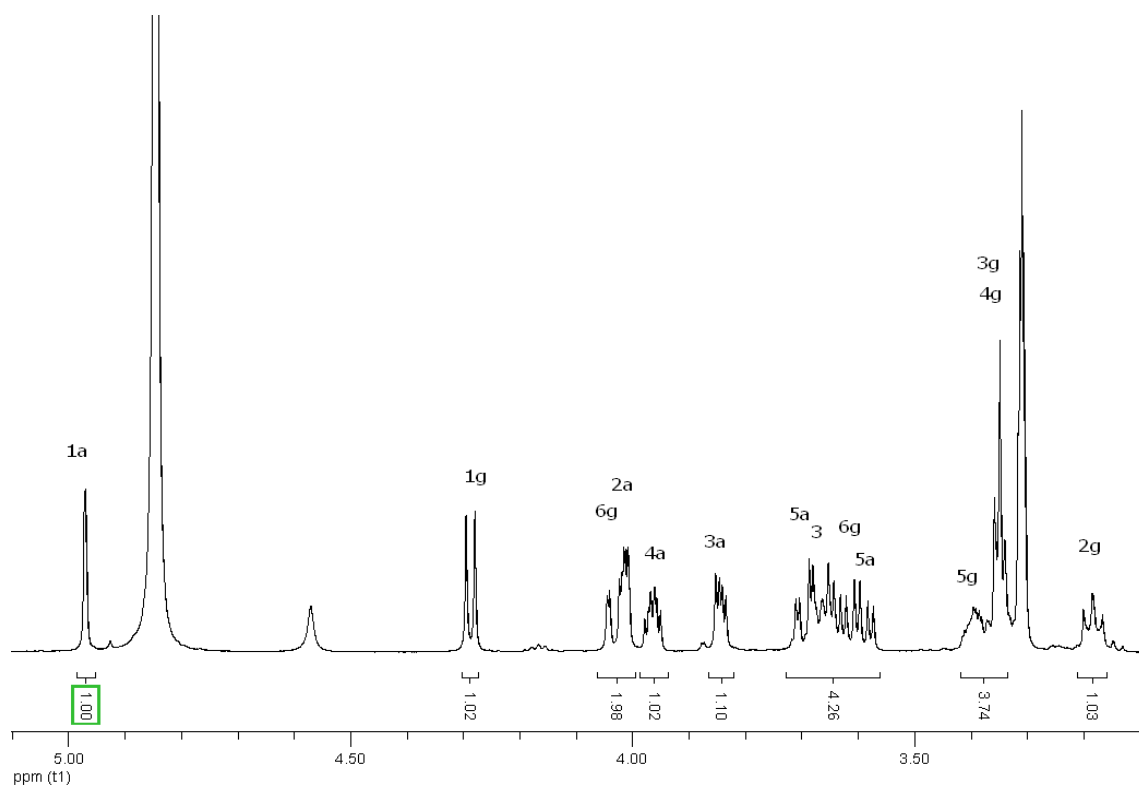
Slika 2.1.62. Strukturna formula jedinjenja **8**



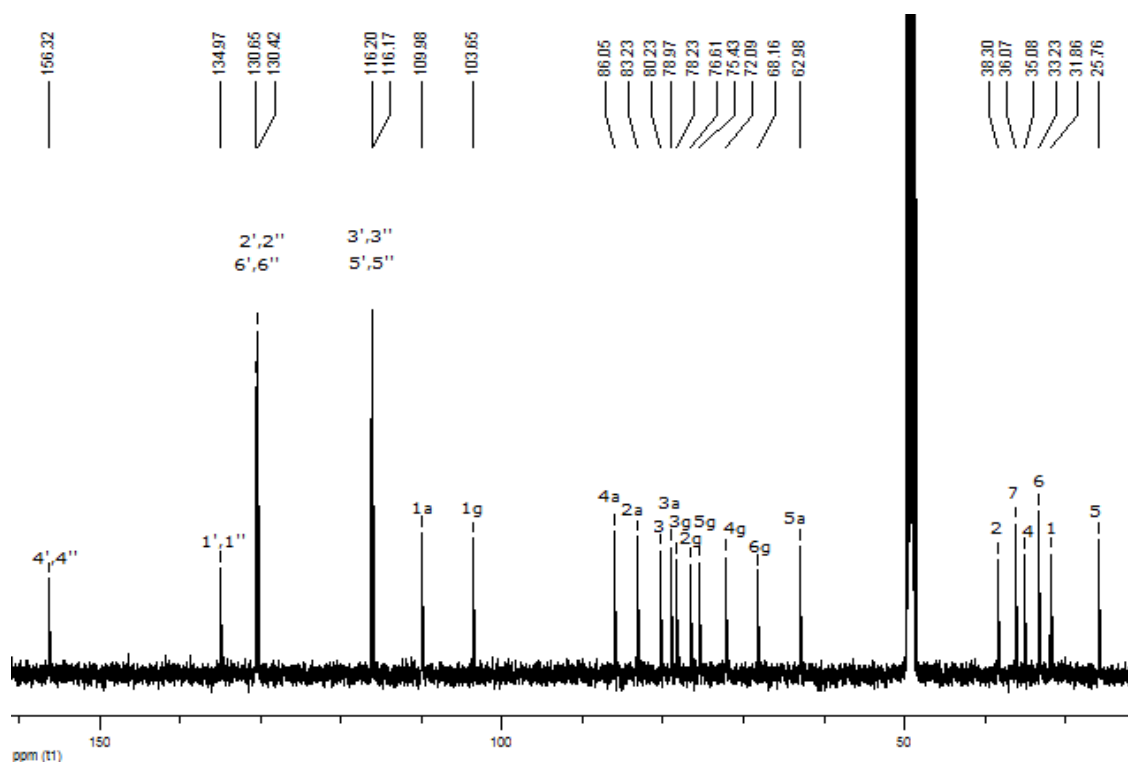
Slika 2.1.63. Deo HR-ESI-MS spektra jedinjenja **8**



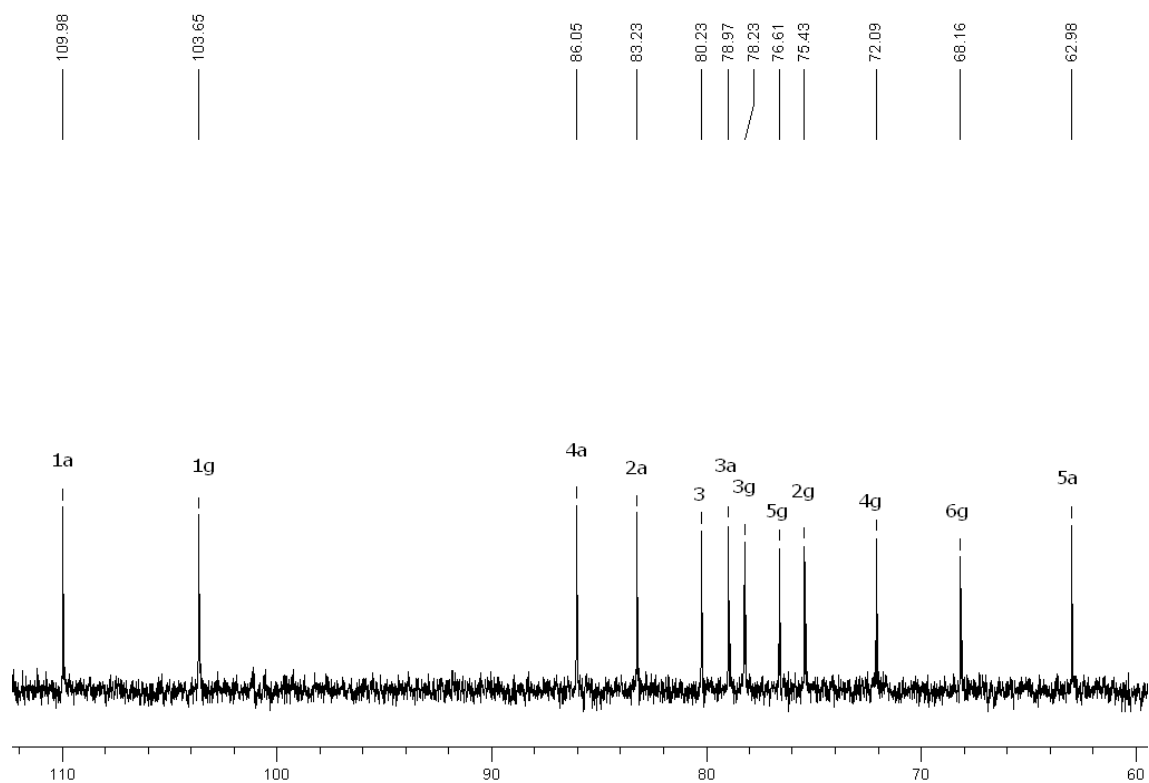
Slika 2.1.64. ^1H NMR spektar jedinjenja **8**



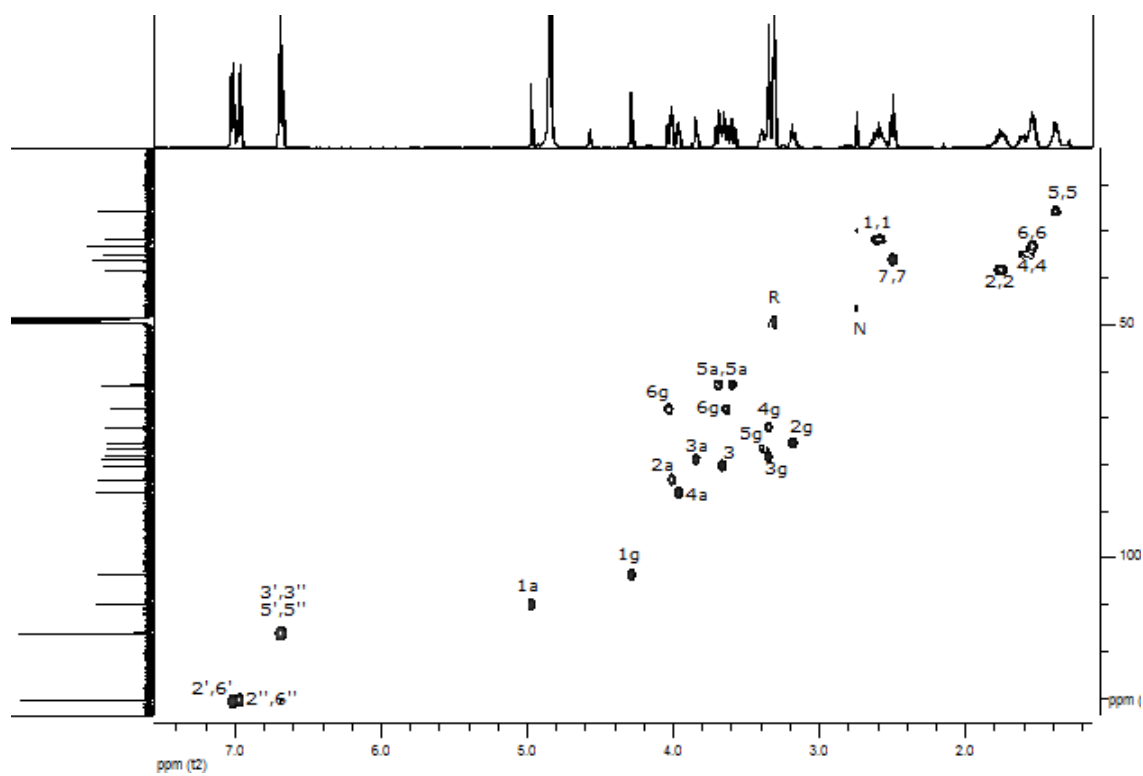
Slika 2.1.65. Signali saharidnih i H-3 protona u ^1H NMR spektru jedinjenja 8



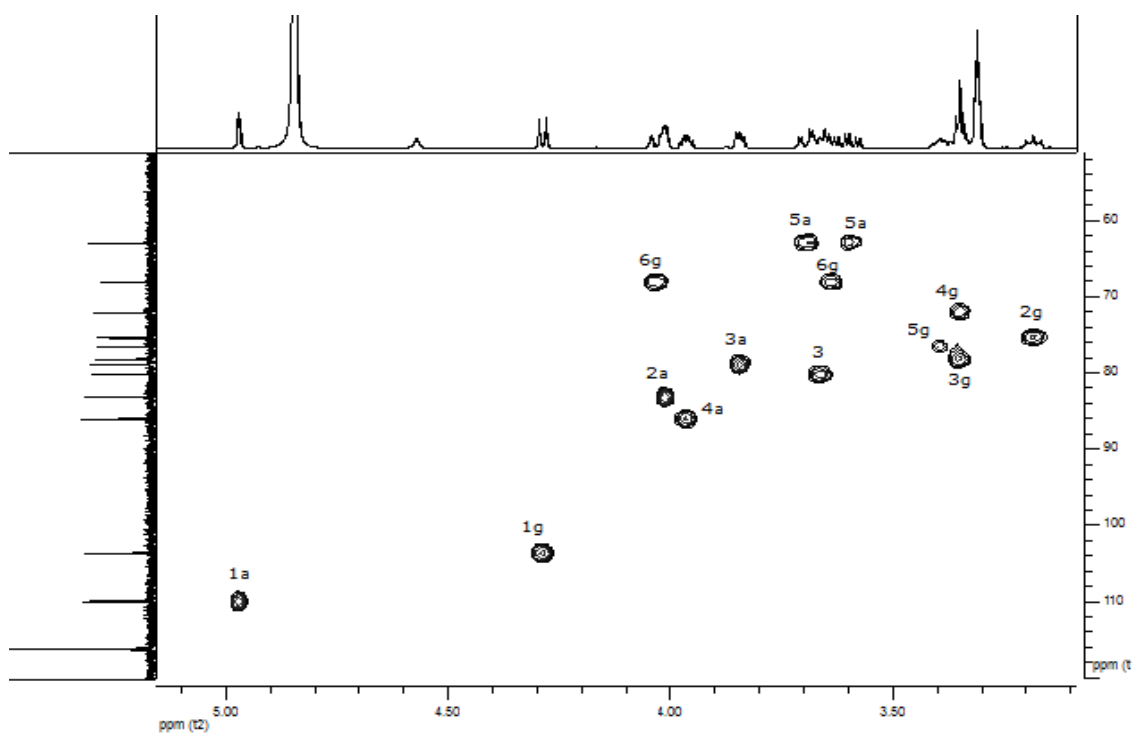
Slika 2.1.66. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 8



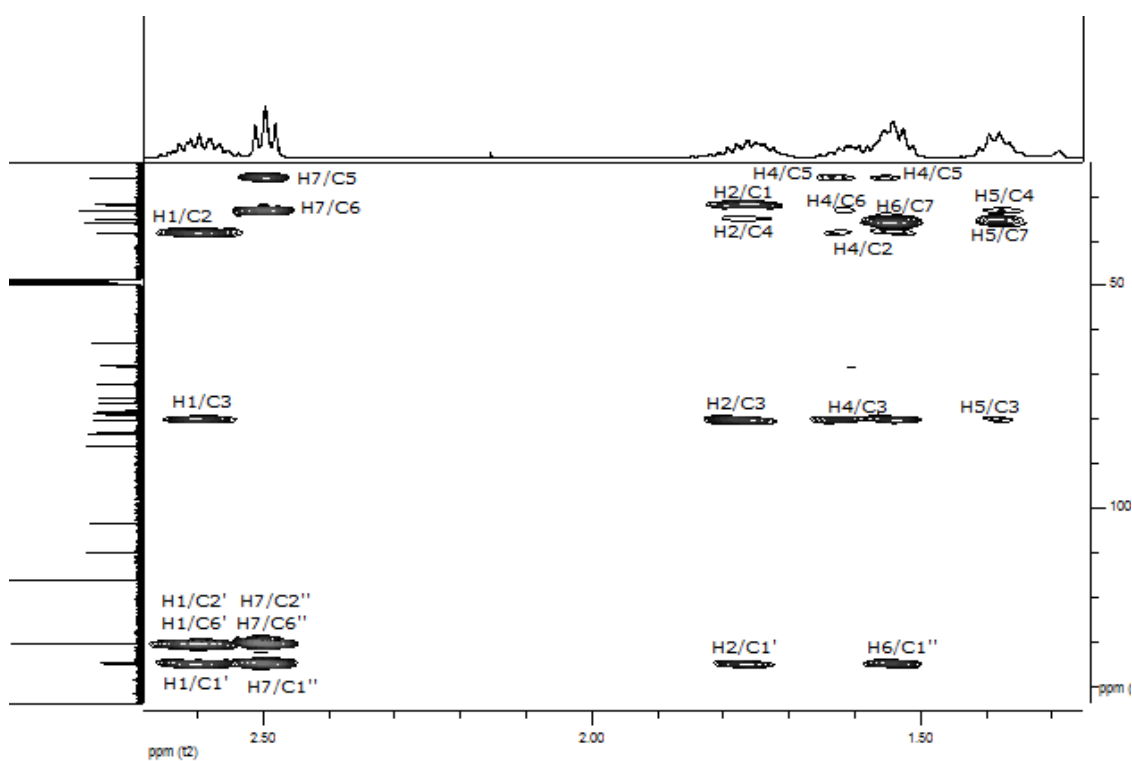
Slika 2.1.67. Signali saharidnih i C-3 ugljenika u ^{13}C NMR spektru jedinjenja 8



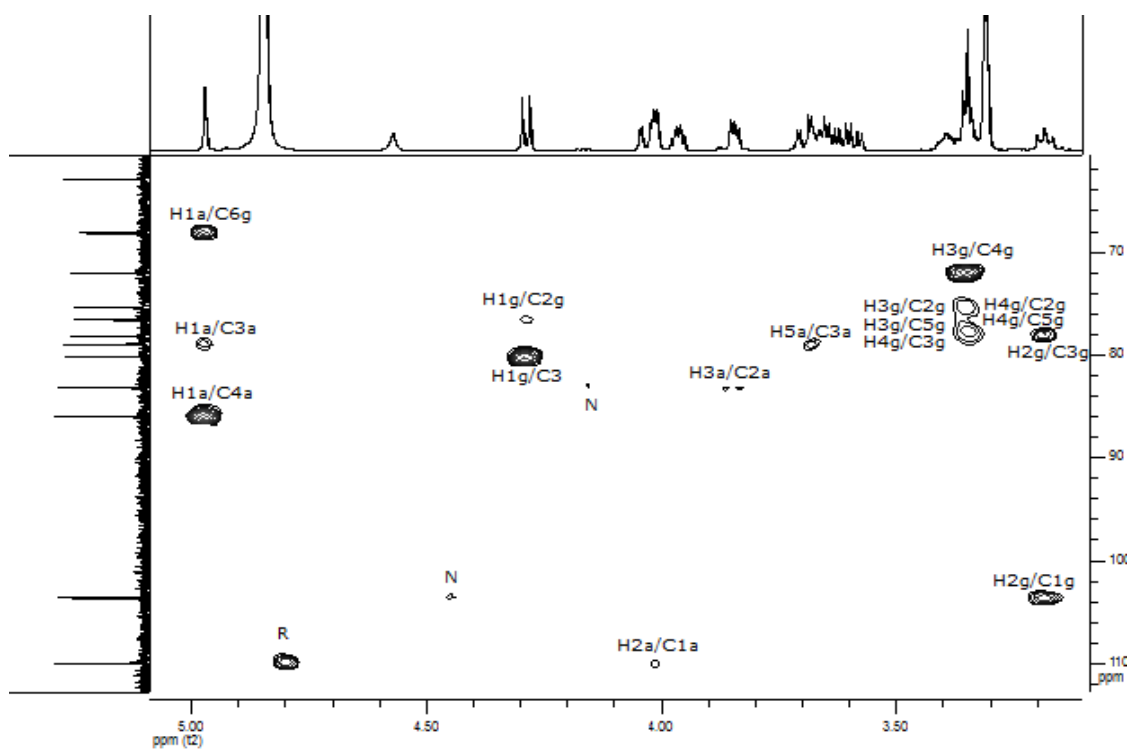
Slika 2.1.68. HSQC spektar jedinjenja 8



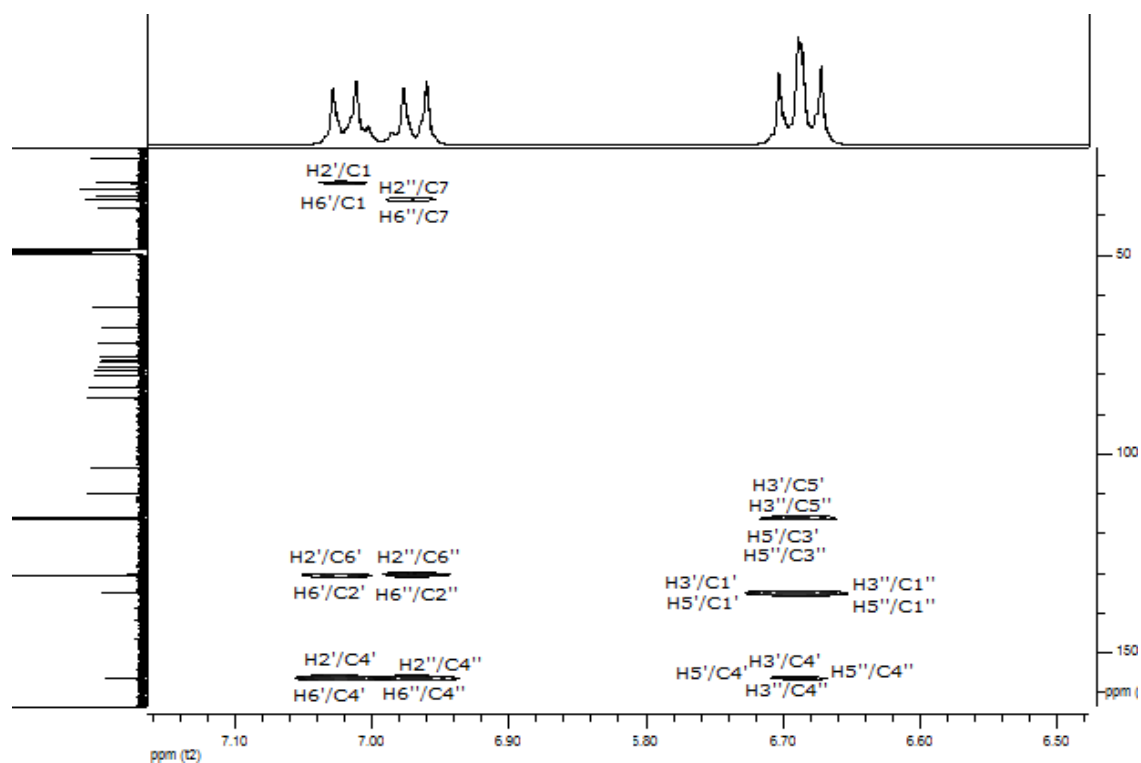
Slika 2.1.69. Korelacije saharidnih i H-3 protona u HSQC spektru jedinjenja **8**



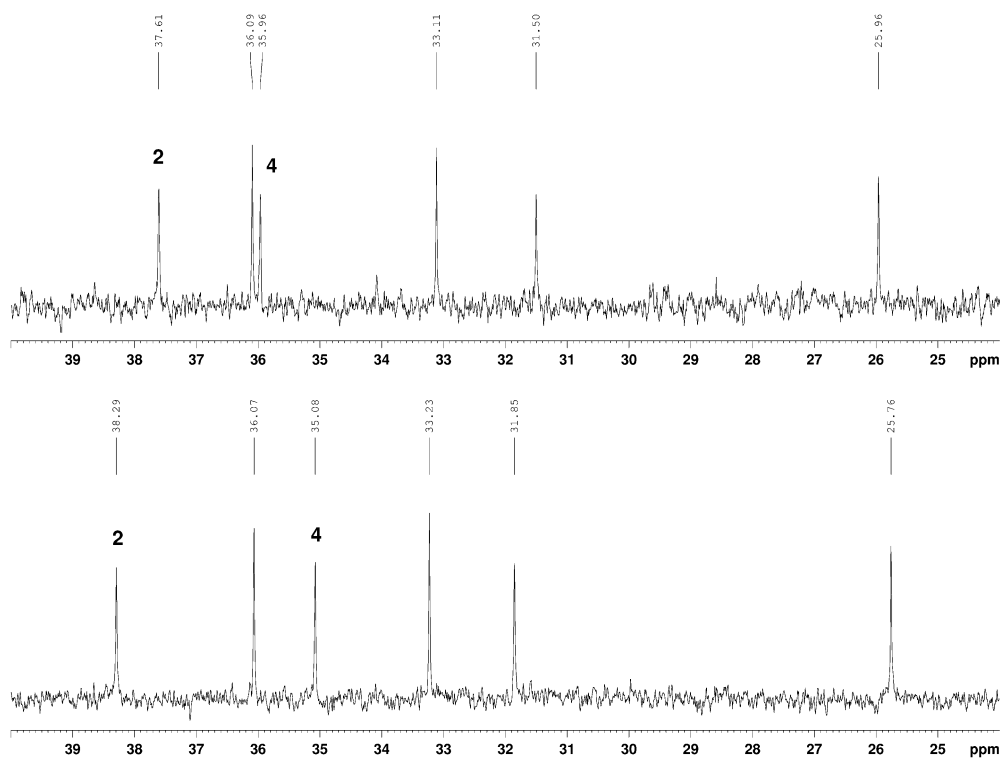
Slika 2.1.70. HMBC korelacije heptanoidnih protona (bez H-3) jedinjenja **8**



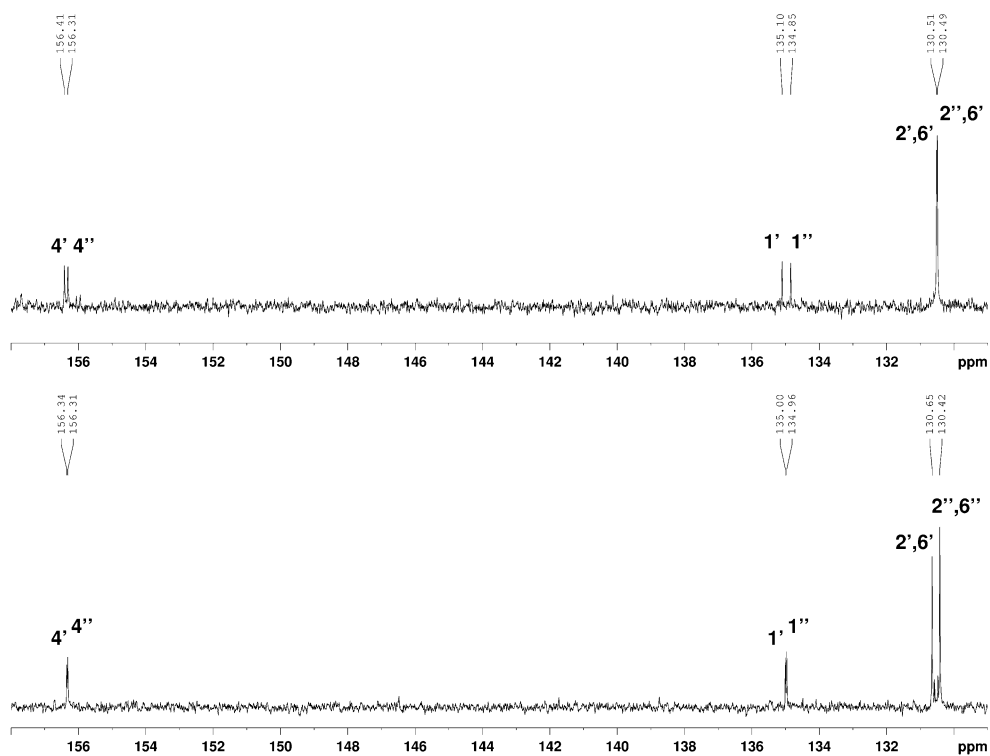
Slika 2.1.71. HMBC korelacije saharidnih protona jedinjenja 8



Slika 2.1.72. HMBC korelacije aromatičnih protona jedinjenja 8



Slika 2.1.73. Heptanoidni deo ^{13}C NMR spektara jedinjenja 7 (gore) i 8 (dole)



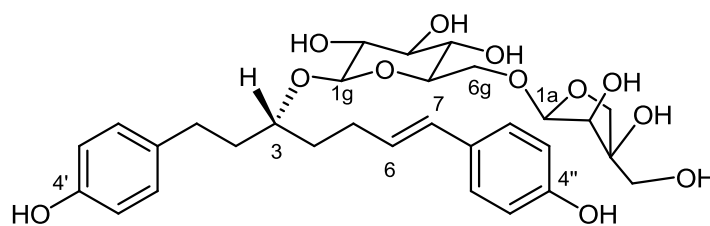
Slika 2.1.74. Aromatični deo ^{13}C NMR spektara jedinjenja 7 (gore) i 8 (dole)

Tabela 2.1.4. ^{13}C i ^1H NMR podaci za jedinjenja 7 i 8

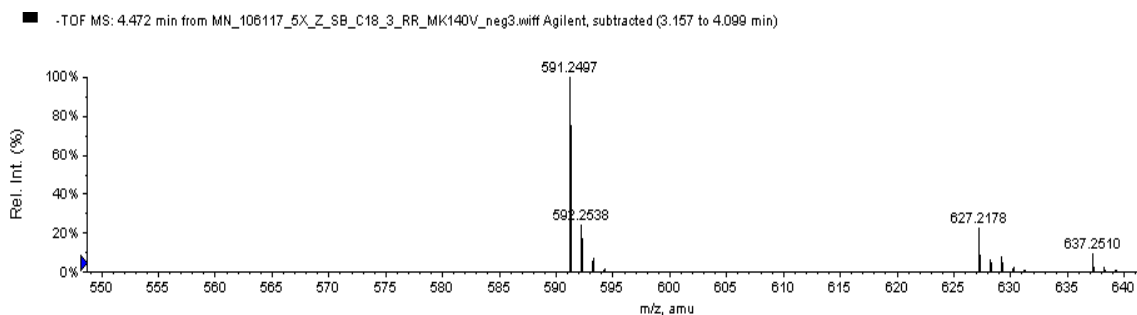
C/H	7		8	
	δ_{C} , tip	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C} , tip	δ_{H} (J u Hz)
1	31,5; CH ₂	2,61 m	31,9; CH ₂	2,60 m
2	37,6; CH ₂	1,77 m	38,3; CH ₂	1,75 m
3	80,4; CH	3,67 t (6,0)	80,2; CH	3,66 m
4	36,0; CH ₂	1,59 m	35,1; CH ₂	1,55 m; 1,61 m
5	26,0; CH ₂	1,40 m	25,8; CH ₂	1,39 m
6	33,1; CH ₂	1,59 m	33,2; CH ₂	1,54 m
7	36,1; CH ₂	2,51 t (7,0)	36,1; CH ₂	2,50 t (7,5)
1'	135,1; C	-	135,0; C	-
2'	130,5; CH	7,02 d (8,5)	130,6; CH	7,02 d (8,5)
3'	116,2; CH	6,68 d (8,5)	116,2; CH	6,69 d (8,5)
4'	156,4; C	-	156,3; C	-
5'	116,2; CH	6,68 d (8,5)	116,2; CH	6,69 d (8,5)
6'	130,5; CH	7,01 d (8,5)	130,6; CH	7,02 d (8,5)
1''	134,9; C	-	135,0; C	-
2''	130,5; CH	7,01 d (8,5)	130,4; CH	6,97 d (8,5)
3''	116,2; CH	6,68 d (8,5)	116,2; CH	6,68 d (8,5)
4''	156,3; C	-	156,3; C	-
5''	116,2; CH	6,68 d (8,5)	116,2; CH	6,68 d (8,5)
6''	130,5; CH	6,99 d (8,5)	130,4; CH	6,97 d (8,5)
	Glc		Glc	
1g	103,9; CH	4,29 d (8,0)	103,7; CH	4,29 d (8,0)
2g	75,5; CH	3,18 dd (8,0; 1,5)	75,4; CH	3,18 dd (8,0; 1,5)
3g	78,3; CH	3,34 m	78,2; CH	3,34 m
4g	72,3; CH	3,34 m	72,1; CH	3,34 m
5g	76,6; CH	3,36 m	76,6; CH	3,39 m
6g	68,3; CH ₂	3,61 m 3,99 m	68,2; CH ₂	3,64 dd (11,0; 5,5) 4,03 dd (11,0; 2,0)
	Arabf		Arabf	
1a	110,0; CH	4,96 d (1,0)	110,0; CH	4,97 d (1,0)
2a	83,2; CH	4,00 m	83,2; CH	4,01 dd (3,5; 1,5)
3a	79,1; CH	3,84 m	79,0; CH	3,84 dd (5,5; 3,5)
4a	86,2; CH	3,96 m	86,1; CH	3,96 m
5a	63,1; CH ₂	3,58 m 3,72 dd (12,0; 3,5)	63,0; CH ₂	3,59 dd (12,0; 5,5) 3,69 dd (12,0; 3,5)

Glc – glukopiranozil grupa; **Arabf** – arabinofuranozil grupa

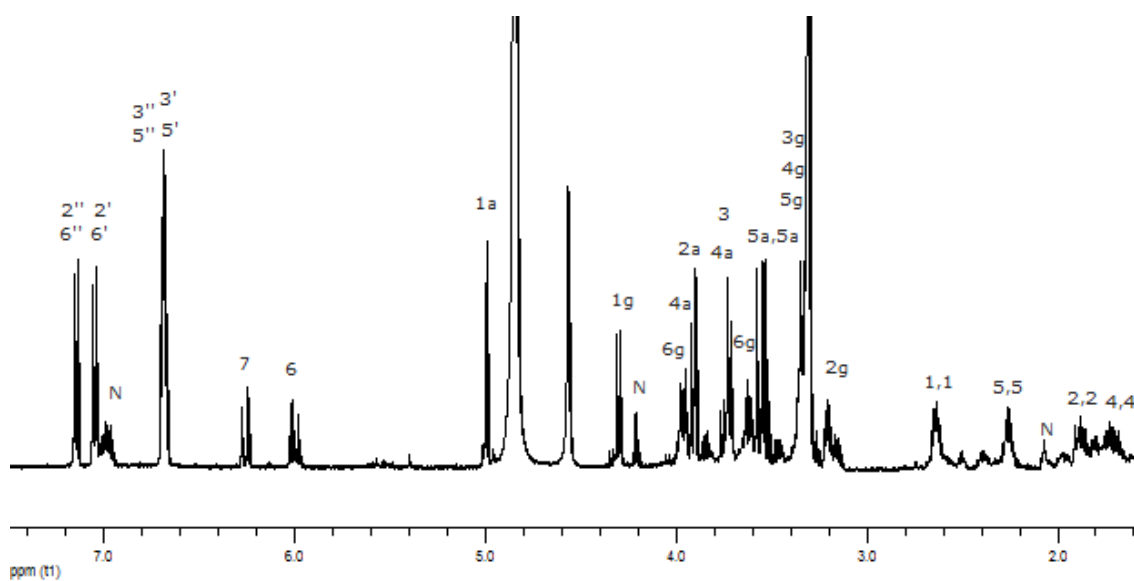
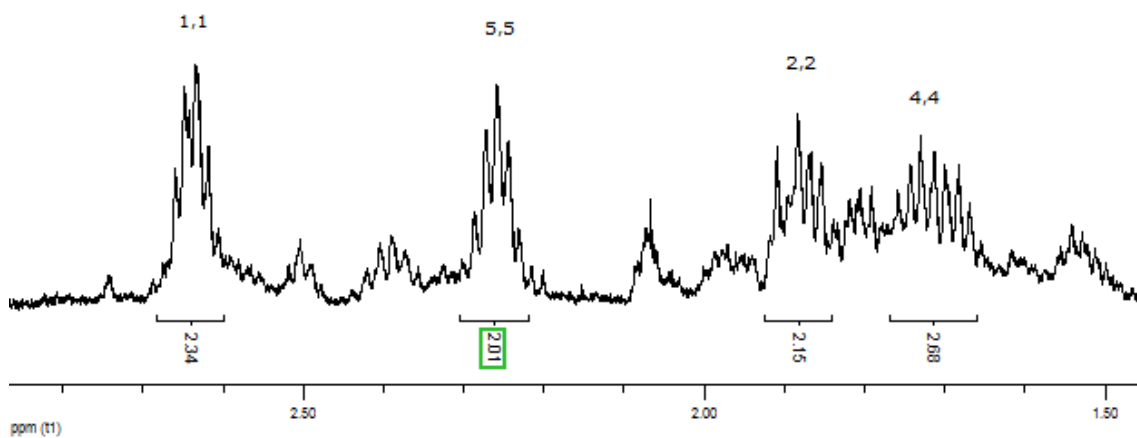
Jedinjenje **9** (Slika 2.1.75) je izolovano u količini od 3 mg. S obzirom na to da nije dobijeno u potpuno čistom stanju nije podvrgnuto ispitivanju biološke aktivnosti. Ipak, NMR spektri su bili dovoljno jasni da se reši struktura ovog jedinjenja. U aromatičnom delu ^1H NMR spektra jedinjenja **9** (Slika 2.1.80) pored signala AA'BB' spinskog sistema protona *p*-hidroksifenil grupa uočeni su triplet na 6,00 ppm i dublet na 6,27 ppm sa vicinalnim konstantama spreznja od 16,0 Hz, što je ukazalo na *E* dvostruku vezu. Činjenica da je signal za proton na 6,27 ppm dublet, a ne neki složeniji multiplet ukazala je na to da nema protona (osim vicinalnog suseda) sa kojim bi se sprezao, što je dovelo do zaključka da je dvostruka veza konjugovana sa jednim od aromatičnih prstenova. HMBC korelacije H-4/C-3,C-5,C-6, H-2/C-3, H-5/C-6, H-2',H-6'/C-1, H-1/C-2',C-6' i H-6,H-7/C-5 (Slike 2.1.83 i 2.1.85) zajedno sa HSQC korelacijama (Slika 2.1.82) ukazale su na Δ^6 dvostruku vezu. Daljom analizom saharidne oblasti ^1H i ^{13}C NMR spektara (Slike 2.1.79 i 2.1.81) i poređenjem sa podacima za jedinjenja **2** i **6** (Slika 2.1.2, Tabele 2.1.1, 2.1.3 i 2.1.5), zaključeno je da se radi o β -D-apiofuranozil- β -D-glukopiranozi i to u položaju 3, što je potvrdila HMBC korelacija H-1g/C-3 (Slika 2.1.84). HR-ESI-MS spektar potvrdio je molekulsku formulu $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_{12}$ na osnovu kvazimolekulskih jona $[\text{M}-\text{H}]^-$ na m/z 591,2497 i $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ na m/z 627,2178 (Slika 2.1.76). *R* konfiguracija na C-3 određena je primenom pravila ^{13}C glikozidacionog pomeranja, jer je poređenjem ^{13}C NMR spektara jedinjenja **9** i rubranola (**20**) uočeno da je $\Delta\delta_{\text{C}4} > \Delta\delta_{\text{C}2}$ ($2,9 > 2,1$) (Slika 2.2.40, Tabele 2.1.5 i 2.2.3). Dodatne OH grupe u položajima 3' i 3'' u odnosu na aglikon ne utiču bitno na δ_{C} za C-2 i C-4 kao ni Δ^6 dvostruka veza na δ_{C} za C-4 u jedinjenju **9**. S obzirom na to da izgled NMR spektara ukazuje na to da jedinjenje **9** nije čisto, $[\alpha]_{\text{D}}$ vrednost nije određena. Kako u literaturi nema podataka o ovom jedinjenju, ono se smatra novim prirodnim proizvodom.

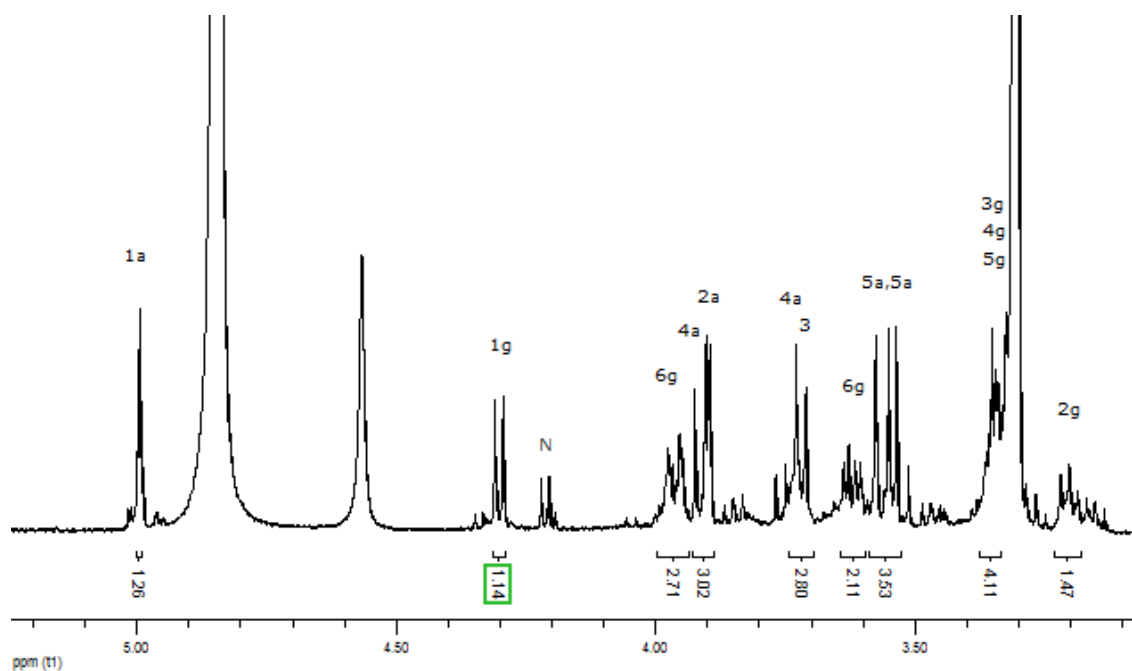


Slika 2.1.75. Strukturna formula jedinjenja **9**

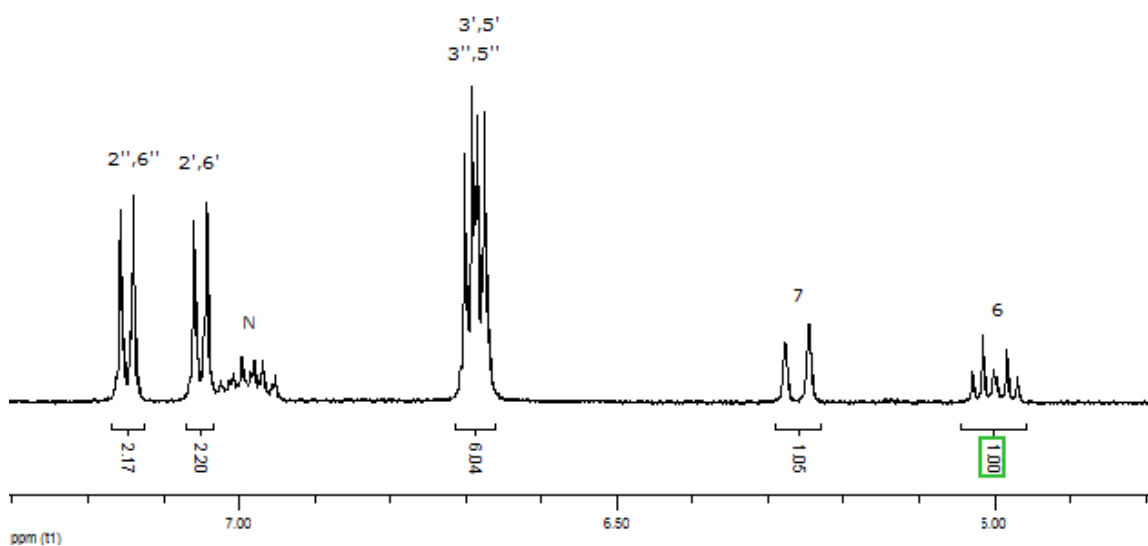


Slika 2.1.76. HR-ESI-MS spektar jedinjenja 9

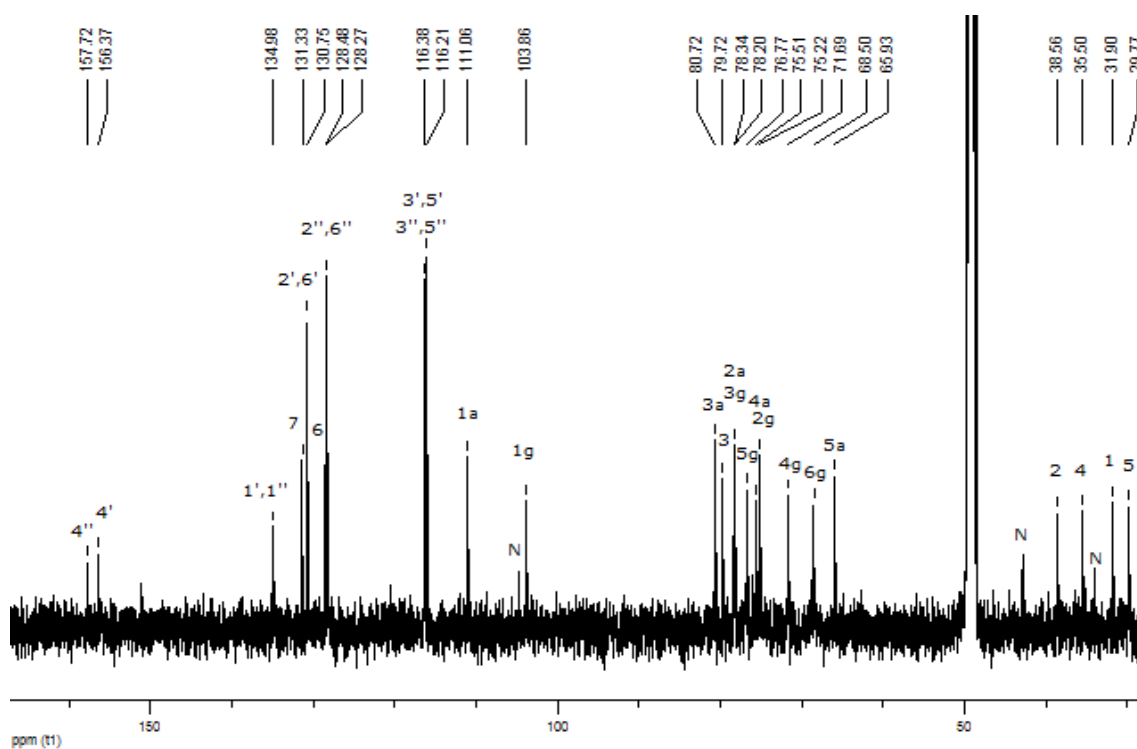
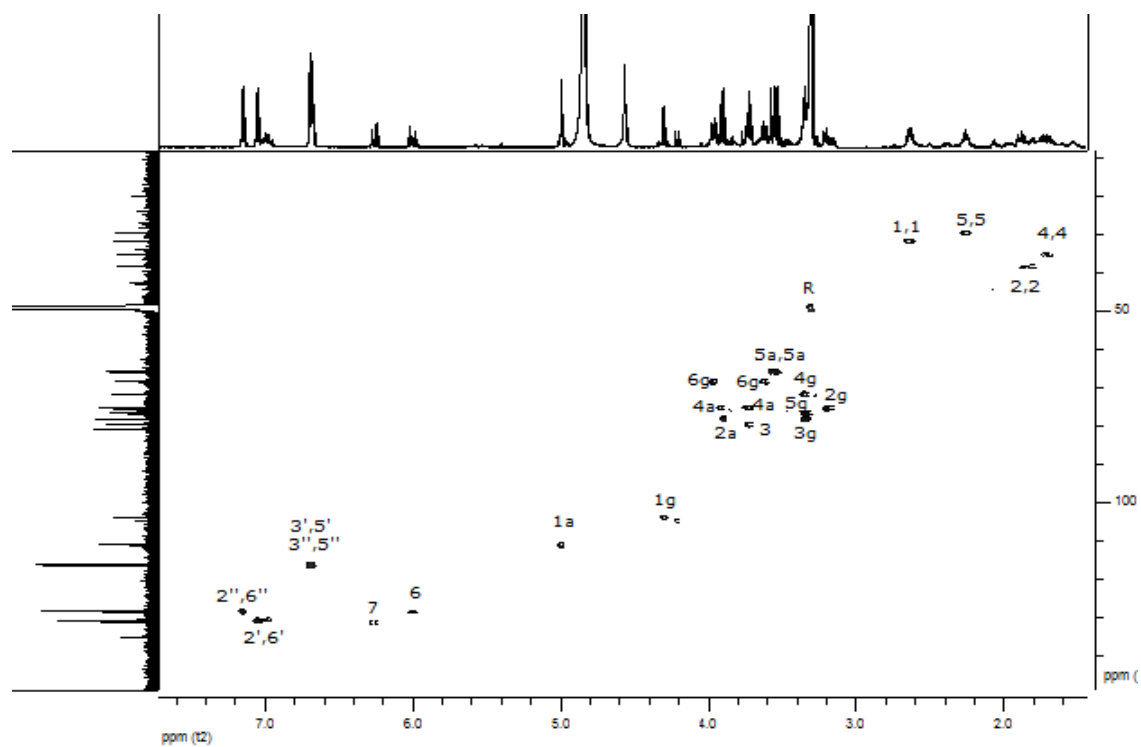
Slika 2.1.77. ^1H NMR spektar jedinjenja 9Slika 2.1.78. Signali protona H₂-1, H₂-2, H₂-4 i H₂-5 u ^1H NMR spektru jedinjenja 9



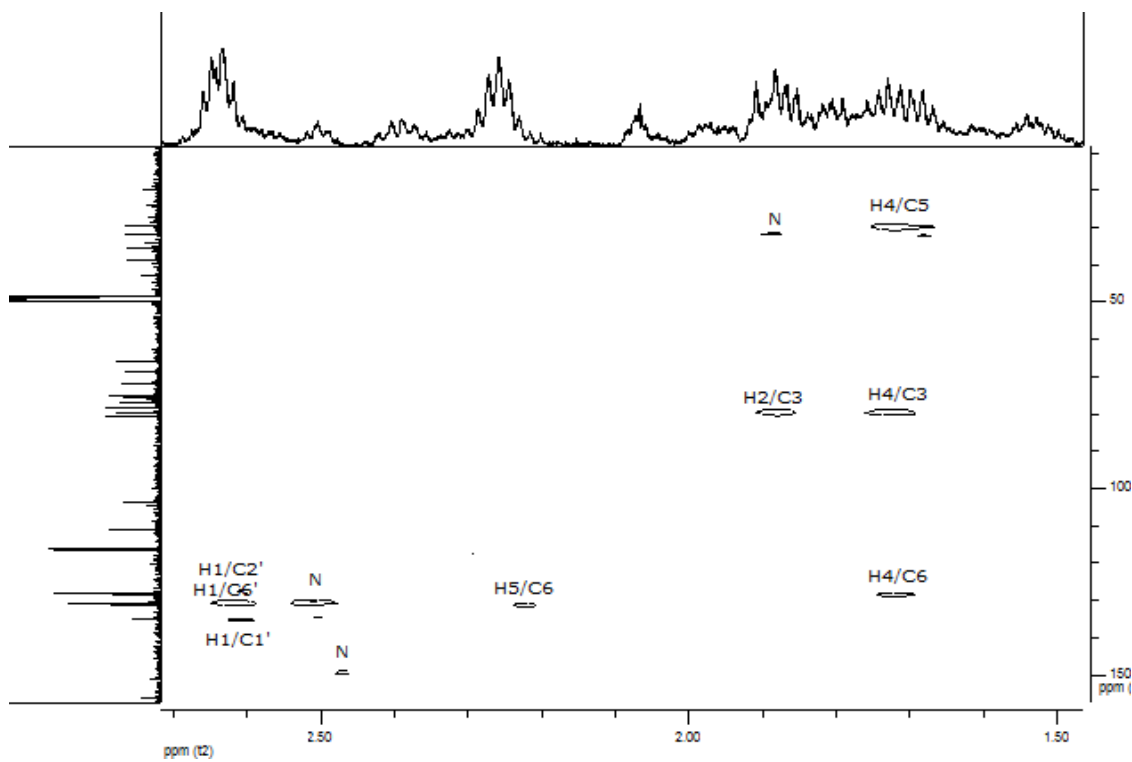
Slika 2.1.79. Signali saharidnih i H-3 protona u ^1H NMR spektru jedinjenja **9**



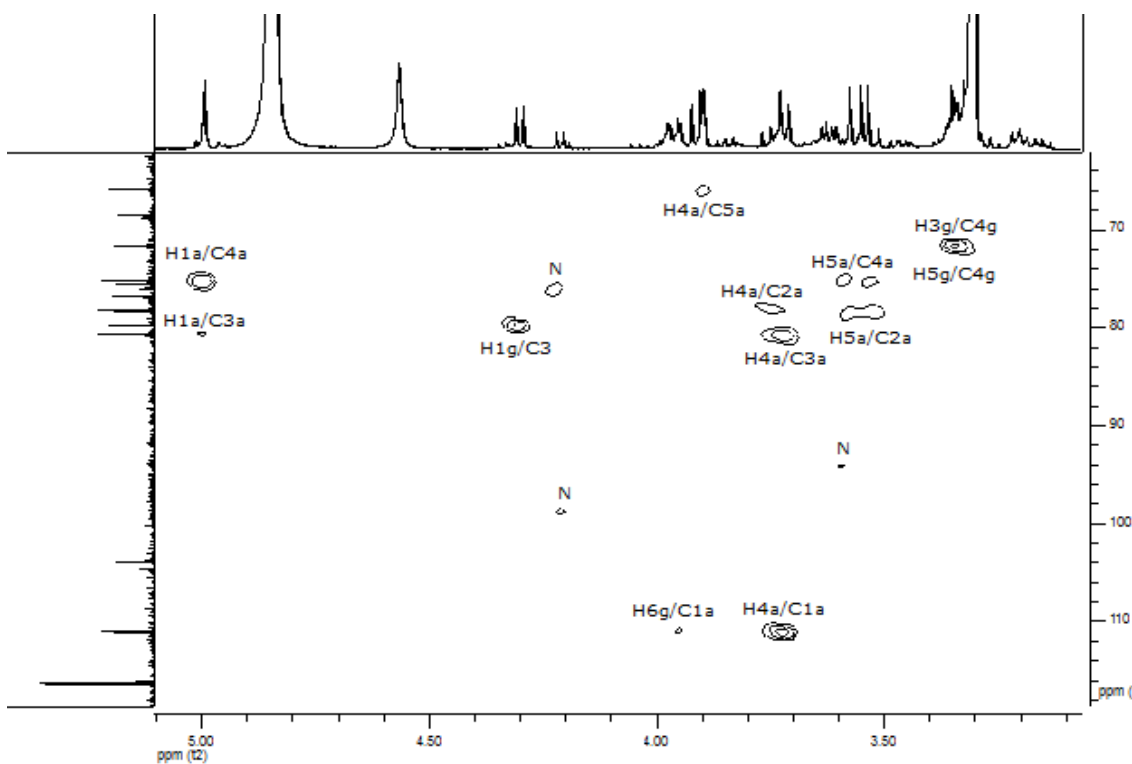
Slika 2.1.80. Signali aromatičnih, H-6 i H-7 protona u ^1H NMR spektru jedinjenja **9**

Slika 2.1.81. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 9

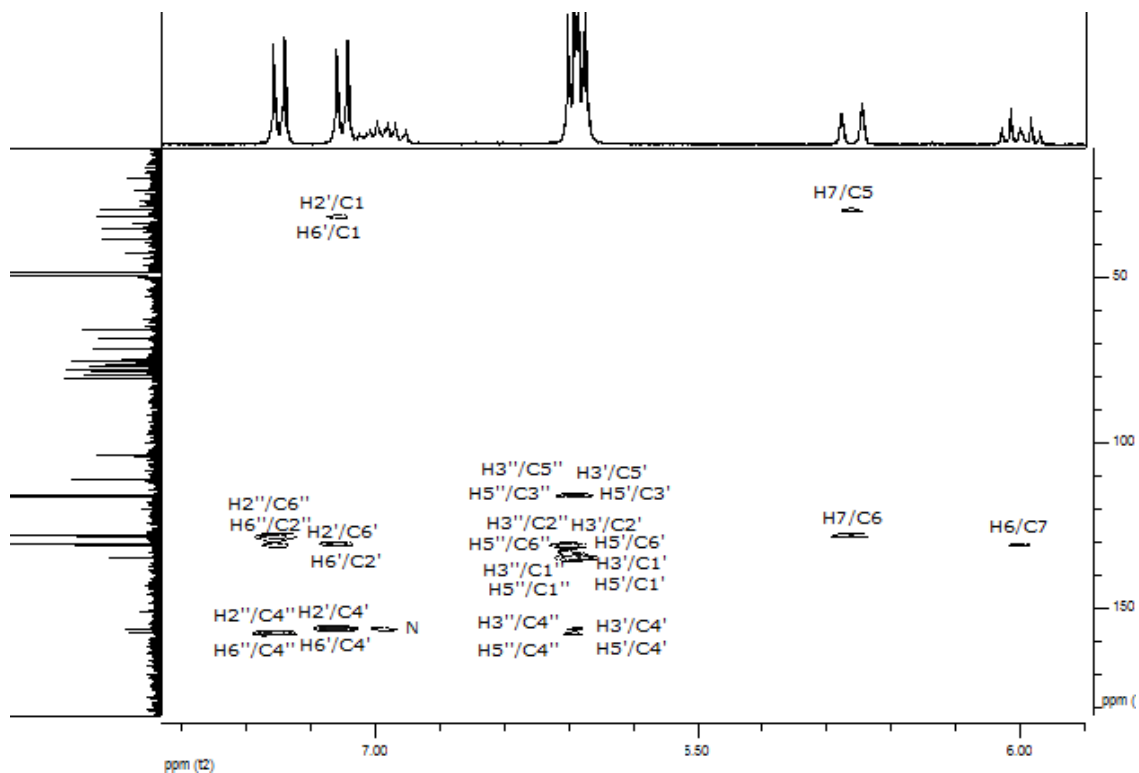
Slika 2.1.82. HSQC spektar jedinjenja 9



Slika 2.1.83. HMBC korelacije heptanoidnih protona (bez H-3, H-6 i H-7) jedinjenja 9



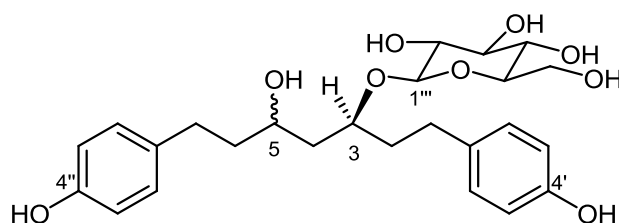
Slika 2.1.84. HMBC korelacije saharidnih protona jedinjenja 9



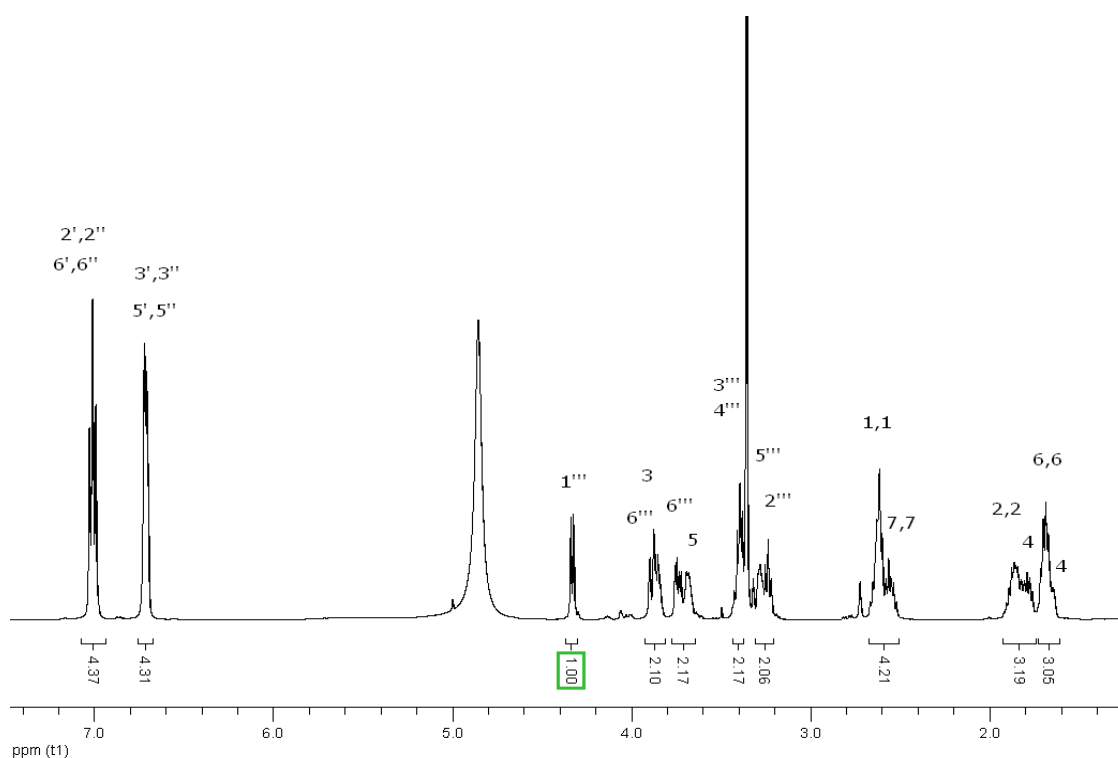
Slika 2.1.85. HMBC korelacije aromatičnih i olefinskih protona jedinjenja **9**

Jedinjenje **10** (Slika 2.1.86) izolovano je u količini od 8 mg. Na osnovu analize ^1H i ^{13}C NMR spektara (Slike 2.1.87 i 2.1.88) i poređenja sa NMR podacima već izolovanog acerozida VII (**5**) (Slika 2.1.35), zaključeno je da se radi o diarilheptanoidu sa β -D-glukopiranozom. U ^{13}C NMR spektru (Slika 2.1.88), 5 signala u oblasti ispod 45 ppm potiče od metilenskih ugljenika heptanskog niza, dok je 8 signala u saharidnoj oblasti ukazalo na postojanje dva kiseonična supstituenta na heptanskom nizu. Jedan od njih je D-glukopiranoza, a drugi OH grupa, što se ispostavilo na osnovu razlike u masi za 16 jedinica u odnosu na acerozid (**5**) i činjenice da dodatnih signala u ^1H NMR spektru (Slika 2.1.87) nije bilo. Ovo je potvrđeno HR-ESI-MS spektrom i kvazi-molekulskim jonima $[\text{M}-\text{H}]^-$ na m/z 477,2130 i $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ na m/z 513,1891, tj. dobijenom molekulskom formulom $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_9$. Konstanta sprežanja od 7,8 Hz za dublet anomernog protona H-1'' na 4,31 ppm ukazala je na β -konfiguraciju D-glukopiranoze. Raspored hidroksilne i β -D-glukopiranozne grupe ustanovljen je na osnovu HMBC korelacija H-1'', H-1, H-2/C-3, H-1, H-2/C-1' i H-4, H-6/C-5 (Slike 2.1.90 i 2.1.91), tako da je u položaju 3 β -D-glukopiranoza, a u položaju 5 OH grupa. HSQC i ostale HMBC korelacije (Slike 2.1.89-2.1.92) su, zajedno sa literaturnim podacima⁴⁶, potvrdile

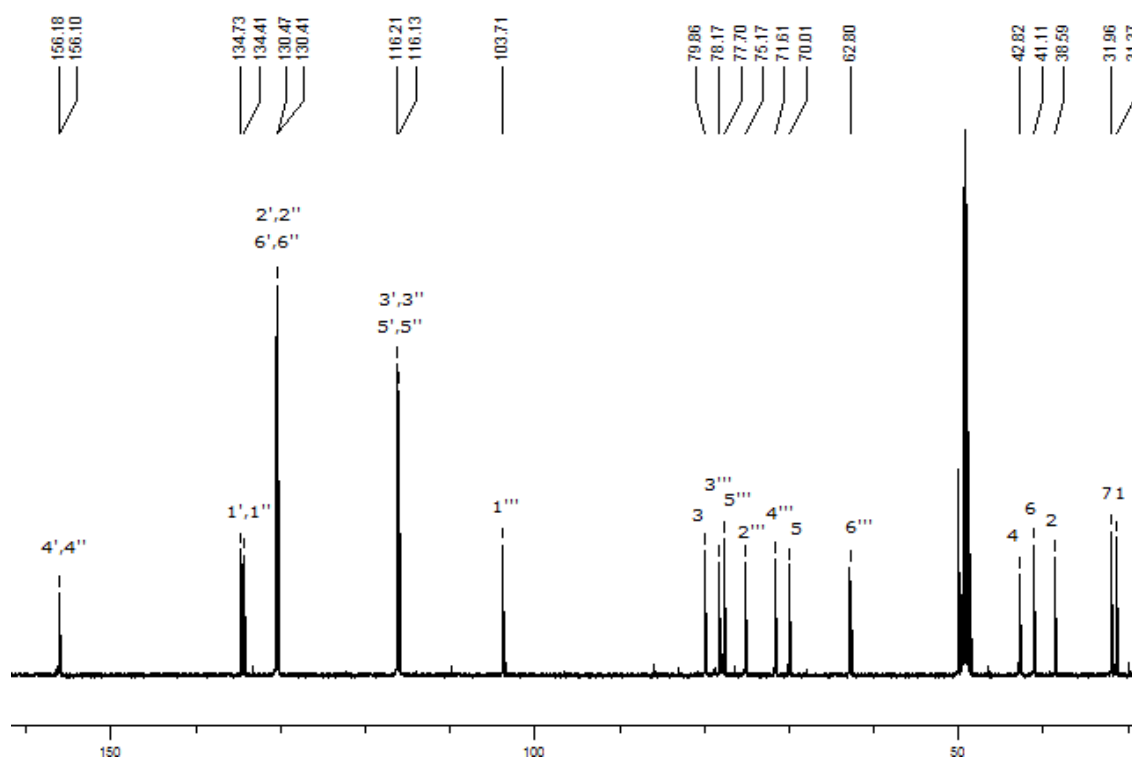
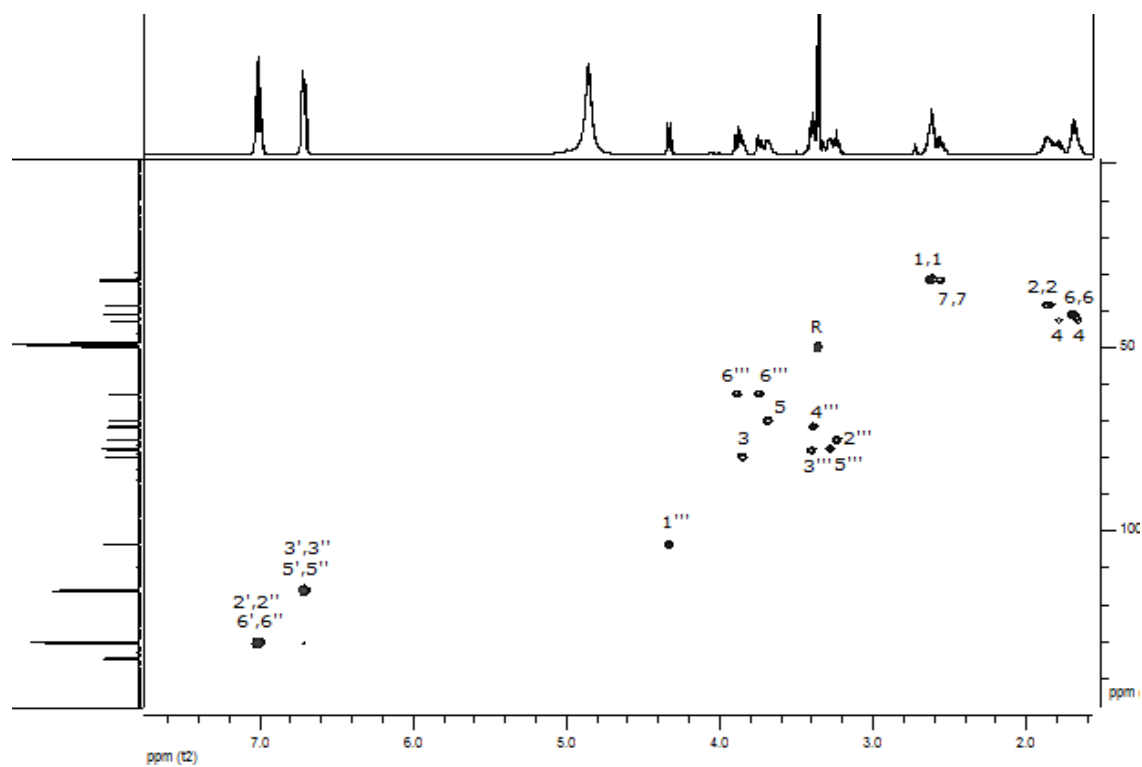
strukturu 1,7-bis-(4-hidroksifenil)-5-hidroksi-heptan-3-*O*- β -D-glukopiranozida (**Slika 2.1.86**). Prilikom određivanja konfiguracija na C-3 i C-5 došlo je do kontradiktornosti sa literaturnim podacima⁴⁶: na osnovu ^{13}C NMR spektara potpuno poklapanje je bilo sa 3*S*,5*S* izomerom, a na osnovu $[\alpha]_{\text{D}}$ vrednosti izmerene u metanolu poklapanje je bilo sa 3*S*,5*R* izomerom (eksp. +5,0, lit. +4,4) tako da je sigurna jedino konfiguracija 3*S*.



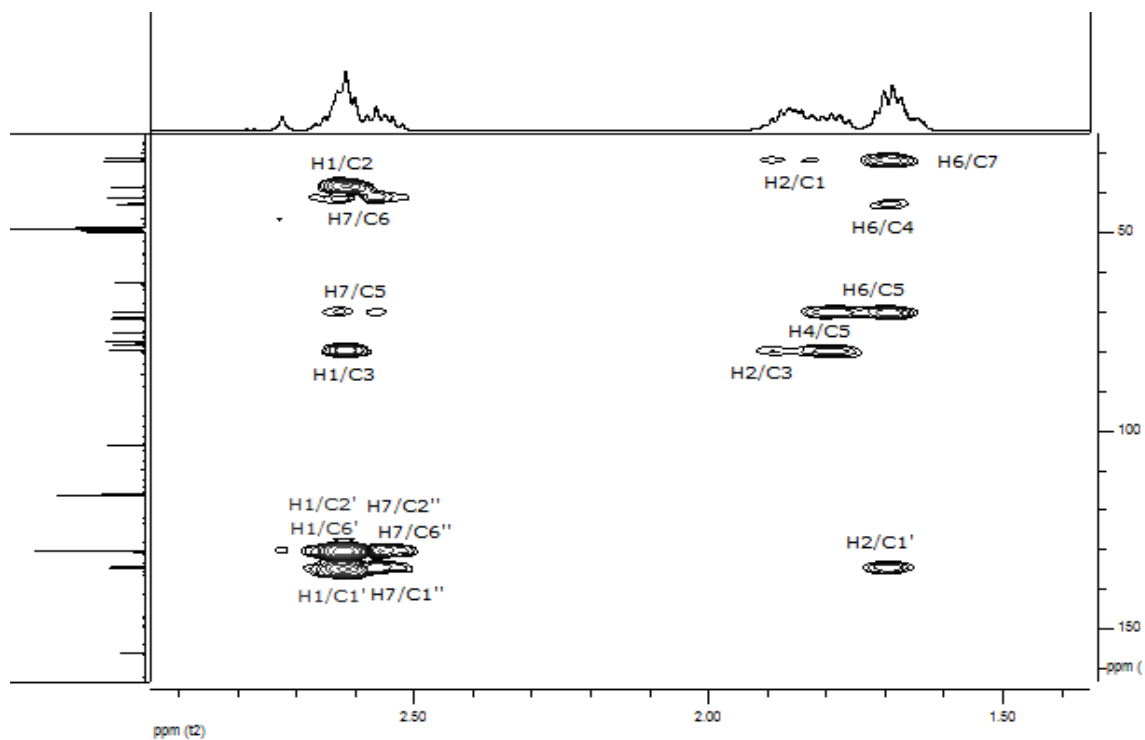
Slika 2.1.86. Strukturna formula jedinjenja **10**



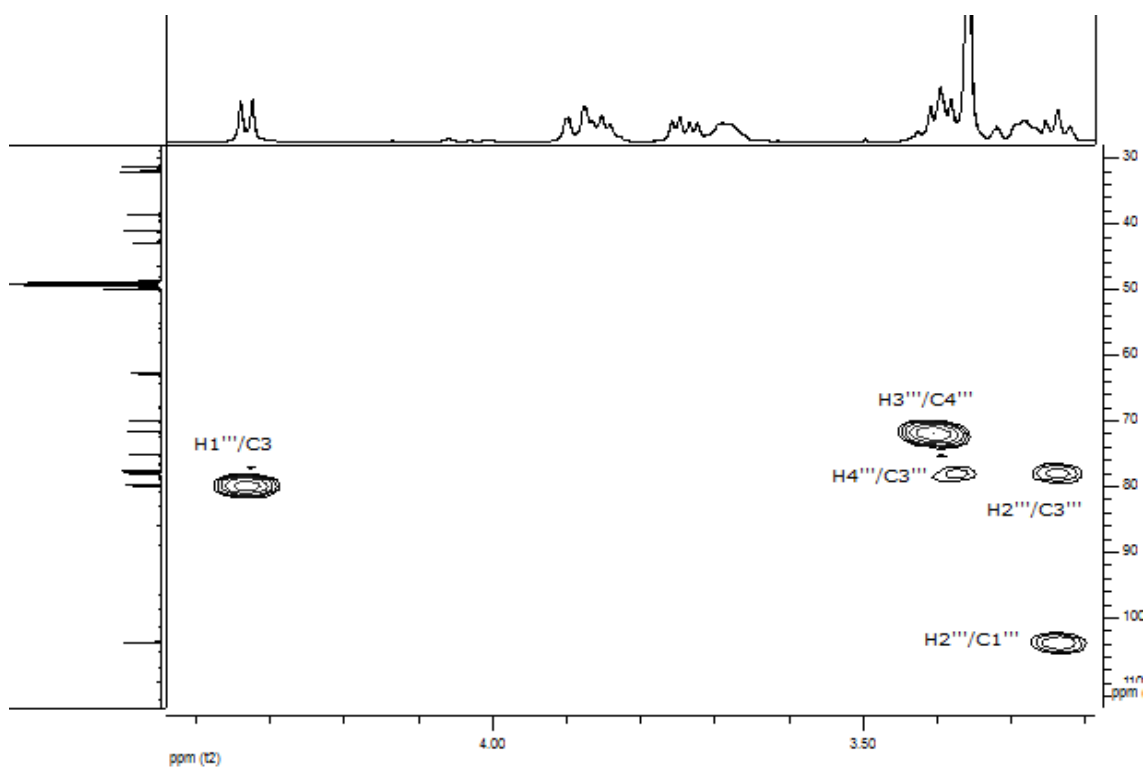
Slika 2.1.87. ^1H NMR spektar jedinjenja **10**

Slika 2.1.88. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 10

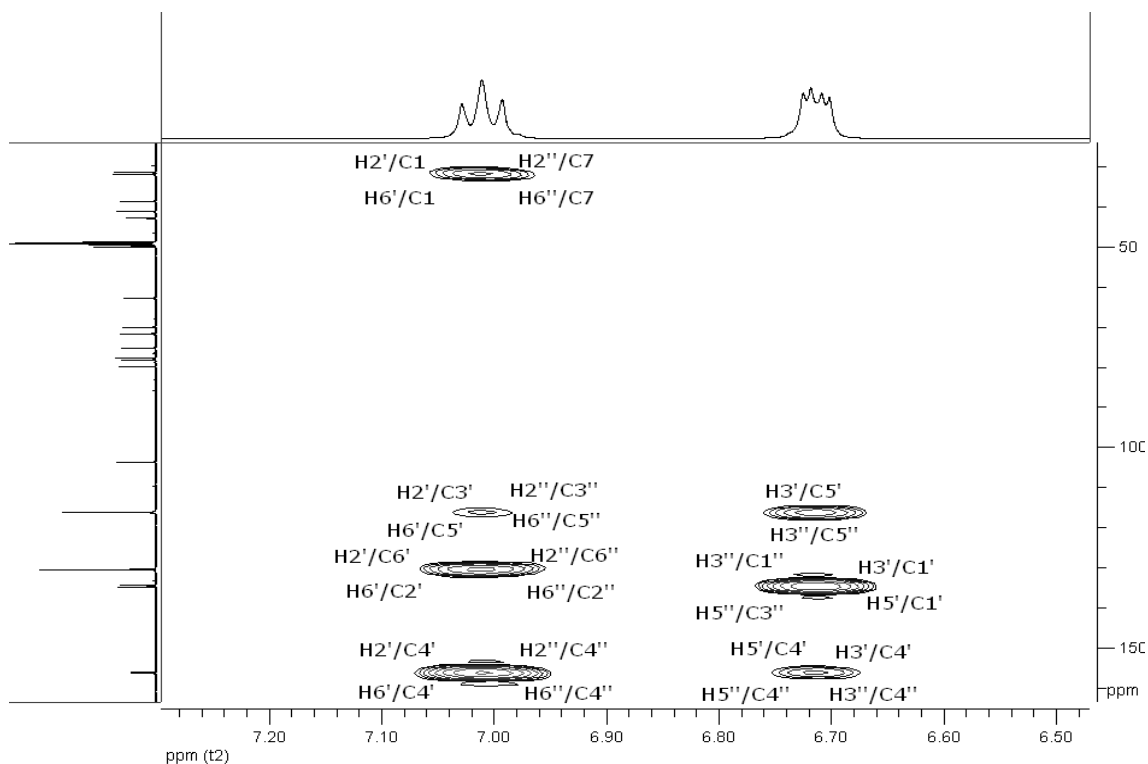
Slika 2.1.89. HSQC spektar jedinjenja 10



Slika 2.1.90. HMBC korelacije heptanoidnih (bez H-3 i H-5) protona jedinjenja **10**



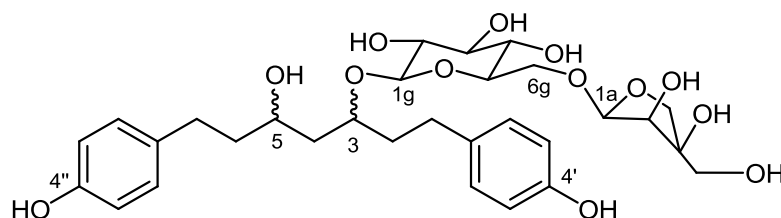
Slika 2.1.91. HMBC korelacije saharidnih protona jedinjenja **10**



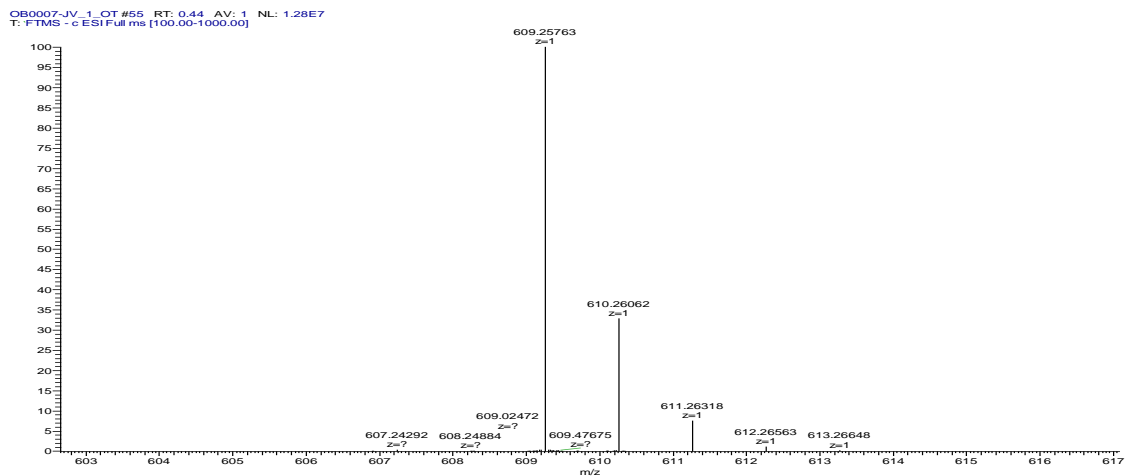
Slika 2.1.92. HMBC korelacije aromatičnih protona jedinjenja **10**

Jedinjenje **11** (**Slika 2.1.93**) je izolovano u količini od 12 mg. Molekulska formula $C_{30}H_{42}O_{13}$ je dobijena iz HR-ESI-MS spektra (**Slike 2.1.94** i **2.1.95**) na osnovu kvazimolekuskog jona $[M-H]^-$ na m/z 609,2576. Na osnovu analize 1H i ^{13}C NMR spektara (**Slike 2.1.96-2.1.98**) i poređenja sa NMR podacima za acerozid VIII (**6**) (**Slika 2.1.42**), zaključeno je da se radi o diarilheptanoidu sa dve monosaharidne jedinice. U ^{13}C NMR spektru 5 signala u oblasti ispod 45 ppm potiče od 5 metilenskih grupa, i zajedno sa 13 signala u saharidnoj oblasti ukazalo je na postojanje dva kiseonična supstituenta na heptanskom nizu (**Slika 2.1.98**). HMBC korelacije H-1g,H-1,H-2,H-4/C-3, H-2',H-6'/C-1, H-4,H-6,H-7/C-5 (**Slike 2.1.100-2.1.102**) ukazale su na to da je jedan supstituent disaharidna jedinica u položaju 3, a drugi OH grupa u položaju 5. Kako je saharidni deo ^{13}C NMR spektra veoma sličan saharidnom delu ^{13}C NMR spektra jedinjenja **2** i **6** (**Slika 2.1.2**) i kako je jedina razlika pojava signala na 70,0 ppm, zaključeno je da je disaharidna jedinica ista kao u jedinjenjima **2** i **6** - β -D-apiofuranozil- β -D-glukopiranoza. To potvrđuje i velika sličnost saharidnih delova 1H NMR i HMBC spektara sa onim za jedinjenja **2** i **6** (**Slike 2.1.13, 2.1.18, 2.1.44** i **2.1.49**), kao i fragmentacioni joni $[M-Api]^-$ na m/z 477,3594 i $[M-GlcApi]^-$ na m/z 315,2960 iz HR-

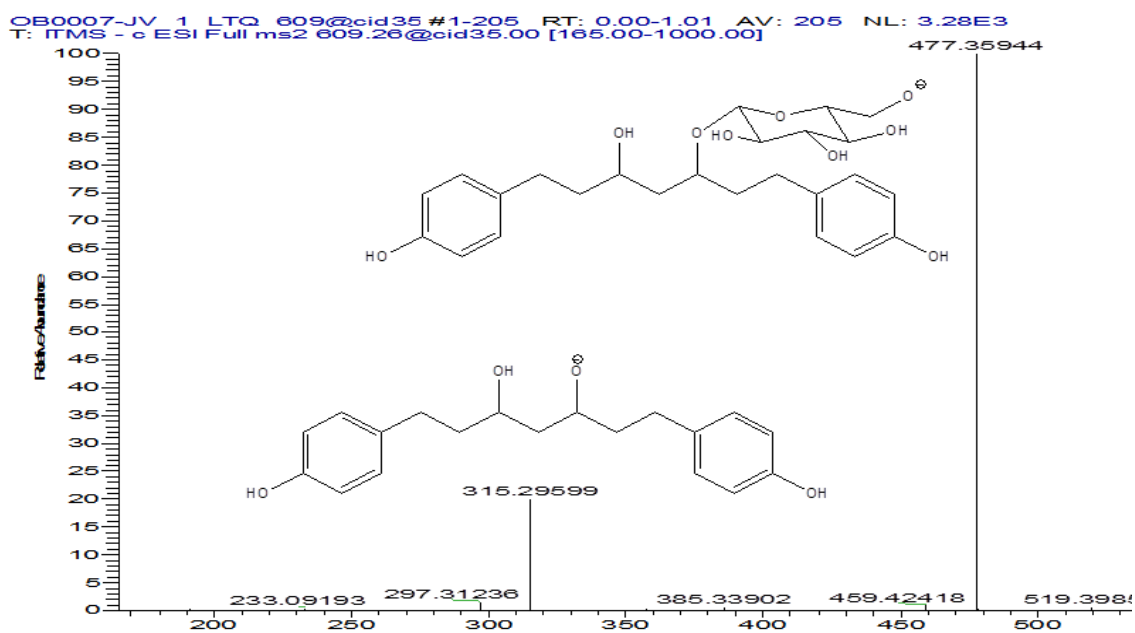
ESI-MS spektra jedinjenja **11** (Slika 2.1.95). Konstanta spreznja od 2,5 Hz dubleta anomernog vodonika na 5,01 ppm u ^1H NMR spektru potiče od β -konfiguracije D-apiofuranoze, a konstanta spreznja od 8,0 Hz dubleta drugog anomernog vodonika na 4,27 ppm od β -konfiguracije D-glukopiranoze (Slika 2.1.97). HMBC korelacije aromatičnih protona su karakteristične za AA'BB' spinski sistem (Slika 2.1.102). HSQC spektar je dat na Slici 2.1.99 i dodatna je potvrda pretpostavljene strukture. $[\alpha]_D$ vrednost za ovo jedinjenje iznosi -48,0. Konfiguracije na C-3 i C-5 nisu utvrđene. Kako nema podataka u literaturi o ovom jedinjenju, 1,7-bis-(4-hidroksifenil)-5-hidroksiheptan-3-O- β -D-apiofuranozil(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopiranozidu, ono predstavlja novi prirodni proizvod.



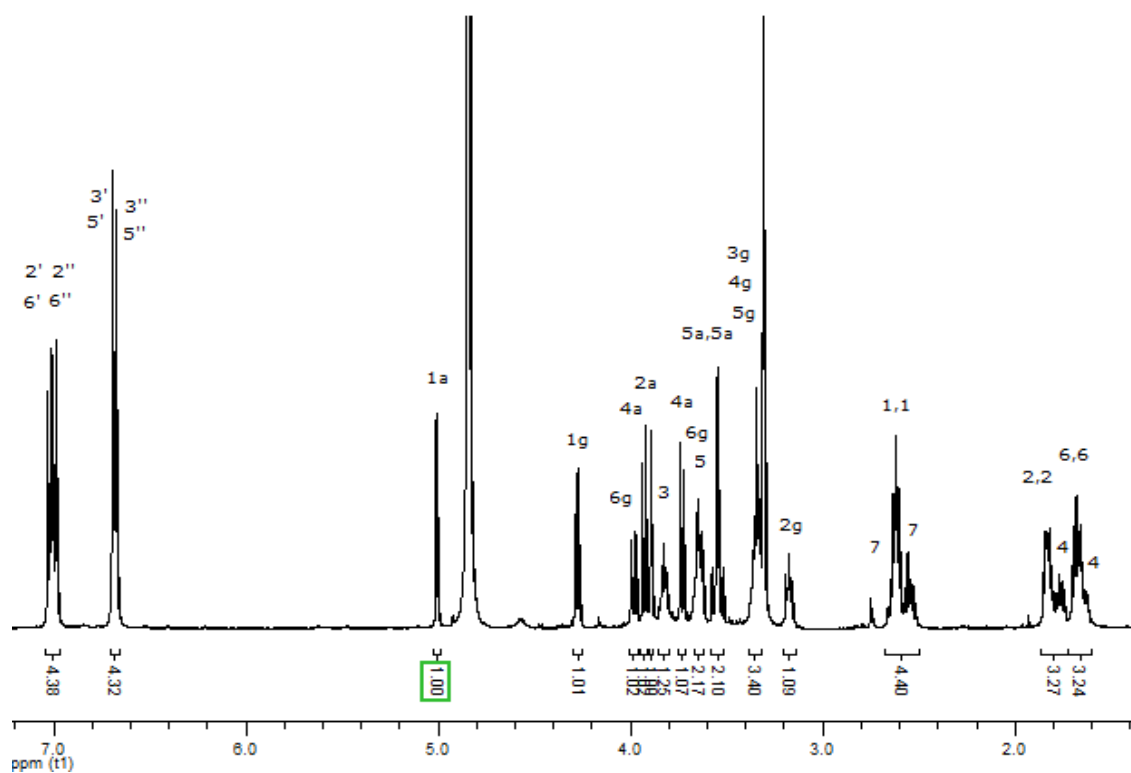
Slika 2.1.93. Strukturna formula jedinjenja **11**

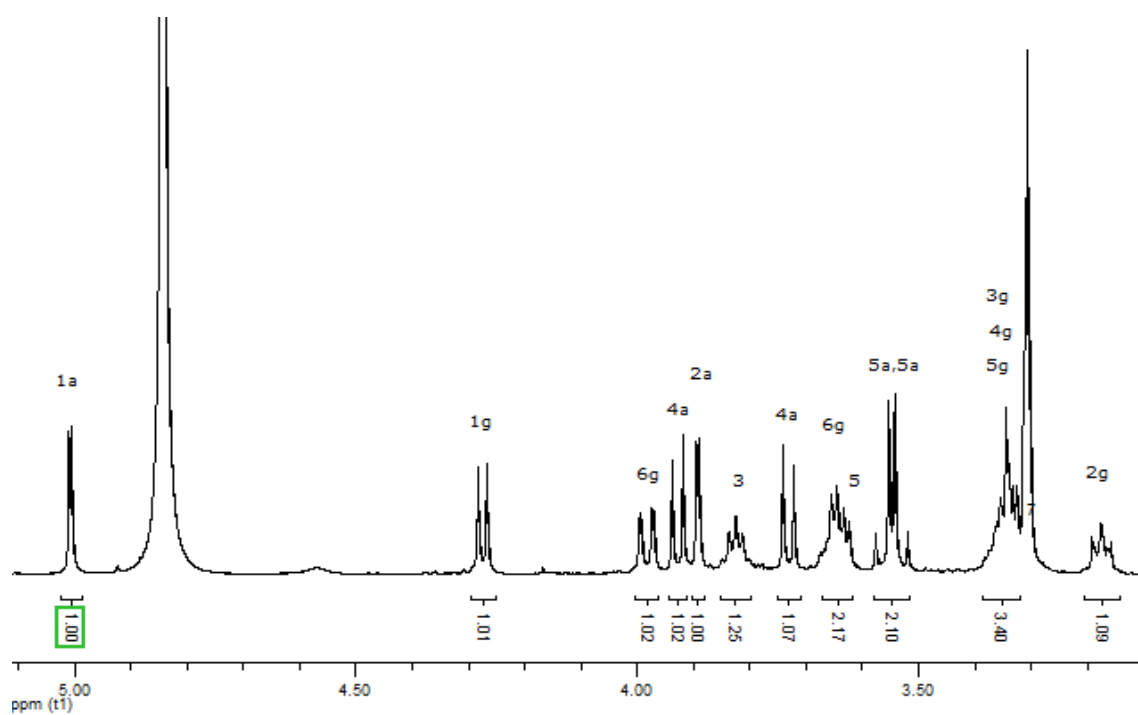


Slika 2.1.94. MS spektar jedinjenja **11**

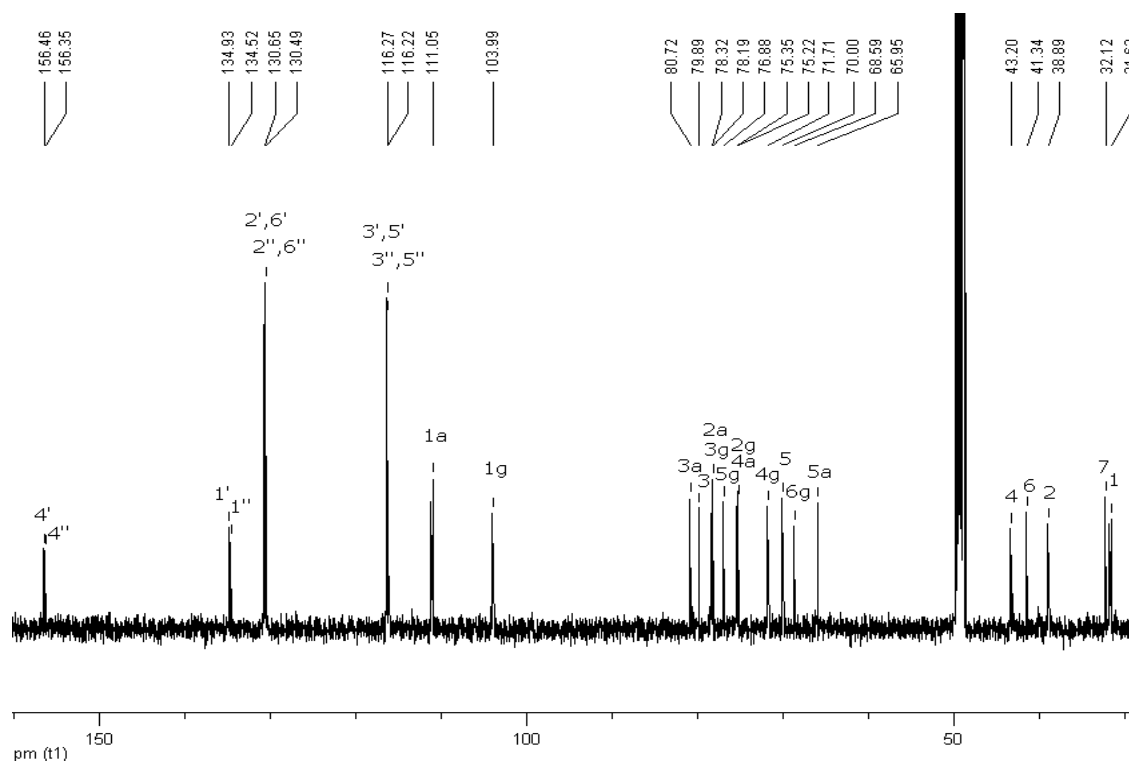


Slika 2.1.95. Fragmentacioni joni iz MS spektra jedinjenja 11

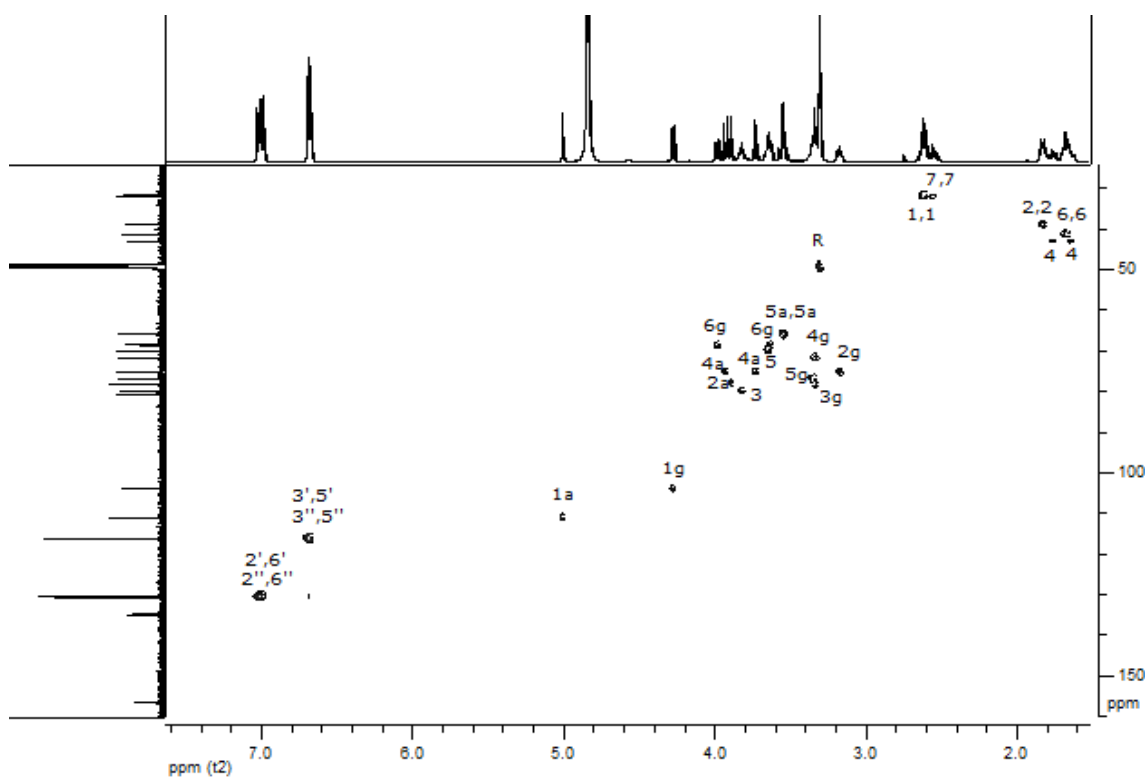
Slika 2.1.96. ^1H NMR spektar jedinjenja 11



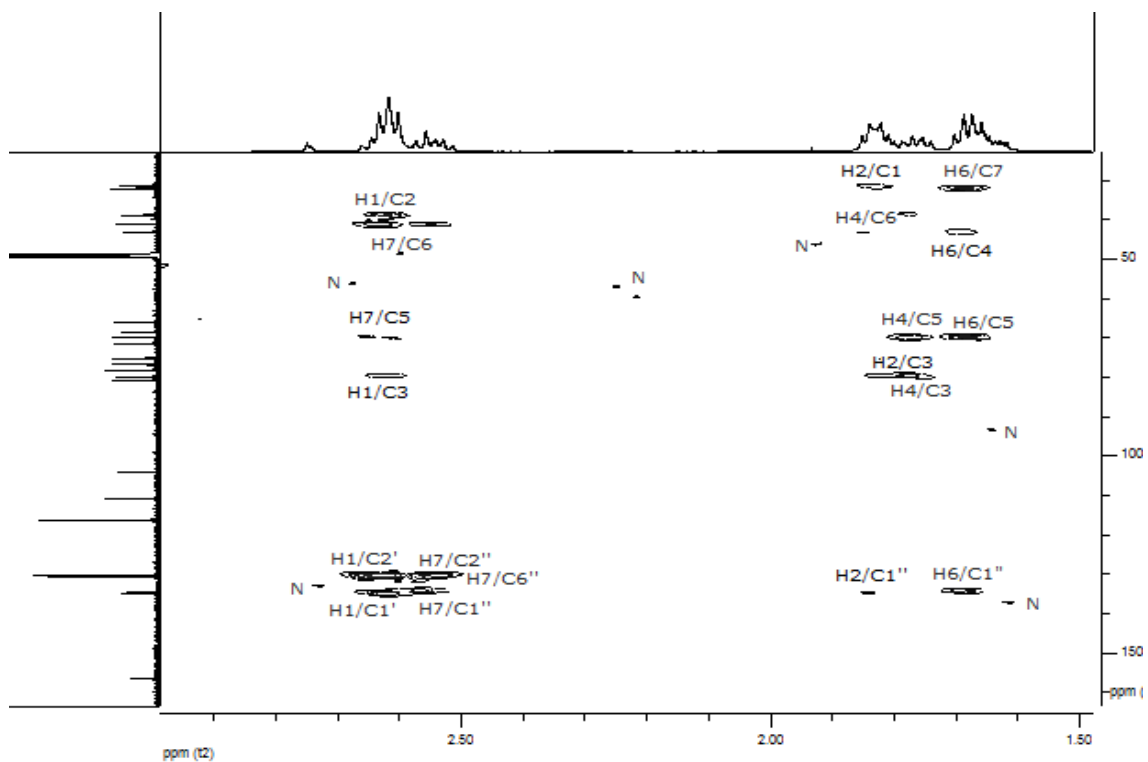
Slika 2.1.97. Signali saharidnih, H-3 i H-5 protona u ^1H NMR spektru jedinjenja 11



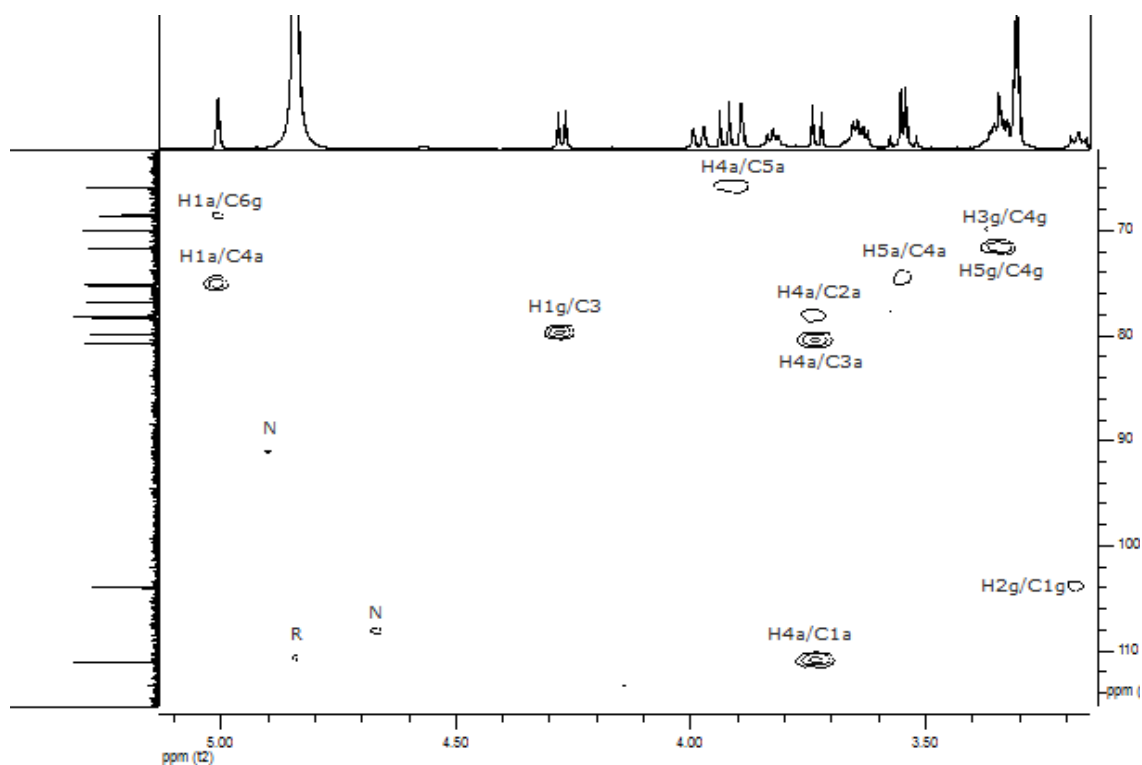
Slika 2.1.98. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 11



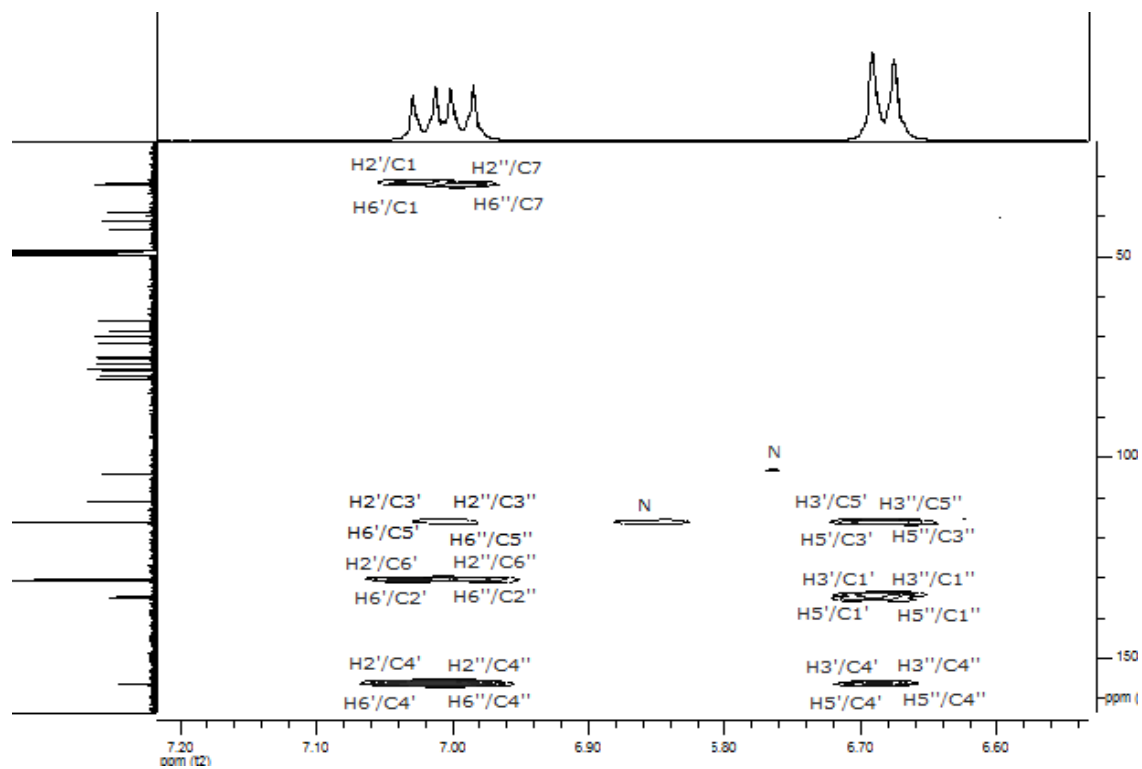
Slika 2.1.99. HSQC spektar jedinjenja 11



Slika 2.1.100. HMBC korelacije heptanoidnih protona (bez H-3 i H-5) jedinjenja 11



Slika 2.1.101. HMBC korelacije saharidnih protona jedinjenja 11



Slika 2.1.102. HMBC korelacije aromatičnih protona jedinjenja 11

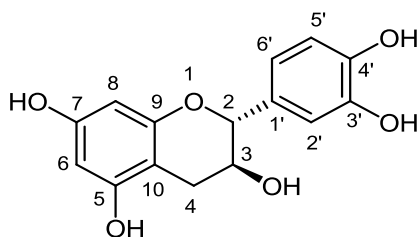
Tabela 2.1.5. NMR podaci za jedinjenja **9**, **10** i **11** (CD₃OD)

C/H	9		10		11	
	δ_C , tip	δ_H (J u Hz)	δ_C , tip	δ_H (J u Hz)	δ_C , tip	δ_H (J u Hz)
1	31,9; CH ₂	2,64 m	31,4; CH ₂	2,62 t (7,5)	31,6; CH ₂	2,62 t (7,5)
2	38,6; CH ₂	1,87 m	38,6; CH ₂	1,86 m	38,9; CH ₂	1,83 m
3	79,7; CH	3,73 m	79,9; CH	3,87 qui	79,9; CH	3,83 m
4	35,5; CH ₂	1,71 m	42,8; CH ₂	1,67 m; 1,79 m	43,2; CH ₂	1,63 m; 1,75 m
5	29,8; CH ₂	2,26 dd (7,5; 7,0)	70,0; CH	3,69 m	70,0; CH	3,63 m
6	128,5; CH	6,00 dt (16,0; 7,0)	41,1; CH ₂	1,70 q	41,3; CH ₂	1,67 m
7	131,3; CH	6,26 d (16,0)	32,0; CH ₂	2,55 m; 2,62 m	32,1; CH ₂	2,54 m; 2,62 m
1'	135,0; C	-	134,7; C	-	134,9; C	-
2'	130,8; CH	7,05 d (8,5)	130,5; CH ^b	7,02 d (9,0)	130,7; CH ^b	7,02 d (8,5)
3'	116,4; CH ^a	6,68 d (8,5)	116,2; CH ^a	6,72 d (8,0) ^a	116,3; CH ^a	6,67 d (8,5)
4'	156,4; C	-	156,2; C	-	156,5; C	-
5'	116,4; CH ^a	6,68 d (8,5)	116,2; CH ^a	6,72 d (8,0) ^a	116,3; CH ^a	6,67 d (8,5)
6'	130,8; CH	7,05 d (8,5)	130,5; CH ^b	7,02 d (9,0)	130,7; CH ^b	7,02 d (8,5)
1''	135,0; C	-	134,4; C	-	134,5; C	-
2''	128,3; CH	7,15 d (8,5)	130,4; CH ^b	6,99 d (9,0)	130,5; CH ^b	6,99 d (8,5)
3''	116,2; CH ^a	6,69 d (8,5)	116,1; CH ^a	6,71 d (8,0) ^a	116,2; CH ^a	6,67 d (8,5)
4''	157,7; C	-	156,1; C	-	156,3; C	-
5''	116,2; CH ^a	6,69 d (8,5)	116,1; CH ^a	6,71 d (8,0) ^a	116,2; CH ^a	6,67 d (8,5)
6''	128,3; CH	7,15 d (8,5)	130,4; CH ^b	6,99 (9,0)	130,5; CH ^b	6,99 d (8,5)
		Glep		Glep		Glep
1'''	103,9; CH	4,30 d (7,5)	103,7; CH	4,33 (8,0)	104,0; CH	4,27 d (8,0)
2'''	75,5; CH	3,20 dd (9,0; 1,5)	75,2; CH	3,23 t (8,5)	75,4; CH	3,17 m
3'''	78,3; CH	3,34 m	78,2; CH	3,40 t (7,0)	78,3; CH	3,33 m ^c
4'''	71,7; CH	3,35 m	71,6; CH	3,39 t (7,0)	71,7; CH	3,34 m ^c
5'''	76,8; CH	3,34 m	77,7; CH	3,28 m	76,9; CH	3,35 m ^c
6'''	68,5; CH ₂	3,62 dd (11,0; 4,5) 3,96 dd (11,0; 2,0)	62,8; CH ₂	3,74 dd (11,5; 5,0) 3,89 dd (11,5; 2,0)	68,6; CH ₂	3,63 dd (11,0; 5,0) 3,98 dd (11,0; 1,5)
		Apiof		Apiof		Apiof
1'''	111,1; CH	5,00 d (2,5)	-	-	111,1; CH	5,01 d (2,5)
2'''	78,2; CH	3,90 d (2,5)	-	-	78,3; CH	3,89 d (2,5)
3'''	80,7; CH	-	-	-	80,7; CH	-
4'''	75,2; CH ₂	3,71 d (9,5) 3,91 d (9,5)	-	-	75,2; CH ₂	3,73 d (9,5) 3,93 d (9,5)
5'''	65,9; CH ₂	3,54 ABq (11,5); $\Delta\delta$ 6,71	-	-	66,0; CH ₂	3,55 ABq (11,5); $\Delta\delta$ 6,71

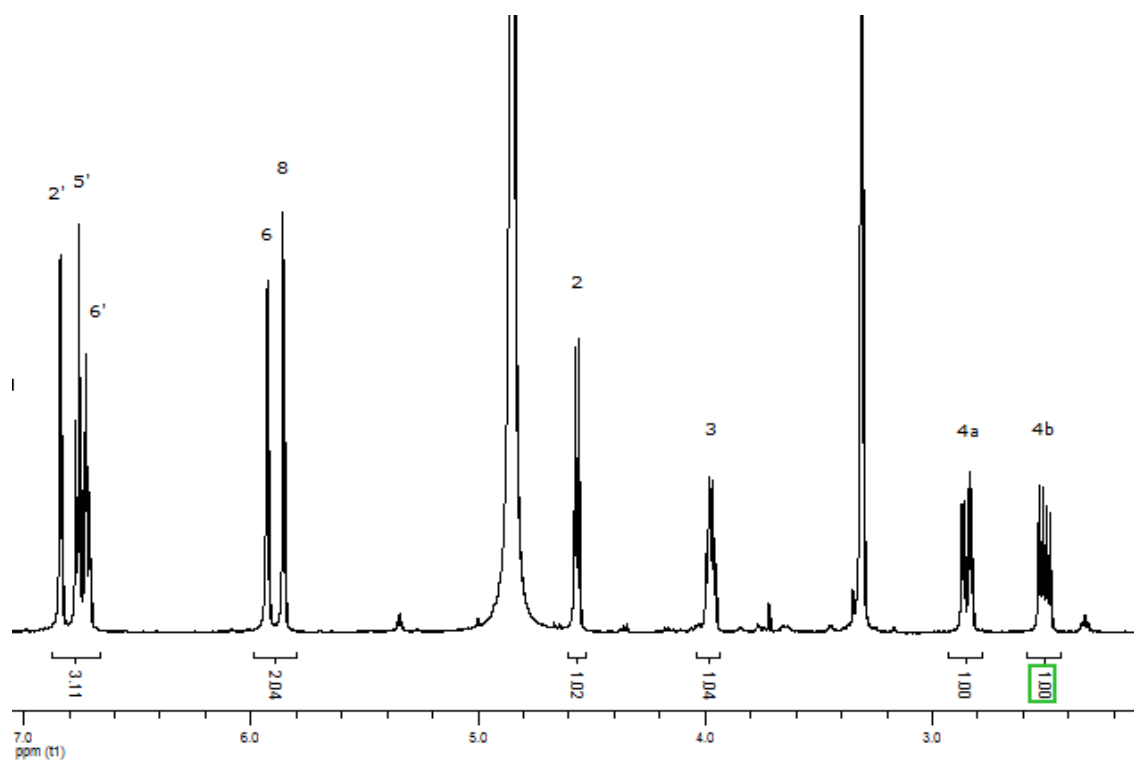
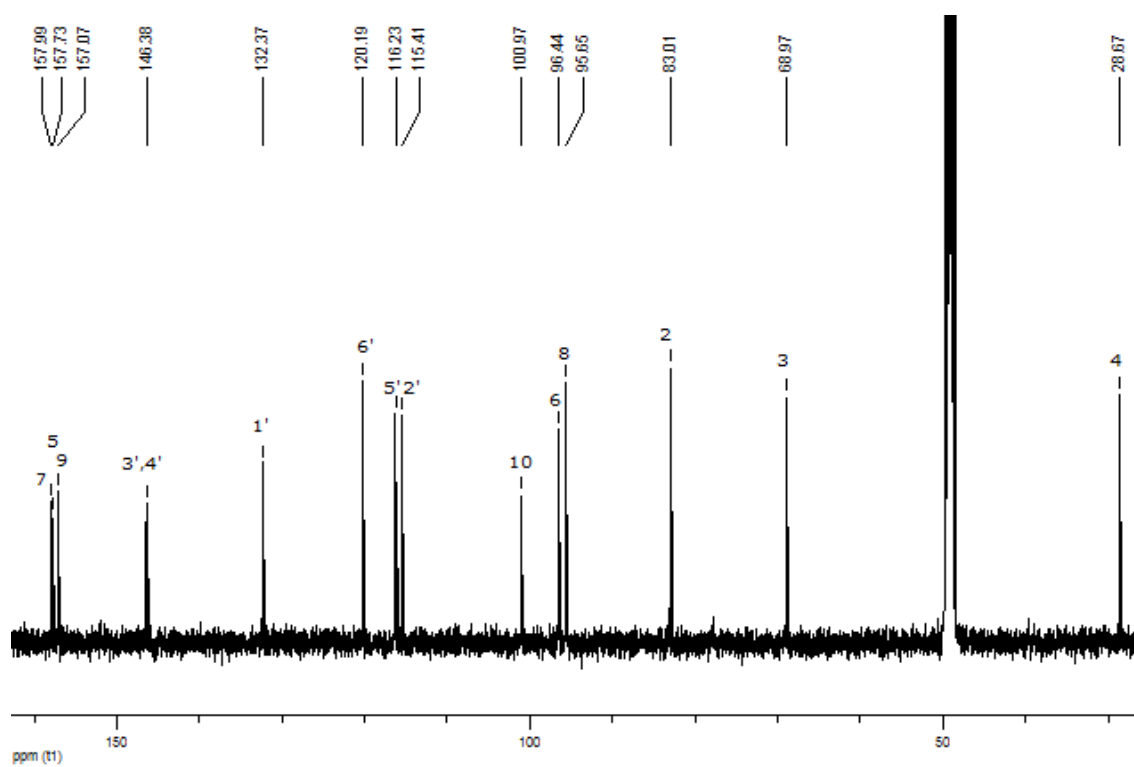
Glep - glukopiranozil grupa; **Apiof** - apiofuranozil grupa; ^{a,b} signali mogu biti zamenjeni; ^c signal preklapljen signalom rastvarača (vrednost dobijena iz HSQC spektra)

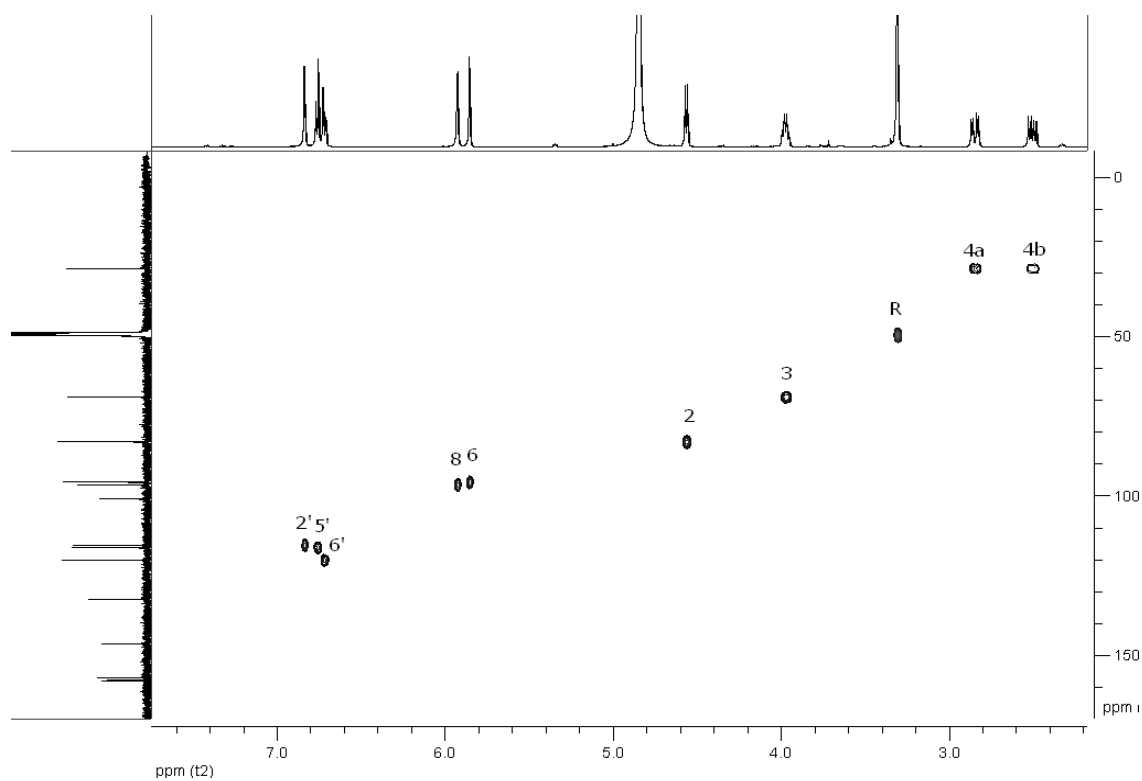
2.1.3. Ostala jedinjenja

Jedinjenje **12** (**Slika 2.1.103**) je izolovano u količini od 14 mg. Analiza ^1H i ^{13}C NMR spektara ovog jedinjenja (**Slike 2.1.104** i **2.1.105**) ukazala je na to da se radi o sekundarnom metabolitu koji ne pripada diarilheptanoidima. Molekulska formula $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ je dobijena iz HR-ESI-MS spektra na osnovu kvazimolekuskog jona $[\text{M}-\text{H}]^-$ na m/z 289,0718. U aromatičnoj oblasti ^1H NMR spektra (**Slika 2.1.104**), u oblasti 6,70-6,85 ppm nalazi se skup signala koji se sastoji iz dva dubleta sa konstantama sprezanja od 1,5, odnosno 8,5 Hz i jednog dvostrukog dubleta sa obe ove konstante sprezanja (**Tabela 2.1.6**), koji je uputio na kateholску grupu. Dva dubleta sa konstantama sprezanja od 2,0 Hz u oblasti 5,80-6,00 ppm uputila su na *meta* protone drugog aromatičnog prstena. U alifatičnoj oblasti ^1H NMR spektra dublet na 3,9 ppm i multiplet na 4,6 ppm uputili su na protone vezane za oksigenovane ugljenikove atome čiji se signali u ^{13}C NMR spektru (**Slika 2.1.105**) nalaze na 69,0, odnosno 83,0 ppm (HSQC spektar, **Slika 2.1.106**). Dvostruki dubleti na 2,5, odnosno 2,8 ppm, potiču od dva diastereotopna protona metilenske grupe susedne oksigenovanom ugljeniku (**Slika 2.1.104**, **Tabela 2.1.6**). Kombinacija masenih i NMR podataka i odsustvo drugih signala u ^1H NMR spektru uputili su na OH grupe kao supstituente i na strukturu flavan-3-ola katehina. $[\alpha]_D$ vrednost od +11,0, određena za jedinjenje **12**, uputila je na (+)-katehin, odnosno 2*R*,3*S*-katehin.^{36,73} HSQC i HMBC spektri dati na **Slikama 2.1.106** - **2.1.108** su potvrdili ovu strukturu (**Slika 2.1.103**). Svi ovi podaci su se odlično složili sa literaturnim.^{36,73} Ranije je (+)-katehin izolovan iz *Betula platyphylla* var. *japonica*⁴⁶ i *Betula papyrifera*⁴⁴, biljnim vrstama roda *Betula*, veoma bliskog rodu *Alnus*.

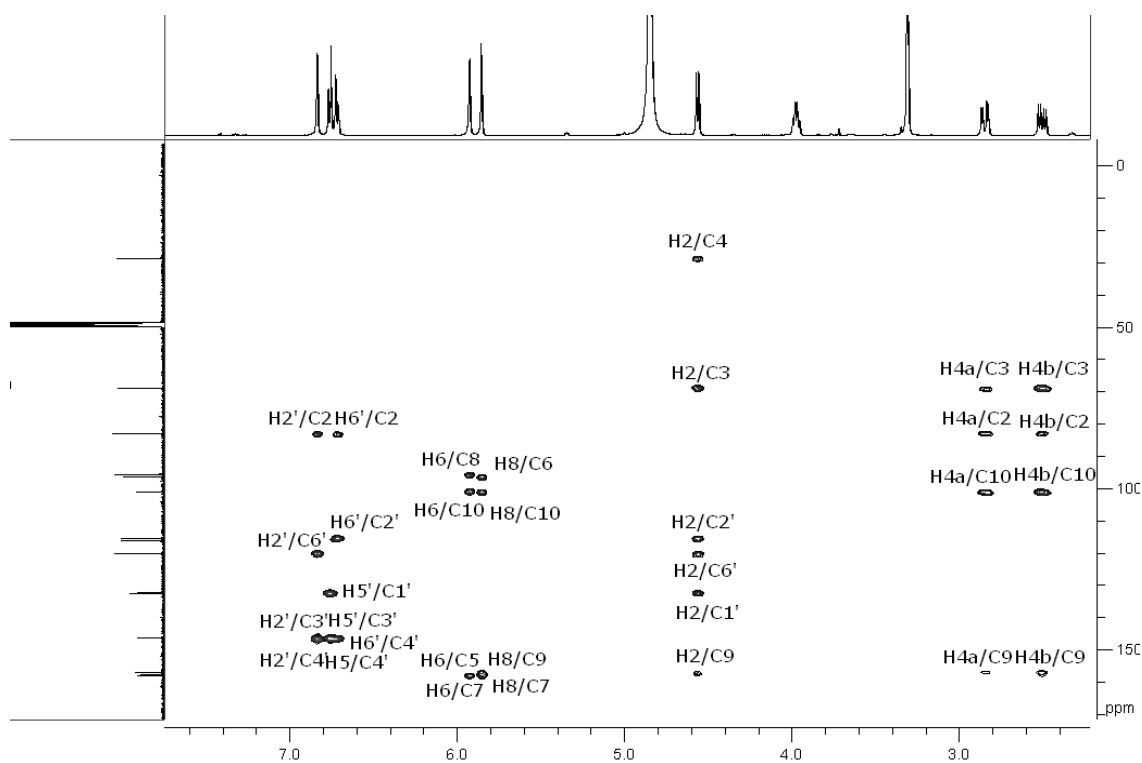


Slika 2.1.103. Strukturna formula (+)-katehina (**12**)

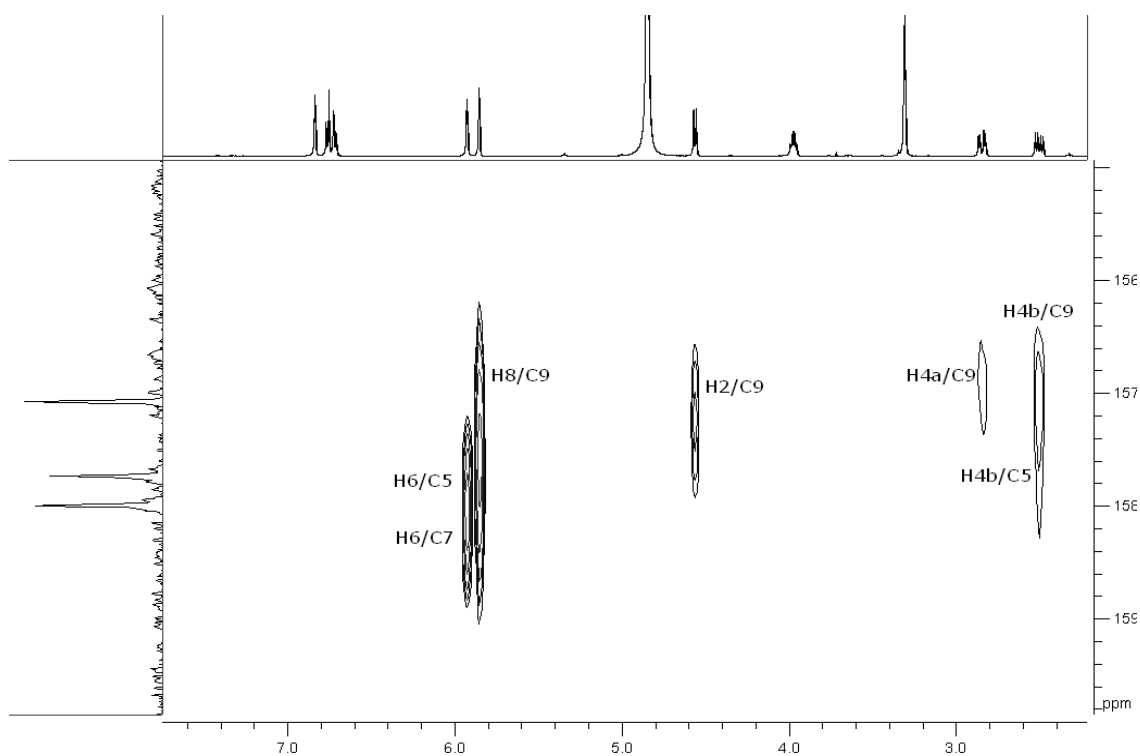
Slika 2.1.104. ^1H NMR spektar (+)-katehina (12)Slika 2.1.105. ^{13}C NMR spektar (+)-katehina (12)



Slika 2.1.106. HSQC spektar (+)-katehina (12)



Slika 2.1.107. HMBC spektar (+)-katehina (12)



Slika 2.1.108. Deo HMBC spektra (+)-katehina (**12**) - razlikovanje C-5, C-7 i C-9

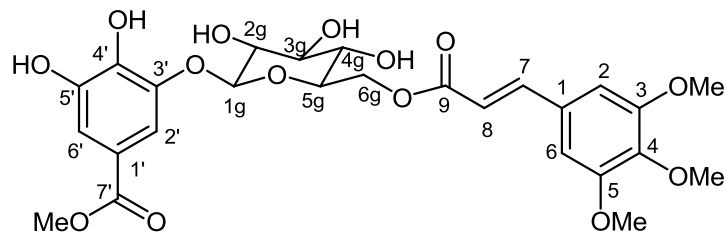
Tabela 2.1.6. NMR podaci jedinjenja **12** (CD₃OD)

C/H	(+)-Katehin (12)	
	δ_C , tip	δ_H (J u Hz)
1	-	-
2	83,0; CH	4,56 d (7,5)
3	69,0; CH	3,98 m
4	28,7; CH ₂	2,51 dd (16,0; 8,0) 2,85 dd (16,0; 5,5)
5	157,7; C	-
6	96,4; CH	5,93 d (2,0)
7	158,0; C	-
8	95,7; CH	5,86 d (2,5)
9	157,1; C	-
10	101,0; C	-
1'	132,4; C	-
2'	115,4; CH	6,84 d (1,5)
3'	146,4; C	-
4'	146,4; C	-
5'	116,2; CH	6,76 d (8,5)
6'	120,2; CH	6,72 dd (8,5; 1,5)

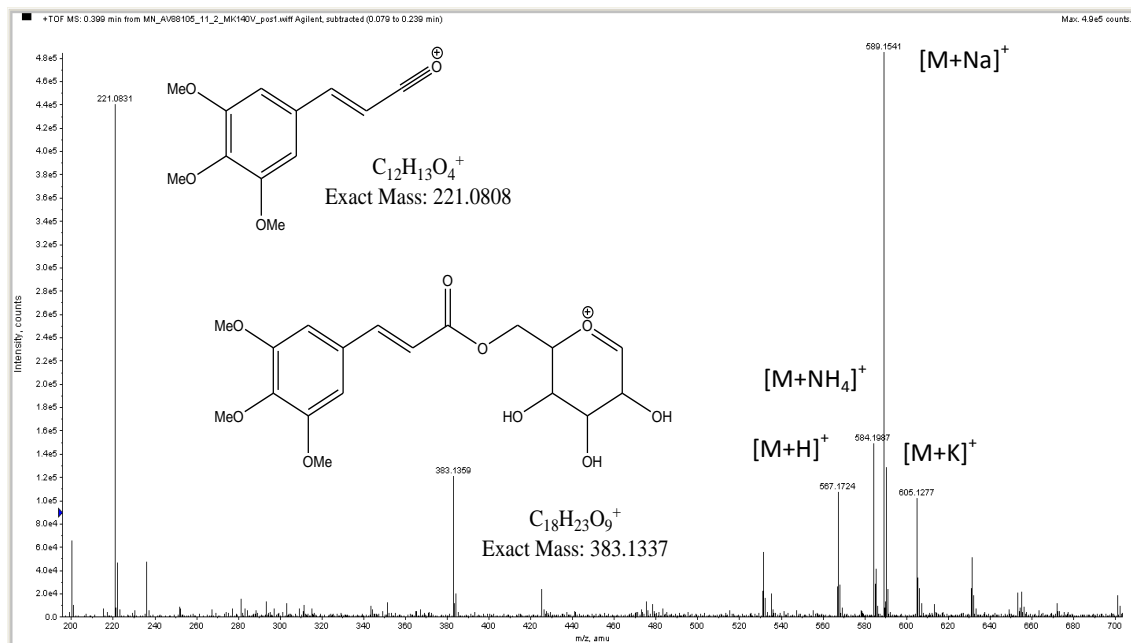
Jedinjenje **13** (**Slika 2.1.109**) je izolovano u količini od 1,5 mg. Poređenjem sa NMR podacima izolovanih diarilheptanoida, uočeno je da jedinjenje **13** ne pripada ovoj grupi prirodnih proizvoda. U HR-ESI-MS spektru kvazimolekulski joni $[M+H]^+$ na m/z 567,1724, $[M+Na]^+$ na m/z 589,1541, $[M+K]^+$ na m/z 605,1277 i $[M+NH_4]^+$ na m/z 584,1987 (**Slika 2.1.110**) su ukazali na molekulska formulu $C_{32}H_{36}O_{13}$. Pored kvazimolekulskih, zastupljeni su i fragmentacioni joni $[C_{12}H_{13}O]^+$ na m/z 221,0808 i $[C_{18}H_{23}O_9]^+$ na m/z 383,1337 koji su zajedno sa NMR spektrima i literaturnim podacima za cinamoil derivate izolovane iz biljaka *Alnus* vrsta³¹ uputili na to da je jedna aromatična jedinica (m/z 221,0808) trimetoksicinamoil (TMC) grupa, za koju je kasnije ustanovljeno da se sreće u složenim diarilheptanoidima izolovanim iz crne jove. Iz razlike od 184,0387 dobijene iz jona $[M+H]^+$ na m/z 567,1724 i $[C_{18}H_{23}O_9]^+$ na m/z 383,1337 (**Slika 2.1.110**) i 1H NMR podataka (**Tabela 2.1.7**), zaključeno je da je metil ester galne kiseline (MGall) druga aromatična grupa vezana za C-1g β -D-glukopiranoze, koja je određena na osnovu NMR podataka i biogenetskog razmatranja. Galna kiselina kao deo molekula složenog diarilheptanoida se sreće kod jedinjenja **3** (**Slika 2.1.20**).

U 1H NMR spektru singlet od dva protona na 6,88 ppm (**Slika 2.1.111**) pokazao je HMBC korelaciju (**Slika 2.1.114**) sa ugljenikom na 146,7 ppm (**Slika 2.1.112**) što je uputilo, sa već poznatim MS podacima, na 3,4,5-TMC grupu. Dodatne korelacije H-2/C-3,C-4,C-6, H-6/C-2,C-4,C-5, H-7/C-2,C-6,C-9, H-8/C-1, OMe-C-3/C-3, OMe-C-4/C-4 i OMe-C-5/C-5 su karakteristične za TMC grupu (**Slika 2.1.114**). Dubleti na 6,52, odnosno 7,59 ppm, i konstanta kuplovanja od $J_{7,8}=16,0$ Hz ukazali su na *E* konfiguraciju dvostruke veze. Preostala dva dubleta sa konstantom kuplovanja od 2,0 Hz u aromatičnoj oblasti 1H NMR spektra (**Slika 2.1.111**, **Tabela 2.1.7**) karakteristična su za *meta* protone, i u kombinaciji sa MS podacima ustanovljeno je da potiču od H-2' i H-6' metil estra galne kiseline. Njihovo prisustvo je uputilo na to da je β -D-glukopiranoza vezana za C-3'-OH grupu metil estra galne kiseline; veza za C-4'-OH bi dala singlet zbog simetrije. Podatak za hemijsko pomeranje karbonilnog ugljenika u ^{13}C -NMR spektru na 168,7 ppm (pored karbonilnog ugljenika iz cinamoil grupe na 168,5 ppm) i HMBC korelacije OMe-C-7'/C-7' potvrdili su prisustvo metil estra galne kiseline (**Slike 2.1.112** i **2.1.114**). Hemijska pomeranja za oba H₂-6g su potvrdila da je β -D-glukopiranoza vezana za kiseonik iz estarske (cinamoil) grupe, a ne za kiseonik iz etarske

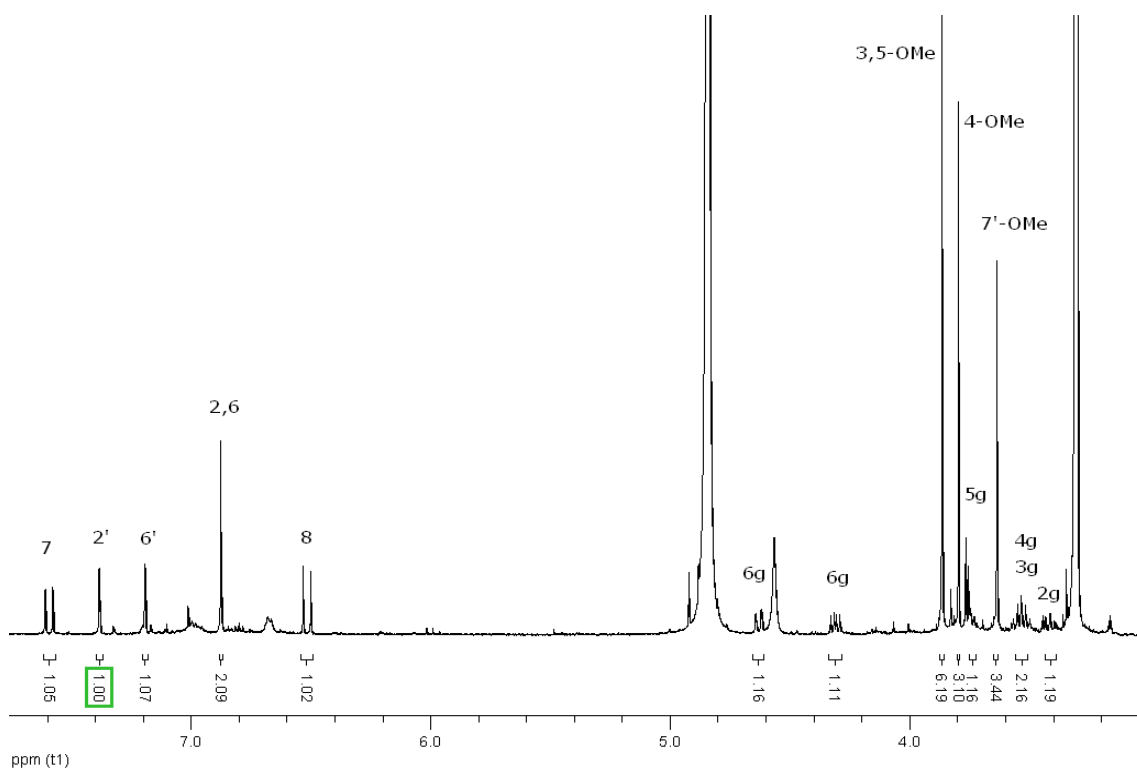
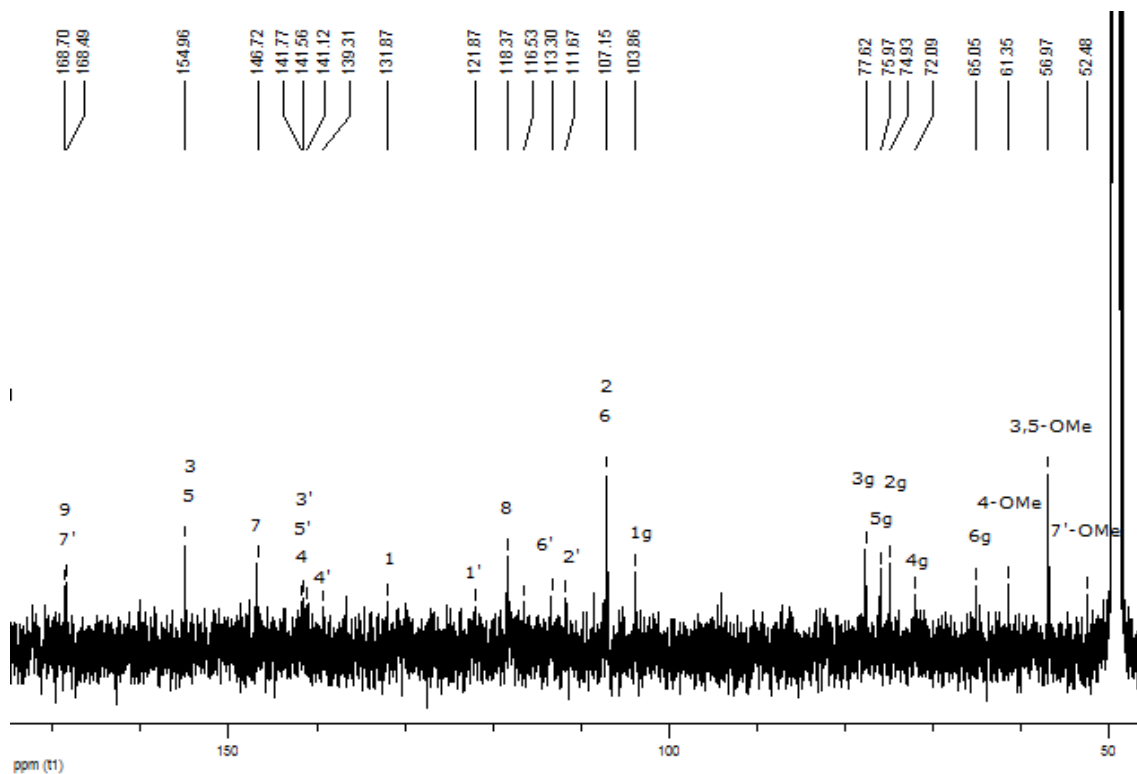
(galoil) grupe. Kako nema podataka u literaturi o ovom jedinjenju, ono se smatra novim prirodnim proizvodom.

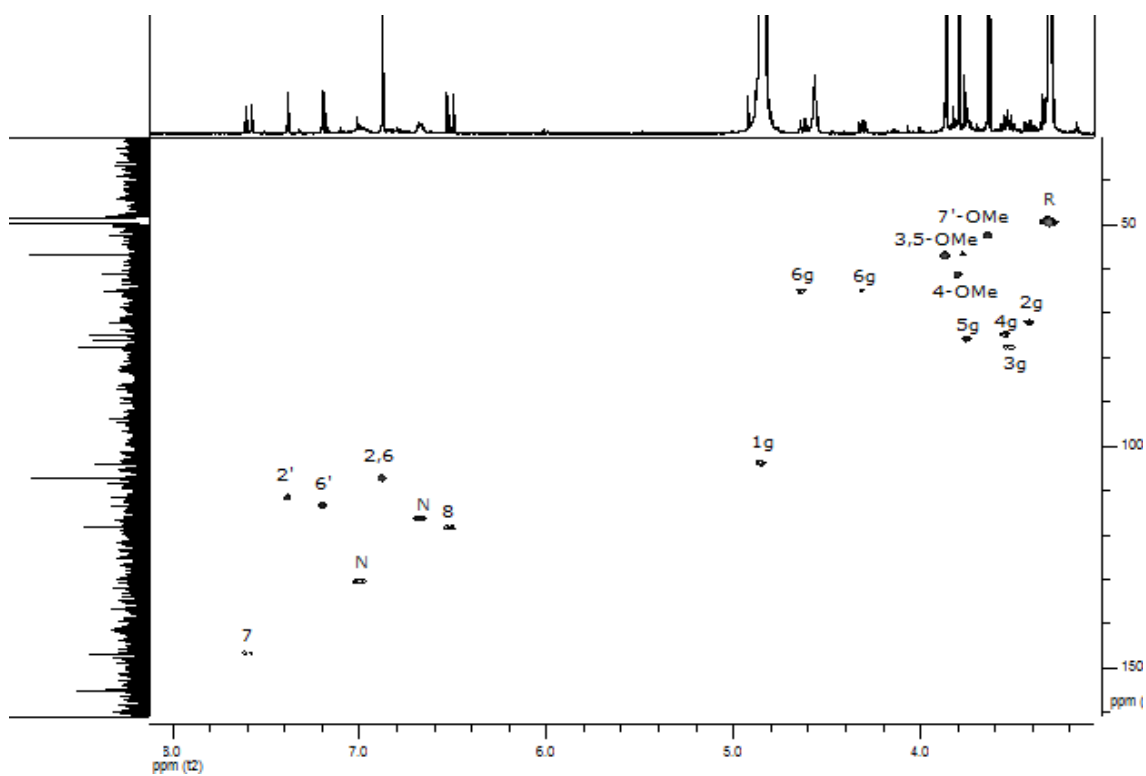


Slika 2.1.109. Strukturna formula jedinjenja **13**

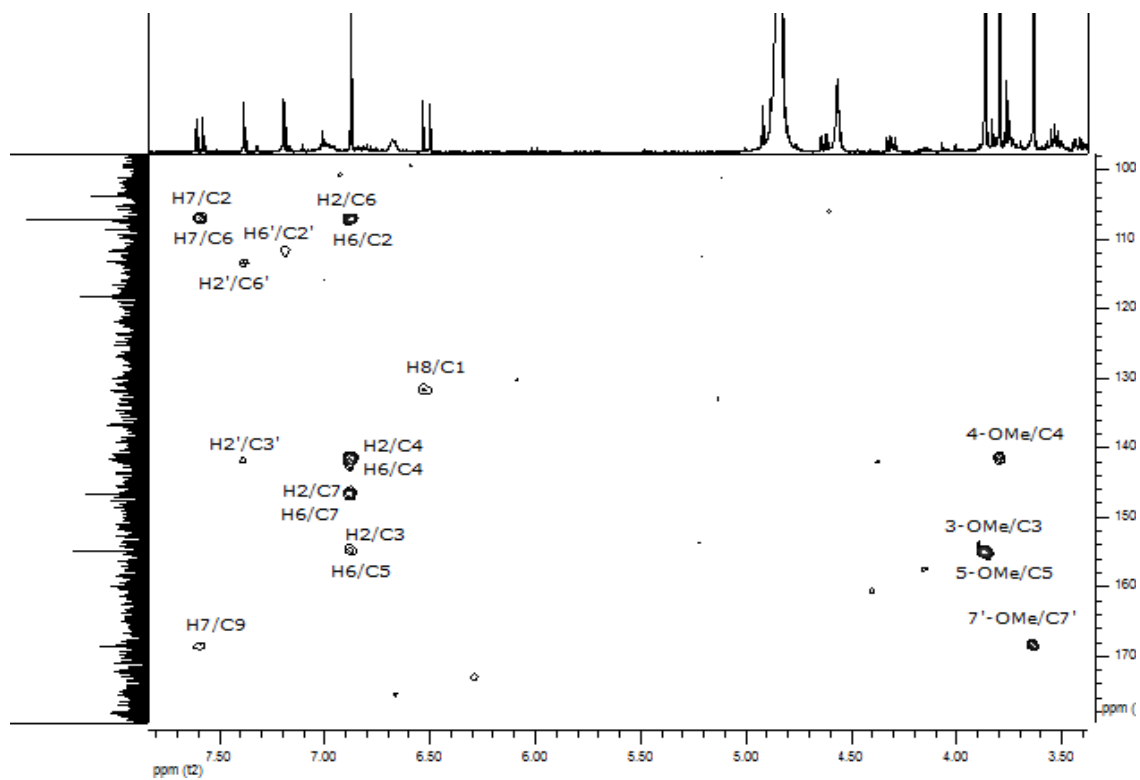


Slika 2.1.110. Fragmentacije u HR-ESI-MS spektru jedinjenja **13**

Slika 2.1.111. ^1H NMR spektar jedinjenja 13Slika 2.1.112. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 13



Slika 2.1.113. HSQC spektar jedinjenja 13



Slika 2.1.114. HMBC spektar jedinjenja 13

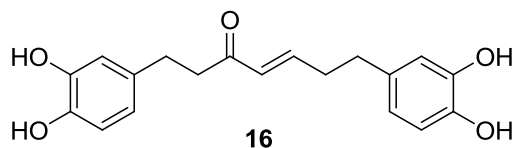
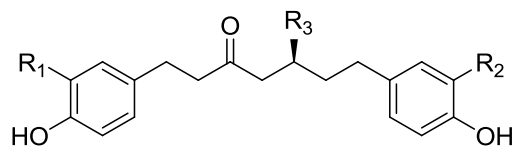
Tabela 2.1.7. ^{13}C i ^1H NMR podaci jedinjenja 13

13		
Glep	δ_{C} , tip	δ_{H} (J u Hz)
1g	103,9; CH	4,85 ^a
2g	74,9; CH	3,41 brt (9,0)
3g	77,6; CH	3,52 brt (9,0)
4g	72,1; CH	3,55 brt (9,0)
5g	76,0; CH	3,75 m
6g	66,1; CH ₂	4,31 dd (12,0; 7,5)
		4,63 dd (12,0; 2,0)
TMC		
1	131,9; C	-
2	107,2; CH	6,88 (s)
3	155,0; C	-
4	141,6; C ^a	-
5	155,0; C	-
6	107,2; CH	6,88 s
7	146,7; CH	7,59 d (16,0)
8	118,2; CH	6,52 d (16,0)
9	168,5; C	-
3,5-OMe	57,0; CH ₃	3,87 s
4-OMe	61,4; CH ₃	3,80 s
MGall		
1"	121,9; C ^a	-
2"	111,5; CH	7,38 d (2,0)
3"	141,8; C ^a	-
4"	139,3; C ^a	-
5"	141,6; C ^a	-
6"	113,2; CH	7,19 d (2,0)
7"	168,7; C	-
7"-OMe	52,5; CH ₃	3,64 s

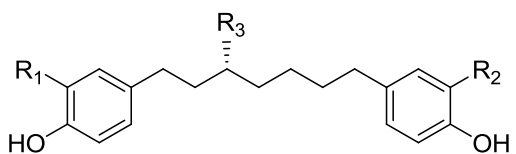
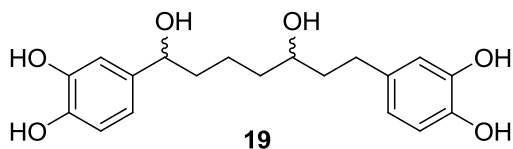
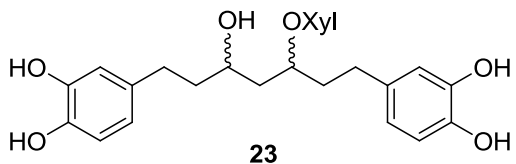
Glep – glukopiranozil grupa; **TMC** – trimetoksicinamoil grupa; **MGall** – metilgaloil grupa; ^a podaci dobijeni iz HSQC i HMBC spektara

2.2. Jedinjenja izolovana iz kore crne jove (*A. glutinosa*)

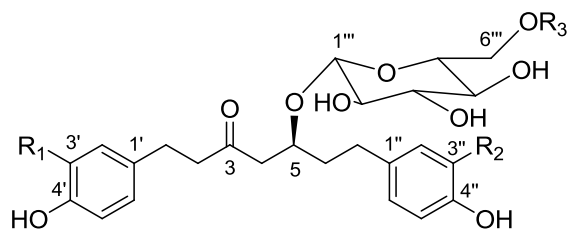
Za razliku od ekstrakta kore zelene jove iz kog su izolovani i sekundarni metaboliti koji nisu diarilheptanoidi, iz ekstrakta kore crne jove izolovana je isključivo ova grupa jedinjenja. Njihovo izolovanje rađeno je u dva navrata. U prvom je cilj bio da se izoluju oni jednostavniji, prosti i glikozidi, prisutni u većim količinama. U drugom je akcenat bio na izolovanju složenih diarilheptanoida prisutnih u malim količinama, pri čemu su i jednostavniji sakupljeni, prečišćavani i obogaćivani za ispitivanje bioloških aktivnosti. U oba slučaja primenjen je isti postupak izolovanja. Iz hloroformsko-metanolnih ekstrakata (1:1) kore crne jove razdvajanjem kolonskom hromatografijom na silika gelu i semipreparativnom reversno-faznom HPLC hromatografijom izolovano je ukupno 28 diarilheptanoida, prostih, glikozida i složenih (**Slika 2.2.1**), a za određivanje strukture su korišćene instrumentalne metode: NMR, MS, UV, IR, CD i polarimetrija. Od 28 izolovanih diarilheptanoida, 13 su novi prirodni proizvodi. Pored toga, dva nova jedinjenja koja nije bilo moguće razdvojiti od drugih diarilheptanoida okarakterisana su analizom NMR spektara smeša. Dva poznata diarilheptanoid glikozida, platifilozid (**1**) i acerozid VII (**5**), izolovana su i iz zelene jove i analiza njihovih NMR spektara i određivanje strukture dati su u odeljku **2.1**. Detaljan postupak izolovanja svih jedinjenja dat je u Eksperimentalnom delu, dok su u ovom poglavlju prikazani i interpretirani NMR spektri svih izolovanih diarilheptanoida iz kore crne jove i HR-ESI-MS spektri novih jedinjenja na osnovu kojih je određena njihova struktura. ^{13}C i ^1H NMR podaci svih izolovanih jedinjenja prezentovani su u tabelama, dok su spektroskopski podaci za nova jedinjenja dati u Eksperimentalnom delu, u poglavlju **3.3.3**. U poglavlju **2.2.1** prikazano je struktarno određivanje prostih diarilheptanoida i diarilheptanoid glikozida koji su izolovani u većoj količini. Poglavlje **2.2.2** obuhvata struktarno određivanje složenih diarilheptanoida – jedinjenja prisutnih u malim količinama u kori crne jove.



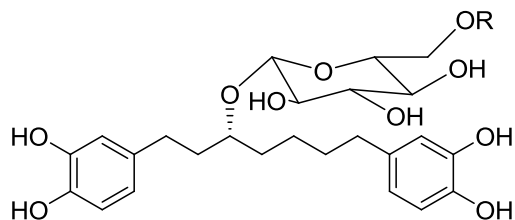
- 1:** $R_1=R_2=H$; $R_3=\beta\text{-D-Glcp}$
14: $R_1=R_2=R_3=OH$
15: $R_1=R_2=OH$; $R_3=OCH_3$
17: $R_1=R_2=OH$; $R_3=\beta\text{-D-Xylp}$
18: $R_1=R_2=OH$; $R_3=\beta\text{-D-Glcp}$
24: $R_1=R_2=H$; $R_3=\beta\text{-D-Xylp}$
25: $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=\beta\text{-D-Xylp}$
26: $R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=\beta\text{-D-Xylp}$
27: $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=\beta\text{-D-Glcp}$



- 5:** $R_1=R_2=H$; $R_3=\beta\text{-D-Glcp}$
20: $R_1=R_2=OH$; $R_3=OH$
21: $R_1=R_2=OH$; $R_3=\beta\text{-D-Xylp}$
22: $R_1=R_2=OH$; $R_3=\beta\text{-D-Glcp}$
28: $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=\beta\text{-D-Glcp}$

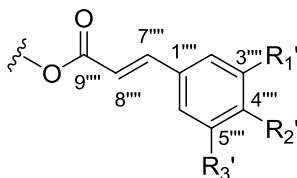


- 29:** $R_1=R_2=OH$; $R_3=E\text{-}3,4\text{-DMC}$
30: $R_1=R_2=OH$; $R_3=Z\text{-}3,4\text{-DMC}$
31: $R_1=R_2=OH$; $R_3=pC$
32: $R_1=R_2=OH$; $R_3=E\text{-}3,4,5\text{-TMC}$
36: $R_1=R_2=H$; $R_3=E\text{-}3,4\text{-DMC}$
37: $R_1=R_2=H$; $R_3=pC$
38: $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=E\text{-}3,4\text{-DMC}$
39: $R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=Z\text{-}3,4\text{-DMC}$

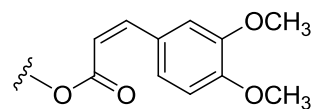


- 33:** $R=E\text{-}3,4\text{-DMC}$
34: $R=Z\text{-}3,4\text{-DMC}$
35: $R=E\text{-}3,4,5\text{-TMC}$

- pC:** $R_1'=R_3'=H$; $R_2'=OH$
E-3,4-DMC: $R_1'=R_2'=OCH_3$; $R_3'=H$
E-3,4,5-TMC: $R_1'=R_2'=R_3'=OCH_3$



Z-3,4-DMC:



Slika 2.2.1. Diarylheptanoidi izolovani iz kore crne jove

2.2.1. Strukturno određivanje prostih diarilheptanoida i diarilheptanoid glikozida kore crne jove

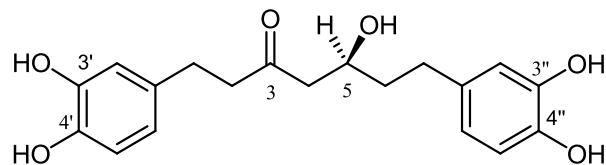
Ovo poglavlje obuhvata proste diarilheptanoide i diarilheptanoid glikozide koji su na osnovu diarilheptanoidnog skeleta podeljeni u tri grupe. Tako su prvo objašnjene strukture diarilheptanoida sa obe kateholske, potom sa obe *p*-hidroksifenil i na kraju sa jednom kateholskom i jednom *p*-hidroksifenil grupom.

2.2.1.1. Prosti diarilheptanoidi i diarilheptanoid glikozidi sa dve kateholske grupe

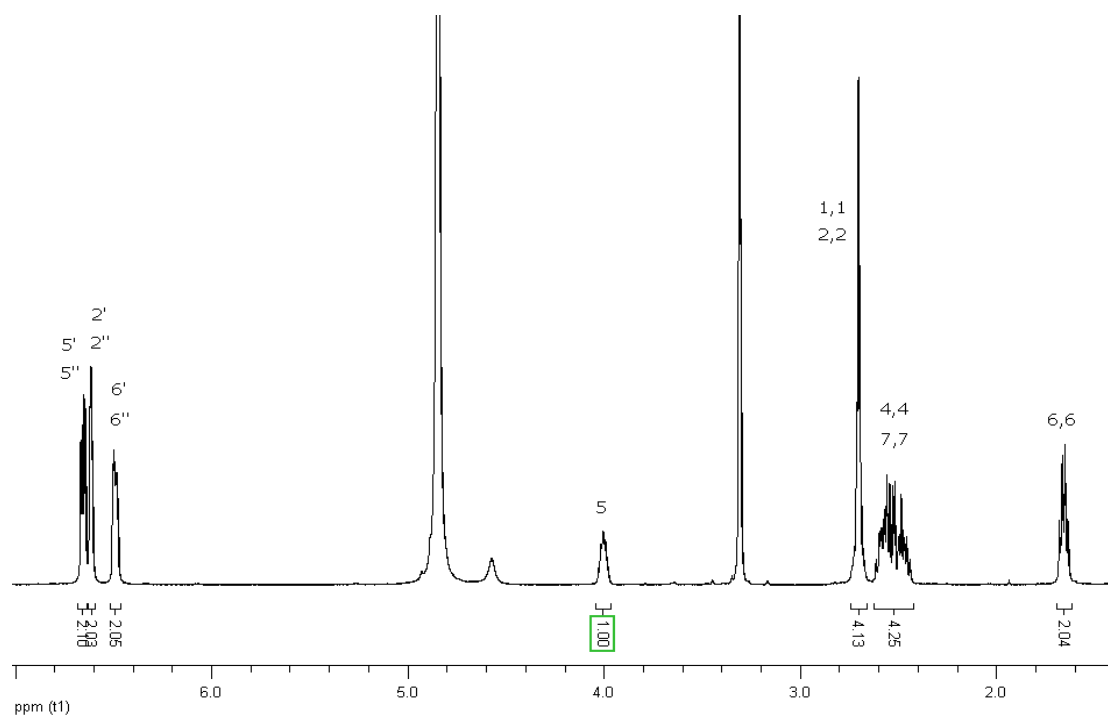
Kateholske grupe diarilheptanoida daju tipičan skup signala u aromatičnoj oblasti ^1H NMR spektra – jedan dublet sa malom konstantom sprežanja od oko 2 Hz, jedan dublet sa velikom konstantom sprežanja od oko 8 Hz i jedan dvostruki dublet sa obe pomenute konstante sprežanja. U ^{13}C NMR spektru kateholske grupe su okarakterisane signalima ugljenika na sledećim hemijskim pomeranjima: ~ 116 ppm (C-2', C-2'', C-5', C-5''), ~ 120 ppm (C-6', C-6''), ~ 134 ppm (C-1', C-1''), ~ 145 ppm (C-3', C-3'', C-4', C-4'').

Prvi diarilheptanoid sa dve kateholske grupe izolovan u količini od 14 mg je jedinjenje **14** (Slika 2.2.2). Na osnovu analize ^1H i ^{13}C NMR spektara (Slike 2.2.3 i 2.2.4) zaključeno je da se radi o jednostavnom diarilheptanoidu koji pored kateholskih grupa u položajima 1 i 7 heptanskog niza ima keto grupu i hidroksilnu grupu. Na ove dve grupe ukazali su signali u ^{13}C NMR spektru (Slika 2.2.4) na 212,2 ppm, odnosno na 68,5 ppm, redom. Kvazimolekulski joni iz HR-ESI-MS spektra $[\text{M}+\text{H}]^+$ na m/z 347,1484 i $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ na m/z 329,1383 ukazali su na molekulska formulu $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_6$. HMBC korelacije H-1/C-2,C-3, H-2/C-1,C-3,C-1', H-4/C-3,C-5, H-6/C-4,C-5,C-7,C-1'' (Slike 2.2.6 i 2.2.7), HSQC korelacije (Slika 2.2.5) i MS podaci su uputili na strukturu hirsutanonola (Slika 2.2.2). Karakteristične korelacije u HMBC spektru koje su potvrdile kiseonični supstituent na C-5 (ovde OH grupu čiji se signal ne vidi u ^1H NMR spektru usled izmene sa jezgrima deuterijuma iz CD_3OD) su H-4,H-6,H-7/C-5, dok su korelacije H-1,H-2/C-1' i H-7/C-1'' omogućile razlikovanje bliskih signala ugljenika C-1' i C-1'' (Slike 2.2.4 i 2.2.6). Konfiguracija na C-5 je *S*, pošto se vrednost za specifičnu optičku rotaciju $[\alpha]_{\text{D}}$ -4,0 relativno dobro slaže sa literaturnom od -2,0⁷⁴, a isto tako je CD spektar hirsutanonola veoma sličan CD spektru oregonina za koji je *S* konfiguracija

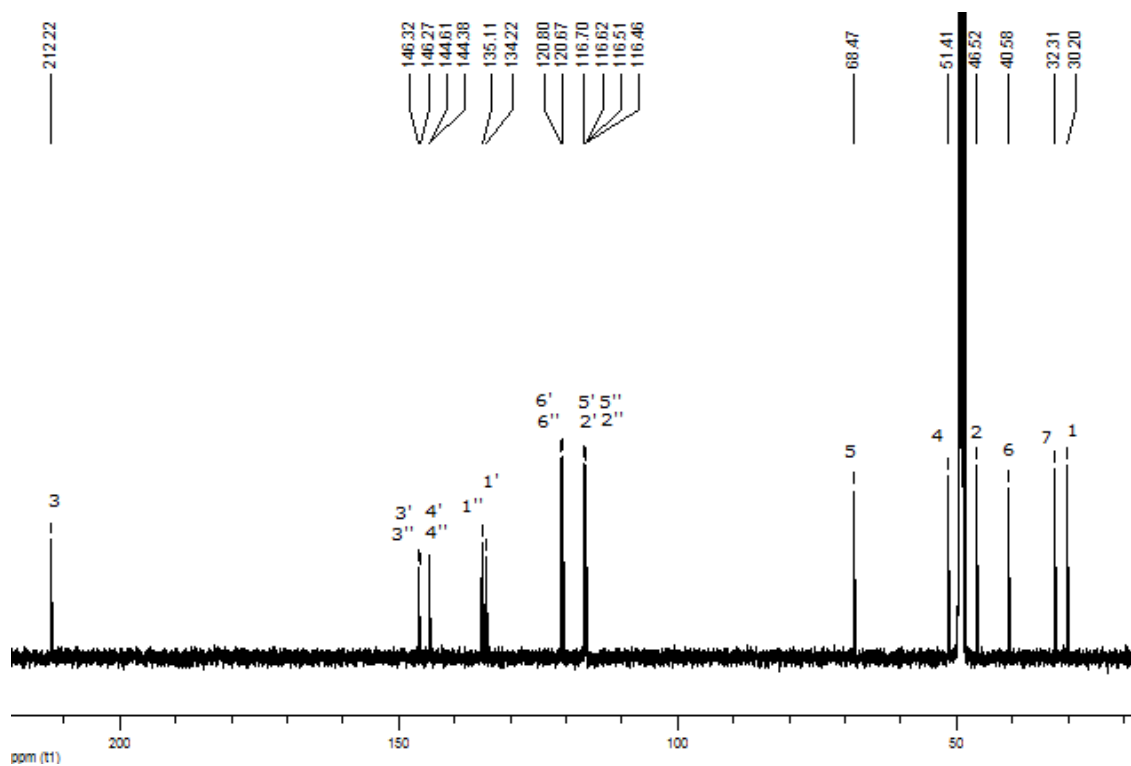
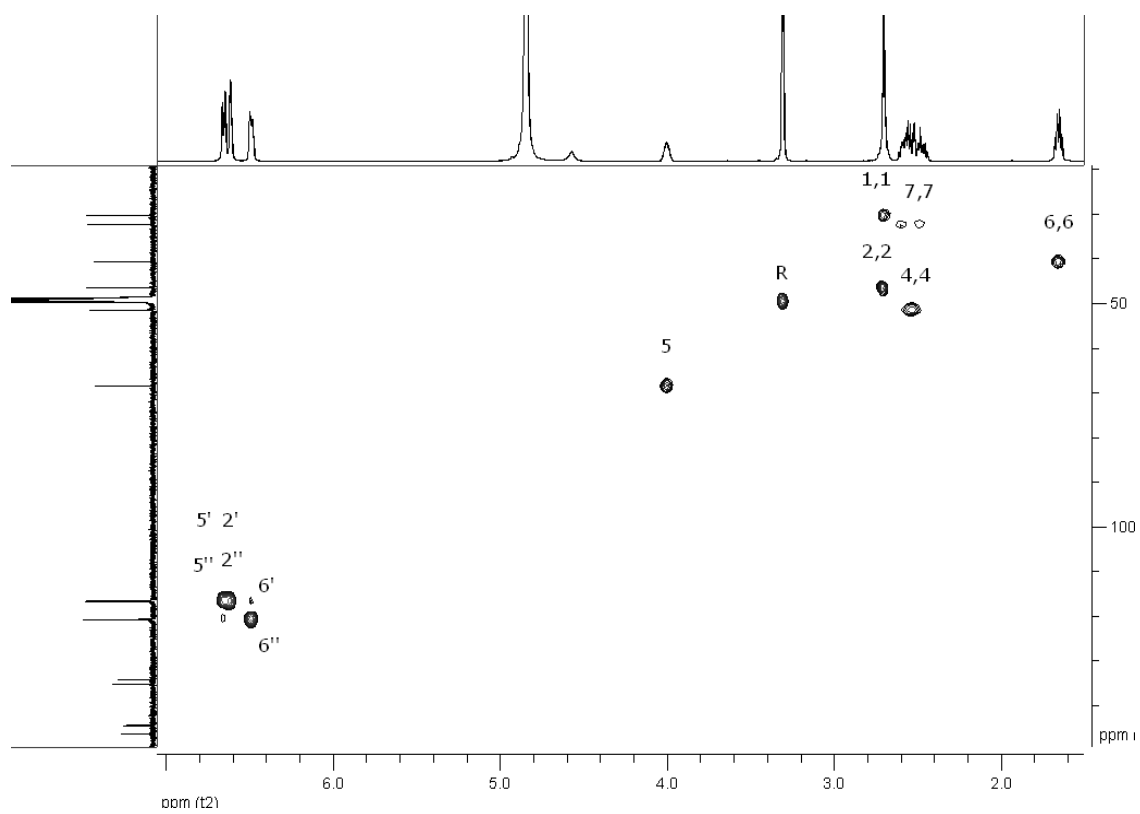
utvrđena rendgenskom strukturnom analizom, kao i pravilom ^{13}C glikozidacionog pomeranja.⁶⁸ I ostali spektroskopski podaci su u saglasnosti sa literaturnim⁷⁴, što je potvrdilo strukturu hirsutanonola – aglikona mnogih diarilheptanoid glikozida izolovanih u ovom radu.

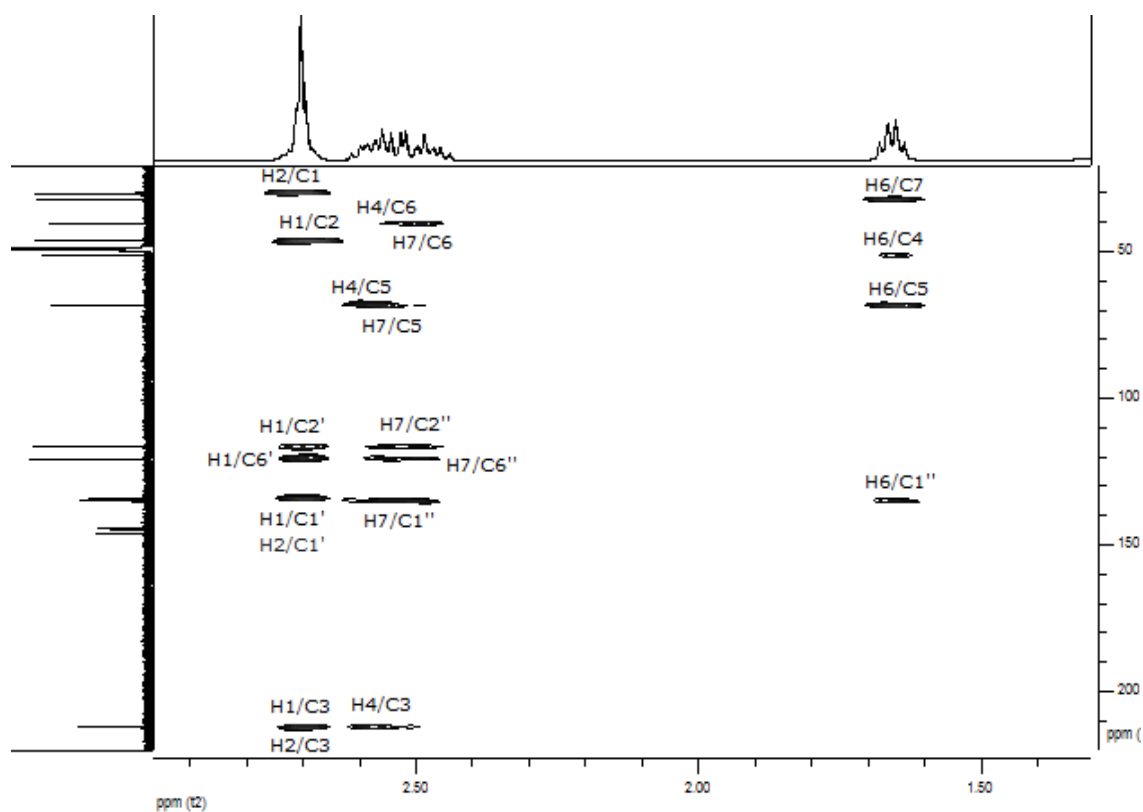


Slika 2.2.2. Strukturna formula hirsutanonola (**14**)

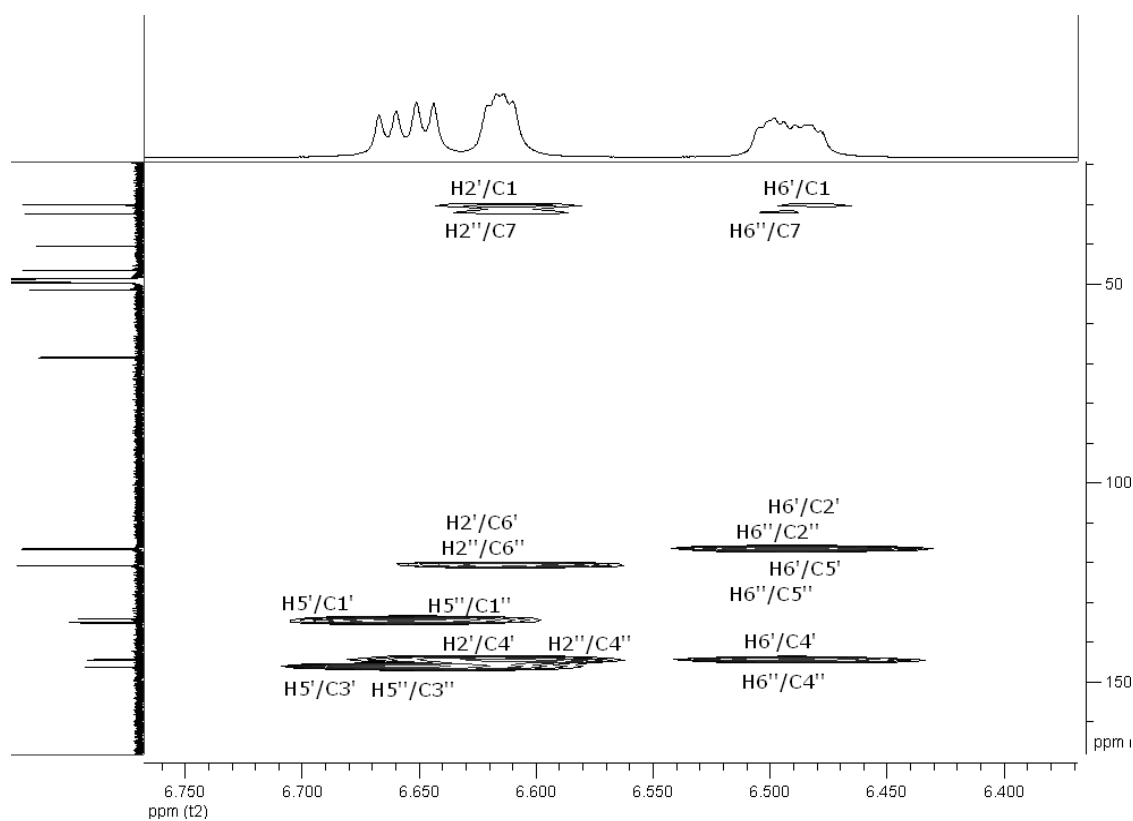


Slika 2.2.3. ^1H NMR spektar hirsutanonola (**14**)

Slika 2.2.4. ^{13}C NMR spektar hirsutanonola (**14**)Slika 2.2.5. HSQC spektar hirsutanonola (**14**)

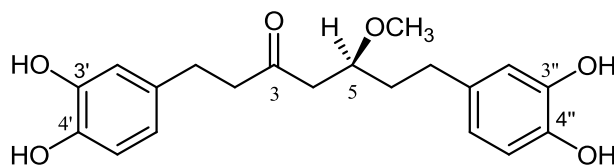


Slika 2.2.6. HMBC korelacije alifatičnih protona (bez H-5) hirsutanonola (**14**)

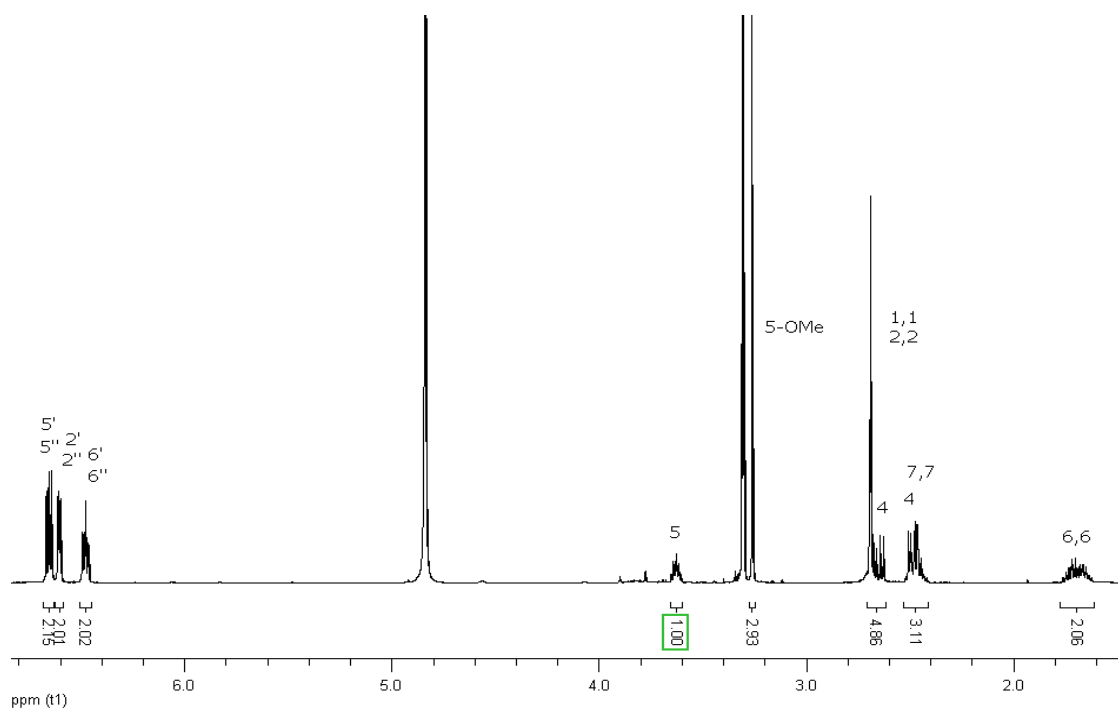


Slika 2.2.7. HMBC korelacije aromatičnih protona hirsutanonola (**14**)

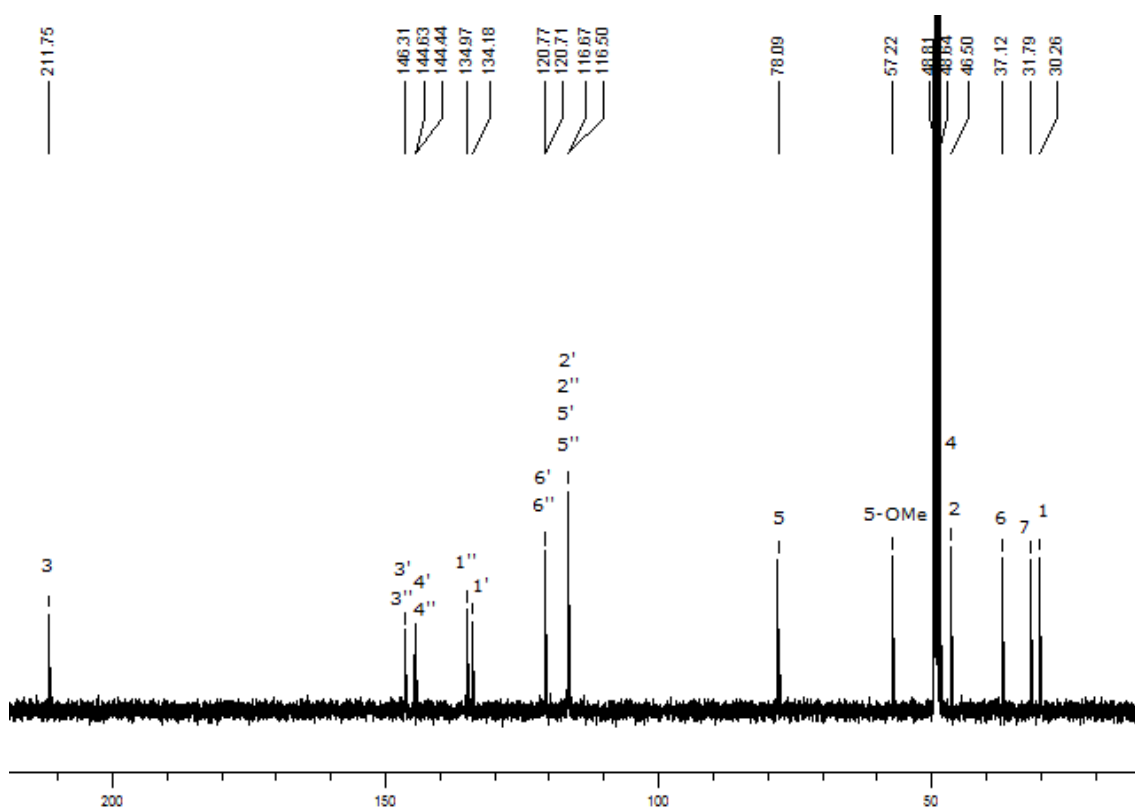
Jedinjenje **15** (**Slika 2.2.8**) je izolovano u količini od 5 mg. NMR spektri jedinjenja **15** su veoma slični NMR spektrima hirsutanonola (**14**) (**Slika 2.2.2**). Uočene male razlike su: pojava singleta od 3 protona na 3,26 ppm koga nije bilo u ^1H NMR spektru hirsutanonola, pomeren multiplet na 3,63 ppm koji je u spektru hirsutanonola bio na 4,01 ppm, kao i izdvojen jedan dvostruki dublet na 2,65 ppm koji je u spektru hirsutanonola deo multipleta na 2,45-2,60 ppm (**Slike 2.2.3 i 2.2.9, Tabela 2.2.1**). Signali H₂-6 se takođe minimalno razlikuju po izgledu (**Slika 2.2.9**). U ^{13}C NMR spektru signal metinskog ugljenika je na većem hemijskom pomeranju (78,1 ppm) u odnosu na hirsutanonol (68,5 ppm), a uočava se i dodatni signal na 57,2 ppm (**Slike 2.2.4 i 2.2.10, Tabela 2.2.1**). Sve navedene razlike potiču od prisustva metoksi grupe u položaju 5 (umesto hidroksilne u hirsutanonolu), tako da je jedinjenje **15** okarakterisano kao 5(*S*)-*O*-metilhirsutanonol (**Slika 2.2.8**). HMBC korelacije H-5/5-OMe i 5-OMe/C-5 su dokaz metoksi grupe u položaju 5 (**Slika 2.2.12**). Singlet protona ove grupe na nešto nižem hemijskom pomeranju (3,26 ppm) od očekivanog (3,40-3,50 ppm) objašnjava se anizotropnim efektom keto grupe u položaju 3. Slično tome, male razlike u hemijskim pomeranjima dvostrukih dubleta koji potiču od diastereotopnih H₂-4 (u odnosu na signale istih protona u ^1H NMR spektru hirsutanonola) javljaju se zbog različitog prostornog uticaja metoksi grupe (**Tabela 2.2.1**). Kvazimolekulski joni dobijeni iz HR-ESI-MS spektra, $[\text{M}+\text{H}]^+$ na m/z 361,1636 i $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ na m/z 343,1529, ukazali su na molekulsku formulu C₂₀H₂₄O₆ i potvrdili strukturu 5(*S*)-*O*-metilhirsutanonola. *S* konfiguracija je ustanovljena na osnovu slaganja $[\alpha]_{\text{D}}$ vrednosti sa literaturnom (+2,0 eksperimentalna, +3,8 literaturna vrednost⁵⁰). HSQC i HMBC spektri (**Slike 2.2.11 i 2.2.12**) su takođe bili slični spektrima hirsutanonola (**14**) i dodatno su potvrdili strukturu jedinjenja **15** (**Slika 2.2.8**). Svi spektroskopski podaci su u dobroj saglasnosti sa literaturnim.⁵⁰



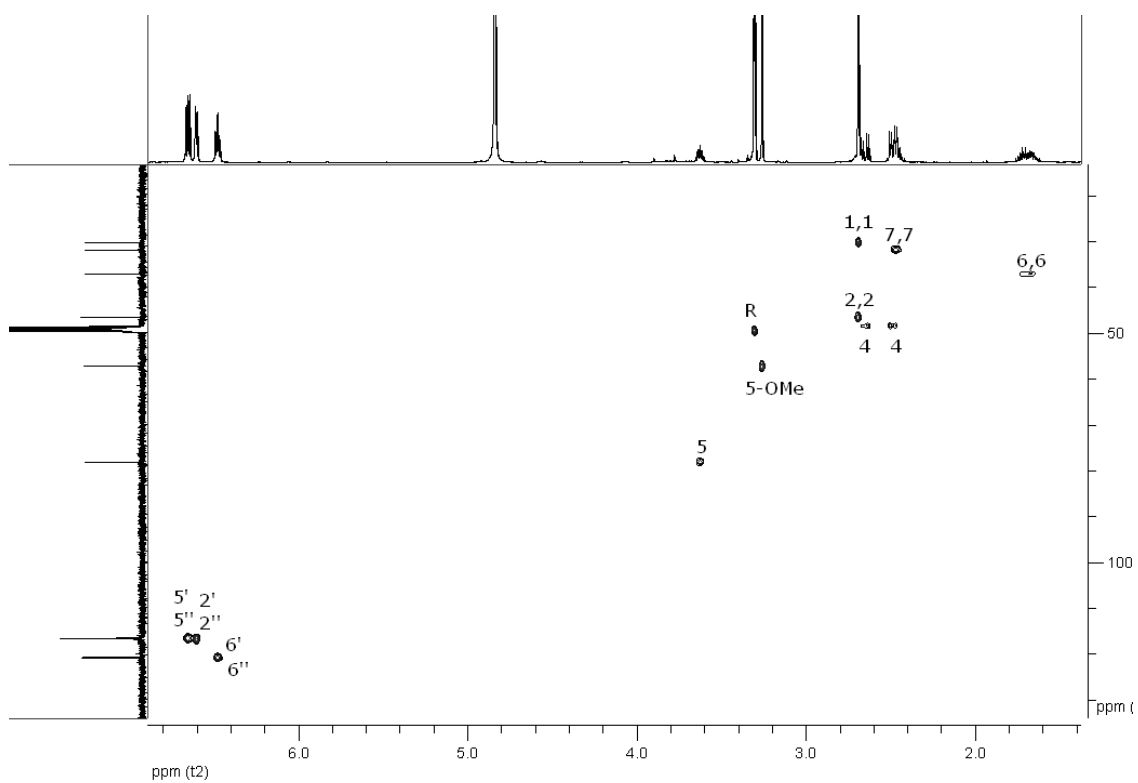
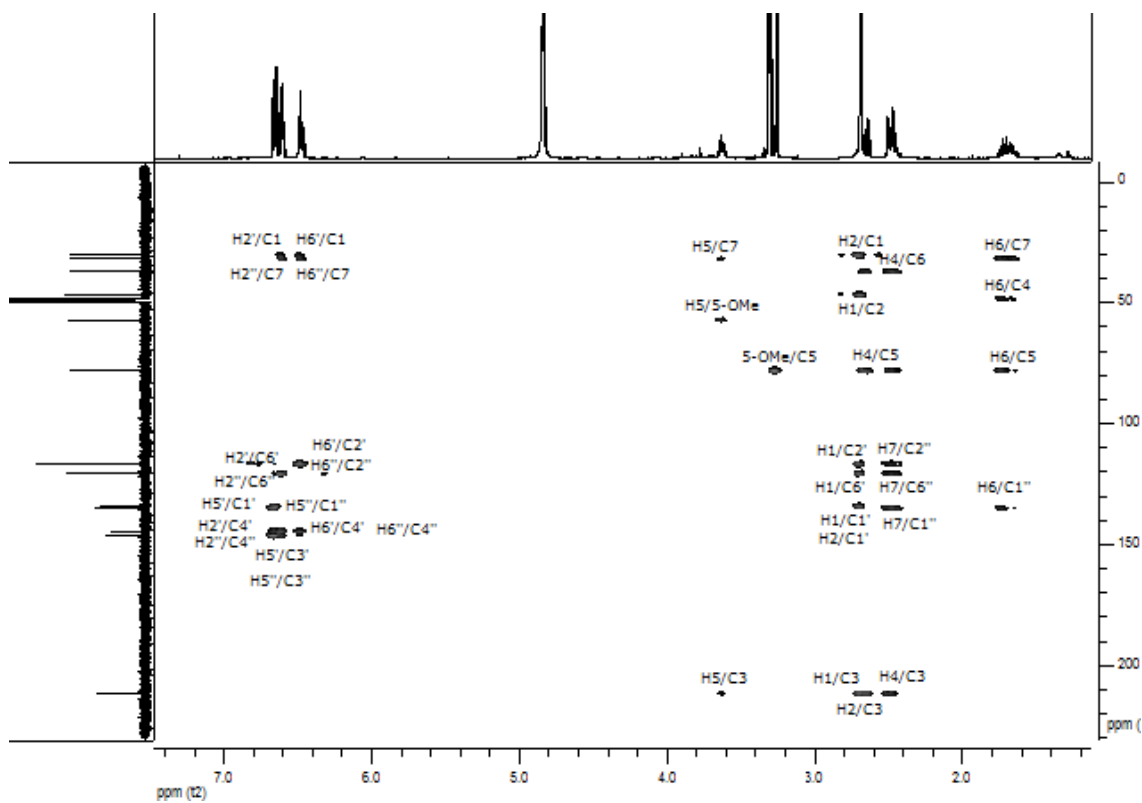
Slika 2.2.8. Strukturna formula 5(*S*)-*O*-metilhirsutanonola (**15**)



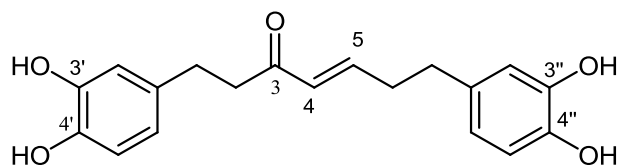
Slika 2.2.9. ^1H NMR spektar 5(S)-O-metilhirsutanonola (15)



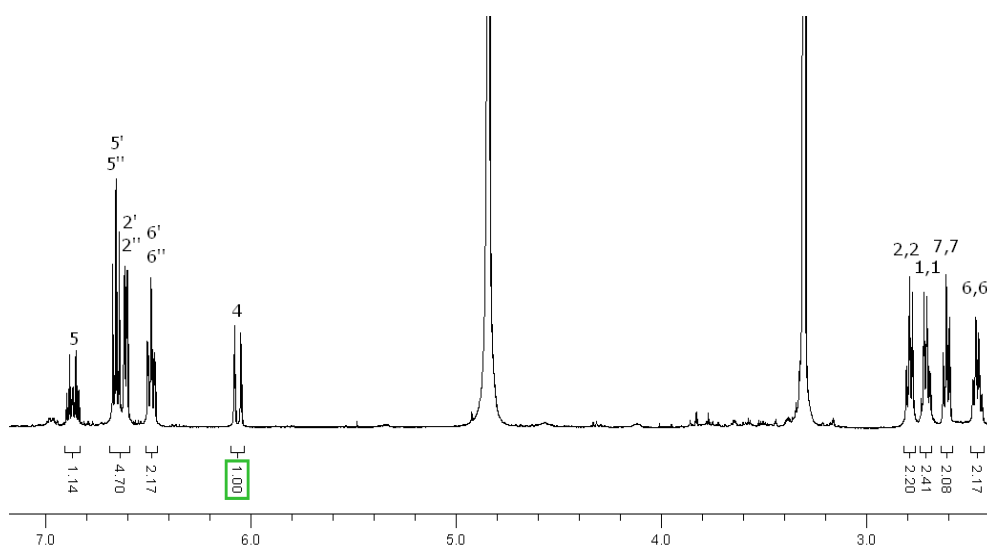
Slika 2.2.10. ^{13}C NMR spektar 5(S)-O-metilhirsutanonola (15)

Slika 2.2.11. HSQC spektar 5(*S*)-*O*-metilhirsutanonola (**15**)Slika 2.2.12. HMBC spektar 5(*S*)-*O*-metilhirsutanonola (**15**)

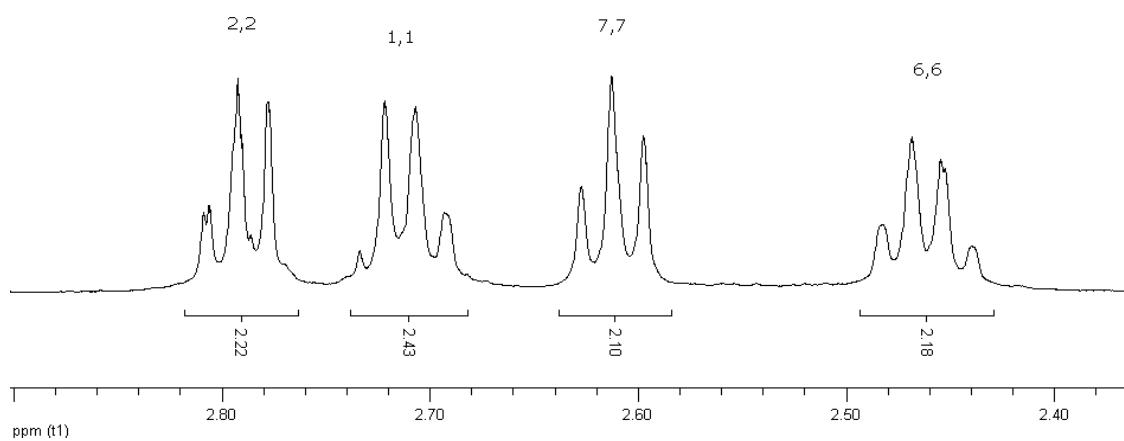
Jedinjenje **16** (Slika 2.2.13) je izolovano u količini od 23 mg. Na osnovu analize ^1H i ^{13}C NMR spektara (Slike 2.2.14-2.2.17) zaključeno je da ovaj diarilheptanoid pored kateholskih grupa ima keto grupu. Međutim, signal za karbonilni ugljenik je bio na nižem δ_{C} za 9 ppm nego što je to bio slučaj sa ostalim ketonskim diarilheptanoidima što je uputilo na konjugaciju keto grupe. Dvostruki tripleti na 6,07, odnosno 6,87 ppm, u ^1H NMR spektru (Slika 2.2.16) i njihove HSQC korelacije sa signalima na 131,8, odnosno 149,4 ppm, u ^{13}C NMR spektru (Slike 2.2.17 i 2.2.18) ukazali su na dvostrukom vezu. Položaj keto grupe i dvostruke veze određen je HMBC korelacijama H-1,H-2,H-4,H-5/C-3, H-4/C-6, H-5/C-7, H-6/C-4,C-5 (Slike 2.2.19 i 2.2.20). Konstanta spreznjanja od 16,0 Hz ukazala je na *E* konfiguraciju dvostruke veze. Kvizimolekulski joni iz HR-ESI-MS spektra, $[\text{M}-\text{H}]^-$ na m/z 327,1264 i $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ na m/z 363,1026, ukazali su na molekulska formulu $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_5$. Svi spektroskopski podaci su u dobroj saglasnosti sa literaturnim bez obzira na to što su literaturni podaci dobijeni snimanjem spektara ovog jedinjenja u CDCl_3 .⁷⁵ Trivijalno ime jedinjenja **16** je hirsutenon.



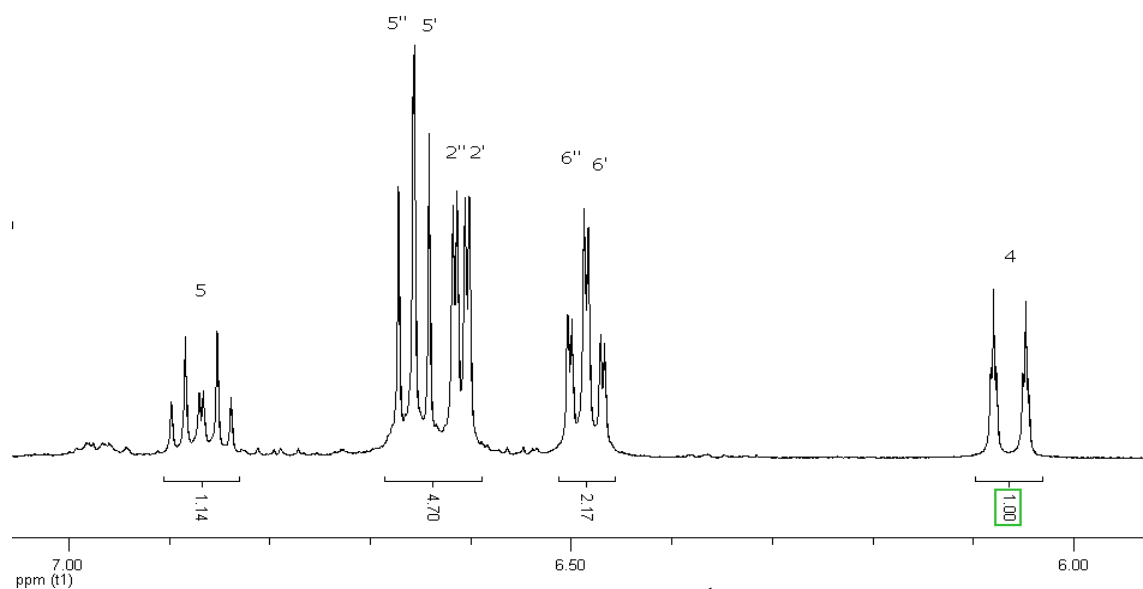
Slika 2.2.13. Strukturna formula hirsutenona (**16**)



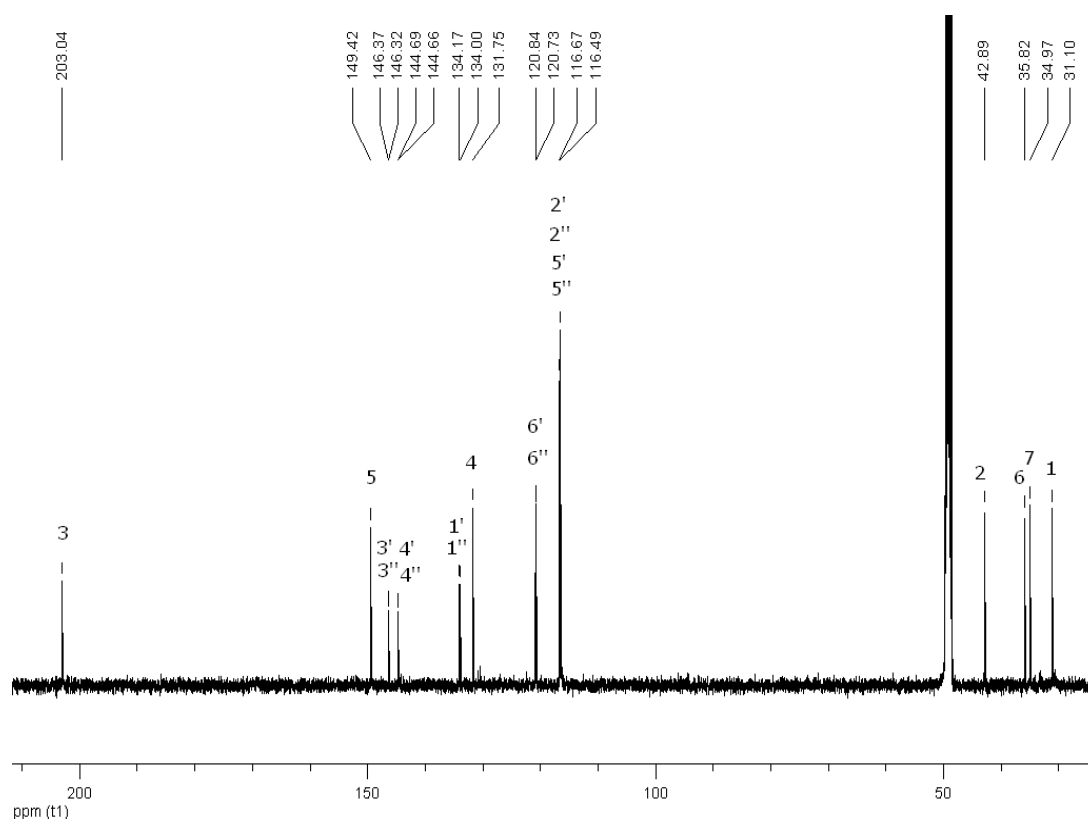
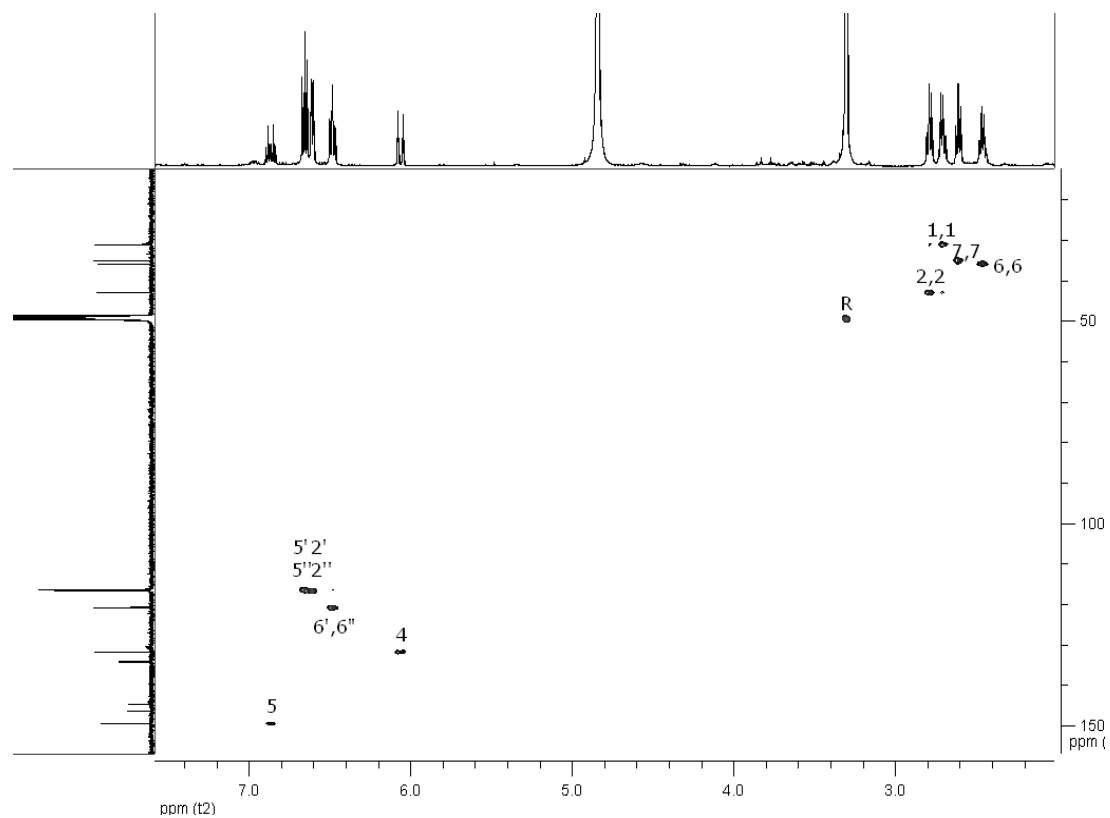
Slika 2.2.14. ^1H NMR spektar hirsutenona (**16**)



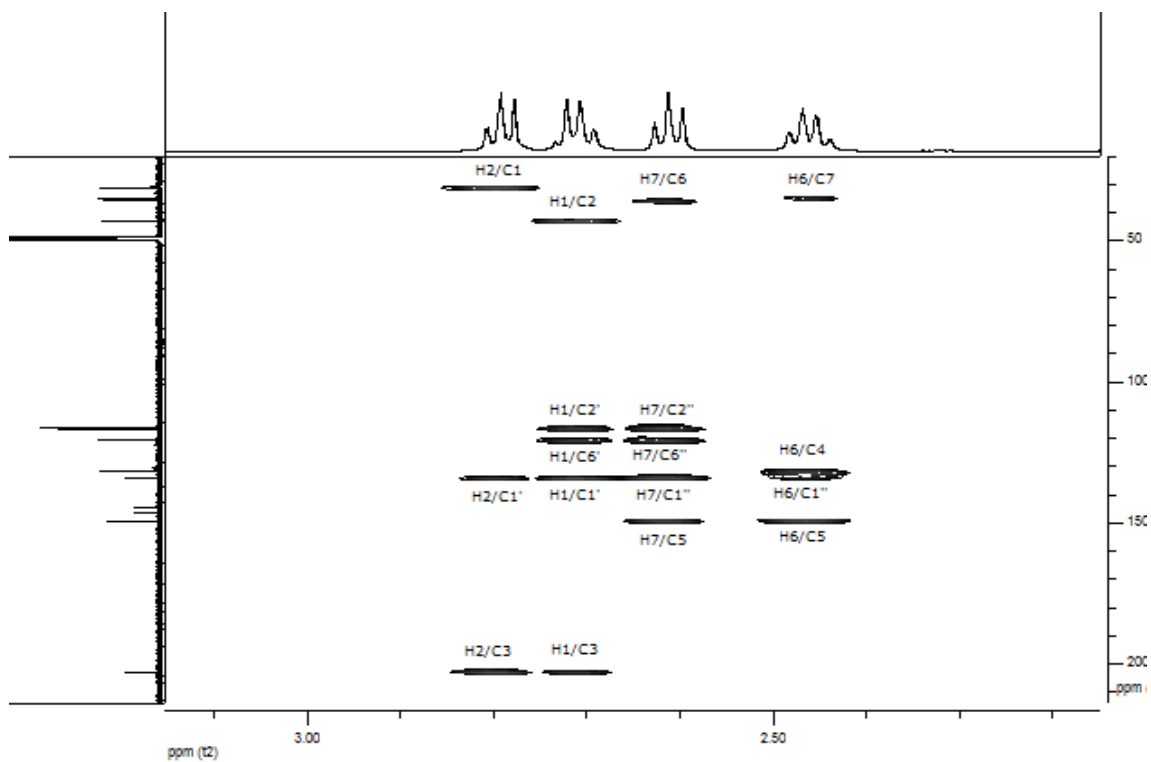
Slika 2.2.15. Signali alifatičnih protona u ^1H NMR spektru hirsutenona (16)



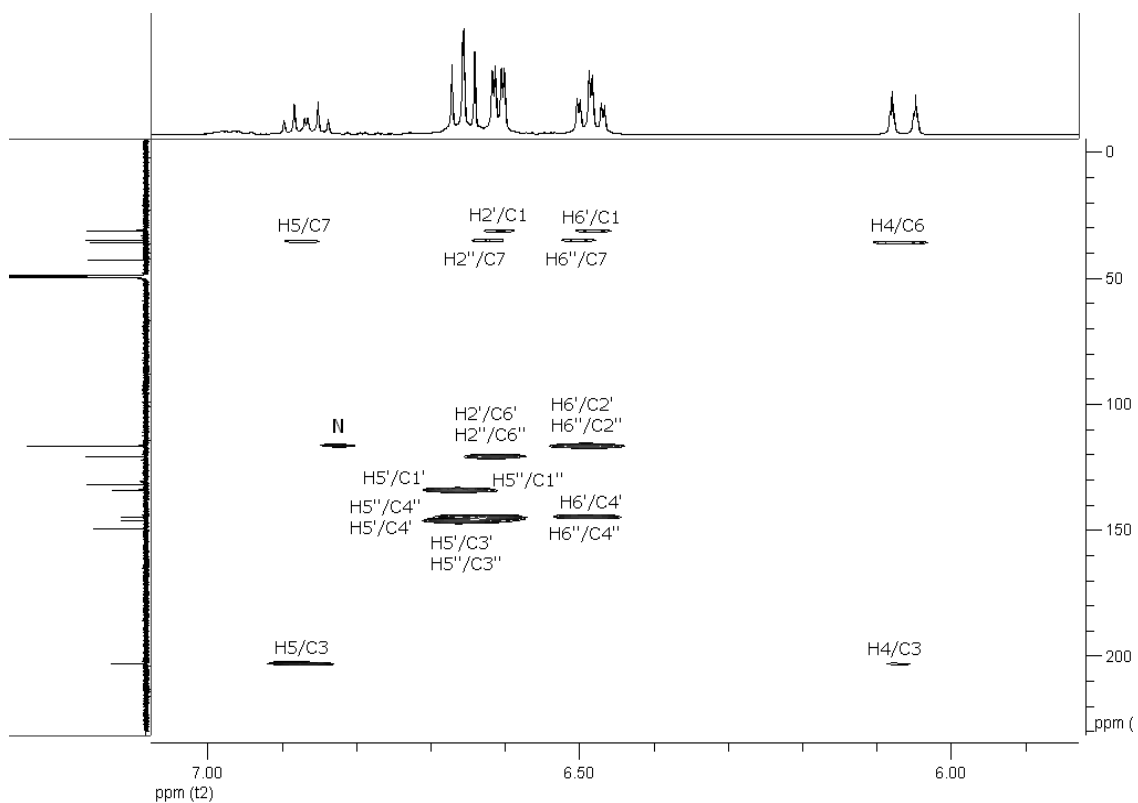
Slika 2.2.16. Signali aromatičnih i olefinskih protona u ^1H NMR spektru hirsutenona (16)

Slika 2.2.17. ^{13}C NMR spektar hirsutenona (16)

Slika 2.2.18. HSQC spektar hirsutenona (16)



Slika 2.2.19. HMBC korelacije alifatičnih protona hirsutenona (**16**)



Slika 2.2.20. HMBC korelacije aromatičnih i olefinskih protona hirsutenona (**16**)

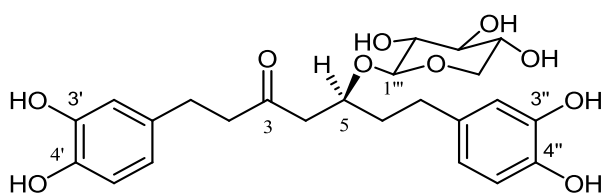
Tabela 2.2.1. NMR podaci za jedinjenja **14**, **15** i **16** (CD₃OD)

C/H	Hirsutanonol (14)		5(S)-O-Metilhirsutanonol (15)		Hirsutenon (16)	
	δ_C , tip	δ_H (J u Hz)	δ_C , tip	δ_H (J u Hz)	δ_C , tip	δ_H (J u Hz)
1	30,2; CH ₂	2,70 brs	30,3; CH ₂	2,69 brs	31,1; CH ₂	2,71 A ₂ B ₂
2	46,6; CH ₂	2,70 brs	46,5; CH ₂	2,69 brs	42,9; CH ₂	2,79 A ₂ B ₂
3	212,2; C	-	211,7; C	-	203,0; C	-
4	51,4; CH ₂	2,52 m 2,55 m	48,3; CH ₂ ^a	2,49 dd (16,0; 5,5) 2,65 dd (16,0; 7,0)	131,8; CH	6,06 dt (16,0; 1,5)
5	68,5; CH	4,00 qui	78,1; CH	3,63 m	149,4 ; CH	6,87 dt (16,0; 7,0)
6	40,6; CH ₂	1,66 A ₂ B ₂	31,1; CH ₂	1,70 m	35,8; CH ₂	2,46 qui (~ 7,0)
7	32,3; CH ₂	2,47 m; 2,58 m	31,8; CH ₂	2,48 m	35,0; CH ₂	2,61 t (7,5)
1'	134,2; C	-	134,2; C	-	134,2; C ^b	-
2'	116,5; CH	6,61 d (2,0)	116,5; CH	6,61 d (2,0)	116,5; CH	6,61 d (2,0)
3'	146,3; C	-	146,3; C	-	146,3; C	-
4'	144,4; C	-	144,4; C	-	144,7; C	-
5'	116,6; CH	6,65 d (8,0)	116,8; CH ^b	6,66 d (8,0)	116,7; CH	6,65 d (8,0)
6'	120,7; CH	6,48 dd (8,0; 2,0)	120,7; CH ^c	6,49 dd (8,0; 2,0)	120,7; CH	6,48 dd (8,0; 2,0)
1''	135,1; C	-	135,0; C	-	134,0; C ^b	-
2''	116,5; CH	6,62 d (2,0)	116,5; CH	6,60 d (2,0)	116,5; CH	6,62 d (2,0)
3''	144,6; C	-	146,3; C	-	146,3; C	-
4''	144,3; C	-	144,6; C	-	144,7; C	-
5''	116,7; CH	6,66 d (8,0)	116,7; CH ^b	6,65 d (8,0)	116,7; CH	6,66 d (8,0)
6''	120,8; CH	6,50 dd (8,0; 2,0)	120,8; CH ^c	6,48 dd (8,0; 2,0)	130,5; CH	6,49 dd (8,0; 2,0)
5-OMe	-	-	57,2; CH ₃	3,26 s	-	-

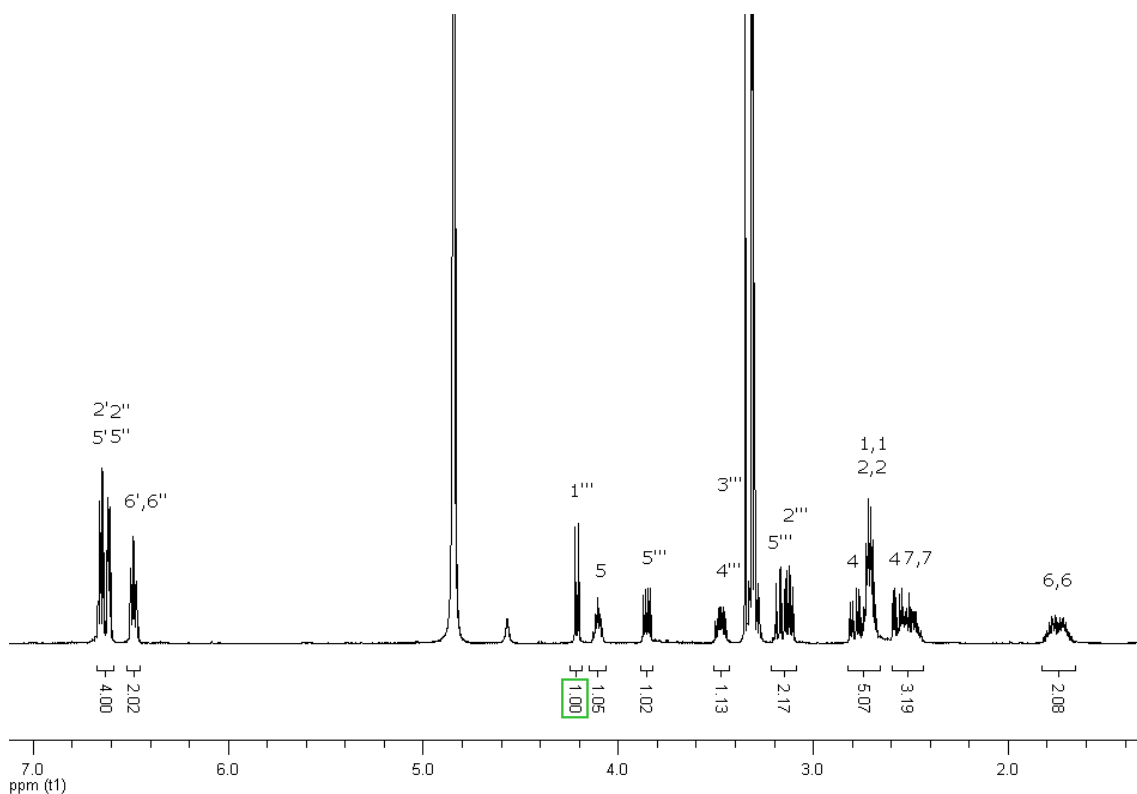
^a vrednost dobijena iz HSQC spektra (signal preklapoljen signalom rastvarača u ¹³C NMR spektru); ^{b,c} signali mogu biti zamenjeni

Jedinjenje **17** (Slika 2.2.21) je najzastupljenije jedinjenje u CHCl₃/MeOH (1:1) ekstraktu kore crne jove. Izolovano je u količini od preko 300 mg, što čini više od 2,4% od ukupne mase ekstrakta. Na osnovu analize ¹H i ¹³C NMR spektara ovog jedinjenja (Slike 2.2.22 i 2.2.23) zaključeno je da se radi o jednostavnom diarilheptanoid glikozidu sa kateholskim grupama, keto grupom i monosaharidnim supstytutentom. Analizom saharidnog dela ¹³C NMR spektra (Slika 2.2.23) uočen je jedan C atom manje i različit raspored signala ostalih monosaharidnih ugljenika nego u ¹³C NMR spektrima ranije izolovanih glukozida iz zelene jove. HSQC spektar (Slika 2.2.24) je pokazao da je jedan C atom monosaharida metilenski, što je, sa podatkom da se kao glikozidi u ekstraktima jova često sreću β -D-ksilopiranozidi, uputilo na ovaj supstytutent. Iz HMBC spektra (Slika 2.2.26) je dobijena potvrda za β -D-ksilopiranozu u položaju 5 na osnovu korelacija H-5'''/C-1''', C-3''', C-4''', H-1'''/C-5''', C-5 i H-5/C-1'''. Ostale korelacije iz HSQC i HMBC spektara (Slike 2.2.24-2.2.27) su potvrdile strukturu jedinjenja datu na

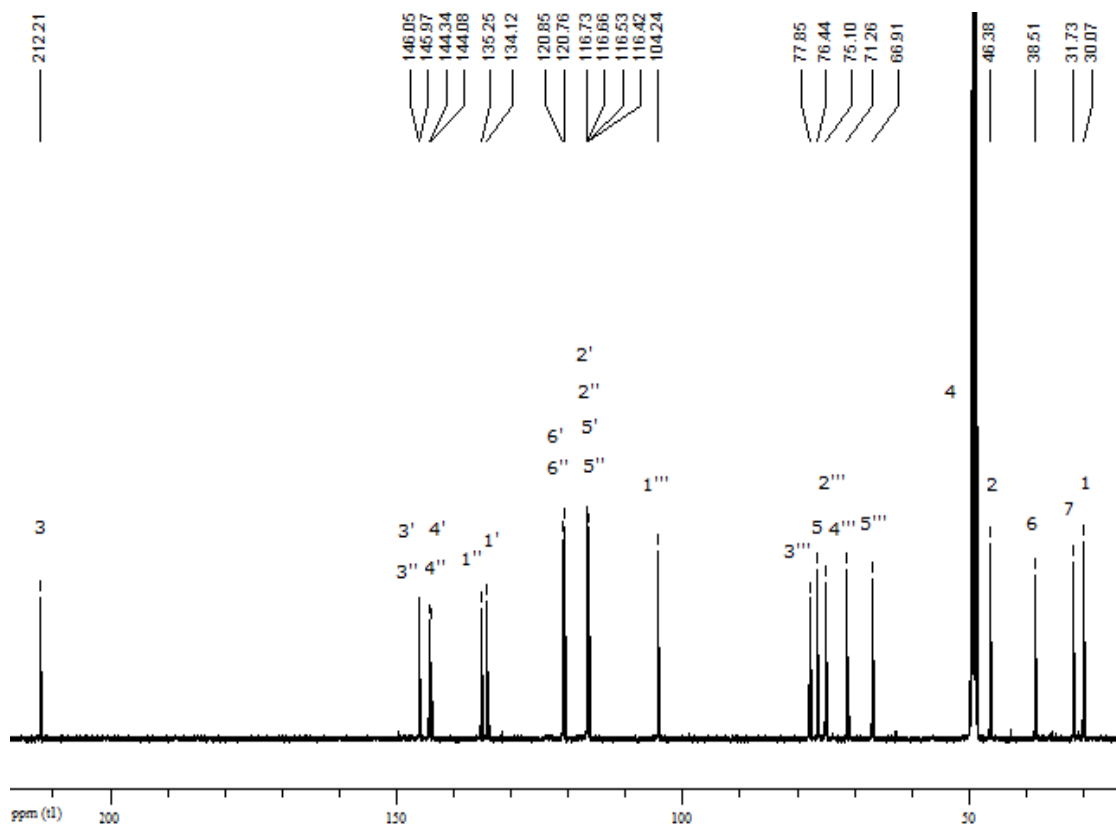
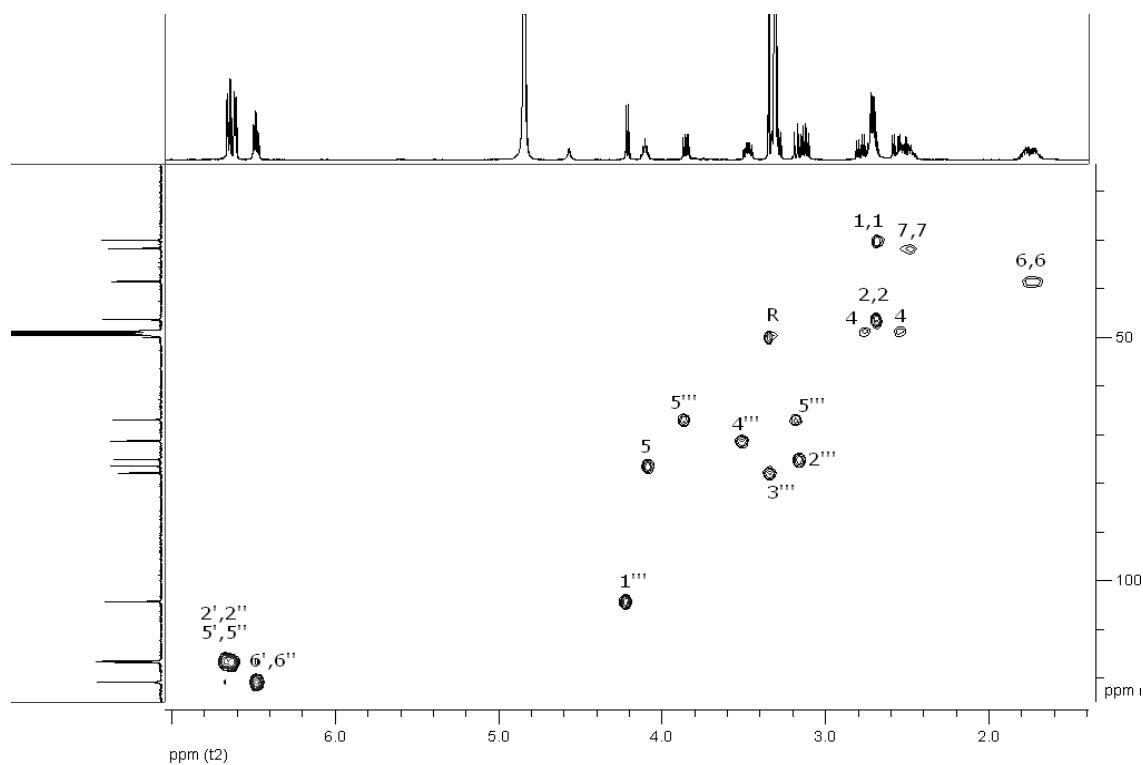
Slici 2.2.21. Kvazimolekulski jon $[M-H]^-$ na m/z 477,1836 u HR-ESI-MS spektru ukazao je na molekulsku formulu $C_{24}H_{30}O_{10}$ i poslužio je kao dodatni dokaz strukture. Vrednost za optičku rotaciju $[\alpha]_D -19,0$ se dobro slaže sa literaturnom od $-16,9^{50}$ i potvrđuje *S* konfiguraciju na C-5, zajedno sa pravilom ^{13}C glikozidacionog pomeranja; analizom ^{13}C NMR spektara jedinjenja **17** i njegovog aglikona hirsutanonola (**14**) (**Slika 2.2.2, Tabele 2.2.1 i 2.2.2**) uočeno da je $\Delta\delta_{C4} > \Delta\delta_{C6}$ ($2,7 > 2,1$). NMR podaci se odlično slažu sa literaturnim.⁵⁰ Trivijalna imena ovog jedinjenja su 5(*S*)-hirsutanonol-5-*O*- β -D-ksilopiranozid i oregonin.



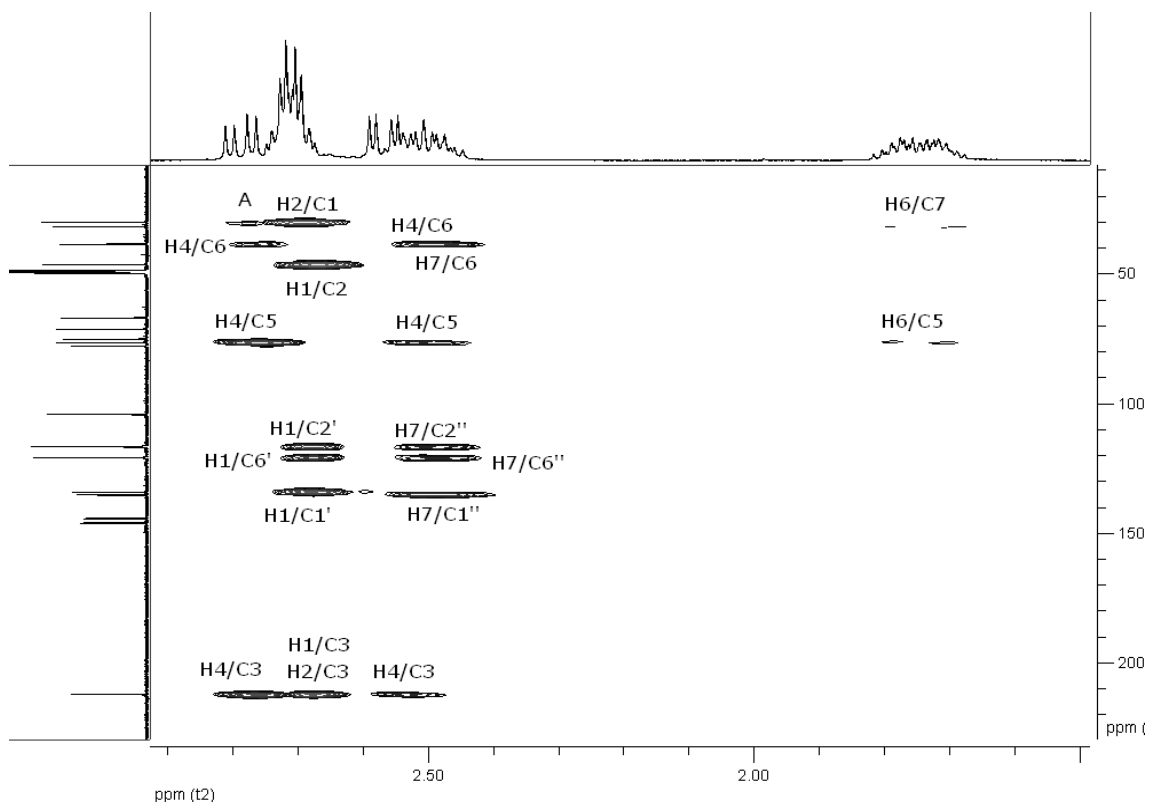
Slika 2.2.21. Strukturna formula oregonina (**17**)



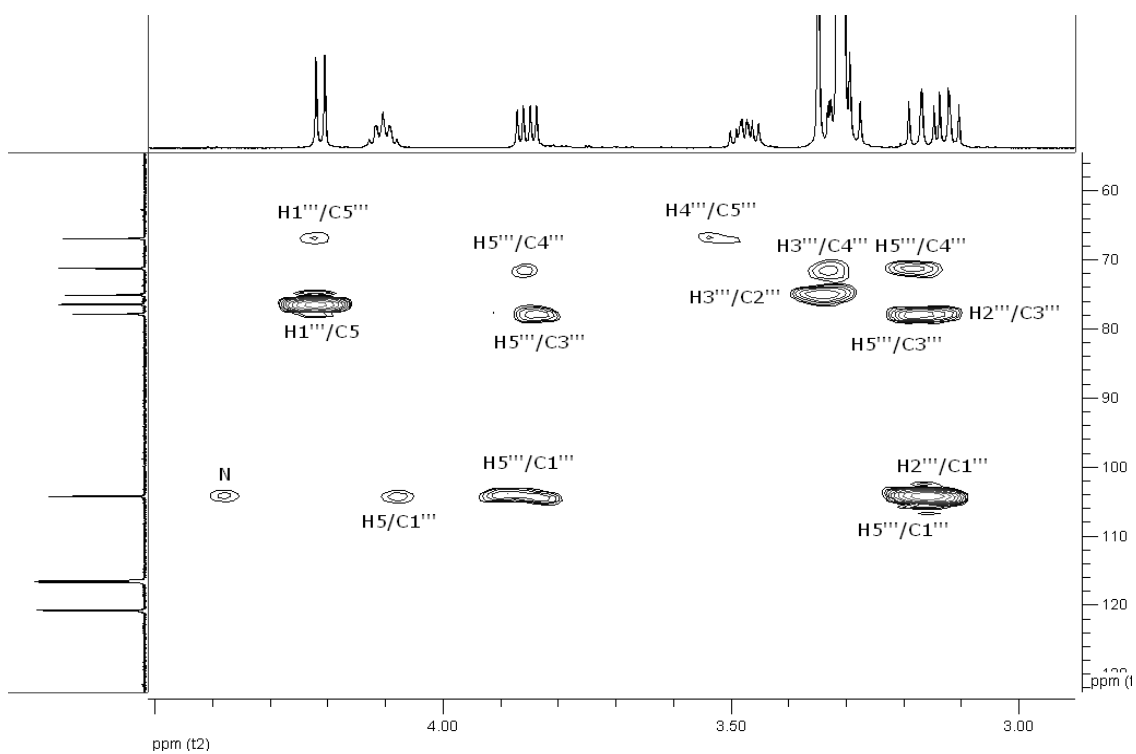
Slika 2.2.22. 1H NMR spektar oregonina (**17**)

Slika 2.2.23. ^{13}C NMR spektar oregonina (17)

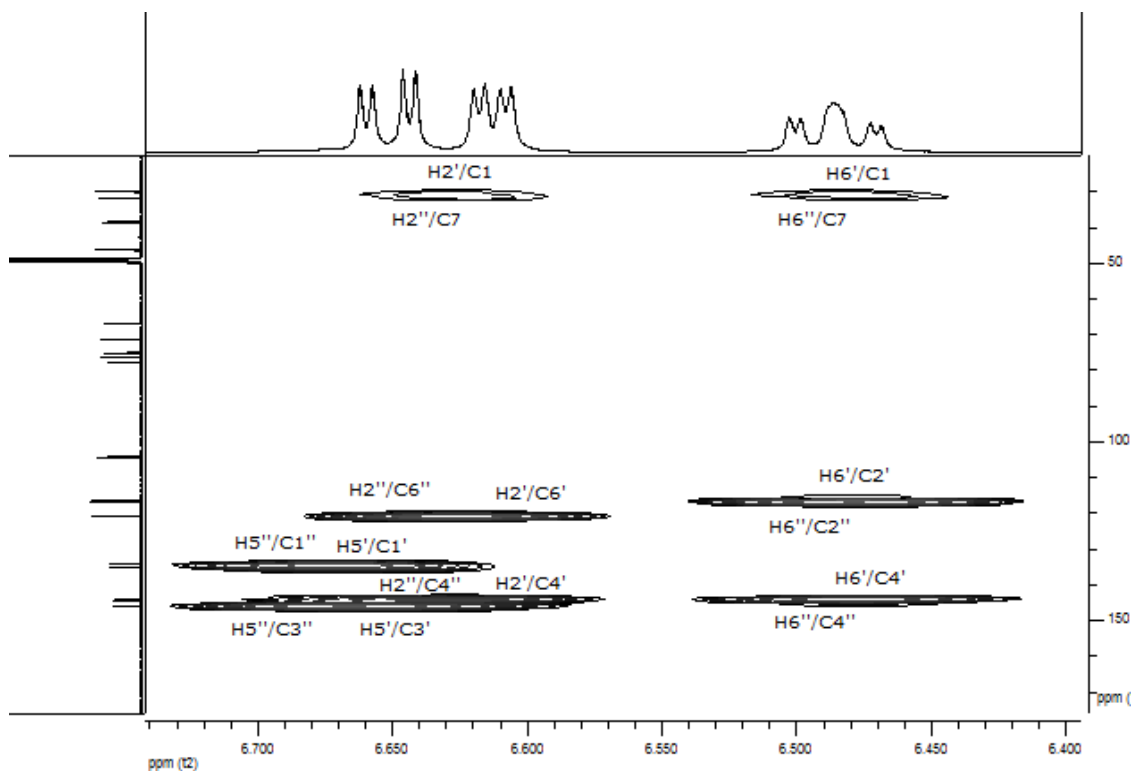
Slika 2.2.24. HSQC spektar oregonina (17)



Slika 2.2.25. HMBC korelacije heptanoidnih (bez H-5) protona oregonina (**17**)

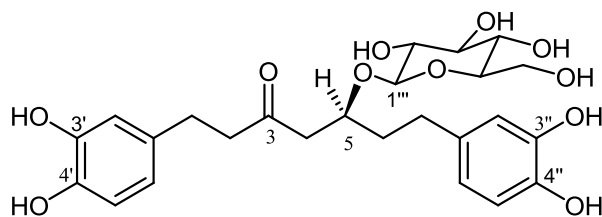


Slika 2.2.26. HMBC korelacije saharidnih i H-5 protona oregonina (**17**)



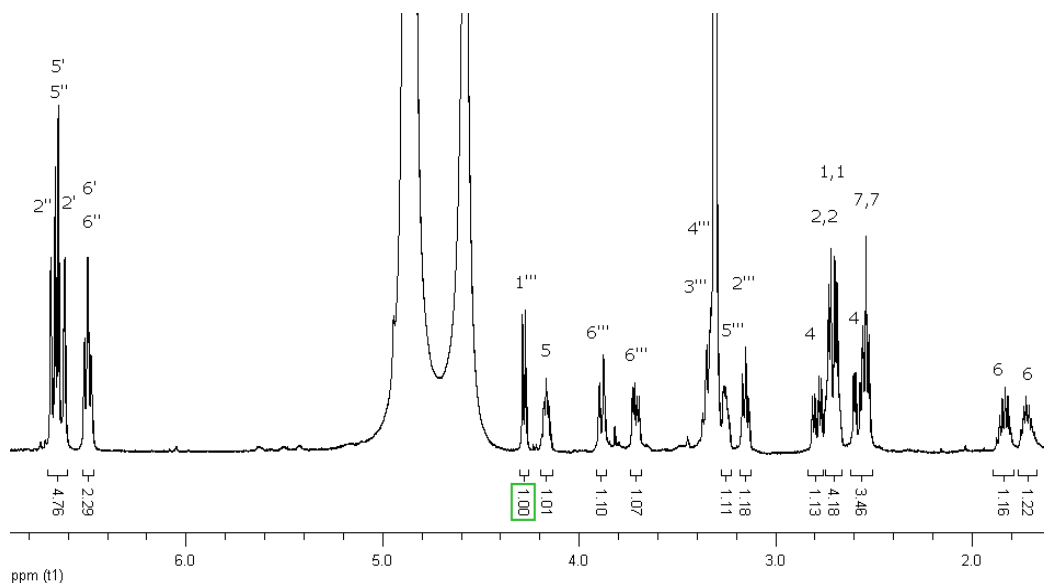
Slika 2.2.27. HMBC korelacije aromatičnih protona oregonina (**17**)

Jedinjenje **18** (**Slika 2.2.28**) je izolovano u količini od 10 mg. Na osnovu analize ^1H i ^{13}C NMR spektara ovog jedinjenja (**Slike 2.2.29** i **2.2.30**) i njihovog poređenja sa NMR spektrima već izolovanih jedinjenja **5**, **14**, **15** i **17** zaključeno je da se radi o jedinjenju koje pripada grupi kateholskih diarilheptanoida sa keto grupom u položaju 3 i D-glukopiranozom u položaju 5 heptanskog niza. Karakteristična vrednost od 4,28 ppm za H-1''' ($d, J=8,0$ Hz) uputila je na β -konfiguraciju anomernog ugljenika D-glukopiranoze čiji su ostali NMR signali prepoznati iz spektara jedinjenja **5** (**Tabela 2.1.3**). HR-ESI-MS spektar je na osnovu kvazimolekuskog jona $[\text{M}-\text{H}]^-$ na m/z 507,1925 ukazao na molekulsku formulu $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{O}_{11}$. HSQC i HMBC spektri (**Slike 2.2.31** i **2.2.32**), kao i dobro slaganje sa literaturnim spektroskopskim podacima^{69,71} su uputili na strukturu hirsutanonol-5-*O*- β -D-glukopiranozida (**Slika 2.2.28**).

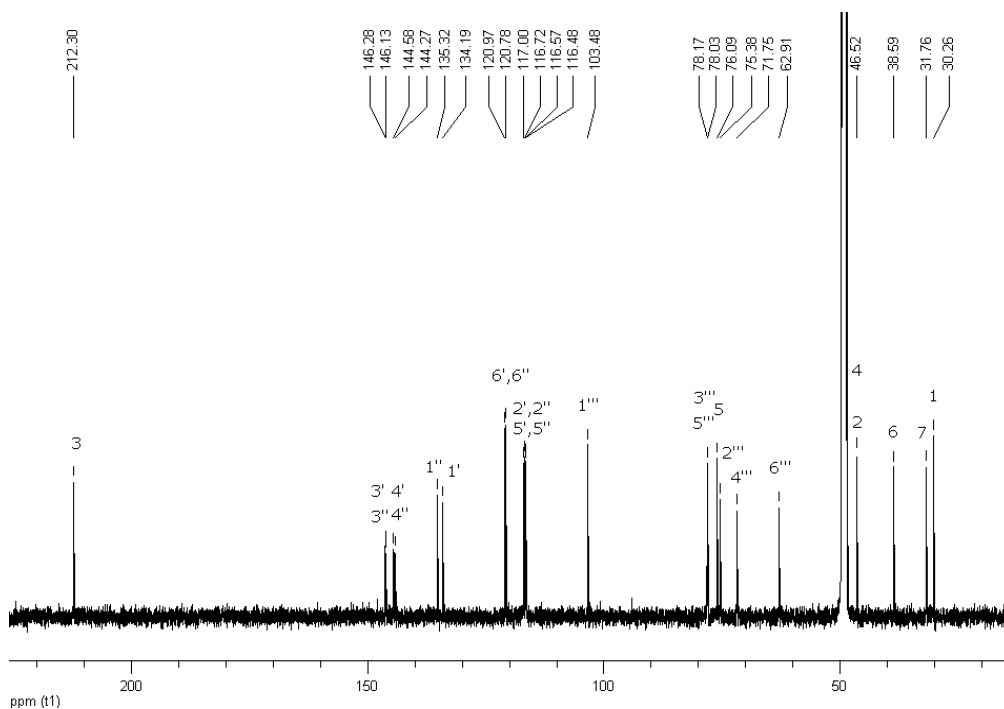


Slika 2.2.28. Strukturna formula jedinjenja **18**

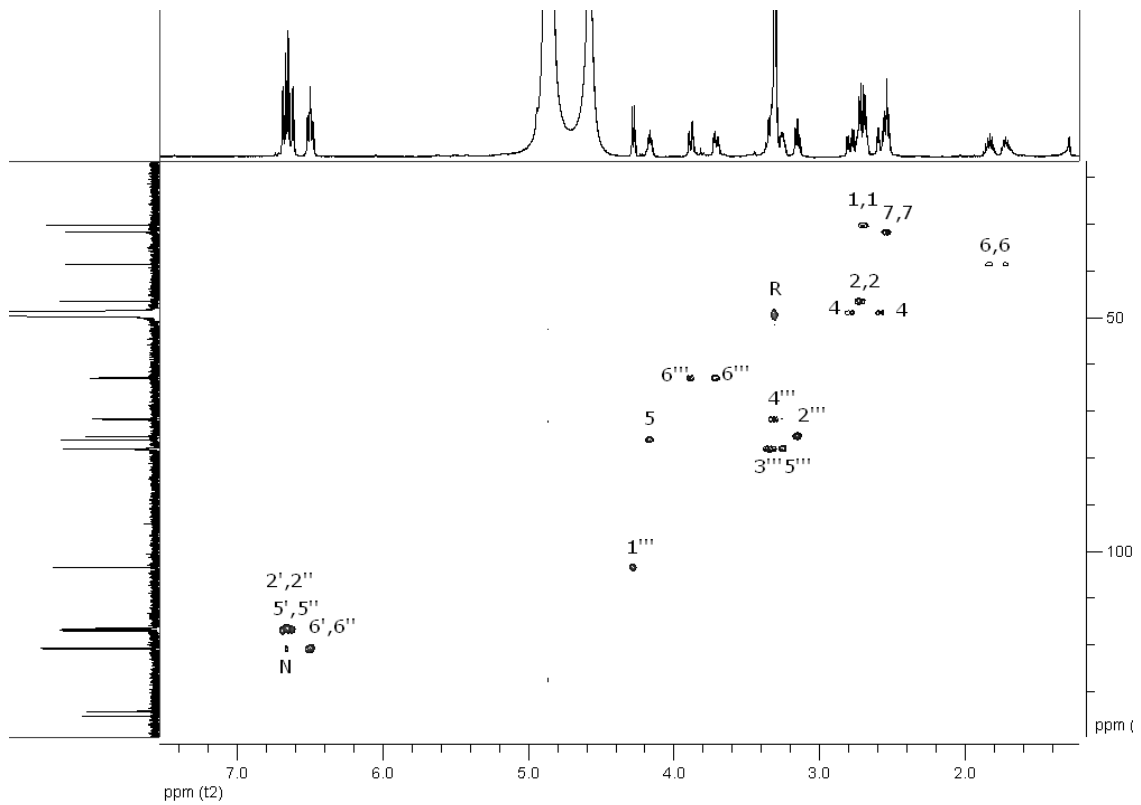
S konfiguracija na C-5 je ustanovljena primenom pravila ^{13}C glikozidacionog pomeranja. Analizom ^{13}C NMR spektara jedinjenja **18** i njegovog aglikona hirsutanola (**14**) (Slika 2.2.2, Tabele 2.2.1 i 2.2.2) uočeno da je $\Delta\delta_{\text{C}4} > \Delta\delta_{\text{C}6}$ ($2,6 > 2,0$). Vrednost za optičku rotaciju za ovo jedinjenje iznosi $[\alpha]_{\text{D}} -40,0$ i znatno se razlikuje od literaturne $-10,0^{68}$, iako je korišćen isti rastvarač (metanol).



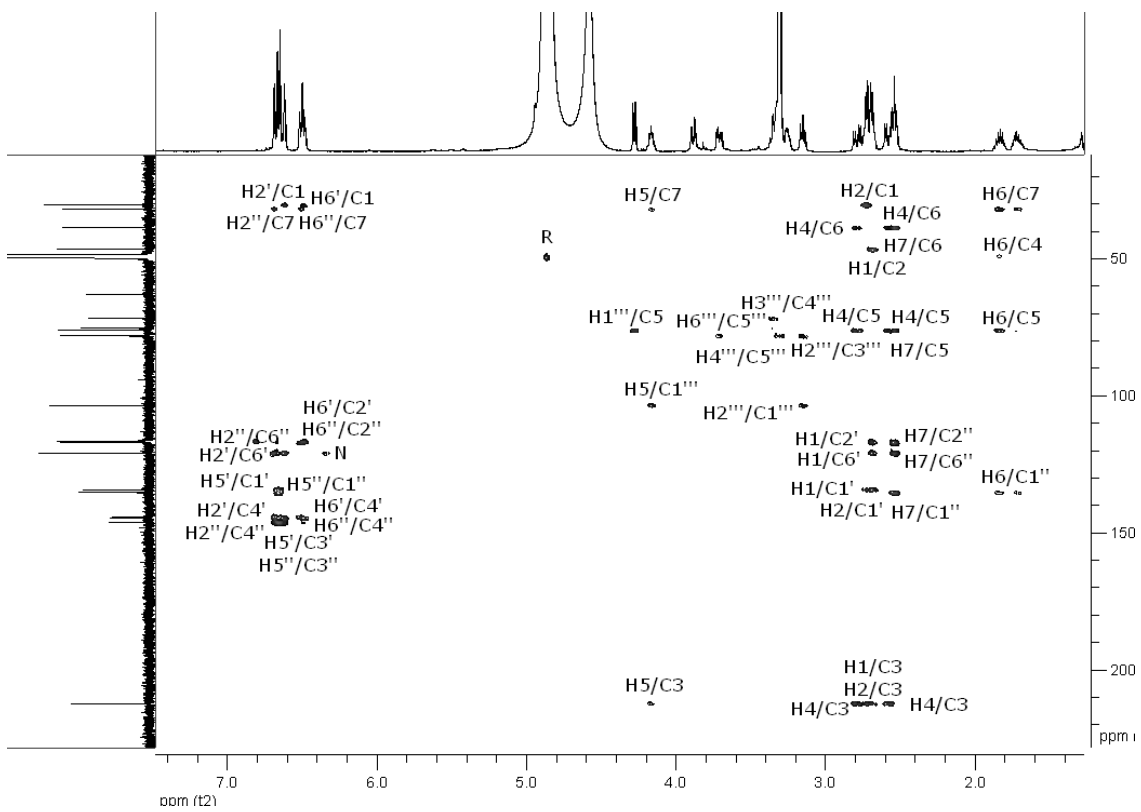
Slika 2.2.29. ^1H NMR spektar jedinjenja **18**



Slika 2.2.30. ^{13}C NMR spektar jedinjenja **18**



Slika 2.2.31. HSQC spektar jedinjenja 18



Slika 2.2.32. HMBC spektar jedinjenja 18

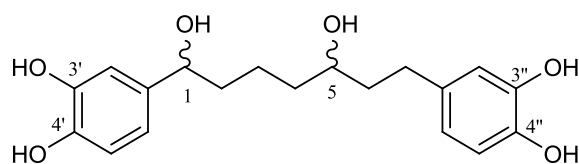
Tabela 2.2.2. NMR podaci za jedinjenja **17** i **18** (CD₃OD)

C/H	Oregonin (17)		18	
	δ_C , tip	δ_H (J u Hz)	δ_C , tip	δ_H (J u Hz)
1	30,1; CH ₂	2,71 A ₂ B ₂	30,3; CH ₂	2,71 A ₂ B ₂
2	46,4; CH ₂	2,71 A ₂ B ₂	46,5; CH ₂	2,71 A ₂ B ₂
3	212,2; C	-	212,3; C	-
4	48,7; CH ₂ ^a	2,57 dd (17,0; 5,5) 2,79 dd (17,0; 7,0)	48,8; CH ₂ ^a	2,58 dd (16,5; 5,5) 2,79 dd (16,5; 7,0)
5	76,4; CH	4,10 qui (~ 5,5)	76,1; CH	4,17 qui (~ 6,0)
6	38,5; CH ₂	1,77 m	38,6; CH ₂	1,72 m; 1,83m
7	31,7; CH ₂	2,51 m	31,8; CH ₂	2,54 t (7,5)
1'	134,1; C	-	134,2; C	-
2'	116,4; CH ^b	6,99 d (8,0)	116,7; CH	6,62 d (2,0)
3'	146,0; C	-	146,3; C ^b	-
4'	144,1; C ^c	-	144,6; C	-
5'	116,5; CH ^b	6,68 d (8,0)	116,4; CH ^c	6,66 d (8,0)
6'	120,8; CH	6,99 d (8,0)	120,8; CH	6,49 dd (8,0; 2,0)
1''	135,3; C	-	135,3; C	-
2''	116,7; CH ^b	7,00 d (8,0)	117,0; CH	6,69 d (2,0)
3''	146,0; C	-	146,2; C ^b	-
4''	144,3; C ^c	-	144,3; C	-
5''	116,8; CH ^b	6,68 d (8,0)	116,5; CH ^c	6,66 d (8,0)
6''	120,8; CH	7,00 d (8,0)	121,0; CH	6,51 dd (8,0; 2,0)
Xylp			-	
1'''	104,2; CH	4,22 d (7,5)	-	-
2'''	75,1; CH	3,12 dd (9,0; 7,5)	-	-
3'''	77,9; CH	3,32 m ^a	-	-
4'''	71,3; CH	3,47 m	-	-
5'''	66,9; CH ₂	3,17 dd (11,0; 10,0) 3,86 dd (11,0; 5,0)	-	-
-			GlcP	
1'''	-	-	103,5; CH	4,28 d (8,0)
2'''	-	-	75,4; CH	3,15 dd (9,0; 8,0)
3'''	-	-	78,2; CH	3,33 m ^a
4'''	-	-	71,8; CH	3,31m ^a
5'''	-	-	78,0; CH	3,26 m
6'''	-	-	62,9; CH ₂	3,71 dd (12,0; 5,5) 3,89 dd (12,0; 2,0)

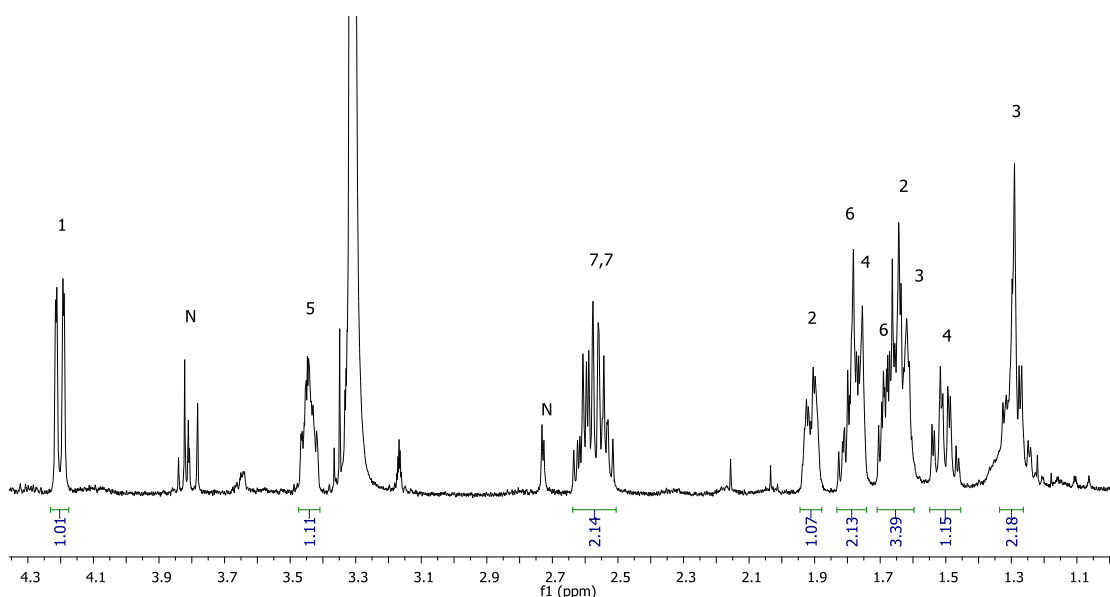
Xylp - ksilopiranozil grupa; **GlcP** - glukopiranozil grupa; ^a vrednost dobijena iz HSQC spektra (signal preklopjen signalom rastvarača u ¹³C NMR spektru); ^{b,c} signali mogu biti zamenjeni

Jedinjenje **19** (Slika 2.2.33) je izolovano u količini od 0,7 mg. Iz NMR spektara (Slike 2.2.34-2.2.36) zaključeno je da je u pitanju jednostavni diarilheptanoid sa dve kateolske grupe. Signali na 3,45 i 4,20 ppm u ¹H NMR spektru, odnosno 79,0 i 81,2 ppm u ¹³C NMR spektru (Slike 2.2.34-2.2.36, Tabela 2.2.3) ukazali su na kiseonične

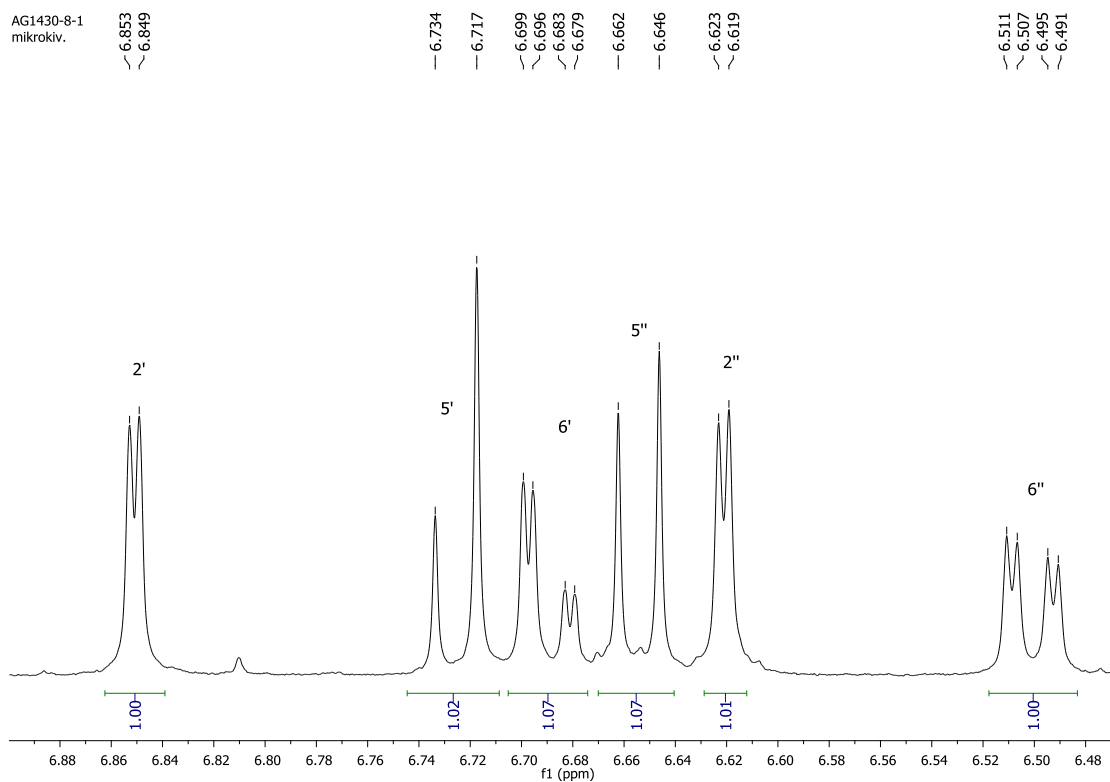
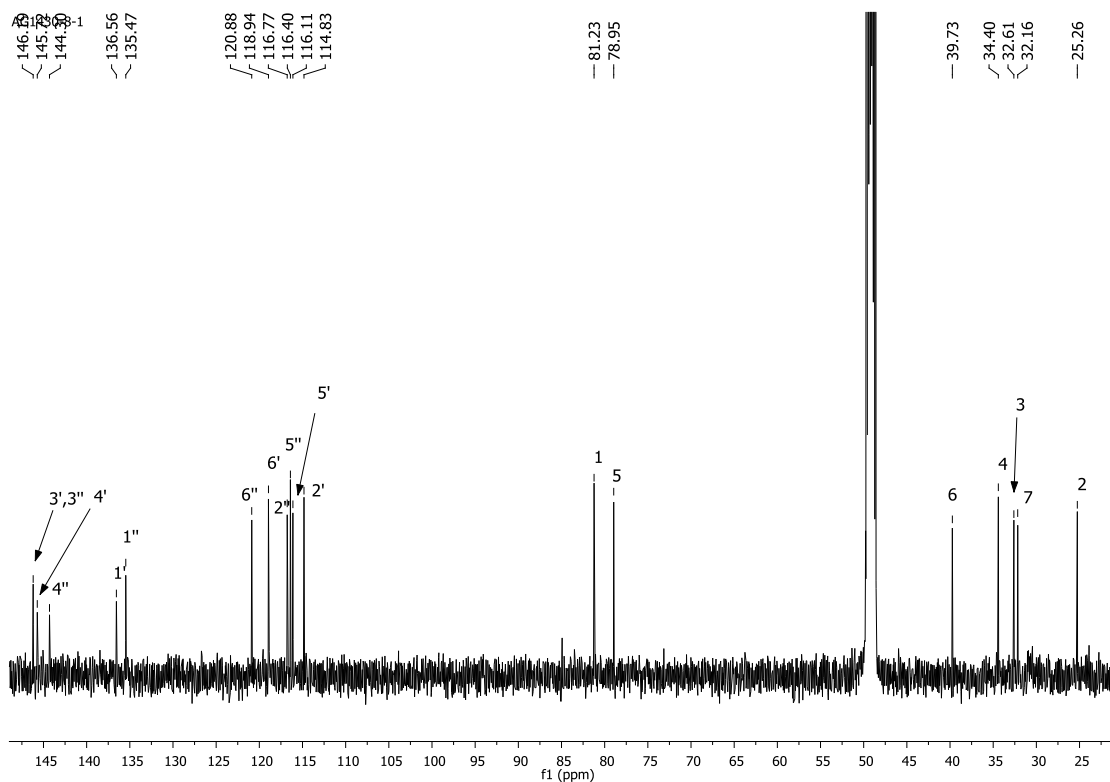
supstituentu. Kako nije bilo dodatnih NMR signala koji bi ukazali na eventualno prisustvo saharidnog supstituenta, zaključeno je da su ti supstituenti hidroksilne grupe. Jon na m/z 329,1418 u HR-ESI-MS spektru prvobitno je smatran za kvazimolekulski $[M-H]^-$, ali to nije bilo u skladu sa NMR podacima. Zbog lakog odlaska molekula vode koji potiče od OH grupe u benzilnom položaju zaključeno je da je u pitanju fragmentacioni jon $[M-H_2O-H]^-$ kao i da je molekulska formula jedinjenja **19** $C_{19}H_{24}O_6$. Na osnovu HMBC korelacija H-1/C-1',C-2',C-6', H-2',H-6'/C-1 utvrđeno je da je jedna OH grupa u položaju 1, a na osnovu korelacija H-2'',H-6''/C-7 i H-7/C-5,C-6,C-1'',C-2'',C-6'', da je druga OH grupa u položaju 5 (Slike 2.2.38 i 2.2.39). Daljom analizom podataka iz HMBC i HSQC spektara (Slike 2.2.37-2.2.39) došlo se do strukture date na Slici 2.2.33. Konfiguracije na C-1 i C-5 nisu određene. $[\alpha]_D$ vrednost nije određena zbog male količine i nedovoljne čistoće; iz istih razloga nije ispitivana ni biološka aktivnost jedinjenja **19**. Kako nema podataka u literaturi o ovom jedinjenju, reč je o novom prirodnom proizvodu.

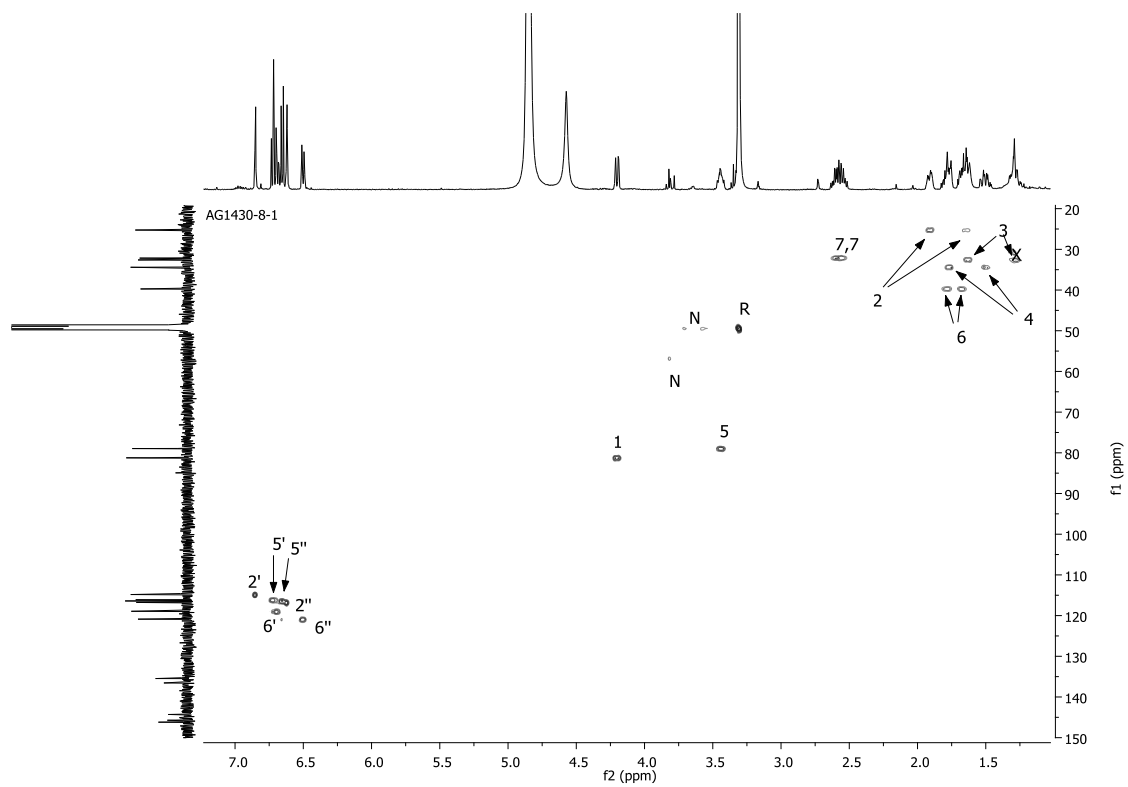


Slika 2.2.33. Strukturna formula jedinjenja **19**

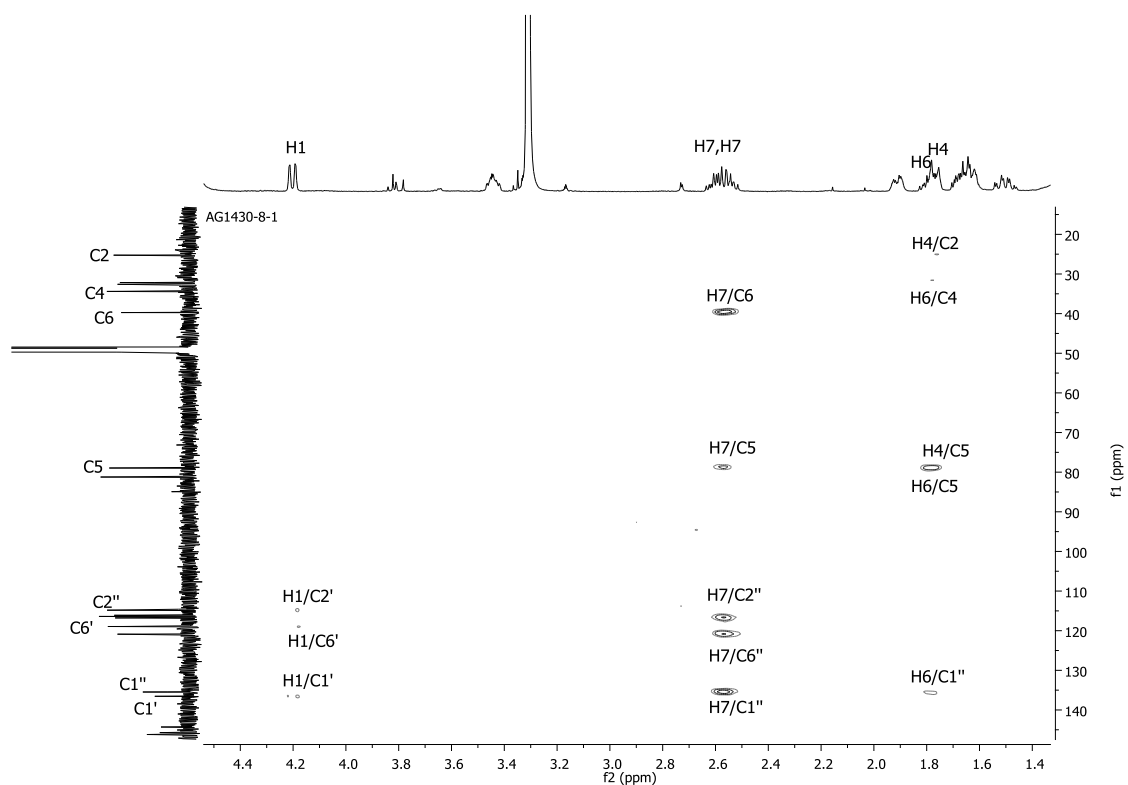


Slika 2.2.34. Signali alifatičnih protona u 1H NMR spektru jedinjenja **19**

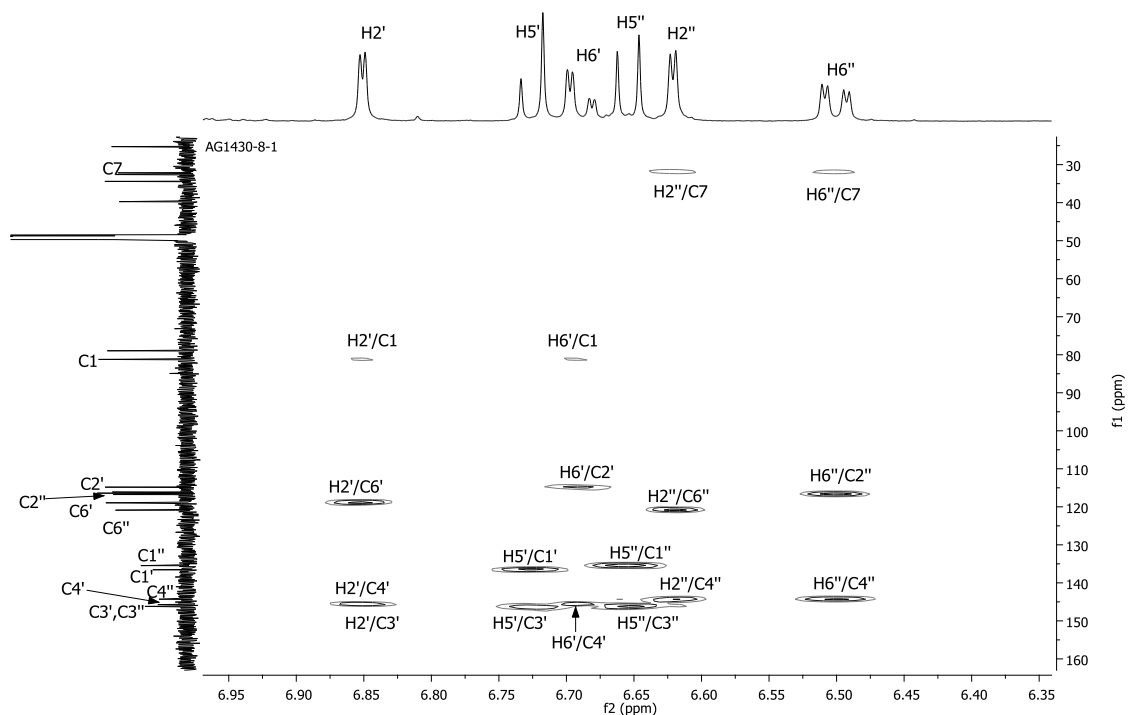
Slika 2.2.35. Signali aromatičnih protona u ^1H NMR spektru jedinjenja 19Slika 2.2.36. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 19



Slika 2.2.37. HSQC spektar jedinjenja 19

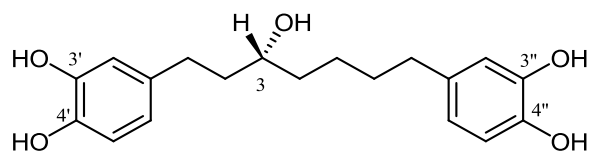


Slika 2.2.38. HMBC korelacije alifatičnih protona jedinjenja 19

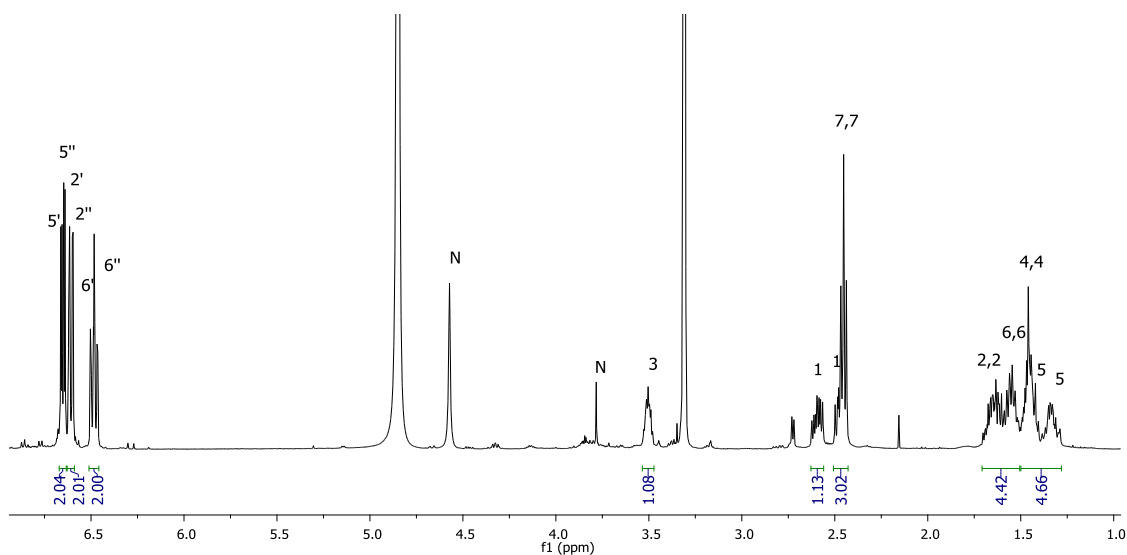
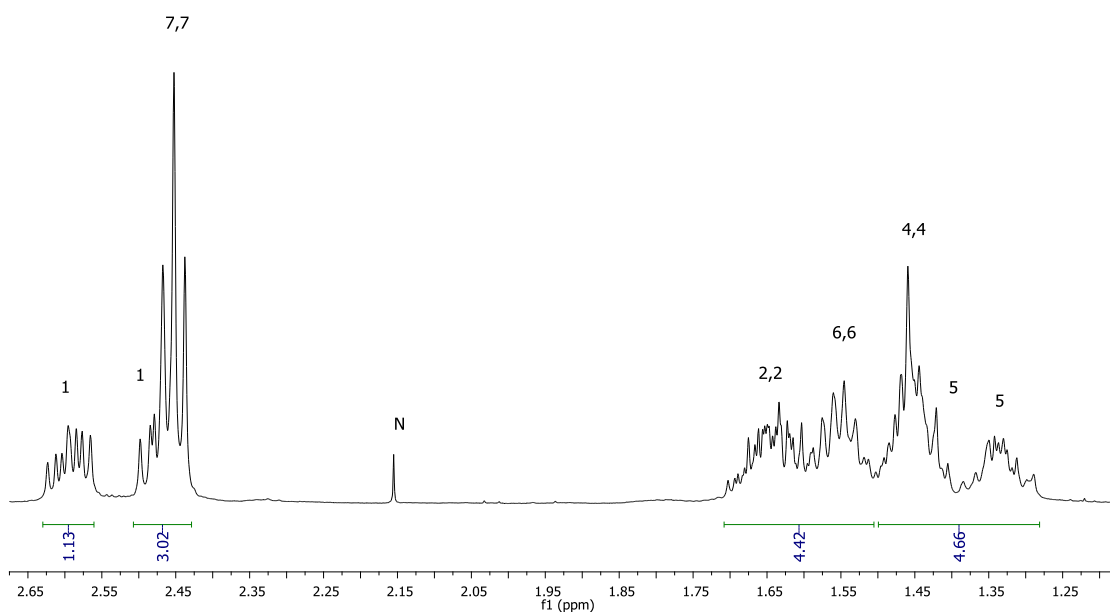


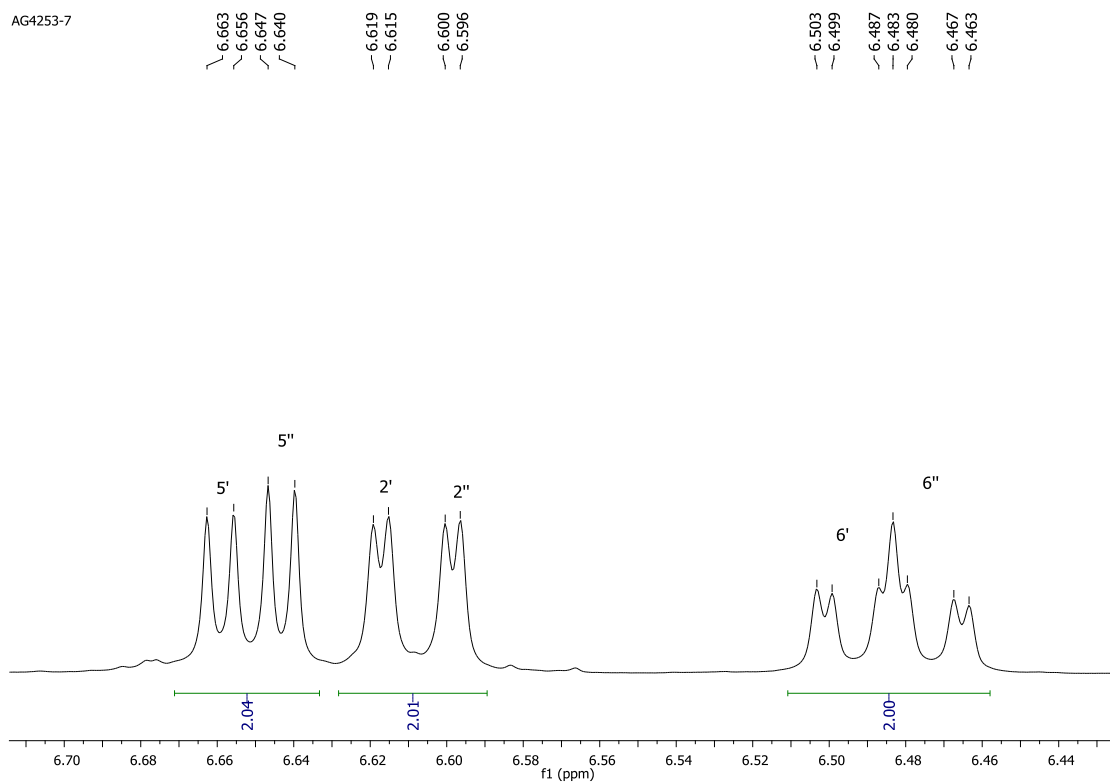
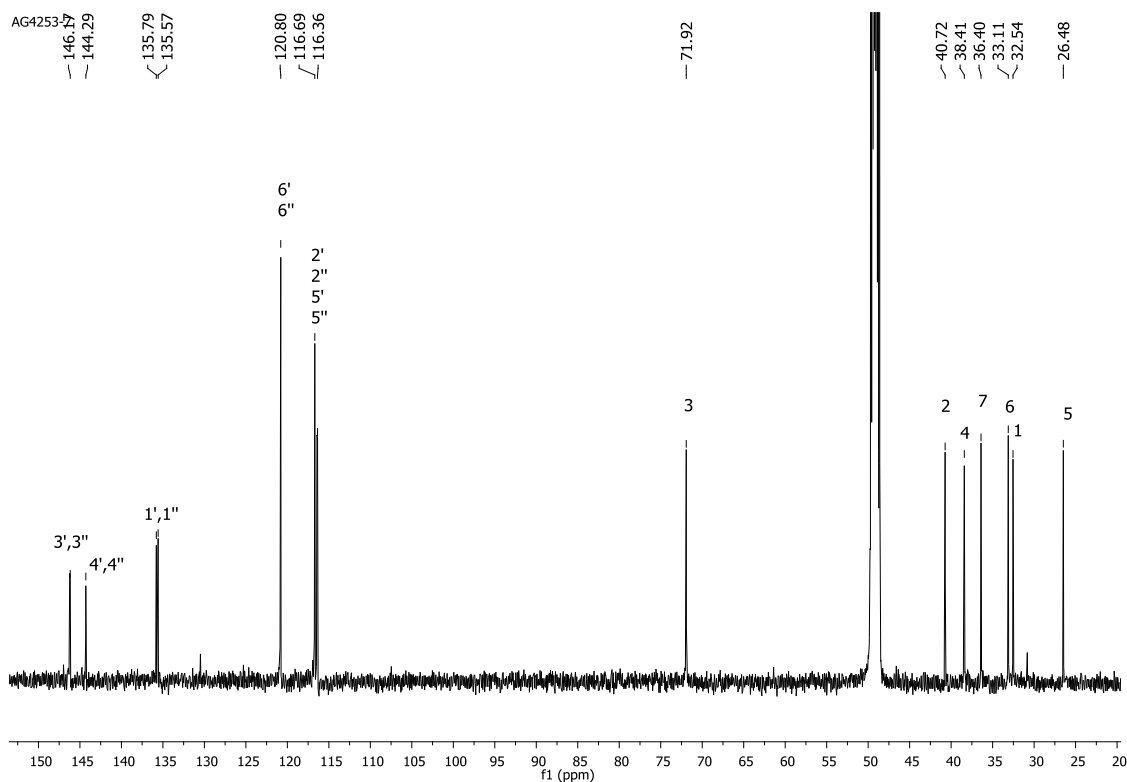
Slika 2.2.39. HMBC korelacije aromatičnih protona jedinjenja **19**

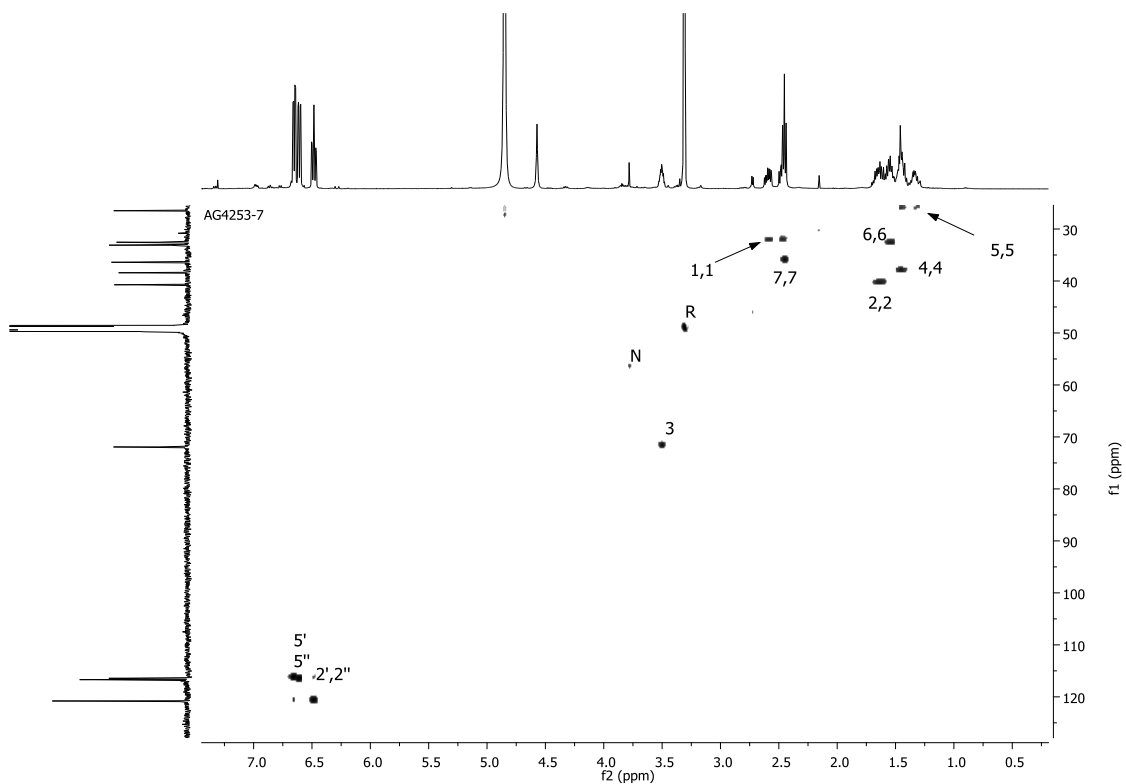
Jedinjenje **20** (Slika 2.2.40) je izolovano u količini od 4 mg. Iz NMR spektara (Slike 2.2.41-2.2.44) videlo se da je u pitanju jednostavni diarilheptanoid sa dve kateolske grupe (Slika 2.2.42). Na prisustvo jednog kiseoničnog supstituenta na heptanskom nizu ukazali su signali na 3,50 ppm u ^1H NMR i 71,9 ppm u ^{13}C NMR spektru (Slike 2.2.41 i 2.2.44, Tabela 2.2.3). Maseni spektar je pokazao da je taj supstituent OH grupa, jer je kvazimolekulski jon $[\text{M}-\text{H}]^-$ na m/z 331,1604 u HR-ESI-MS spektru odgovarao molekulskej formuli $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_5$. Položaj OH grupe je određen na osnovu HMBC korelacija H-1/C-2,C-3, H-2/C-1,C-3 (Slika 2.2.46) i HSQC korelacija (Slika 2.2.45). Slaganje CD podataka sa literaturnim (negativni maksimumi u oblasti 255-285 nm) potvrdilo je *R* konfiguraciju na C-3 jedinjenja **20** - 3(*R*)-1,7-di(3,4-dihidroksifenil)heptan-3-ola, poznatog pod trivijalnim nazivom rubranol.^{68,73} Ovo jedinjenje je aglikon mnogih diarilheptanoid glikozida, a njegovi ^{13}C NMR podaci su korišćeni za izračunavanje glikozidacionih pomeranja i utvrđivanje konfiguracije na C-3 atomima mnogih diarilheptanoid glikozida i složenih diarilheptanoida izolovanih u ovom radu.



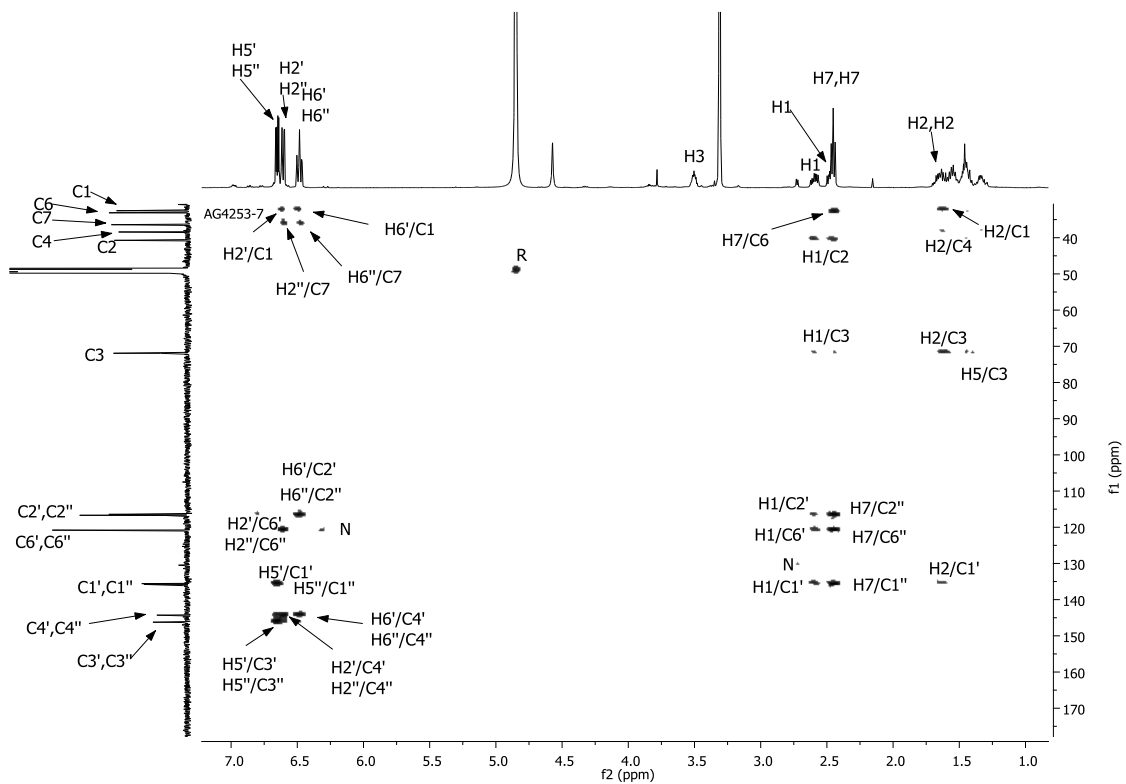
Slika 2.2.40. Strukturna formula rubranola (20)

Slika 2.2.41. ^1H NMR spektar rubranola (20)Slika 2.2.42. Signali alifatičnih protona (bez H-3) u ^1H NMR spektru rubranola (20)

Slika 2.2.43. Signali aromatičnih protona u ^1H NMR spektru rubranola (20)Slika 2.2.44. ^{13}C NMR spektar rubranola (20)



Slika 2.2.45. HSQC spektar rubranola (20)

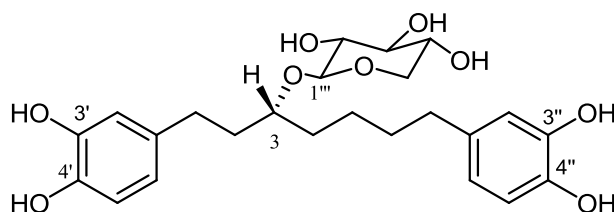


Slika 2.2.46. HMBC spektar rubranola (20)

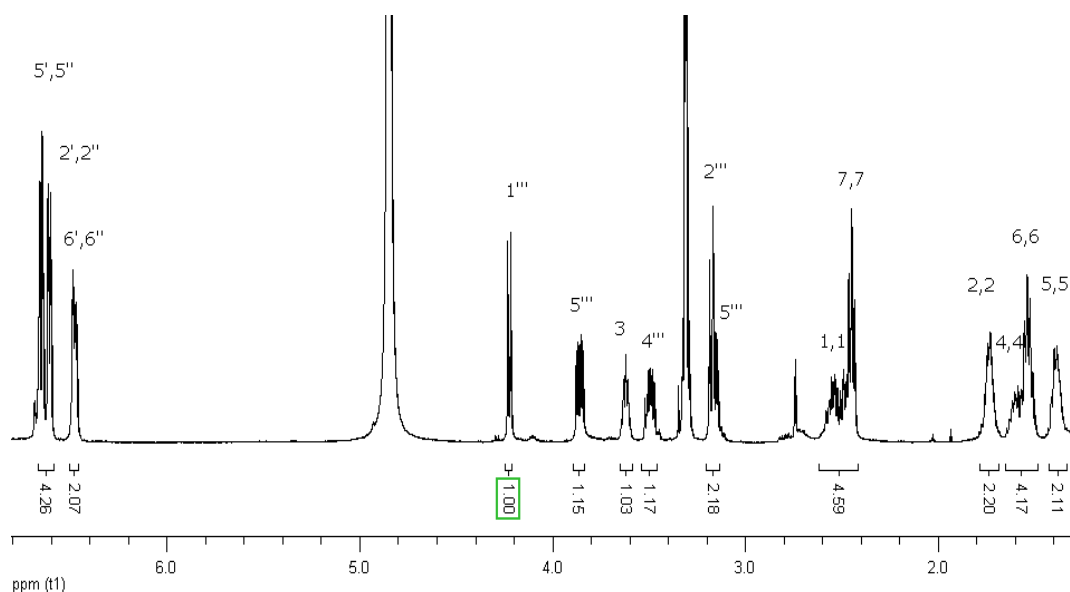
Tabela 2.2.3. NMR podaci za jedinjenja **19** i **20** (CD₃OD)

C/H	19		Rubranol (20)	
	δ_C , tip	δ_H (J u Hz)	δ_C , tip	δ_H (J u Hz)
1	81,2; CH	4,20 dd (11,5; 2,0)	32,6; CH ₂	2,46 m; 2,58 m
2	25,3; CH ₂	1,64 m; 1,91 m	40,7; CH ₂	1,64 m
3	32,6; CH ₂	1,28 m; 1,62 m	71,9; CH	3,50 sept (~4,5)
4	34,4; CH ₂	1,50 m; 1,77 m	48,7; CH ₂	1,46 m
5	79,0; CH	3,45 m	38,4 ; CH ₂	1,32 m; 1,45 m
6	39,7; CH ₂	1,67 m; 1,78 m	33,1; CH ₂	1,55 qui (~7,0)
7	32,2; CH ₂	2,59 m	36,4; CH ₂	2,45 t (7,5)
1'	136,6; C	-	135,8; C	-
2'	114,8; CH	6,85 d (2,0)	130,5; CH	6,62 d (2,0)
3'	146,2; C	-	146,2; C	-
4'	145,7; C	-	144,3; C	-
5'	116,1; CH	6,73 d (8,5)	116,2; CH	6,66 d (8,0)
6'	118,9; CH	6,69 dd (8,5; 2,0)	120,8; CH	6,49 dd (8,0; 2,0)
1''	135,5; C	-	135,6; C	-
2''	116,8; CH	6,62 d (2,0)	130,5; C	6,60 d (2,0)
3''	146,2; C	-	146,2; C	-
4''	144,3; C	-	144,2; C	-
5''	116,4; CH	6,65 d (8,0)	116,4; CH	6,65 d (8,0)
6''	120,9; CH	6,50 dd (8,0; 2,0)	120,8; CH	6,48 dd (8,0; 2,0)

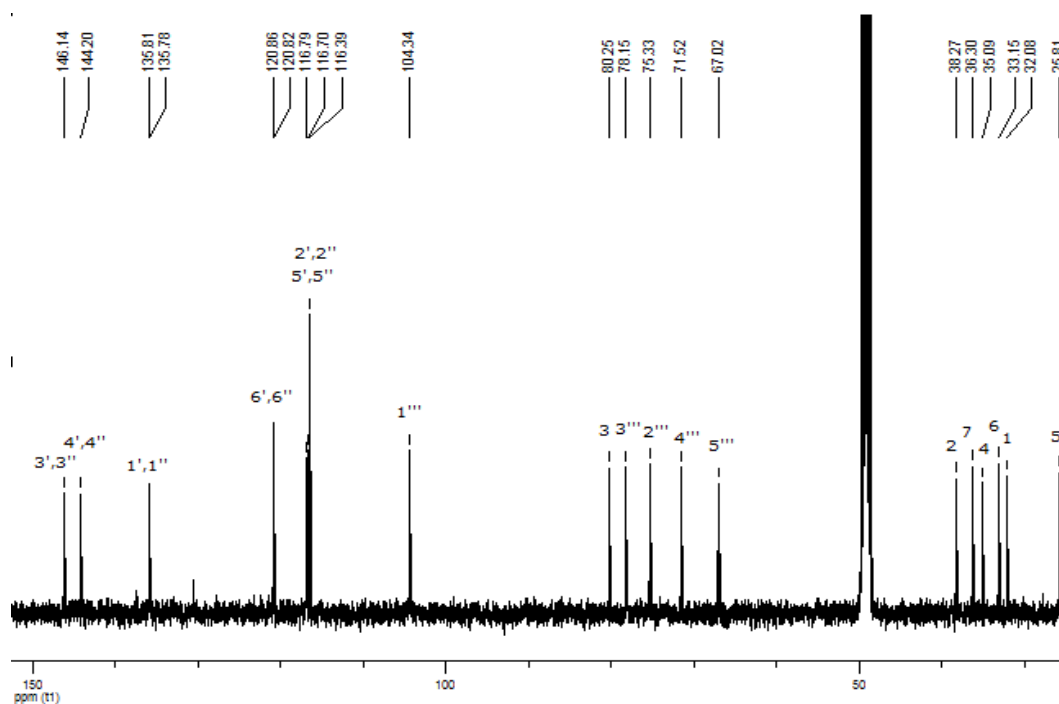
Jedinjenje **21** (Slika 2.2.47) je izolovano u količini od 12 mg i pripada grupi diarilheptanoida koji imaju kateholske grupe u položajima 1 i 7, čije su karakteristike date na početku ovog poglavlja. Za razliku od do sada opisanih jedinjenja izolovanih iz crne jove, jedinjenje **21** nema keto grupu u položaju 3 (izostanak signala na $\delta_C > 200$ ppm u ¹³C NMR spektru). U saharidnoj oblasti ¹H NMR i ¹³C NMR spektara (Slike 2.2.48 i 2.2.49) uočeni su signali na skoro istim hemijskim pomeranjima kao kod jedinjenja **17** (Slika 2.2.21) koji su ukazali na β -D-ksilopiranozu. Kvazimolekulski joni [M+H-H₂O]⁺ na m/z 447,1986 i [M+Na]⁺ na m/z 487,1908 uočeni u HR-ESI-MS spektru uputili su na molekulska formulu C₂₄H₃₂O₉ koja odgovara diarilheptanoidu sa dve kateholske grupe i β -D-ksilopiranozom. Položaj monosaharidne jedinice (C-3) je određen na osnovu HMBC korelacija H-1,H-2,H-4/C-3 i H-3/C-1,C-2,C-5,C-1'' (Slike 2.2.51 i 2.2.52).

**Slika 2.2.47.** Strukturna formula rubranozida B (**21**)

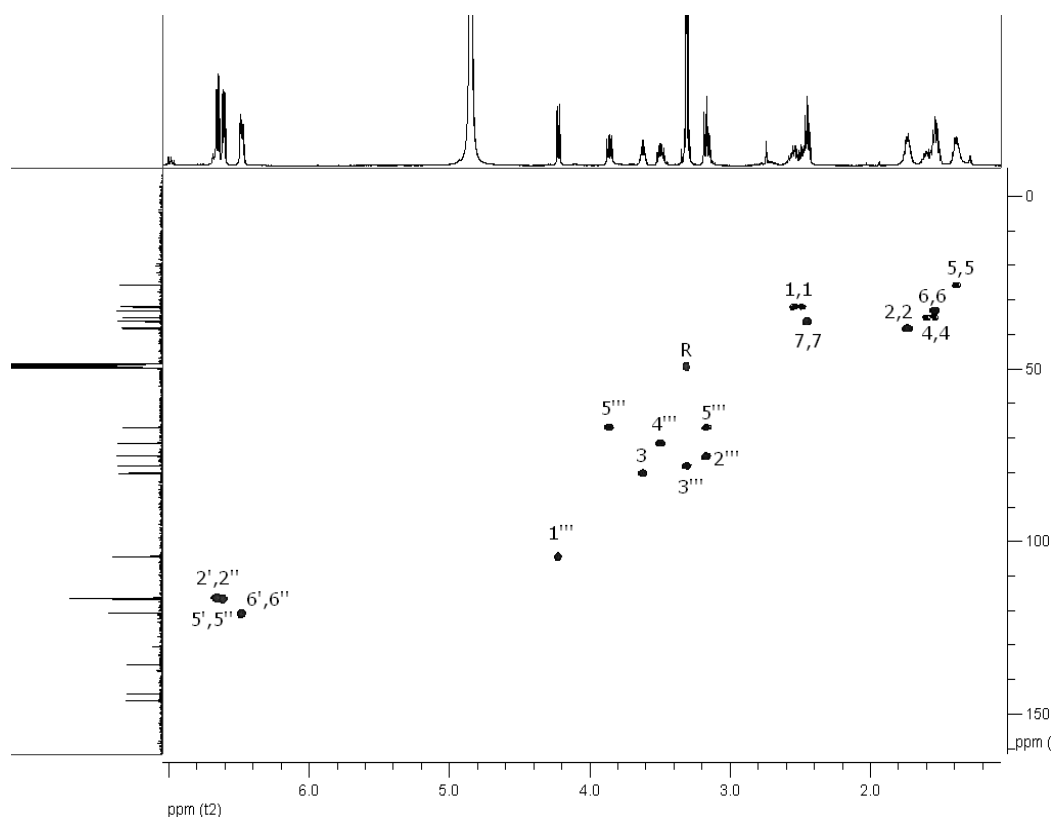
R konfiguracija na C-3 atomu je ustanovljena primenom pravila ^{13}C glikozidacionog pomeranja. Analizom ^{13}C NMR spektara jedinjenja **21** i njegovog aglikona rubranola (**20**) (Slika 2.2.40, Tabele 2.2.3 i 2.2.4) uočeno je da je $\Delta\delta_{\text{C}4} > \Delta\delta_{\text{C}2}$ ($3,3 > 2,4$). HSQC i HMBC korelacije (Slike 2.2.50-2.2.53) su, zajedno sa literaturnim podacima⁷⁷, potvrdile strukturu rubranozida B (Slika 2.2.47).



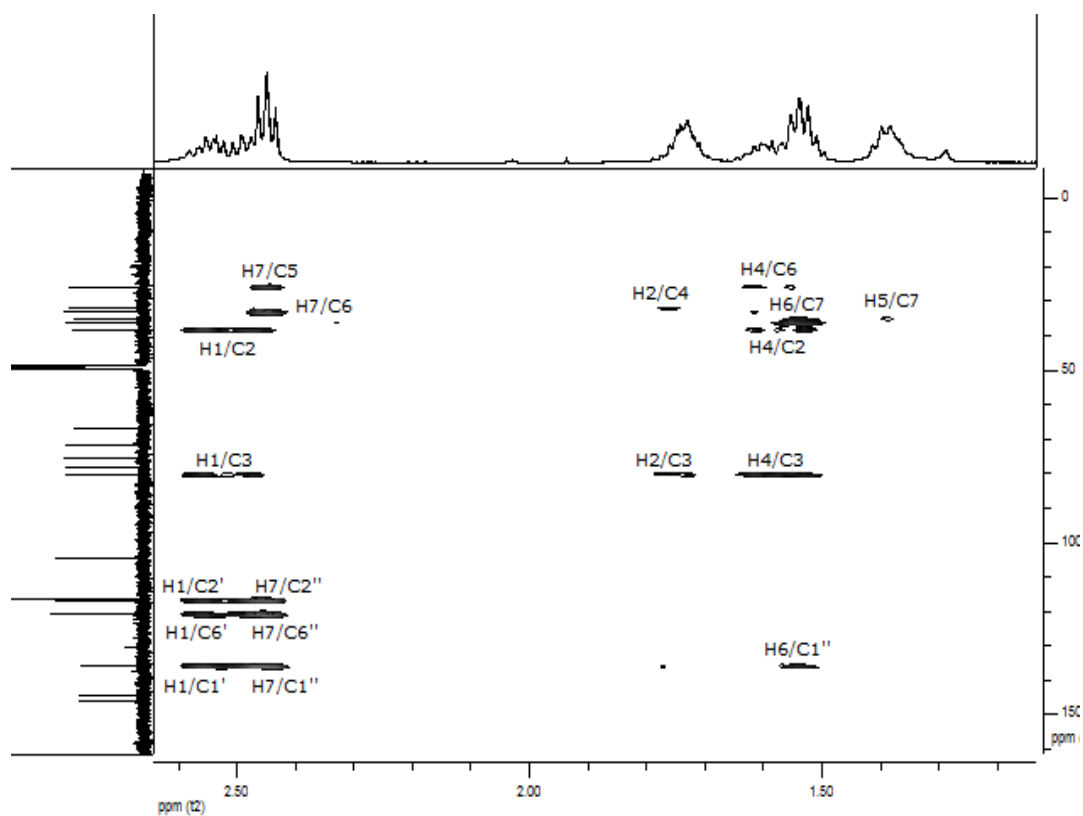
Slika 2.2.48. ^1H NMR spektar rubranozida B (**21**)



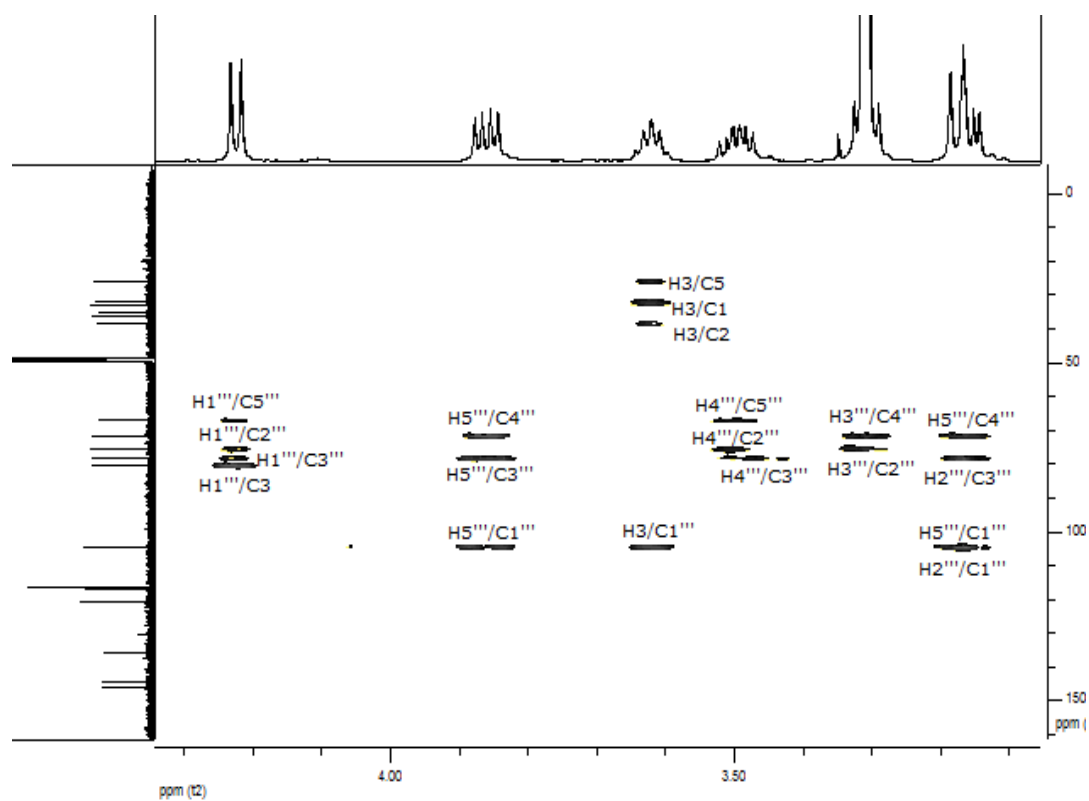
Slika 2.2.49. ^{13}C NMR spektar rubranozida B (**21**)



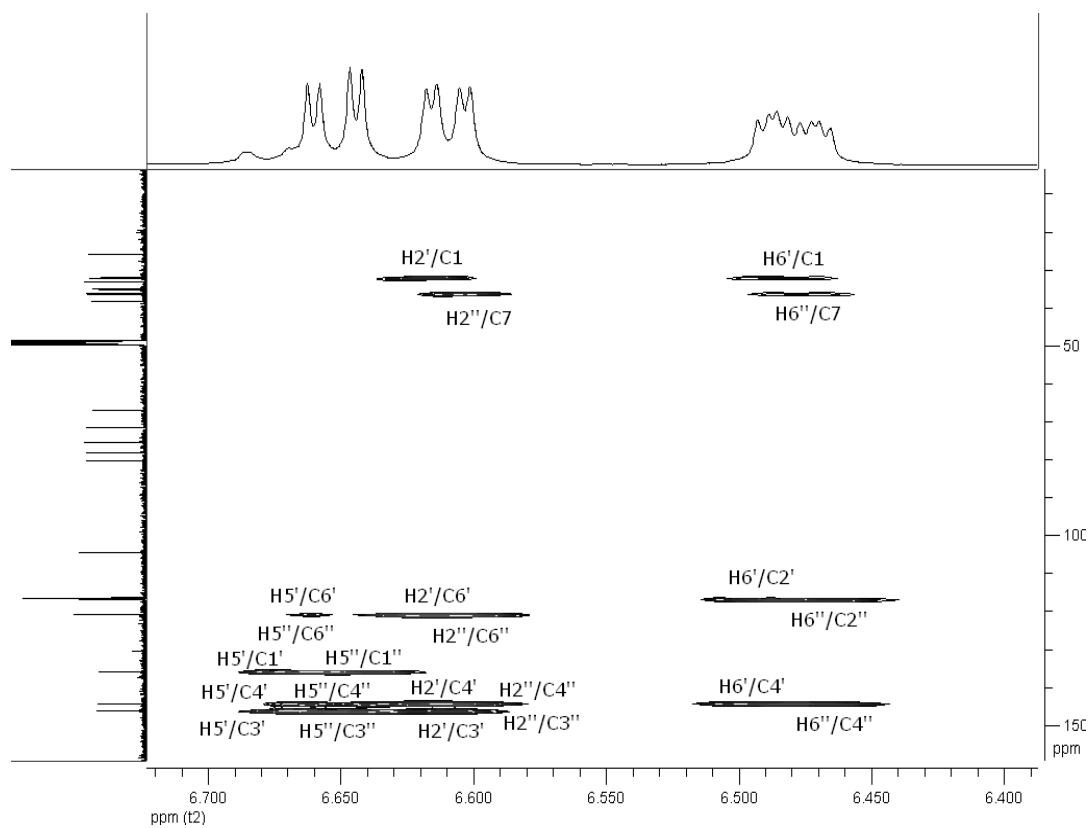
Slika 2.2.50. HSQC spektar rubranozida B (21)



Slika 2.2.51. HMBC korelacije heptanoidnih protona (bez H-3) rubranozida B (21)

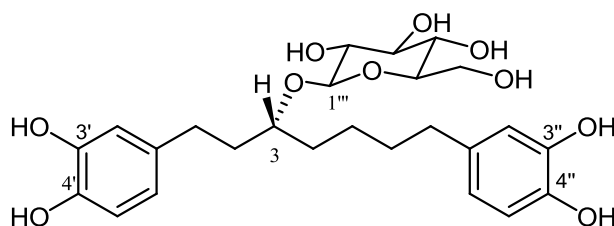


Slika 2.2.52. HMBC korelacije saharidnih i H-3 protona rubranozida B (21)

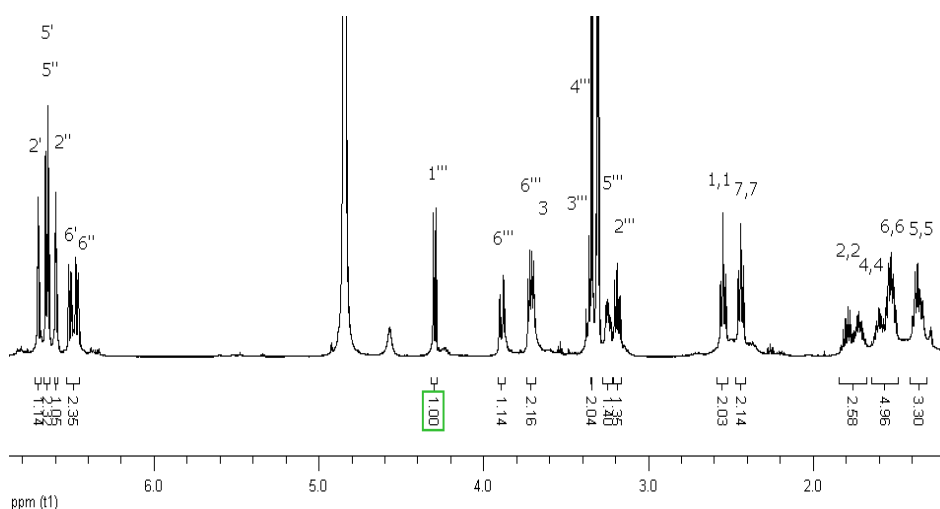


Slika 2.2.53. HMBC korelacije aromatičnih protona rubranozida B (21)

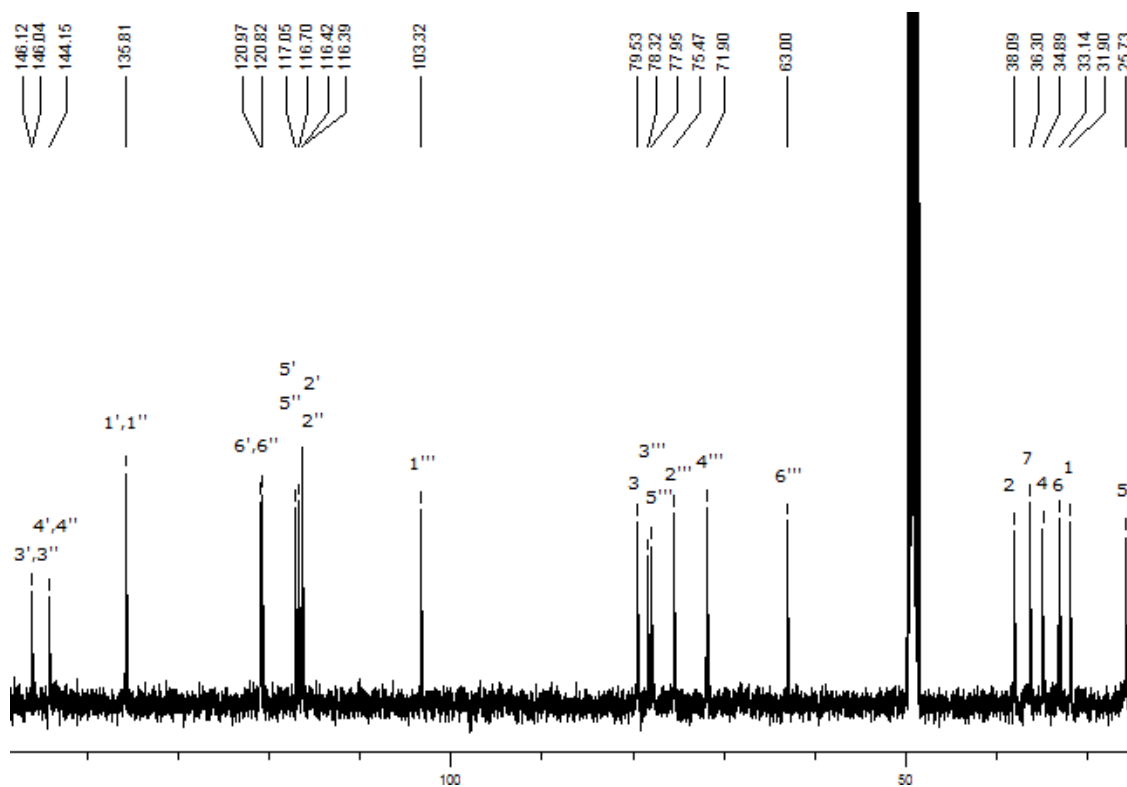
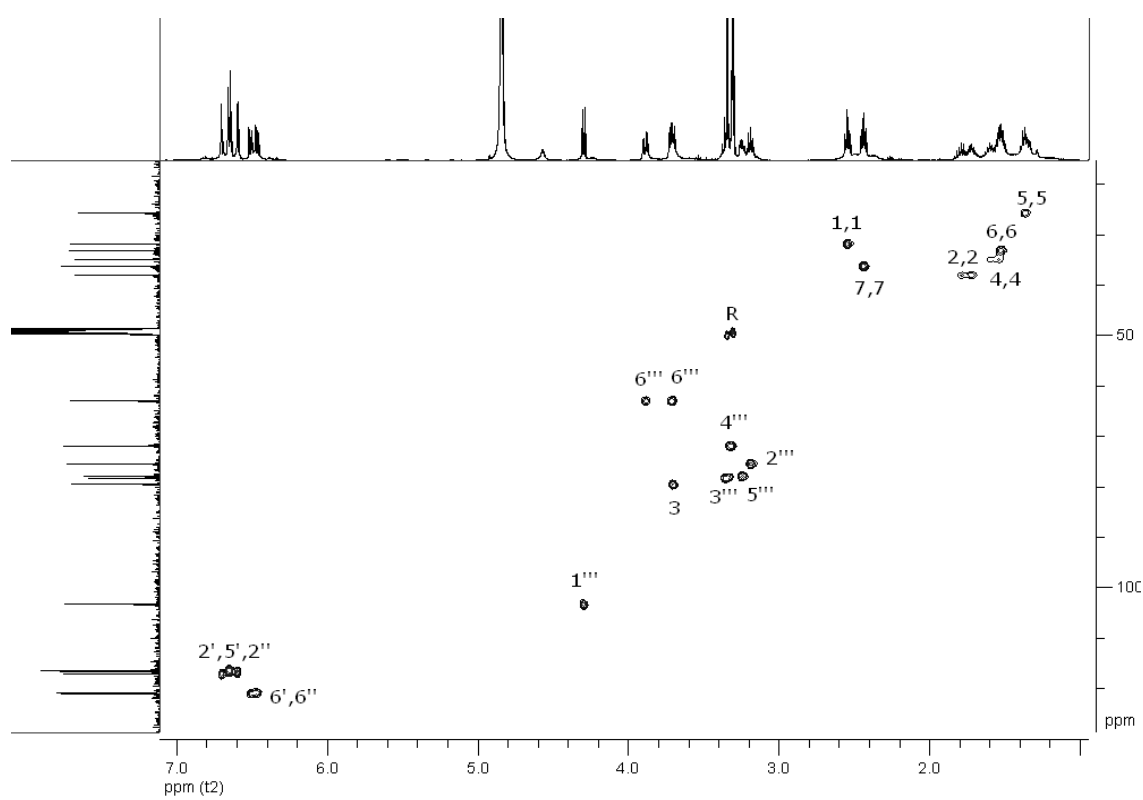
Jedinjenje **22** (Slika 2.2.54) je izolovano u količini od 12 mg. Na osnovu analize ^1H i ^{13}C NMR spektara ovog jedinjenja (Slike 2.2.55 i 2.2.56) zaključeno je da se radi o istom diarilheptanoidnom skeletu kao u rubranozidu B (**21**) (Slika 2.2.47). U saharidnom delu ^{13}C NMR spektra (Slika 2.2.56) uočen je jedan dodatni signal u odnosu na spektar rubranozida A (**21**), gde je monosaharid D-ksiloza, i poređenjem sa već izolovanim jedinjenjima **5** i **18** utvrđeno je da je reč o D-glukozi, i to u položaju 3 heptanskog skeleta, što je potvrdila HMBC korelacija H-1 $'''$ /C-3 (Slika 2.2.58). HR-ESI-MS spektar je, na osnovu kvazimolekuskog jona $[\text{M}+\text{Na}]^+$ na m/z 517,2052, ukazao na molekulsku formulu $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_{10}$ i time potvrdio da je jedinjenje **22** 1,7-di-(3,4-dihidroksifenil)heptan-3-O- β -D-glukopiranozid (Slika 2.2.54), odnosno rubranozid A. HSQC i HMBC korelacije (Slike 2.2.57-2.2.59) su potvrdile ovu strukturu. Svi spektroskopski podaci su u dobroj saglasnosti sa literaturnim.^{76,77} R konfiguracija na C-3 atomu je ustanovljena primenom pravila ^{13}C glikozidacionog pomeranja; analizom ^{13}C NMR spektara jedinjenja **22** i njegovog aglikona rubranola (**20**) (Slika 2.2.40, Tabele 2.2.3 i 2.2.4), nađeno da je $\Delta\delta_{\text{C}4} > \Delta\delta_{\text{C}2}$ (3,5 > 2,6).



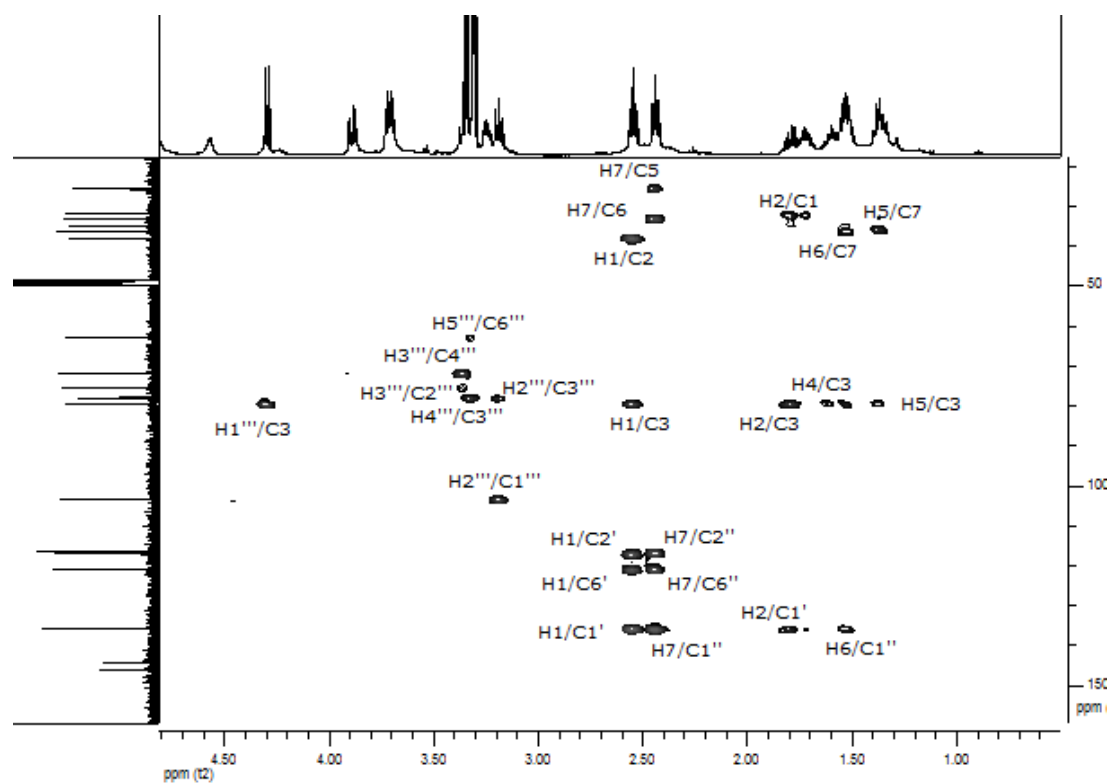
Slika 2.2.54. Strukturna formula rubranozida A (**22**)



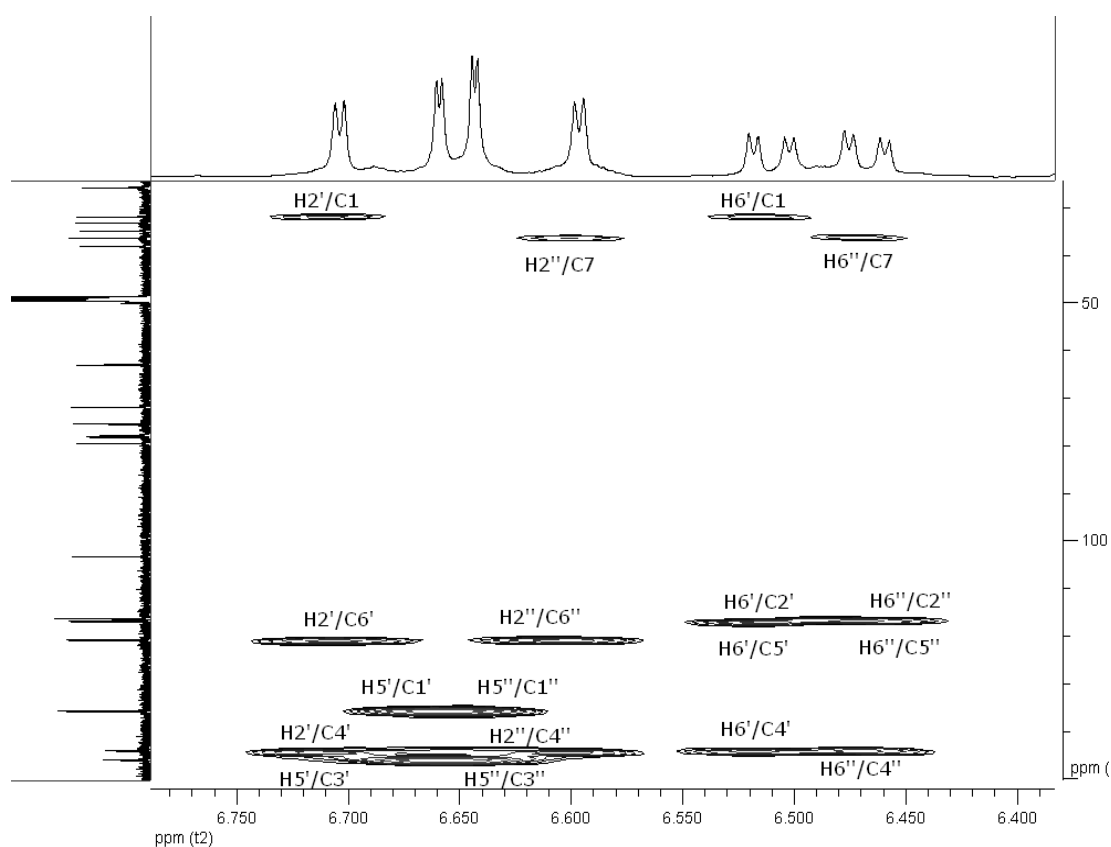
Slika 2.2.55. ^1H NMR spektar rubranozida A (**22**)

Slika 2.2.56. ^{13}C NMR spektar rubranozida A (22)

Slika 2.2.57. HSQC spektar rubranozida A (22)

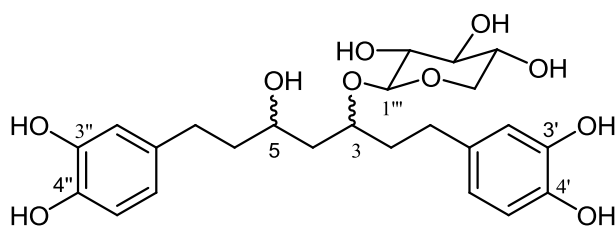


Slika 2.2.58. HMBC korelacije alifatičnih protona rubranozida A (22)

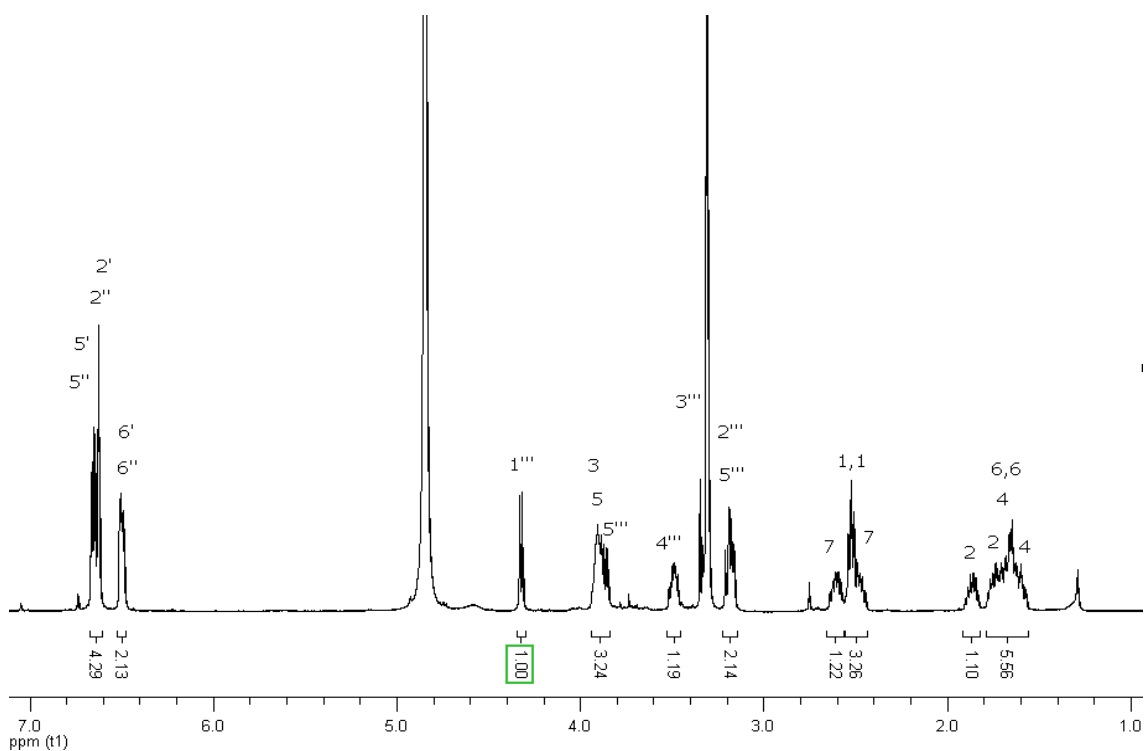
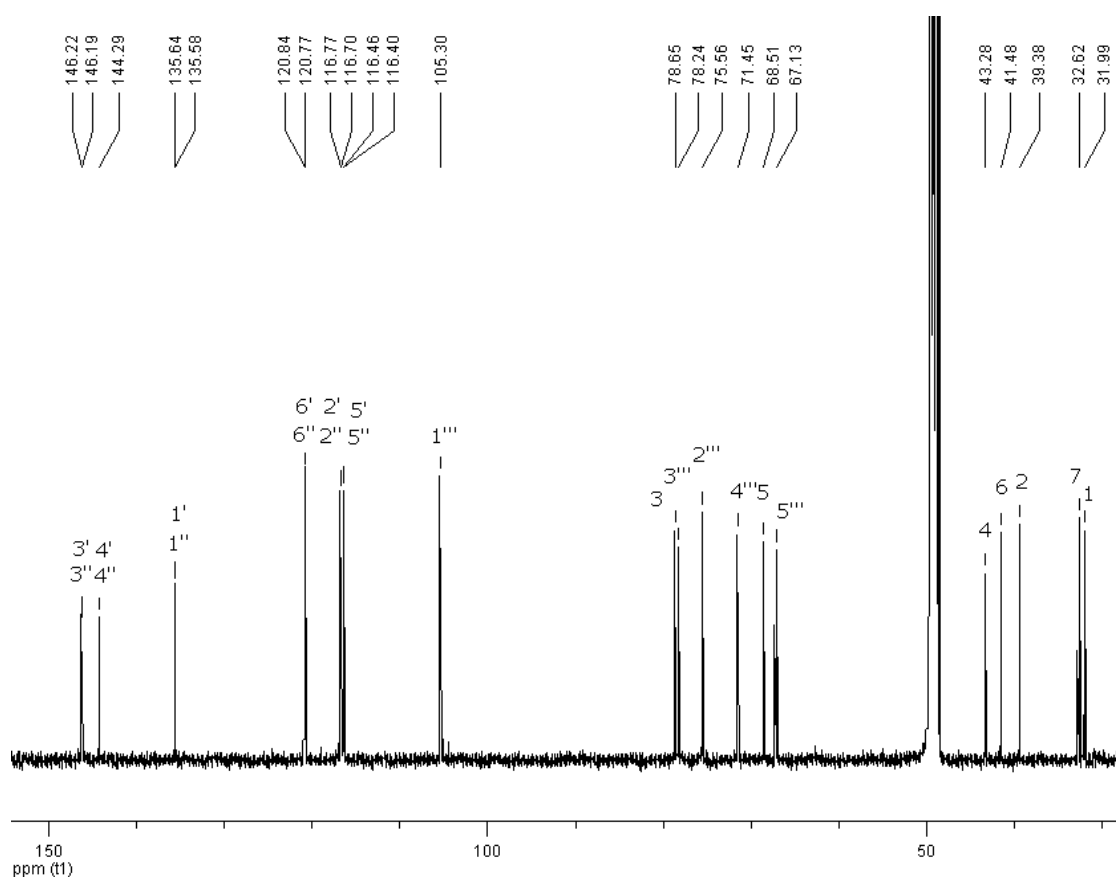


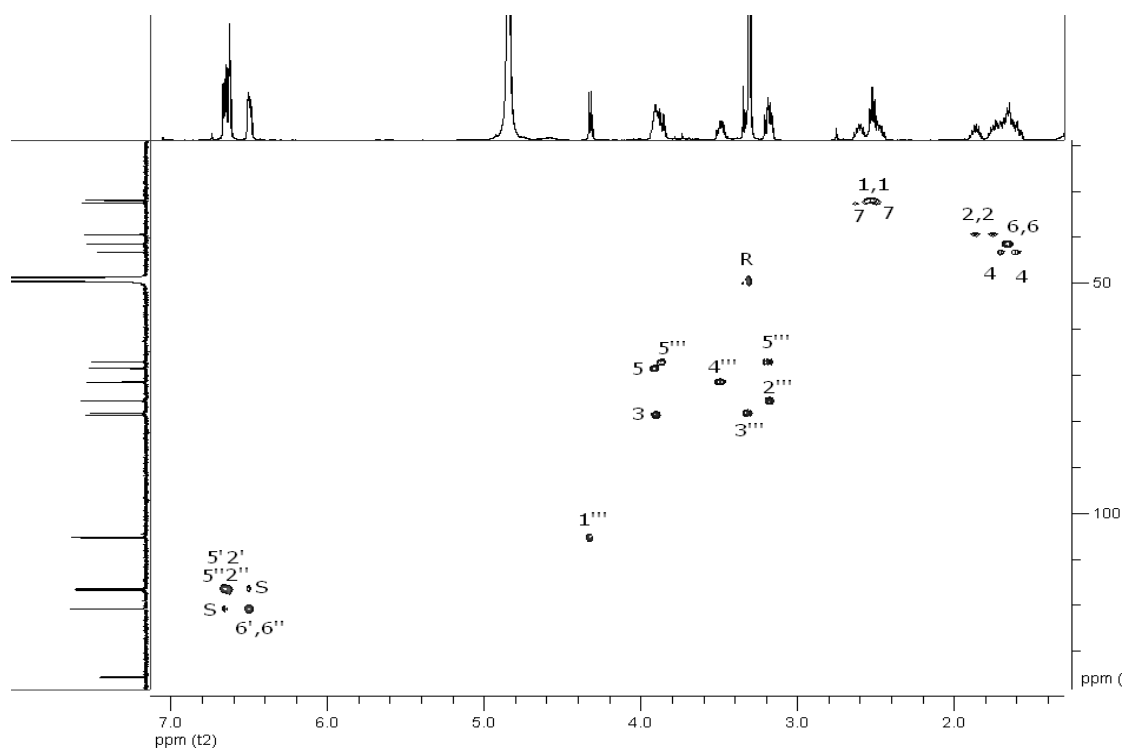
Slika 2.2.59. HMBC korelacije aromatičnih protona rubranozida A (22)

Jedinjenje **23** (Slika 2.2.60) je izolovano u količini od 5 mg. Na osnovu analize ^1H i ^{13}C NMR spektara (Slike 2.2.61 i 2.2.62) i poređenjem sa NMR spektrima poznatih izolovanih jedinjenja, zaključeno je da se radi o diarilheptanoidu koji pored kateholskih grupa u položajima 1 i 7 heptanskog niza ima i β -D-ksilopiranozu. Analizom ^{13}C NMR spektra (Slika 2.2.64) utvrđeno je da u oblasti δ_{C} od 60-80 ppm ima jedan signal više nego kod izolovanih jedinjenja sa jednim ksiloznim supstituentom na heptanskom nizu. Ostali signali su se slagali sa signalima ranije izolovanih ksilozida tako da nije bilo reči o glukozi (koja ima jedan C atom više) već o još jednom kiseoničnom supstituentu. Isto tako, u ^1H NMR spektru ovog jedinjenja (Slika 2.2.61), preklopljeni signali na 3,91 ppm imali su integral od tri protona, što je uputilo na prisustvo još jednog karbinolnog protona pored H-5a'' i H-3. U skladu sa ovim su i HSQC i HMBC korelacije (Slike 2.2.63 i 2.2.64), kao i vrlo slični NMR podaci rubranozida B (**21**). Kako drugih novih signala nije bilo ni u ^1H ni u ^{13}C NMR spektrima, zaključeno je da je OH grupa drugi supstituent na heptanskom nizu, što je potvrđeno masenom spektrometrijom, odnosno kvazimolekulskim jonima $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ na m/z 498,2334 i $[\text{M}+\text{Na}]^+$ na m/z 503,1883, koji su ukazali na molekulsku formulu $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_{10}$ i OH grupu. HMBC korelacije H-1,H-2,H-4,H-5, H-1''/C-3 kao i H-6,H-7/C-5 su ukazale da se OH grupa nalazi u položaju 5, a ksilozna u položaju 3 (Slike 2.2.64 i 2.2.65). Ostale HMBC i HSQC korelacije (Slike 2.2.63-2.2.66) su potvrdile strukturu 1,7-di(3,4-dihidroksifenil)-5-hidroksiheptan-3-O- β -D-ksilopiranozida. Vrednost za optičku rotaciju za ovo jedinjenje iznosi $[\alpha]_{\text{D}} -13,5$ i odstupa od vrednosti -6,3 za izomer sa 3*R*, 5*R* konfiguracijama.¹⁶ Konfiguracije na C-3 i C-5 atomima nisu utvrđene, a kako se i NMR podaci za ovo jedinjenje razlikuju od literaturnih podataka za izomer sa 3*R* i 5*R* konfiguracijama¹⁶, to se samo može isključiti mogućnost da je jedinjenje **23** 3*R*,5*R* izomer.

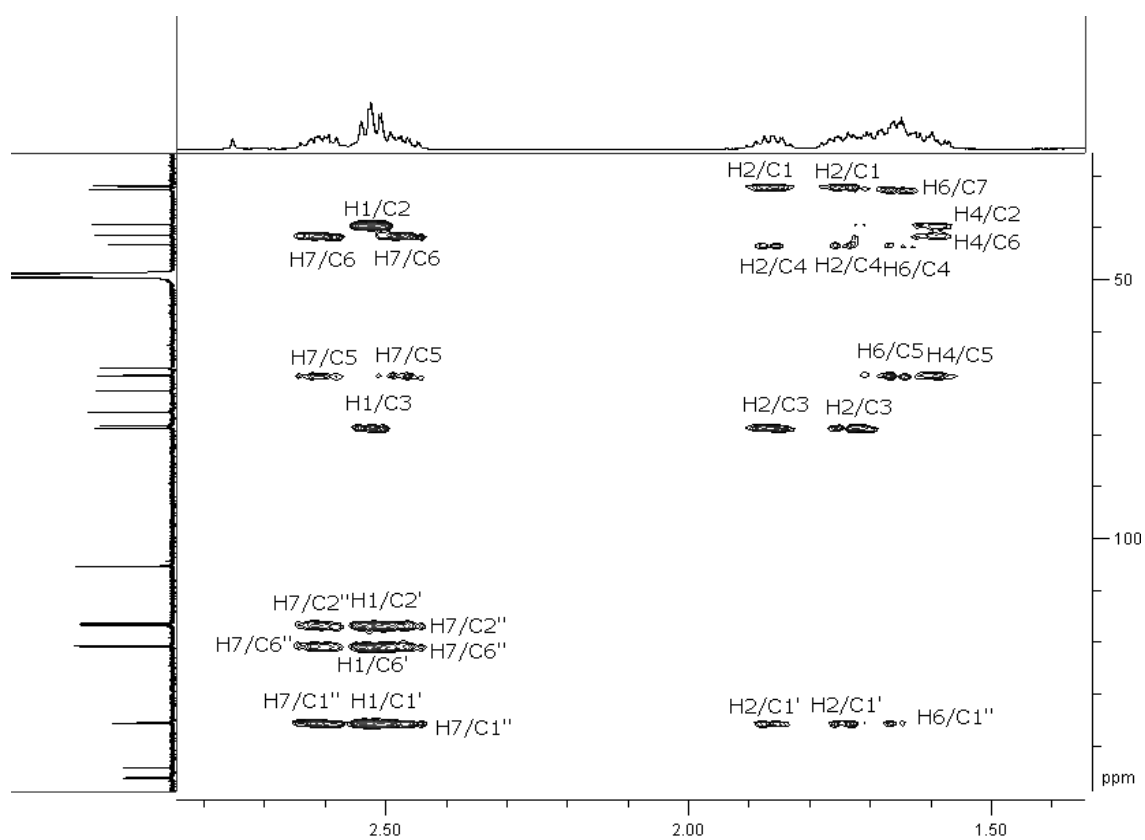


Slika 2.2.60. Strukturna formula jedinjenja **23**

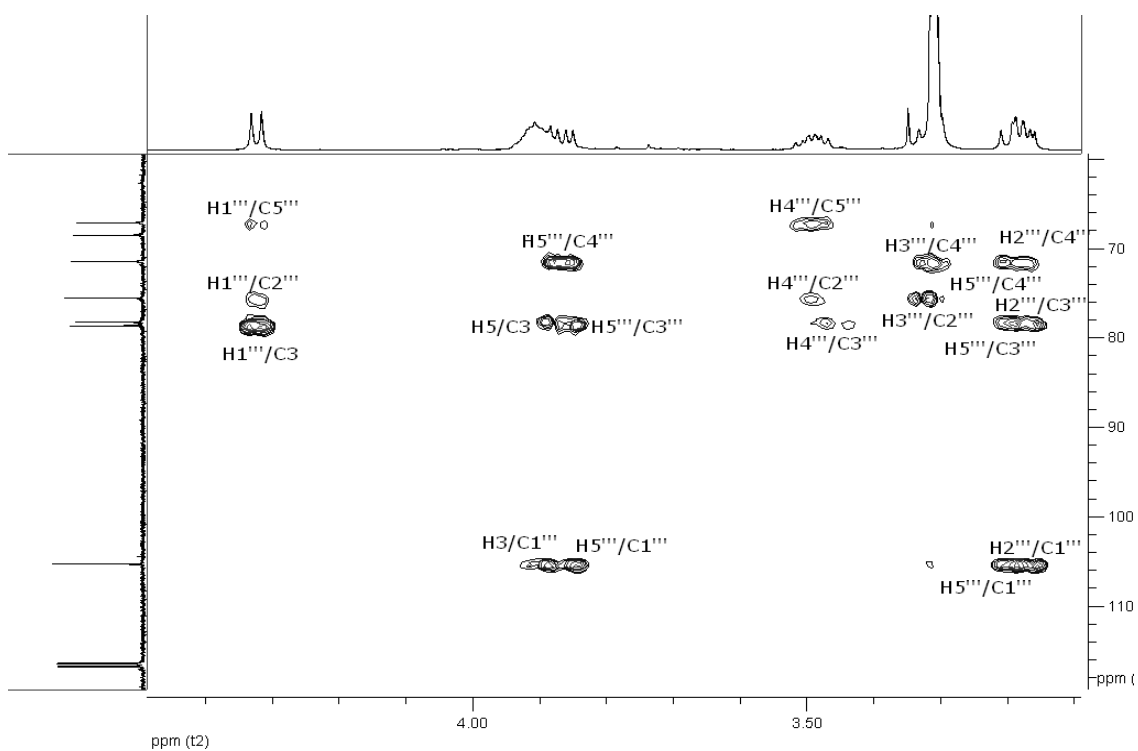
Slika 2.2.61. ^1H NMR spektar jedinjenja 23Slika 2.2.62. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 23



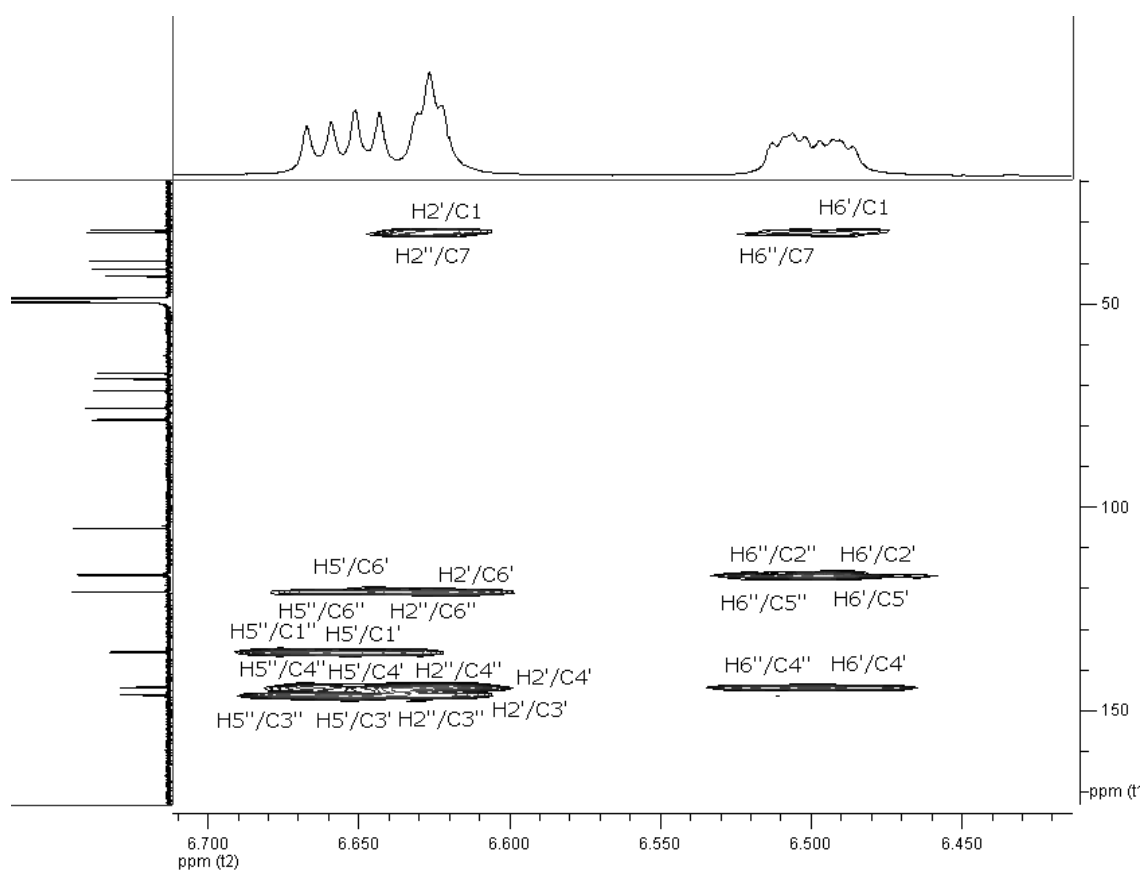
Slika 2.2.63. HSQC spektar jedinjenja 23



Slika 2.2.64. HMBC korelacije heptanoidnih protona (bez H-3 i H-5) jedinjenja 23



Slika 2.2.65. HMBC korelacije saharidnih, H-3 i H-5 protona jedinjenja 23



Slika 2.2.66. HMBC korelacije aromatičnih protona jedinjenja 23

Tabela 2.2.4. NMR podaci za jedinjenja **21**, **22** i **23** (CD₃OD)

C/H	Rubranozid B (21)		Rubranozid A (22)		23	
	δ_C , tip	δ_H (J u Hz)	δ_C , tip	δ_H (J u Hz)	δ_C , tip	δ_H (J u Hz)
1	32,1; CH ₂	2,49 m; 2,54 m	31,9; CH ₂	2,55 t (7,5)	32,0; CH ₂	2,51 t (7,5)
2	38,3; CH ₂	1,74 m	38,1; CH ₂	1,73 m; 1,78 m	39,4; CH ₂	1,75 m; 1,86 m
3	80,2; CH	3,62 qui (6,0)	79,5; CH	3,72 qui (6,0)	78,6; CH	3,91 m
4	35,1; CH ₂	1,59 m	34,9; CH ₂	1,54 m; 1,60 m	43,3; CH ₂	1,60 m; 1,70 m
5	25,8; CH ₂	1,39 m	25,7; CH ₂	1,36 A ₂ B ₂	68,5; CH	3,92 m
6	33,2; CH ₂	1,54 qui (~ 7,5)	38,6; CH ₂	1,54 qui (~ 7,5)	41,5; CH ₂	1,66 m
7	36,3; CH ₂	2,45 t (7,5)	33,1; CH ₂	2,44 t (7,5)	32,6; CH ₂	2,49 m; 2,60 m
1'	133,4; C	-	135,8; C	-	135,6; C	-
2'	116,8; CH	6,62 d (2,0)	117,0; CH	6,70 d (2,0)	116,7; CH	6,62 d (2,0)
3'	146,1; C	-	146,1; C	-	146,2; C	-
4'	144,2; C	-	144,2; C	-	144,3; C	-
5'	116,4; CH	6,66 d (8,0)	116,4; CH	6,68 d (8,0)	116,4; CH	6,64 d (8,0)
6'	120,9; CH	6,49 dd (8,0; 2,0)	121,0; CH	6,51 dd (8,0; 2,0)	120,8; CH	6,49 dd (8,0; 2,0)
1''	135,3; C	-	135,8; C	-	135,6; C	-
2''	116,7; CH	6,60 d (2,0)	116,7; CH	6,65 d (8,0)	116,7; CH	6,63 d (2,0)
3''	146,1; C	-	146,1; C	-	146,2; C	-
4''	144,2; C	-	144,1; C	-	144,3; C	-
5''	116,4; CH	6,65 d (8,0)	116,4; CH	6,65 d (8,0)	116,4; CH	6,66 d (8,0)
6''	120,8; CH	6,48 dd (8,0; 2,0)	120,8; CH	6,47 dd (8,0; 2,0)	120,8; CH	6,51 dd (8,0; 2,0)
Xylp			Xylp			
1'''	104,3; CH	4,22 d (7,5)	-	-	105,3; CH	4,32 d (7,5)
2'''	75,3; CH	3,15 dd (9,0; 7,5)	-	-	75,6; CH	3,18 dd (9,0; 7,5)
3'''	78,1; CH	3,30 m ^a	-	-	78,2; CH	3,30 m ^a
4'''	71,5; CH	3,50 m	-	-	71,5 ; CH	3,50 m
5'''	67,0; CH ₂	3,17 dd (11,5; 9,0) 3,86 dd (11,5; 5,5)	-	-	67,1; CH ₂	3,19 dd (11,5; 9,0) 3,87 dd (11,5; 5,5)
GlcP			GlcP			
1'''	-	-	103,6; CH	4,30 d (8,0)	-	-
2'''	-	-	75,3; CH	3,16 dd (9,0; 8,0)	-	-
3'''	-	-	78,2; CH	3,35 m ^a	-	-
4'''	-	-	71,7; CH	3,32 m ^a	-	-
5'''	-	-	77,9; CH	3,25 m	-	-
6'''	-	-	63,0; CH ₂	3,72 dd (12,0; 5,5) 3,89 dd (12,0; 2,0)	-	-

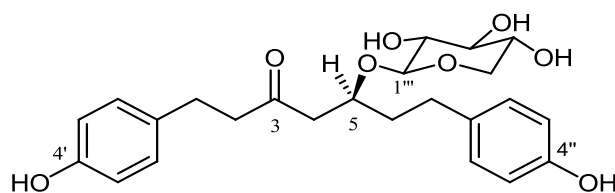
Xylp - ksilopiranozil grupa; **GlcP** – glukopiranozil grupa; ^asignal preklopljen signalom rastvarača (vrednost dobijena iz HSQC spektra)

2.2.1.2. Diarilheptanoid glikozidi sa dve *p*-hidroksifenil grupe

Ova grupa diarilheptanoida je u CHCl₃/MeOH ekstraktu crne jove malobrojna i ima tri člana, jedinjenja **1**, **5** i **24**. Njihove karakteristike su ¹H NMR signali AA'BB' spinskog sistema u aromatičnoj oblasti 6,8-7,1 ppm i u ¹³C NMR spektrima simetrični

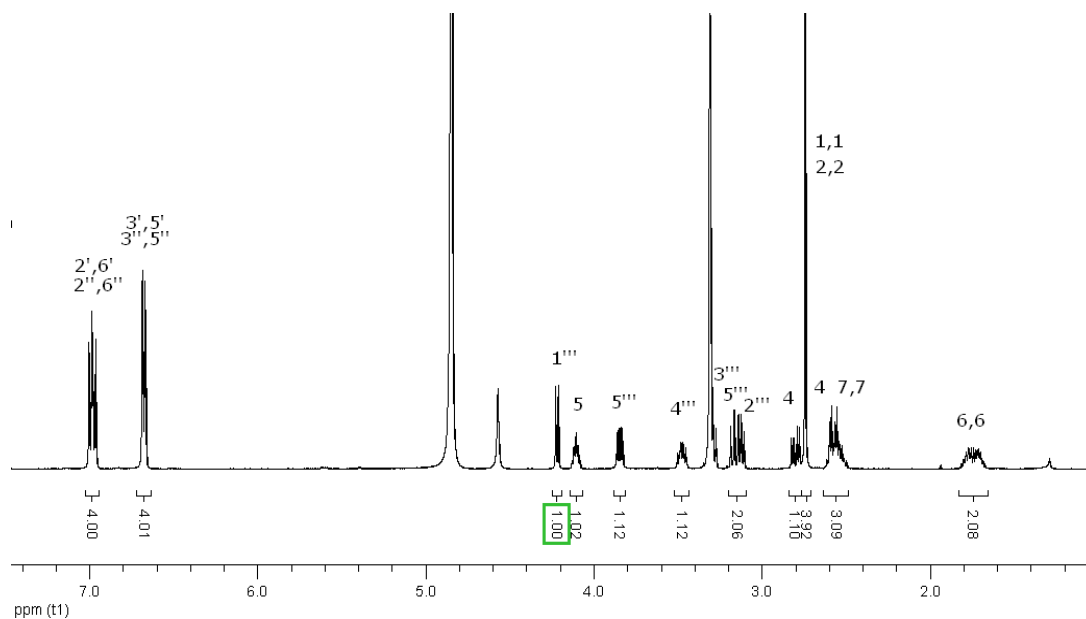
signali na ~ 116 ppm (C-3', C-3'', C-5', C-5''), ~ 130 ppm (C-2', C-2'', C-6', C-6''), ~ 134 ppm (C-1', C-1'') i na ~ 156 ppm (C-4', C-4''). Ova grupa diarilheptanoida je karakteristična za koru zelene jove, jer su iz nje izolovani isključivo diarilheptanoidi ovog tipa (Poglavlje **2.1**). Tako su platifilozid (**1**) i acerozid VII (**5**), izolovani iz CHCl₃/MeOH ekstrakta kore zelene jove, izolovani i iz CHCl₃/MeOH ekstrakta kore crne jove, u količini od 54 mg (**1**), odnosno 8 mg (**5**). Tumačenje spektroskopskih podataka i određivanje strukture za ova jedinjenja dato je u odeljku **2.1** o zelenoj jovi, dok su NMR podaci dati i u odeljku **2.1** u **Tabeli 2.1.1**, i u ovom odeljku u **Tabeli 2.2.5**, radi lakšeg poređenja sa podacima drugih izolovanih jedinjenja iz zelene i crne jove.

Jedinjenje **24** (**Slika 2.2.67**) je izolovano u količini od 7 mg. U saharidnim delovima ¹H i ¹³C NMR spektara ovog jedinjenja (**Slike 2.2.68** i **2.2.69**) prepoznati su H/C signali β-D-ksilopiranoze, na osnovu poređenja sa već poznatim jedinjenjima sa ovim monosaharidom. Interesantna pojava u ¹H NMR spektru ovog jedinjenja, kao i svih drugih diarilheptanoida koji imaju *p*-hidroksifenil grupu u položaju 1 i keto grupu u položaju 3 heptanskog niza (jedinjenja **1**, **2**, **3** iz zelene jove i kasnije izolovana jedinjenja **25**, **27**, **36** i **37** iz crne jove) je singlet od 4 protona na oko 2,7 ppm koji potiče od slučajno izohronih H₂-1 i H₂-2 protona (**Slika 2.2.68**). Ovo je pri kasnijim analizama NMR podataka složenih diarilheptanoida bilo od značaja i olakšavalo je određivanje struktura izolovanih jedinjenja, posebno u slučajevima gde je jedan aromatični sistem bio kateholski, a drugi *p*-hidroksifenil. Karakteristična HMBC korelacija koja potvrđuje da je ksiloza preko C-1''' vezana za C-5 heptanskog skeleta je H-1'''/C-5 (**Slika 2.2.72**). Ostale HMBC i HSQC korelacije (**Slike 2.2.70-2.2.73**) su potvrdile pretpostavljenu strukturu prikazanu na **Slici 2.2.67**. Podatak o masi kvazimolekulskog jona [M-H]⁻ na *m/z* 445,1893 ukazao je na molekulska formulu C₂₄H₃₀O₈ i bio dodatna potvrda strukture. [α]_D vrednost za jedinjenje **24** iznosi -18,0 i u saglasnosti je sa literaturnom od -19,3⁶⁹, što je uputilo na *S* konfiguraciju na C-5 atomu.

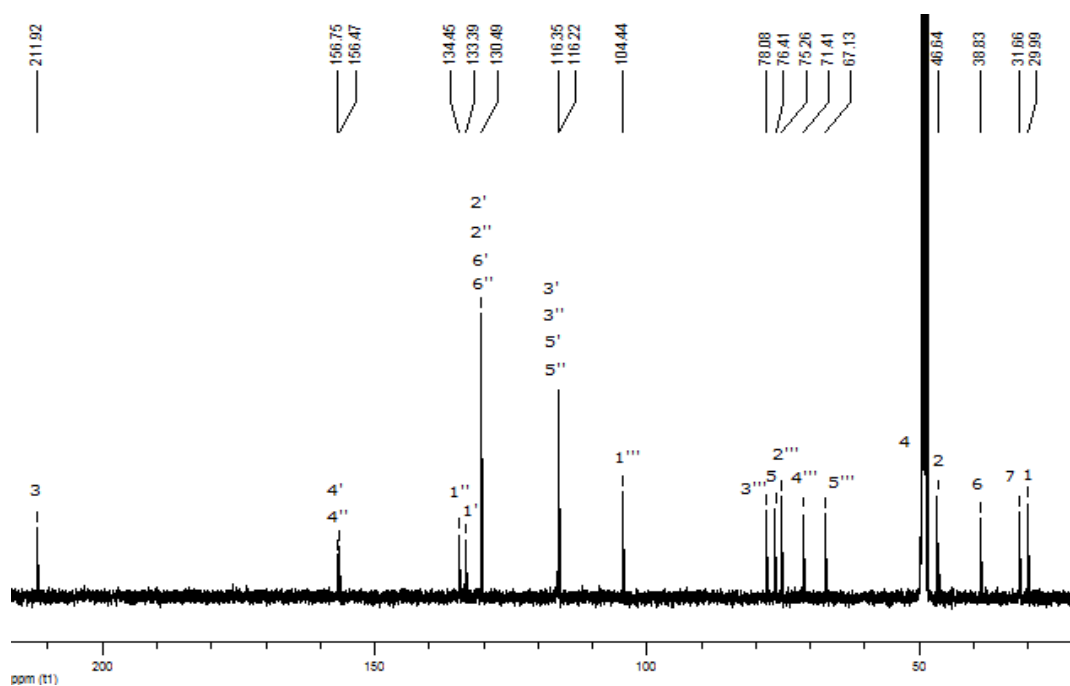


Slika 2.2.67. Strukturna formula jedinjenja **24**

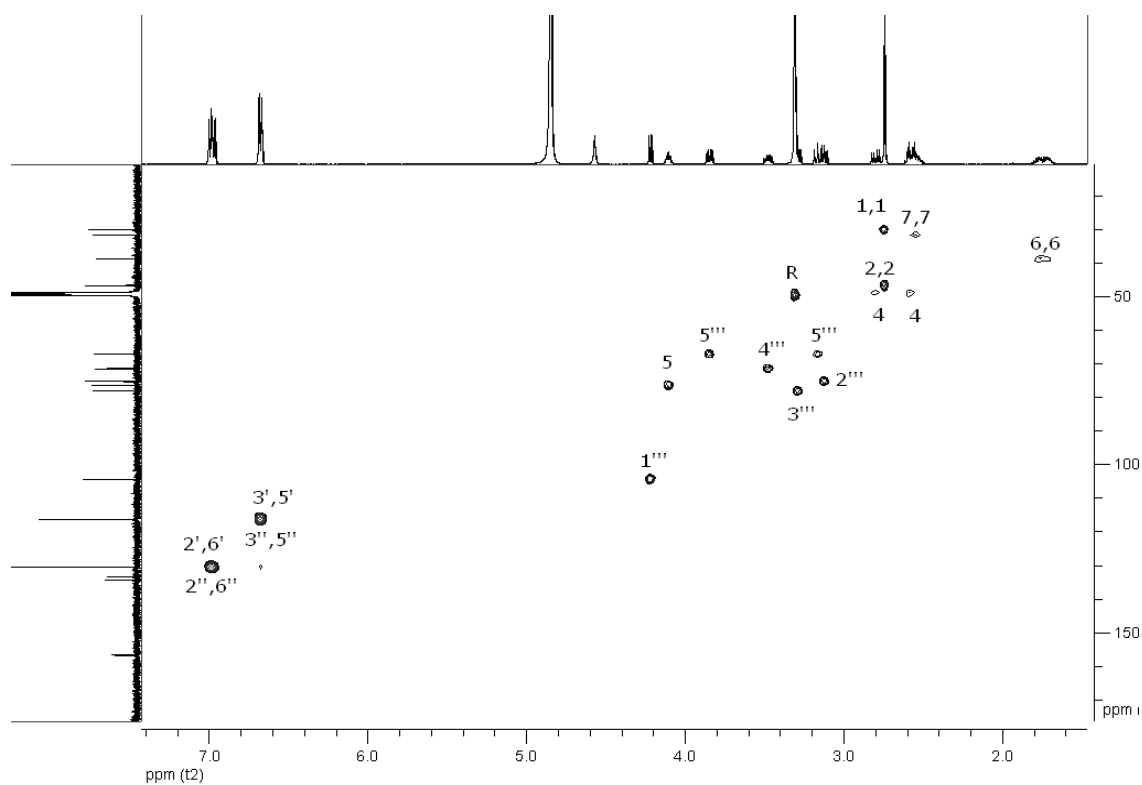
Pravilom ^{13}C glikozidacionog pomeranja je potvrđena *S* konfiguracija; analizom ^{13}C NMR spektara jedinjenja **24** i njegovom aglikonu platifilonolu (za koji nisu bili dostupni NMR podaci) najbližnjeg jedinjenja **14** (Slike 2.1.1 i 2.2.2, Tabele 2.2.1 i 2.2.5) ustanovljeno je da je $\Delta\delta_{\text{C}4} > \Delta\delta_{\text{C}6}$ ($2,7 > 1,8$). NMR podaci su u saglasnosti sa literaturnim⁶⁹, što ukazuje na to da je jedinjenje **24** 5(*S*)-platifilonol-5-*O*- β -ksilopiranozid.



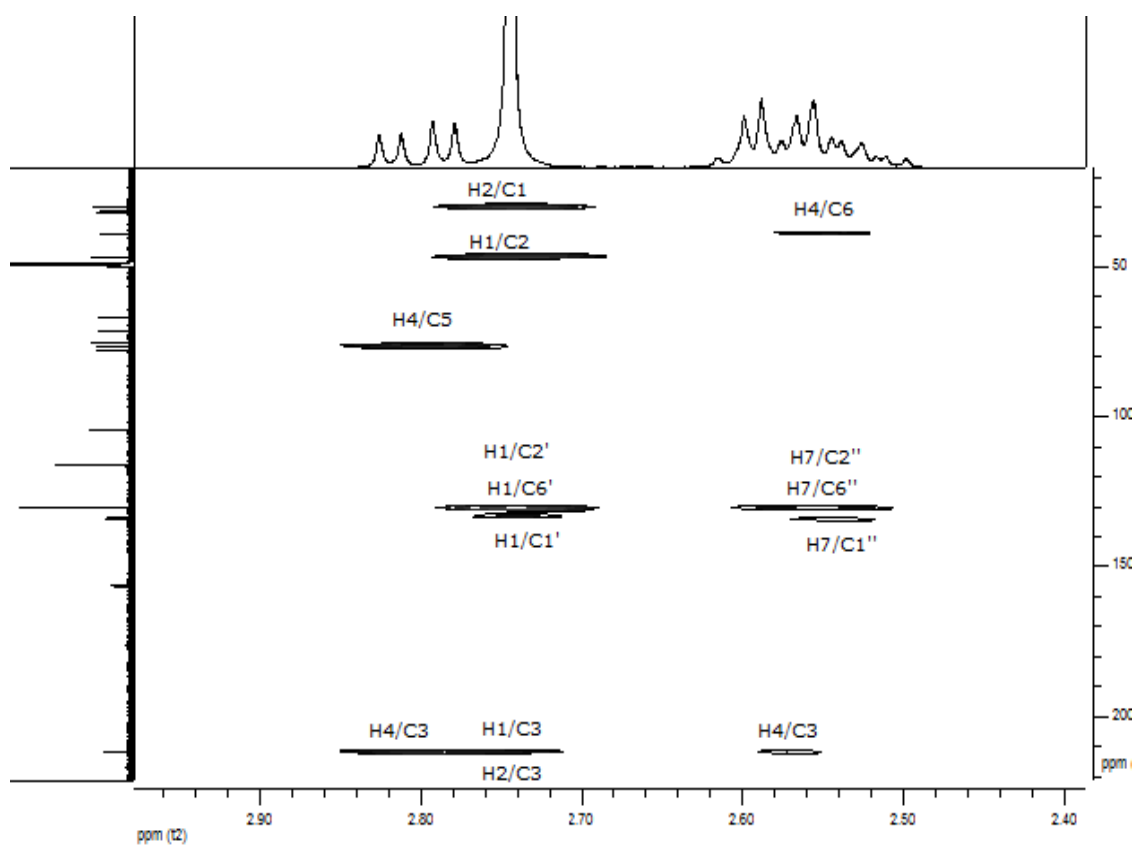
Slika 2.2.68. ^1H NMR spektar jedinjenja **24**



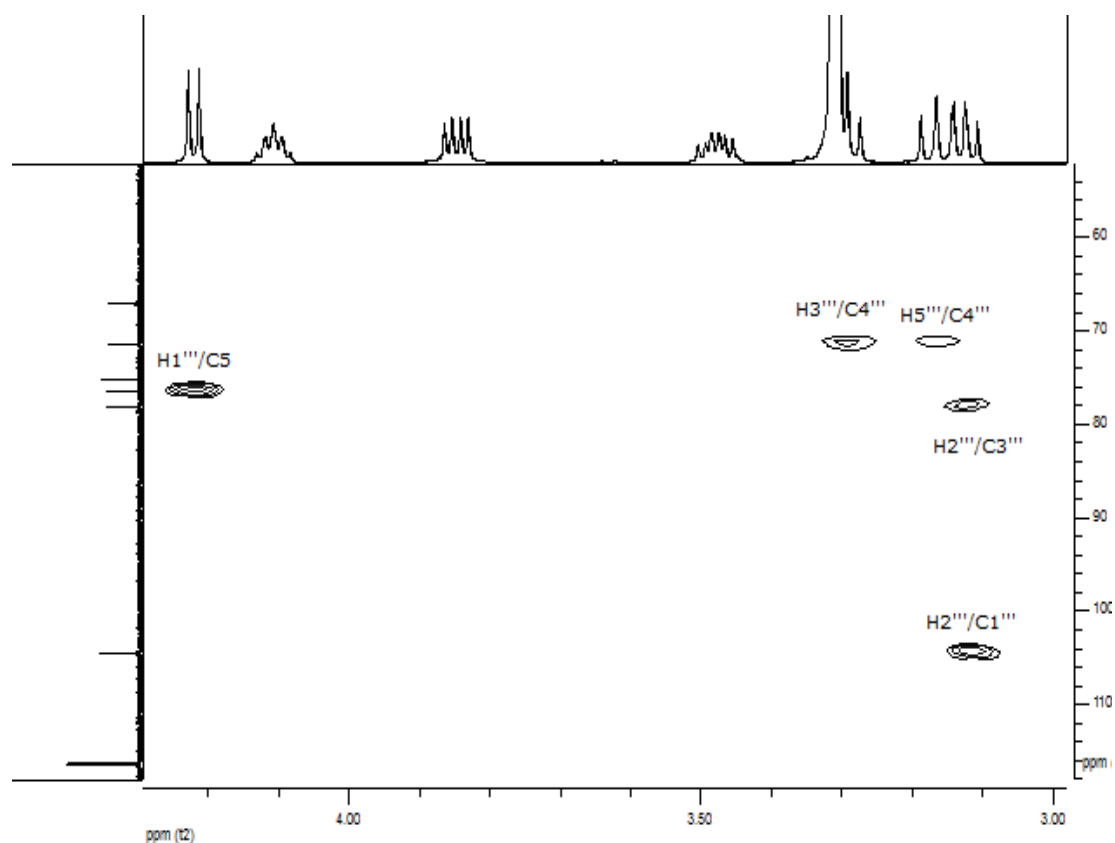
Slika 2.2.69. ^{13}C NMR spektar jedinjenja **24**



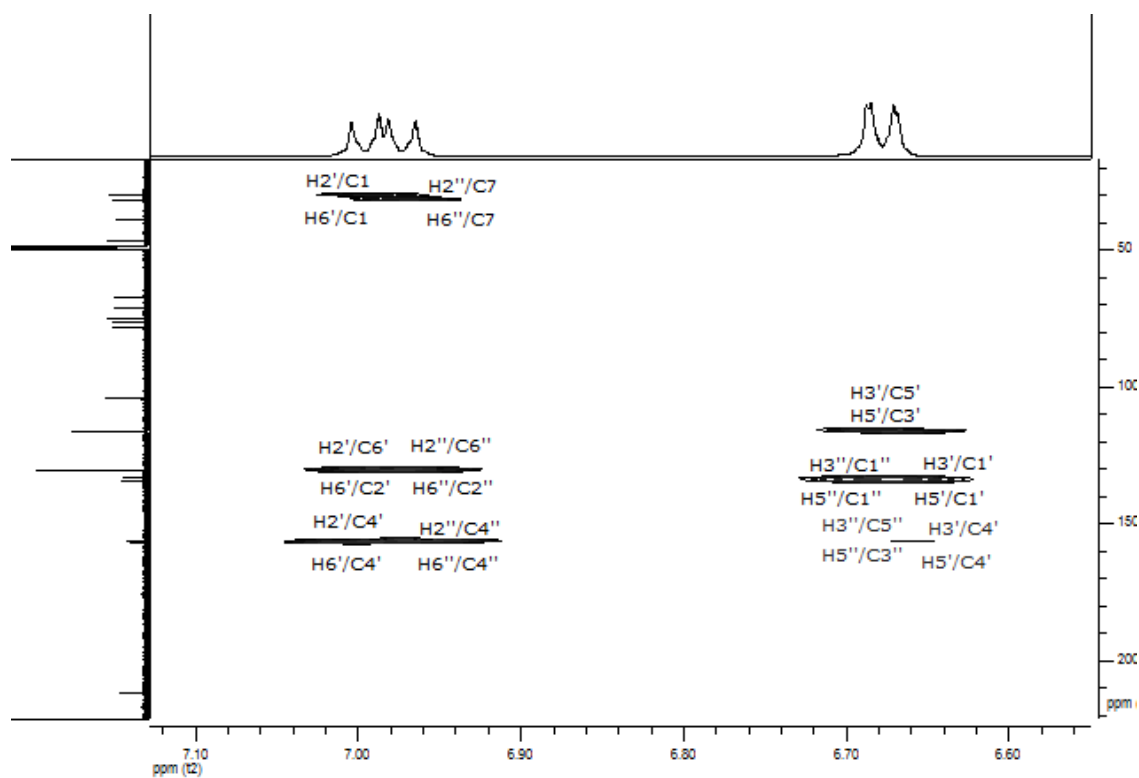
Slika 2.2.70. HSQC spektar jedinjenja 24



Slika 2.2.71. HMBC korelacije H-1, H-2, H-4 i H-7 protona jedinjenja 24



Slika 2.2.72. HMBC korelacije saharidnih protona jedinjenja 24



Slika 2.2.73. HMBC korelacije aromatičnih protona jedinjenja 24

Tabela 2.2.5. NMR podaci za jedinjenja **1**, **5** i **24** (CD₃OD)

C/H	Platifilozid (1)		Acerozid VII (5)		24	
	δ_C , tip	δ_H (J u Hz)	δ_C , tip	δ_H (J u Hz)	δ_C , tip	δ_H (J u Hz)
1	30,0; CH ₂	2,74 brs	31,8; CH ₂	2,60 A ₂ B ₂	30,0; CH ₂	2,74 brs
2	46,5; CH ₂	2,74 brs	38,2; CH ₂	1,77 m	46,6; CH ₂	2,74 brs
3	212,1; C	-	80,0; CH	3,71 m	211,9; C	-
4	48,7; CH ₂ ^a	2,59 dd (16,5; 5,5) 2,80 dd (16,5; 7,0)	34,9; CH ₂	1,60 m	48,7; CH ₂ ^a	2,58 dd (17,0; 5,5) 2,80 dd (17,0; 7,0)
5	76,4; CH	4,16 qui	25,7; CH ₂	1,39 A ₂ B ₂	76,4 ; CH	4,11 qui
6	38,6; CH ₂	1,74 m; 1,83 m	33,3; CH ₂	1,55 qui (~ 7,0)	38,8; CH ₂	1,74 m
7	31,5; CH ₂	2,48 m	36,1; CH ₂	2,50 t (7,5)	31,7; CH ₂	2,56 m
1'	133,4; C	-	135,0; C	-	133,4; C	-
2'	130,5; CH	6,99 d (8,0)	130,6; CH ^a	7,02 d (8,5)	130,5; CH	7,00 d (8,5)
3'	116,2; CH ^b	6,68 d (8,0)	116,2; CH	6,68 d (8,5)	116,2; CH	6,68 d (8,5)
4'	156,7; C	-	156,4; C	-	156,7; C	-
5'	116,2; CH ^b	6,68 d (8,0)	116,2; CH	6,68 d (8,5)	116,2; CH	6,68 d (8,5)
6'	130,5; CH	6,99 d (8,0)	130,6; CH ^a	7,02 d (8,5)	130,5; CH	7,00 d (8,5)
1''	134,5; C	-	135,0; C	-	134,5; C	-
2''	130,6; CH	7,00 d (8,0)	130,4; CH ^a	6,97 d (8,5)	130,5; CH	6,98 d (8,0)
3''	116,3; CH ^b	6,68 d (8,0)	116,2; CH	6,68 d (8,5)	116,4; CH	6,68 d (8,0)
4''	156,4; C	-	156,4; C	-	156,5; C	-
5''	116,3; CH ^b	6,68 d (8,0)	116,2; CH	6,68 d (8,5)	116,4; CH	6,68 d (8,0)
6''	130,6; CH	7,00 d (8,0)	130,4; CH ^a	6,97 d (8,5)	130,5; CH	6,98 d (8,0)
Xylp						
1'''	-	-	-	-	104,4; CH	4,22 d (7,5)
2'''	-	-	-	-	75,3; CH	3,12 dd (9,0; 7,5)
3'''	-	-	-	-	78,1; CH	3,29 m ^a
4'''	-	-	-	-	71,4 ; CH	3,48 m
5'''	-	-	-	-	67,1; CH ₂	3,17 dd (11,5; 10,5) 3,85 dd (11,5; 5,5)
Glep						
1'''	103,6; CH	4,29 d (7,5)	103,5; CH	4,30 (8,0)	-	-
2'''	75,3; CH	3,16 t (8,5)	75,5; CH	3,19 dd (9,0; 8,0)	-	-
3'''	78,2; CH	3,34 t (8,5)	78,4; CH	3,34 m	-	-
4'''	71,7; CH	3,31 qui	71,9; CH	3,33 m	-	-
5'''	77,9; CH	3,25 m	77,9; CH	3,24 m	-	-
6'''	62,9; CH ₂	3,71 dd (12,0; 5,5) 3,87 dd (12,0; 2,0)	63,0; CH ₂	3,71 dd (12,0; 5,5) 3,87 dd (12,0; 2,0)	-	-

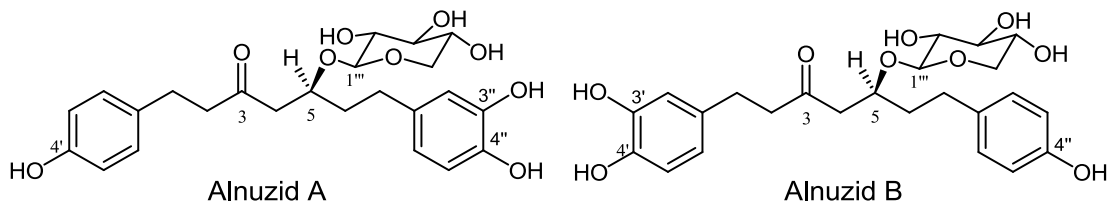
Xylp - ksilopiranozil grupa; **Glep** – glukopiranozil grupa; ^a signal preklapljen signalom rastvarača (vrednost dobijena iz HSQC spektra); ^{b,c} signali mogu biti zamenjeni

2.2.1.3. Diarilheptanoid glikozidi sa jednom *p*-hidroksifenil i jednom kateholskom grupom

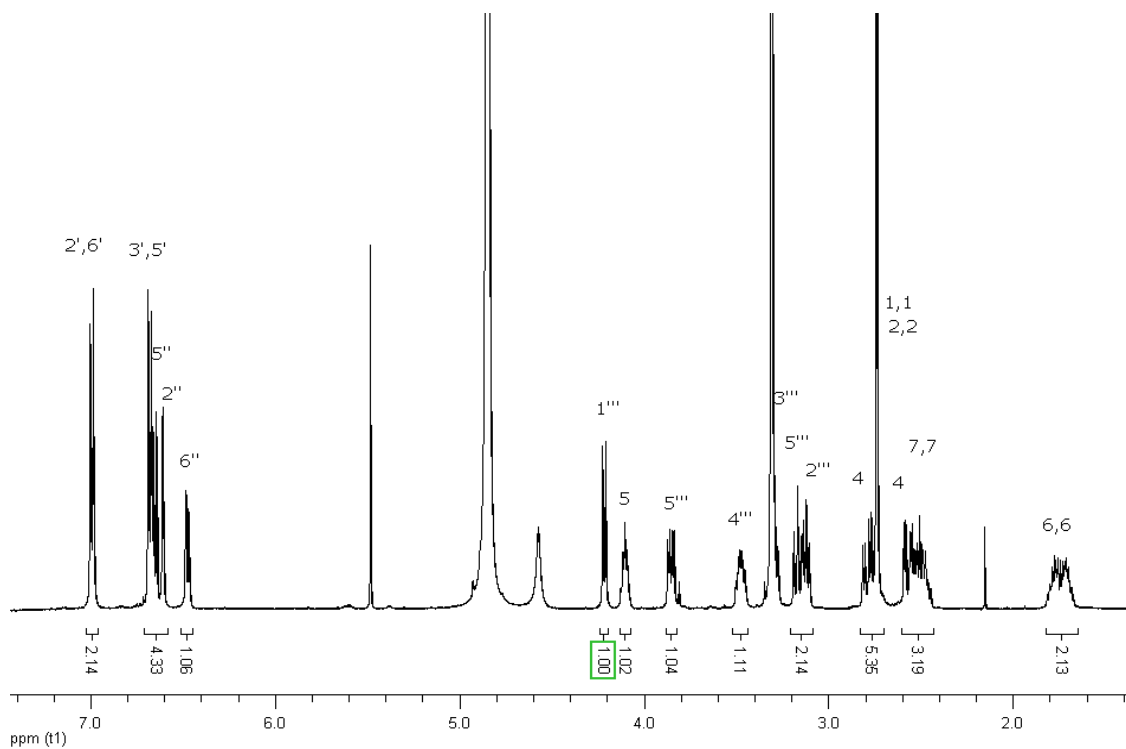
Ovo je grupa diarilheptanoida izolovanih iz crne jove kojoj pripadaju četiri jedinjenja **25-28** (Slika 2.2.1). Za ^1H NMR spektre ovih jedinjenja karakteristični su signali AA'BB' spinskog sistema koji potiče od *p*-hidroksifenil grupe i tipičan skup signala (dva dubleta i jedan dvostruki dublet) koji potiče od kateholske grupe.

Jedinjenja **25** i **26** su izolovana u količinama od 26 mg, odnosno 15 mg. Kako su prvobitno izolovani kao smeša, dodatno su razdvojeni posebnim programom na semipreparativnom HPLC-u, datom u Eksperimentalnom delu. Analizom njihovih NMR spektara utvrđeno je da se radi o strukturnim izomerima, alnuzidu A (**25**) i alnuzidu B (**26**), koji se razlikuju po tome što alnuzid A ima kateholsku grupu u položaju 1 heptanskog niza, a *p*-hidroksifenil grupu u položaju 7, dok je kod alnuzida B obrnuto (Slika 2.2.74). Sve ostalo, uključujući karakterističnu keto grupu u položaju 3 i β -D-ksilopiranozu u položaju 5 (dokaz HMBC korelacije H-5/C-1", H-1"/C-5, Slike 2.2.79 i 2.2.85), im je skoro identično. U ^1H NMR spektrima ova dva jedinjenja postoji mala razlika, a to je da su kod alnuzida A protoni H₂-1 i H₂-2 slučajno izohroni i daju singlet na 2,74 ppm, jer je u položaju 1 *p*-hidroksifenil grupa (što je ranije pomenuto kod tumačenja strukture jedinjenja **24**), a kod alnuzida B nisu, pošto je kod njega u položaju 1 kateholska grupa (Slike 2.2.75 i 2.2.81). Vrlo slični ^{13}C NMR, HSQC i MS spektri nisu mogli da otkriju razliku između ova dva jedinjenja. Međutim, u HMBC spektrima (Slike 2.2.80 i 2.2.87) nađene su dodatne potvrde pošto su u slučaju alnuzida A korelacije H-2",H-6"/C-7 odnose na protone kateholske grupe u položaju 7, a kod alnuzida B se iste te korelacije (Slike 2.2.86 i 2.2.88) odnose na protone AA'BB' spinskog sistema, što ukazuje na to da je *p*-hidroksifenil grupa u položaju 7. Iz HR-ESI-MS spektara oba jedinjenja, na osnovu mase kvazimolekulskih jona $[\text{M-H}]^-$ na m/z 461,1847 (**25**) i 461,1840 (**26**), potvrđena je molekulska formula C₂₄H₃₀O₉. *S* konfiguracija je ustanovljena za oba jedinjenja slaganjem $[\alpha]_D$ vrednosti sa literaturnom (**25**: -12,0 eksp., -13,5 lit.; **26**: -15,0 eksp., -15,5 lit.).⁵⁰ *S* konfiguracija na C-5 atomu za oba jedinjenja potvrđena je pravilom ^{13}C glikozidacionog pomeranja; analizom ^{13}C NMR spektara jedinjenja **25**, **26** i njihovih aglikona ili strukturno veoma sličnih jedinjenja⁷⁸ uočeno da je $\Delta\delta_{\text{C}4} > \Delta\delta_{\text{C}6}$ (2,5 > 1,8) za oba jedinjenja. U literaturi nema NMR podataka o aglikonu jedinjenja **26**, ali ima za veoma slično jedinjenje koje ima metoksi grupu

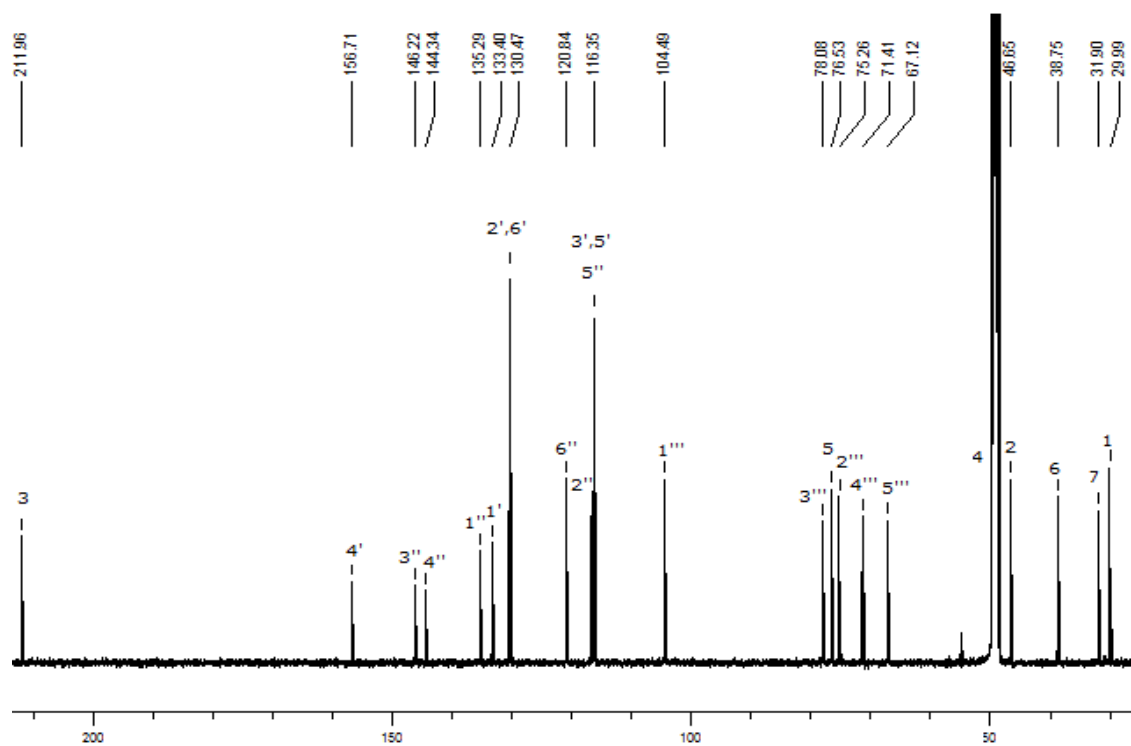
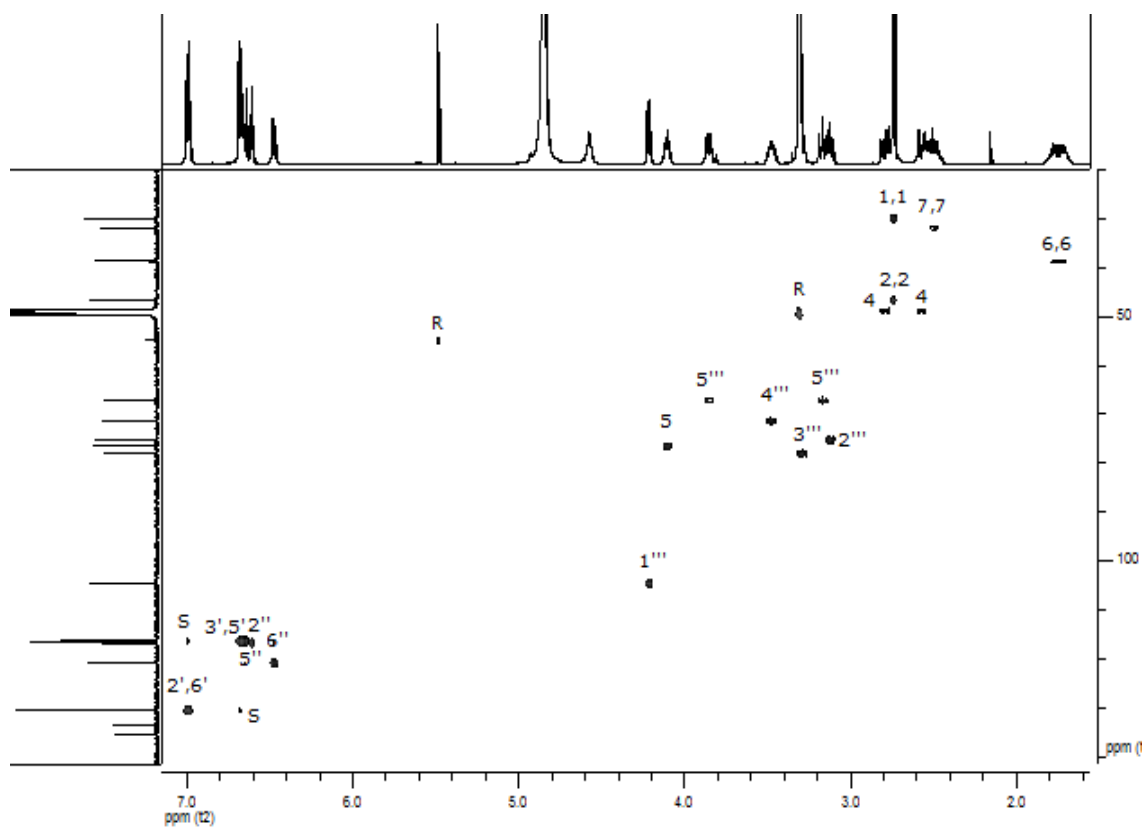
umesto hidroksilne u položaju 3', što ne utiče na vrednosti δ_{C4} i δ_{C6} , pa je ono korišćeno umesto aglikona u razmatranju.⁷⁸ NMR podaci su u dobroj saglasnosti sa literaturnim.⁵⁰



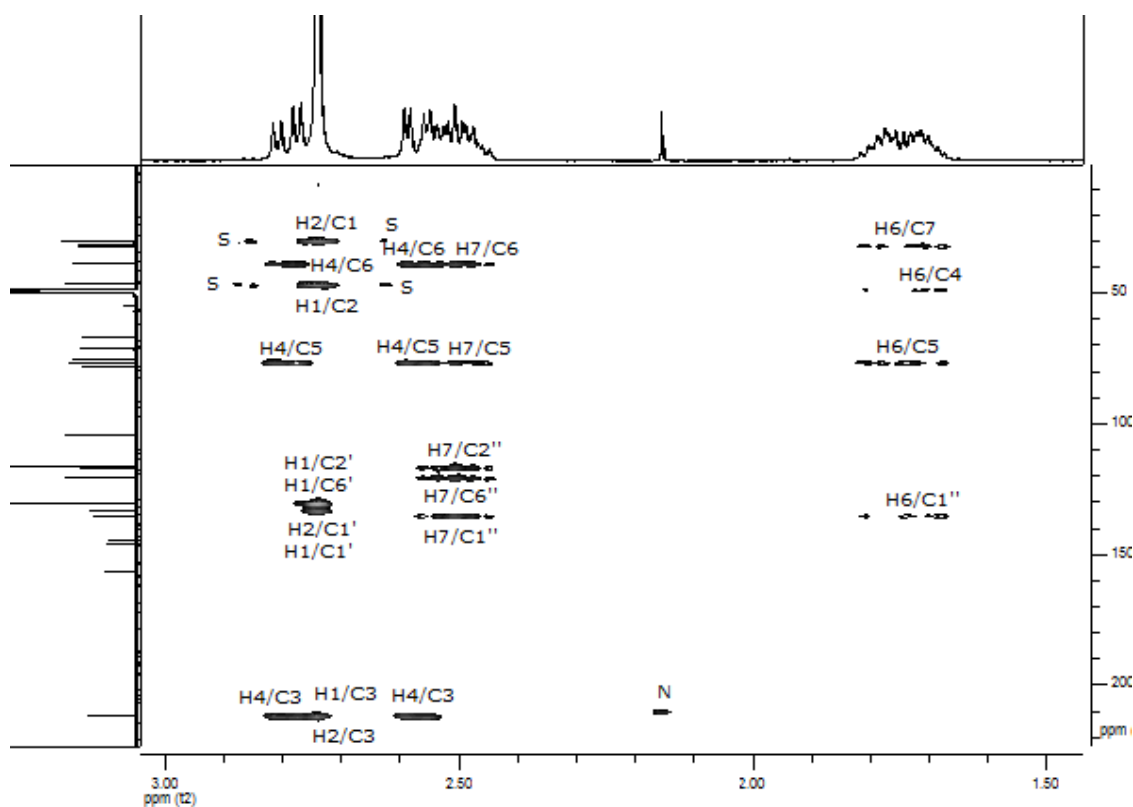
Slika 2.2.74. Strukturne formule alnuzida A (**25**) i alnuzida B (**26**)



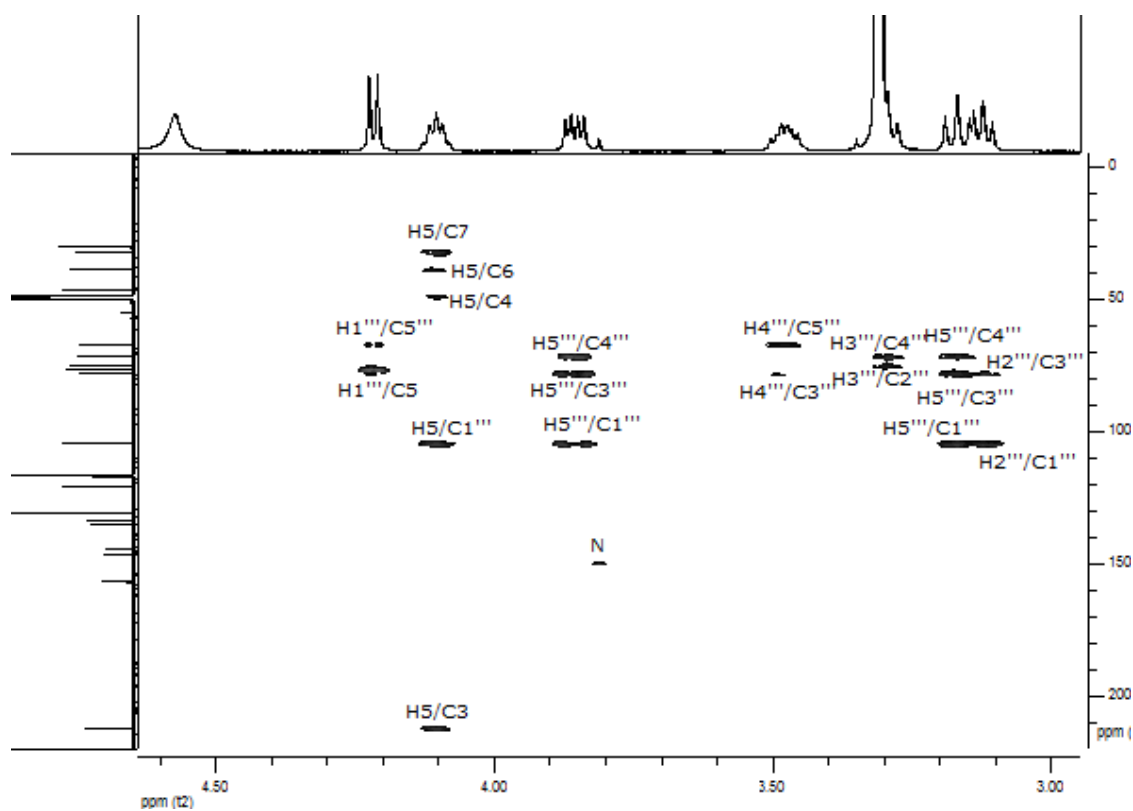
Slika 2.2.75. ^1H NMR spektar alnuzida A (**25**)

Slika 2.2.76. ^{13}C NMR spektar alnuzida A (25)

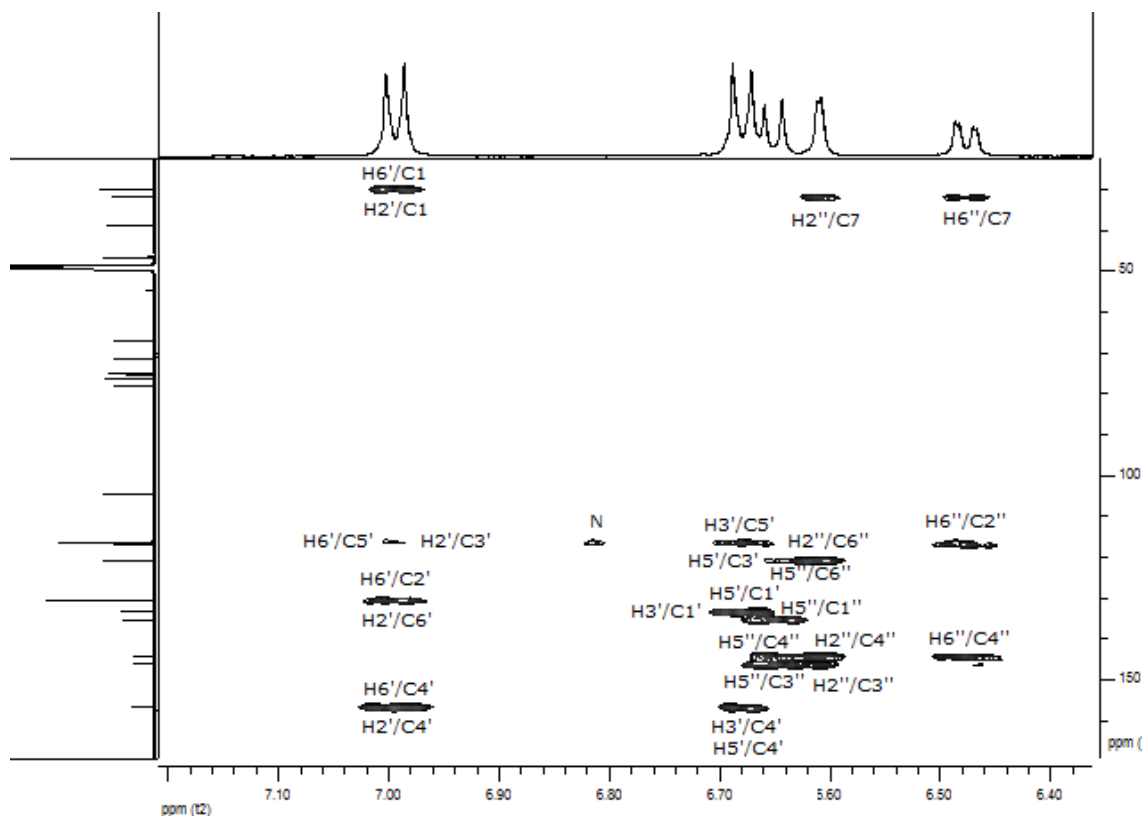
Slika 2.2.77. HSQC spektar alnuzida A (25)



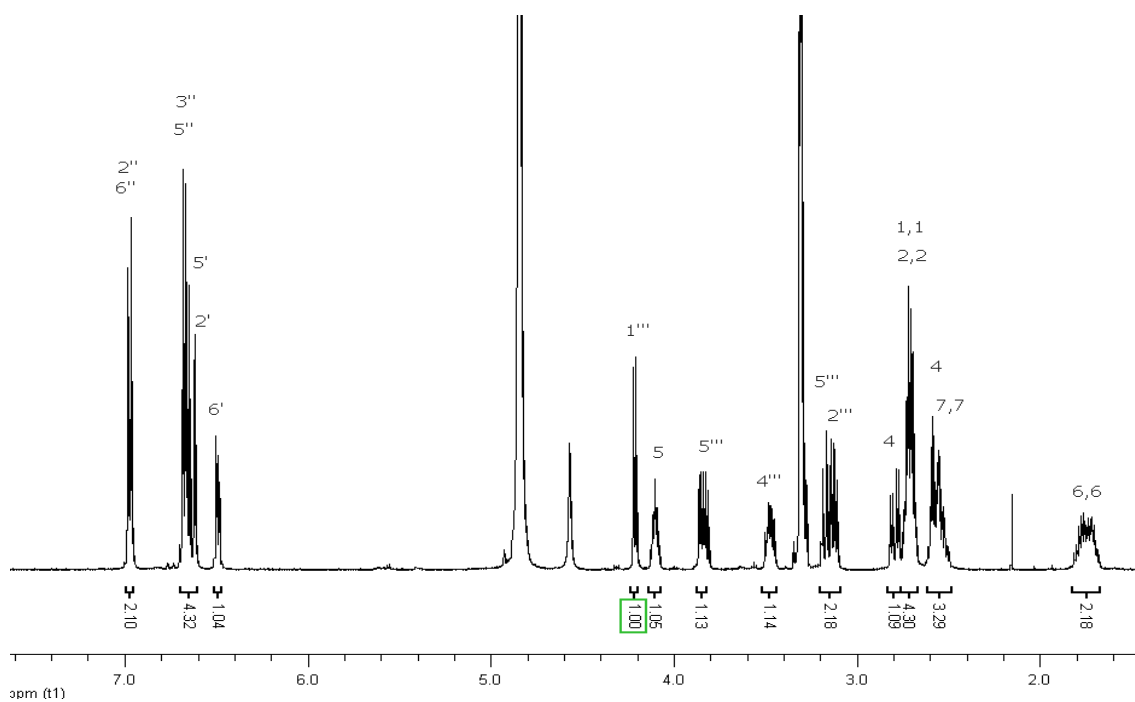
Slika 2.2.78. HMBC korelacije heptanoidnih protona (bez H-5) alnuzida A (25)



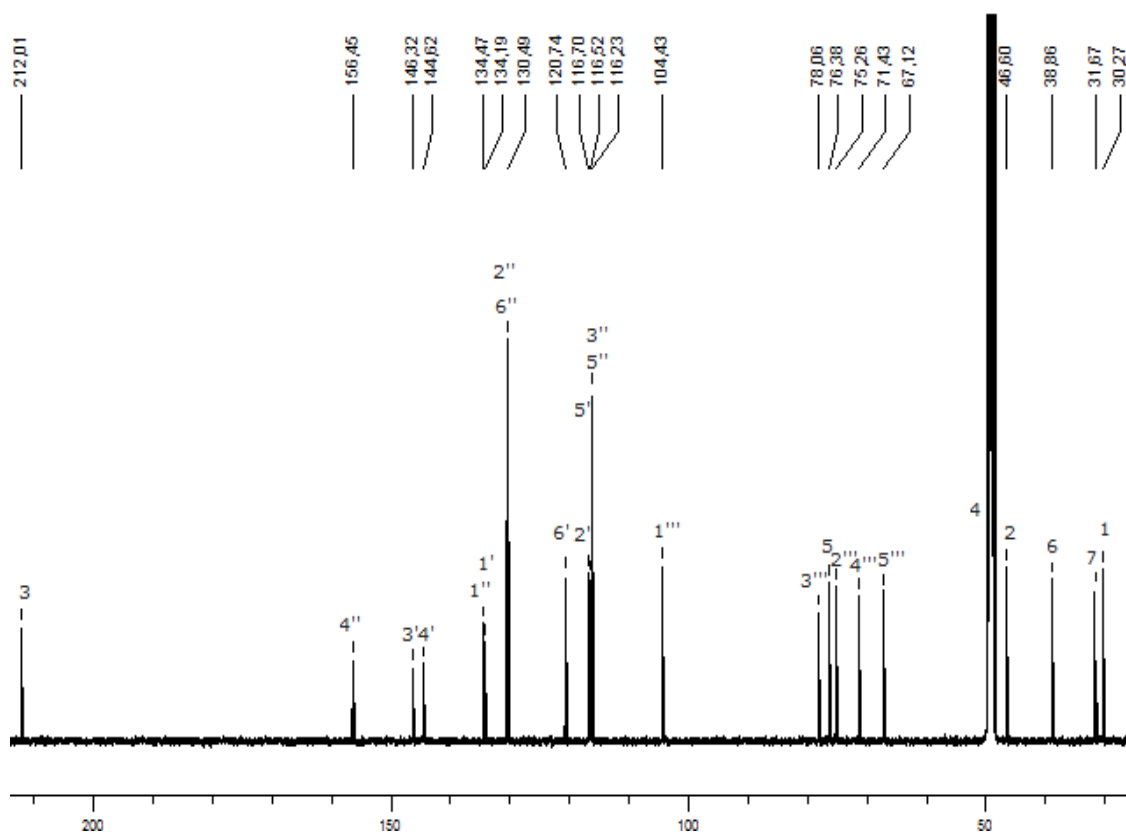
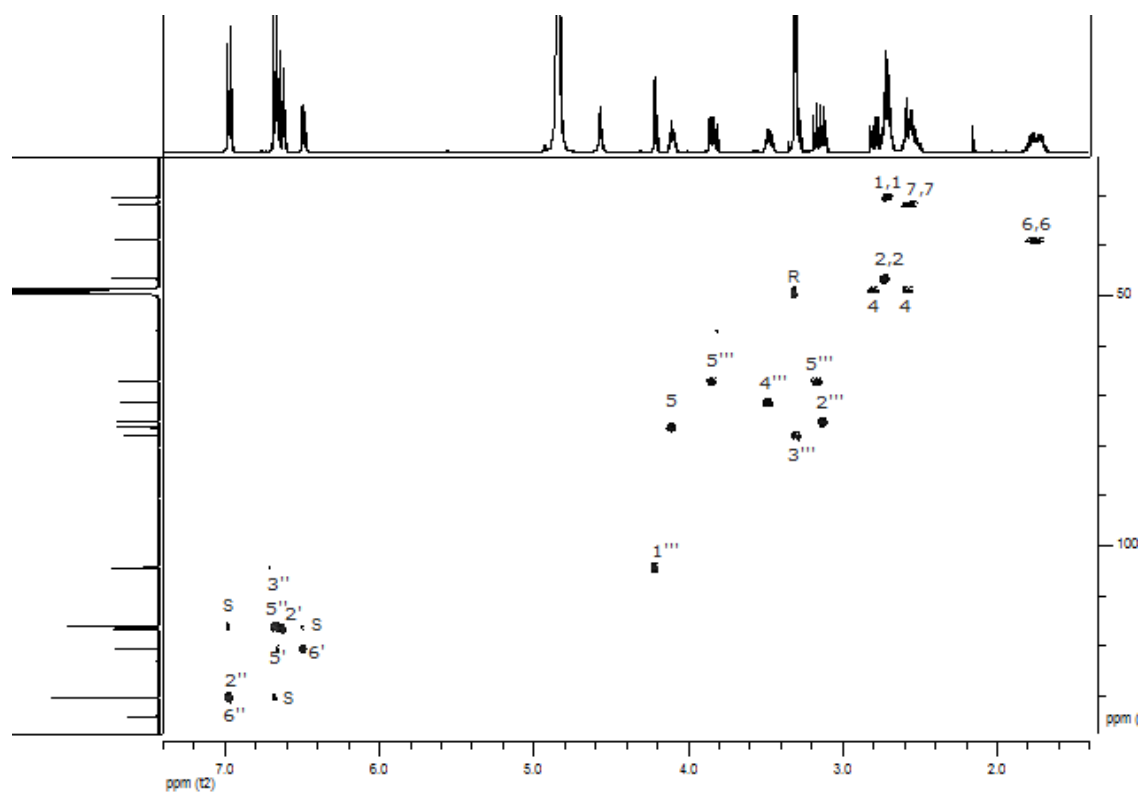
Slika 2.2.79. HMBC korelacije saharidnih i H-5 protona alnuzida A (25)



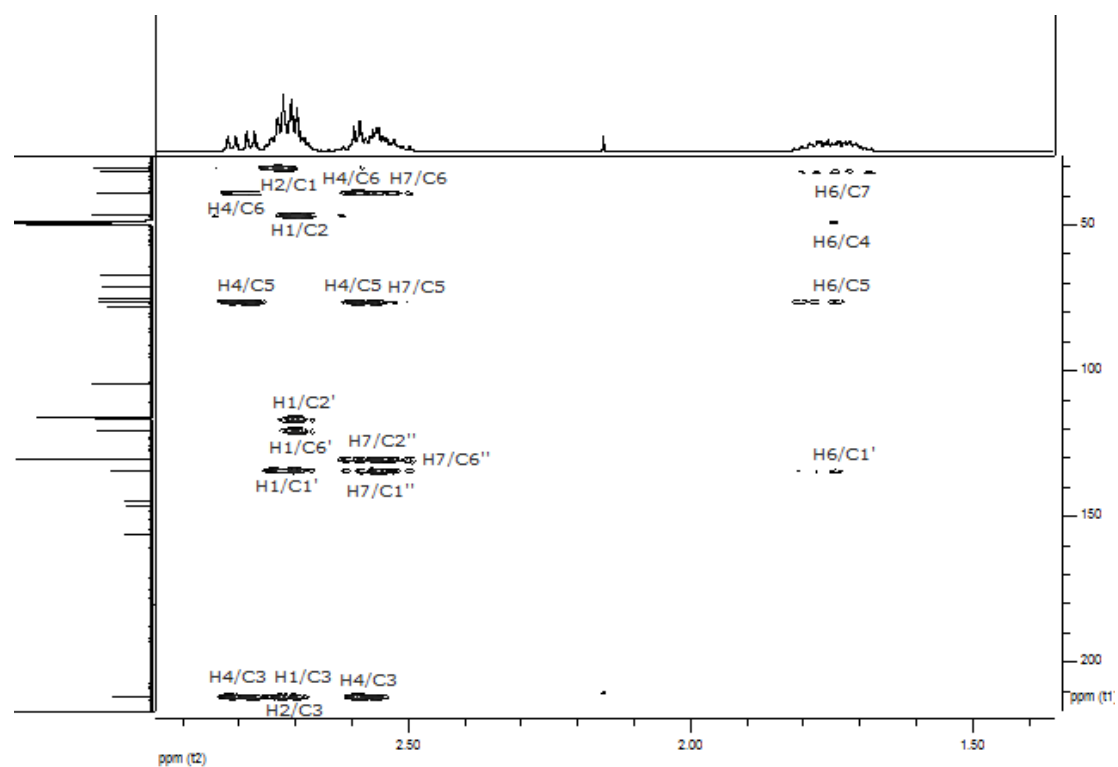
Slika 2.2.80. HMBC korelacije aromatičnih protona alnuzida A (25)



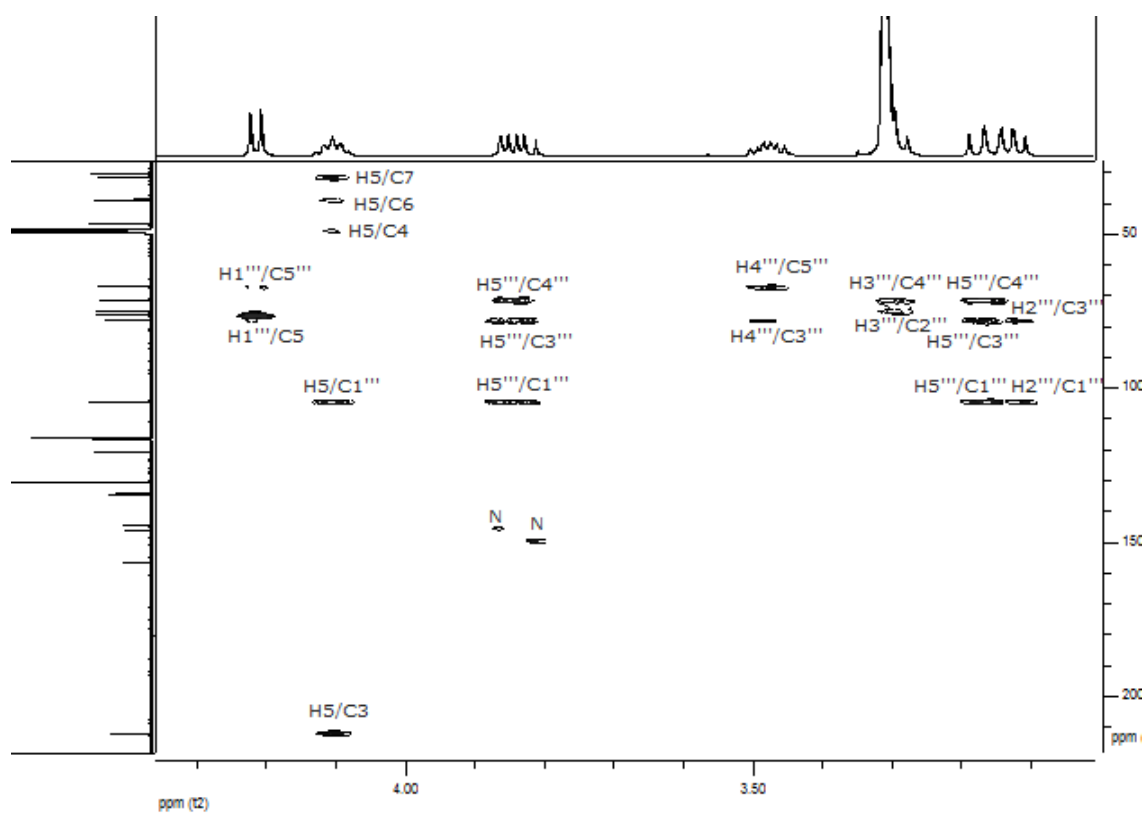
Slika 2.2.81. 1H NMR spektar alnuzida B (26)

Slika 2.2.82. ^{13}C NMR spektar alnuzida B (26)

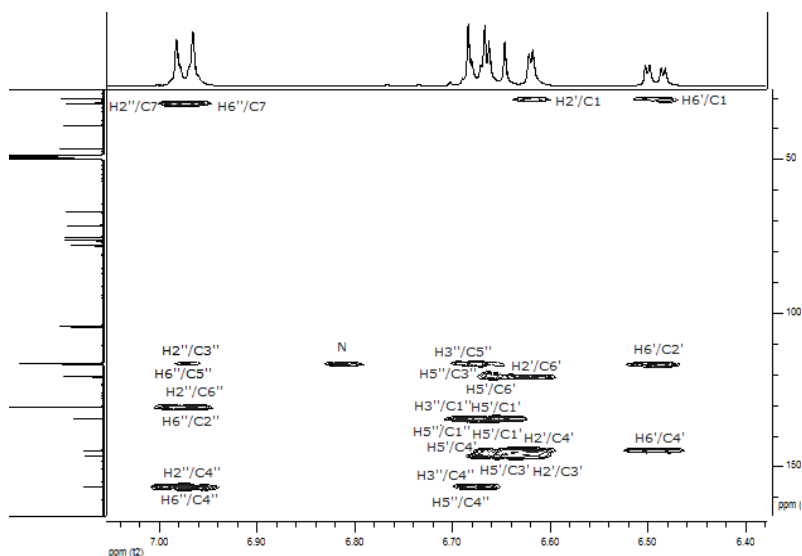
Slika 2.2.83. HSQC spektar alnuzida B (26)



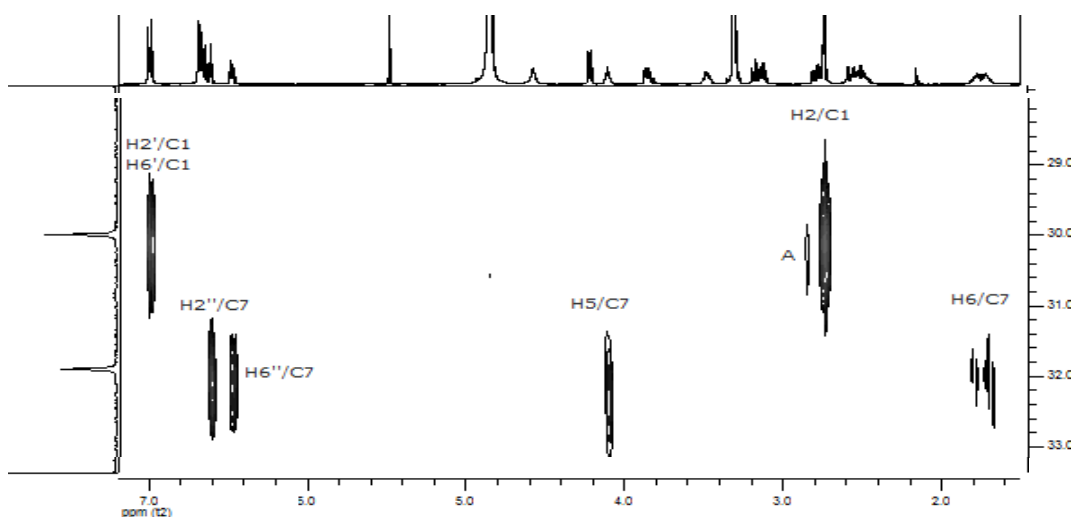
Slika 2.2.84. HMBC korelacije heptanoidnih protona (bez H-5) alnuzida B (26)



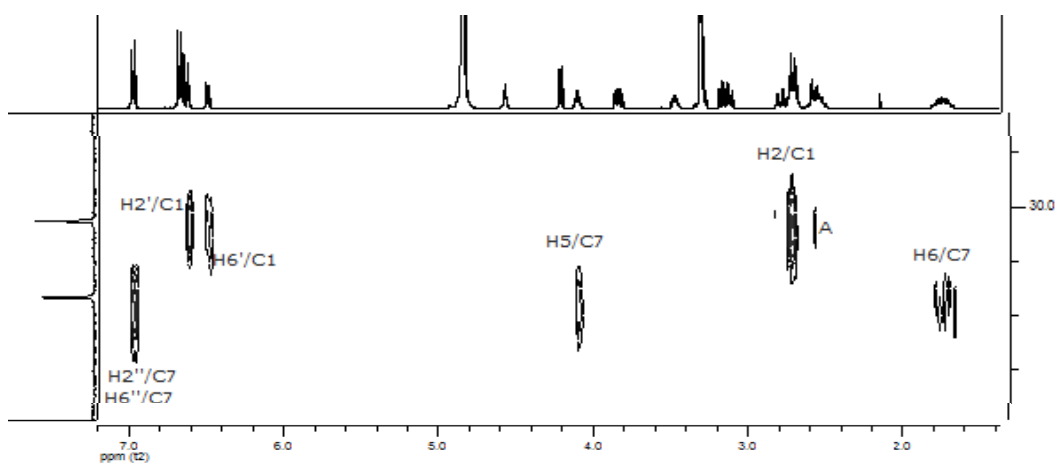
Slika 2.2.85. HMBC korelacije saharidnih i H-5 protona alnuzida B (26)



Slika 2.2.86. Aromatični deo HMBC spektra alnuzida B (26)



Slika 2.2.87. Razlikovanje C-1 i C-7 alnuzida A (25) na osnovu HMBC korelacija



Slika 2.2.88. Razlikovanje C-1 i C-7 alnuzida B (26) na osnovu HMBC korelacija

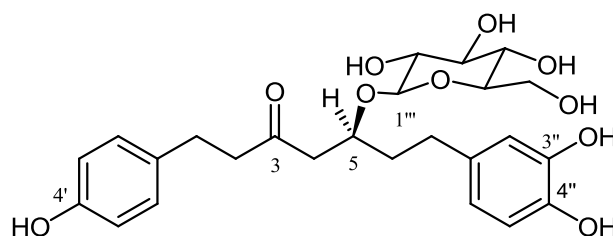
Tabela 2.2.6. NMR podaci za jedinjenja **25** i **26** (CD₃OD)

C/H	Alnuzid A (25)		Alnuzid B (26)	
	δ_C , tip	δ_H (J u Hz)	δ_C , tip	δ_H (J u Hz)
1	30,0; CH ₂	2,74 brs	30,3; CH ₂	2,72 A ₂ B ₂
2	46,7; CH ₂	2,74 brs	46,6; CH ₂	2,72 A ₂ B ₂
3	212,0; C	-	212,0; C	-
4	48,7; CH ₂ ^a	2,57 dd (17,0; 5,5) 2,79 dd (17,0; 7,0)	48,7; CH ₂ ^a	2,57 dd (17,0; 5,5) 2,80 dd (17,0; 7,0)
5	76,5; CH	4,00 qui (~ 6,5)	76,4; CH	4,11 qui (~ 6,5)
6	38,8; CH ₂	1,74 m	38,9; CH ₂	1,75 m
7	31,9; CH ₂	2,51 m	31,7; CH ₂	2,56 m
1'	133,4; C	-	133,2; C	-
2'	130,5; CH	6,99 d (8,5)	116,7; CH	6,62 d (2,0)
3'	116,4; CH	6,68 d (8,5)	146,3; C	-
4'	156,7; C	-	144,6; C	-
5'	116,4; CH	6,68 d (8,5)	116,5; CH	6,66 d (8,0)
6'	130,5; CH	6,99 d (8,5)	120,7; CH	6,49 dd (8,0; 2,0)
1''	135,3; C	-	134,5; C	-
2''	116,4; CH	6,61 d (1,5)	130,5; CH	6,97 d (8,5)
3''	146,2; C	-	116,2; CH	6,68 d (8,5)
4''	144,3; C	-	156,5; C	-
5''	116,8; CH	6,65 d (8,0)	116,2; CH	6,68 d (8,5)
6''	120,8; CH	6,48 dd (8,0; 1,5)	130,5; CH	6,97 d (8,5)
	Xylp		Xylp	
1'''	104,5; CH	4,22 d (7,5)	104,4; CH	4,22 d (7,5)
2'''	75,3; CH	3,12 dd (9,0; 7,5)	75,3; CH	3,13 dd (9,0; 7,5)
3'''	78,1; CH	3,30 m ^a	78,1; CH	3,30 m ^a
4'''	71,4; CH	3,48 m	71,4; CH	3,48 m
5'''	67,1; CH ₂	3,17 dd (11,5; 9,0) 3,86 dd (11,5; 5,5)	67,1; CH ₂	3,17 dd (11,5; 9,0) 3,84 dd (11,5; 5,5)

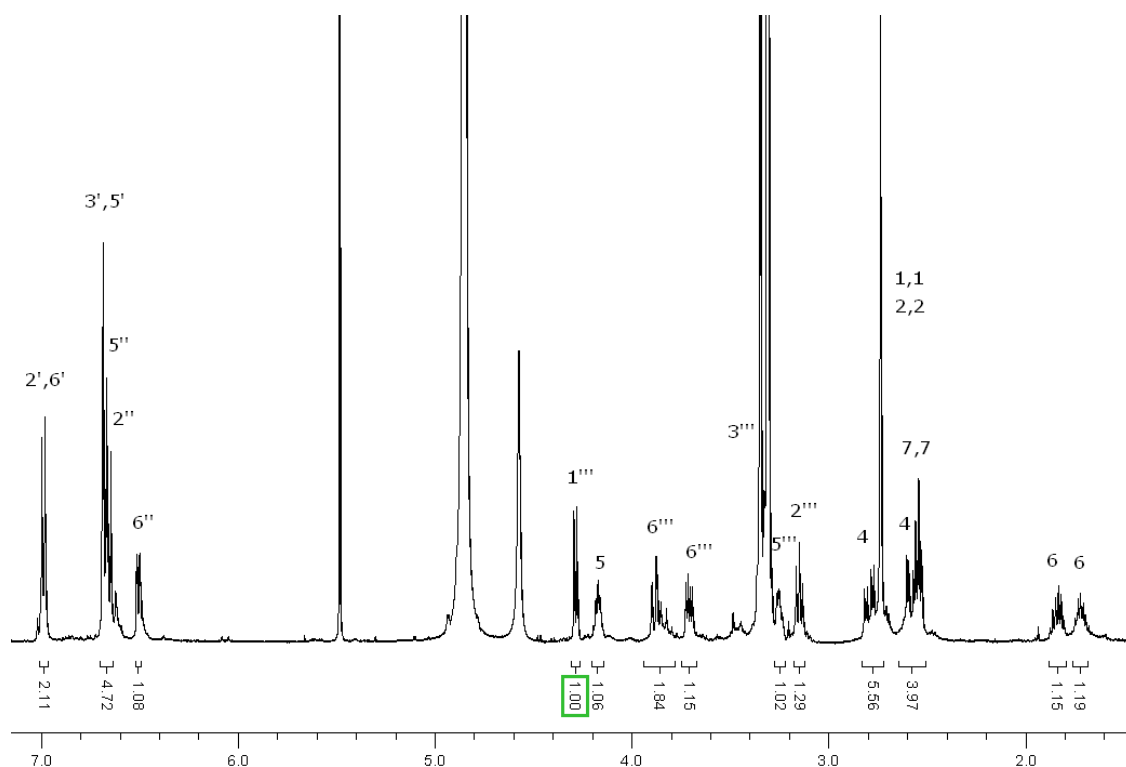
Xylp - ksilopiranozil grupa; ^a signal preklopljen signalom rastvarača (vrednost dobijena iz HSQC spektra)

Jedinjenje **27** (Slika 2.2.89) je izolovano u količini od 3 mg. NMR spektri ovog jedinjenja (Slike 2.2.90–2.2.95) veoma liče na NMR spektre alnuzida A (**25**) (Slike 2.2.75–2.2.80), pri čemu su jedine razlike uočene u saharidnim oblastima ¹H i ¹³C NMR spektara. Međutim, i ovde je rešavanje strukture bilo olakšano jer su iz NMR spektara prethodno izolovanih jedinjenja **18** i **22** (Slika 2.2.1) prepoznati signali β -D-glukopiranoze. Singlet na 2,74 ppm u ¹H NMR spektru (Slika 2.2.90), koji potiče od slučajno izohronih protona H₂-1 i H₂-2 (kao kod jedinjenja **24** i **25**), je ukazao na to da je *p*-hidroksifenil grupa u položaju 1, a kateholska u položaju 7, a HMBC korelacije H-7/C-6, C-1'', C-2'', C-6'', H-2'', H-6''/C-7 su to potvrdile (Slike 2.2.93 i 2.2.95). Karakteristična vrednost za konstantu sprežanja od 8,0 Hz dubleta anomernog H-1''' na 4,29 ppm

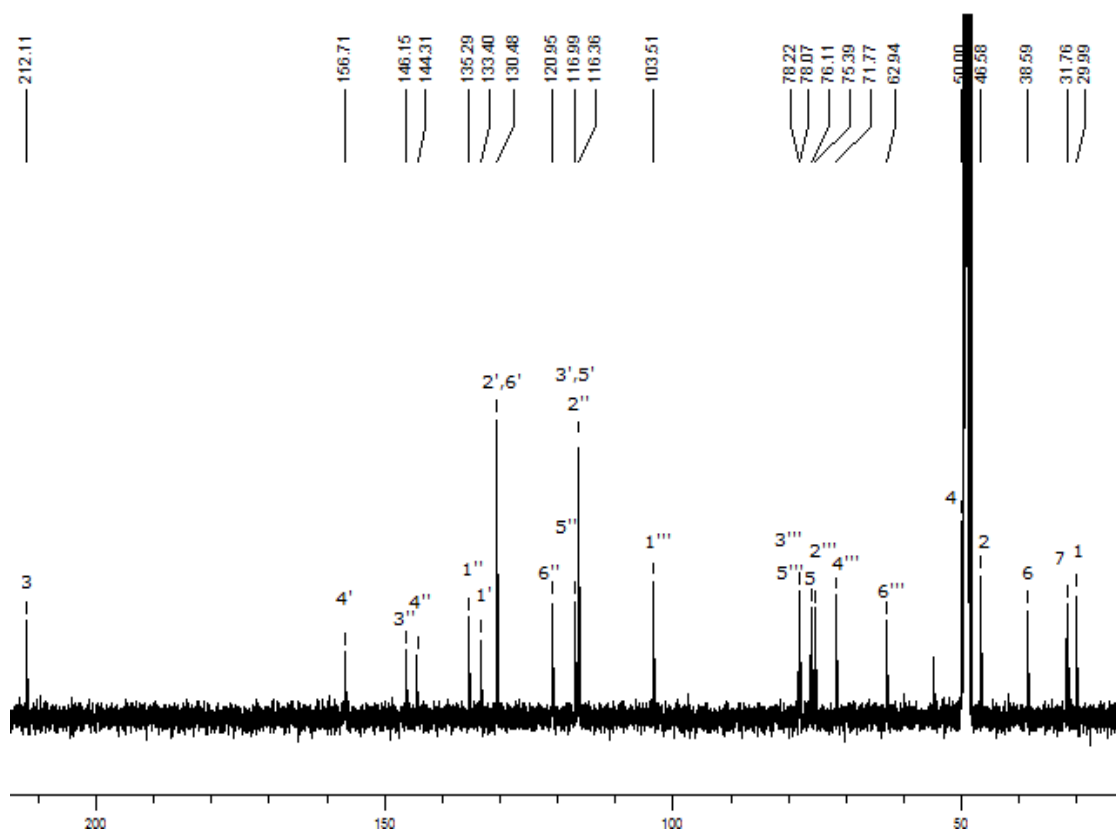
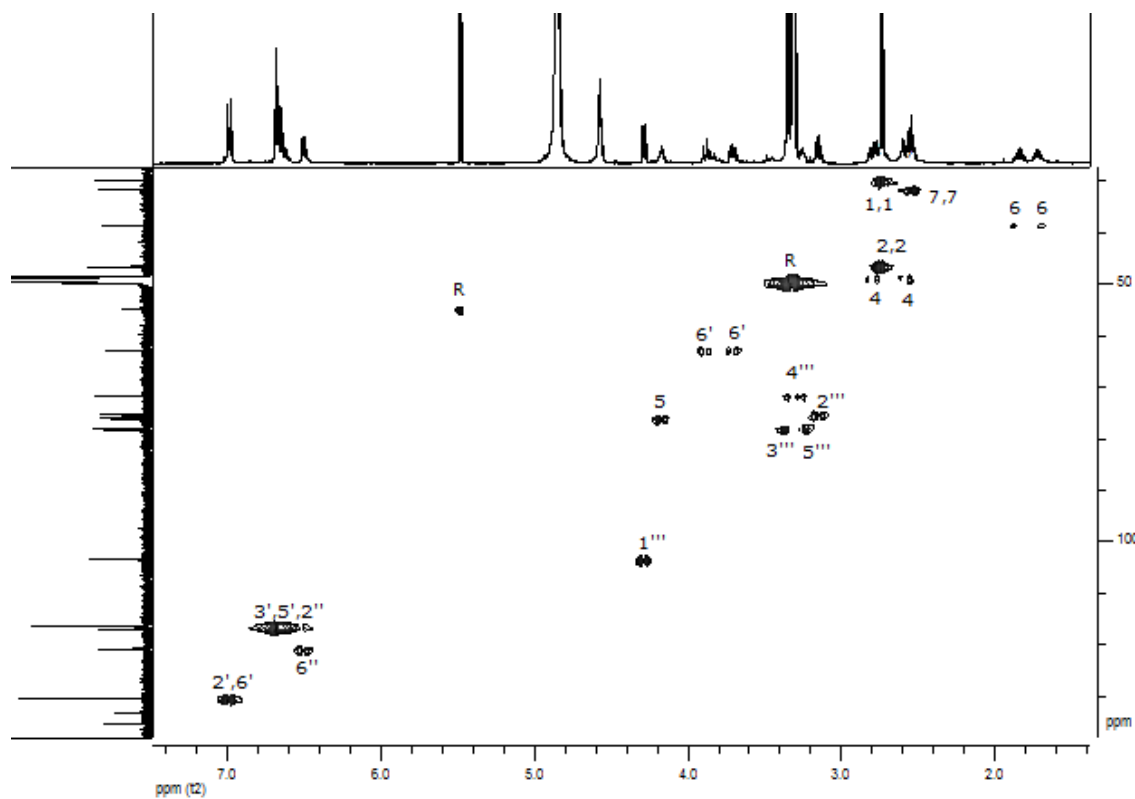
potvrdila je β -konfiguraciju D-glukopiranoze (**Slika 2.2.90**, **Tabela 2.2.7**). Kvazi-molekulski joni u HR-ESI-MS spektru jedinjenja **27** (**Slika 2.2.96**), $[M-H]^-$ na m/z 491,1924 i $[M+HCOO]^-$ na m/z 537,1984, potvrdili su molekulska formulu $C_{25}H_{32}O_{10}$. Konfiguracija na C-5 atomu je određena kao *S* na osnovu sličnosti CD spektra ovog jedinjenja sa CD spektrom jedinjenja **18**. Dodatna potvrda ove konfiguracije bilo je pravilo ^{13}C glikozidacionog pomeranja, jer je pri poređenju ^{13}C NMR spektara jedinjenja **27** i odgovarajućeg aglikona⁷⁸ uočeno da je $\Delta\delta_{C4} > \Delta\delta_{C6}$ ($2,0 > 1,4$). $[\alpha]_D$ vrednost izmerena za ovo jedinjenje iznosi +7,5. Tako je jedinjenje **27** 5(*S*)-1-(4-hidroksifenil)-7-(3,4-dihidroksifenil)-heptan-3-on-5-*O*- β -D-glukopiranozid. Kako u literaturi nije bilo podataka o ovom jedinjenju zaključeno je da se radi o novom prirodnom proizvodu.



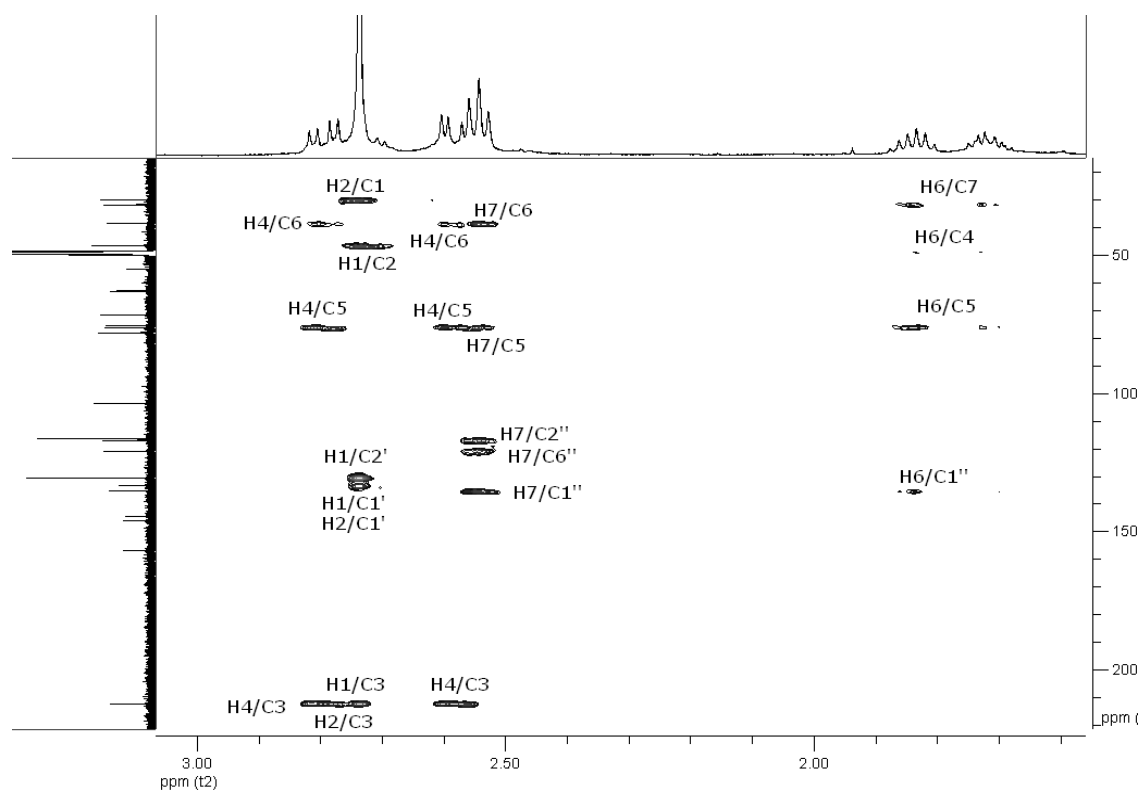
Slika 2.2.89. Strukturna formula jedinjenja **27**



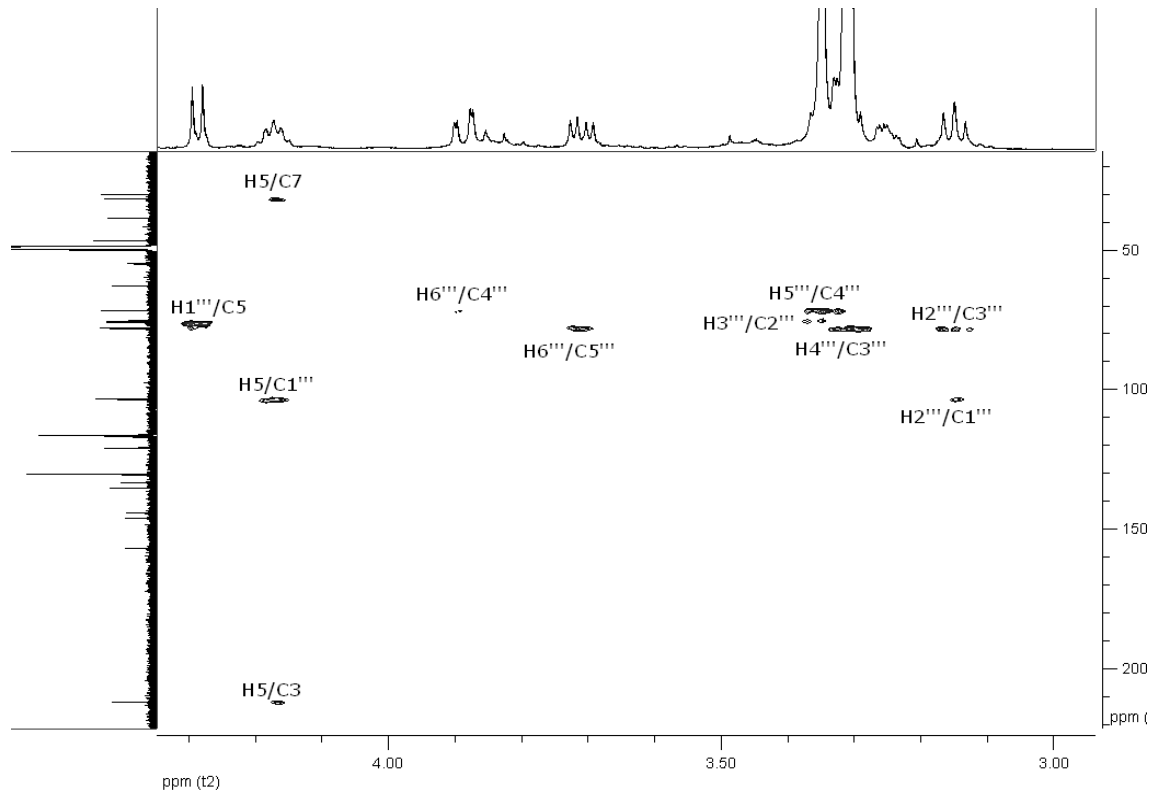
Slika 2.2.90. 1H NMR spektar jedinjenja **27**

Slika 2.2.91. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 27

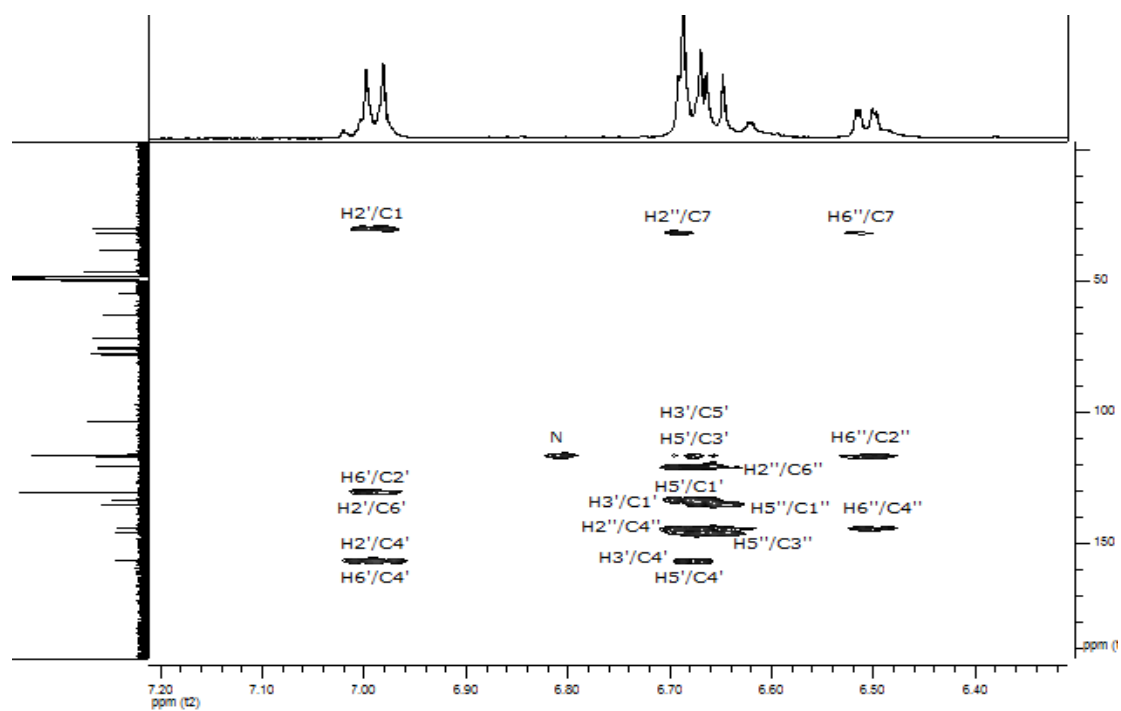
Slika 2.2.92. HSQC spektar jedinjenja 27



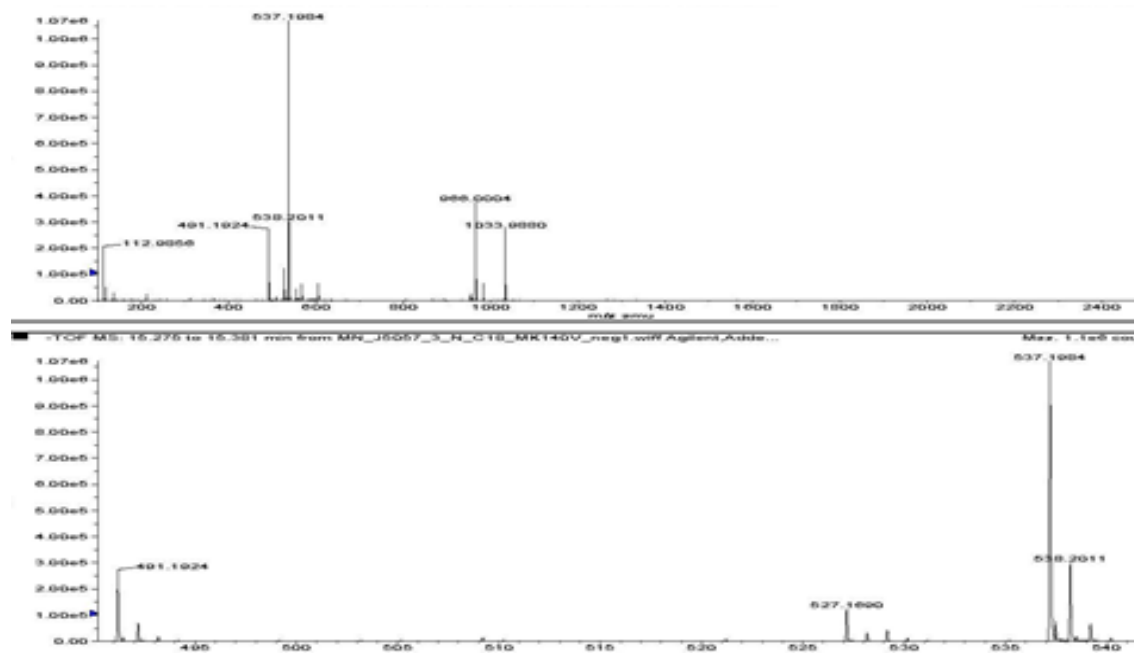
Slika 2.2.93. HMBC korelacije heptanoidnih protona (bez H-5) jedinjenja 27



Slika 2.2.94. HMBC korelacije saharidnih i H-5 protona jedinjenja 27

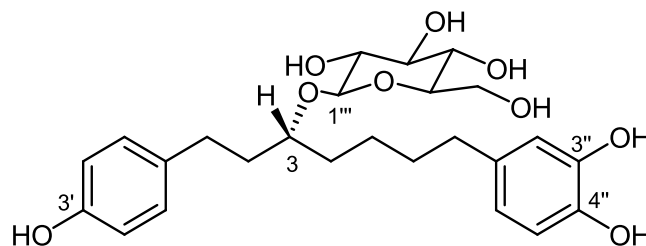


Slika 2.2.95. HMBC korelacije aromatičnih protona jedinjenja 27

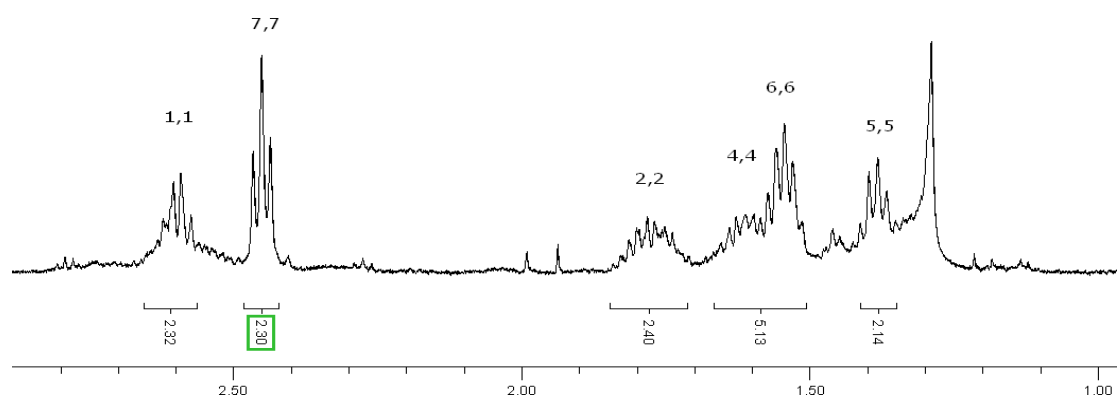


Slika 2.2.96. HR-ESI-MS spektar jedinjenja 27

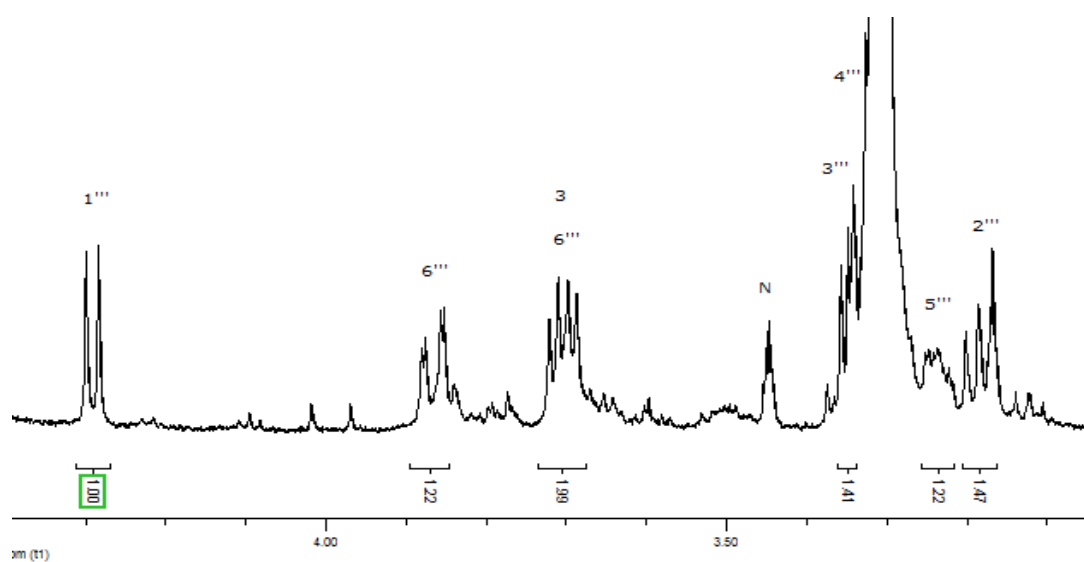
Jedinjenje **28** (Slika 2.2.97) je izolovano u količini od 3 mg. ^{13}C NMR spektar ovog jedinjenja (Slika 2.2.101) je ukazao na izostanak keto grupe (izostanak signala na $\delta_{\text{C}} > 212$ ppm), a aromatični delovi ^1H NMR i ^{13}C NMR spektara (Slike 2.2.100 i 2.2.101) su bili veoma slični odgovarajućim spektrima jedinjenja **25** i **27**. Kao kod pomenutih jedinjenja **25** i **27**, i u jedinjenju **28** je *p*-hidroksifenil grupa u položaju 1, što je potvrđeno HMBC korelacijama H-2,H-2',H-6'/C-1 i H-6,H-6''/C-7 (Slika 2.2.104). Međutim, u ^1H NMR spektru ovog jedinjenja je izostao singlet za H₂-1 i H₂-2 na oko 2,7 ppm koji se javljao kod jedinjenja **1**, **2**, **3**, **24**, **25** i **27**, pošto u položaju 3 heptanskog skeleta nema keto grupe. Kako su signali u saharidnim oblastima NMR spektara prepoznati kao glukozni na osnovu poređenja sa spektrima već izolovanih jedinjenja **18**, **22** i **27**, pretpostavljeno je da se radi o 1-(4-hidroksifenil)-7-(3,4-dihidroksifenil)heptan-3-*O*- β -D-glukopiranozidu. HSQC i HMBC spektri (Slike 2.2.102-2.2.104) su potvrdili pretpostavljenu strukturu kao i maseni spektar koji je na osnovu kvazimolekulskih jona $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ na m/z 496,2545 i $[\text{M}+\text{Na}]^+$ na m/z 501,2092 ukazao na molekulska formulu $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_9$. Konfiguracija na C-3 atomu je određena pravilom ^{13}C glikozidacionog pomeranja kao *R*, jer je poređenjem δ_{C} vrednosti iz ^{13}C NMR spektara ovog jedinjenja (Slika 2.2.101) i njegovog aglikona⁷⁹ dobijeno da je $\Delta\delta_{\text{C}4} > \Delta\delta_{\text{C}2}$ (3,4 > 2,6). NMR podaci su u saglasnosti sa literaturnim,⁵⁷ što daje konačnu potvrdu da je jedinjenje **28** 3(*S*)-1-(4-hidroksifenil)-7-(3,4-dihidroksifenil)heptan-3-*O*- β -D-glukopiranozid (Slika 2.2.97).



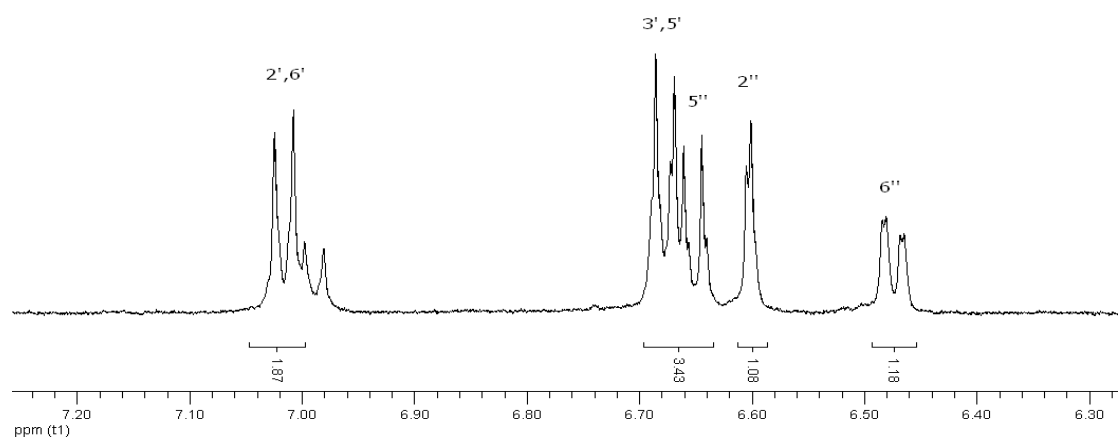
Slika 2.2.97. Strukturna formula jedinjenja **28**



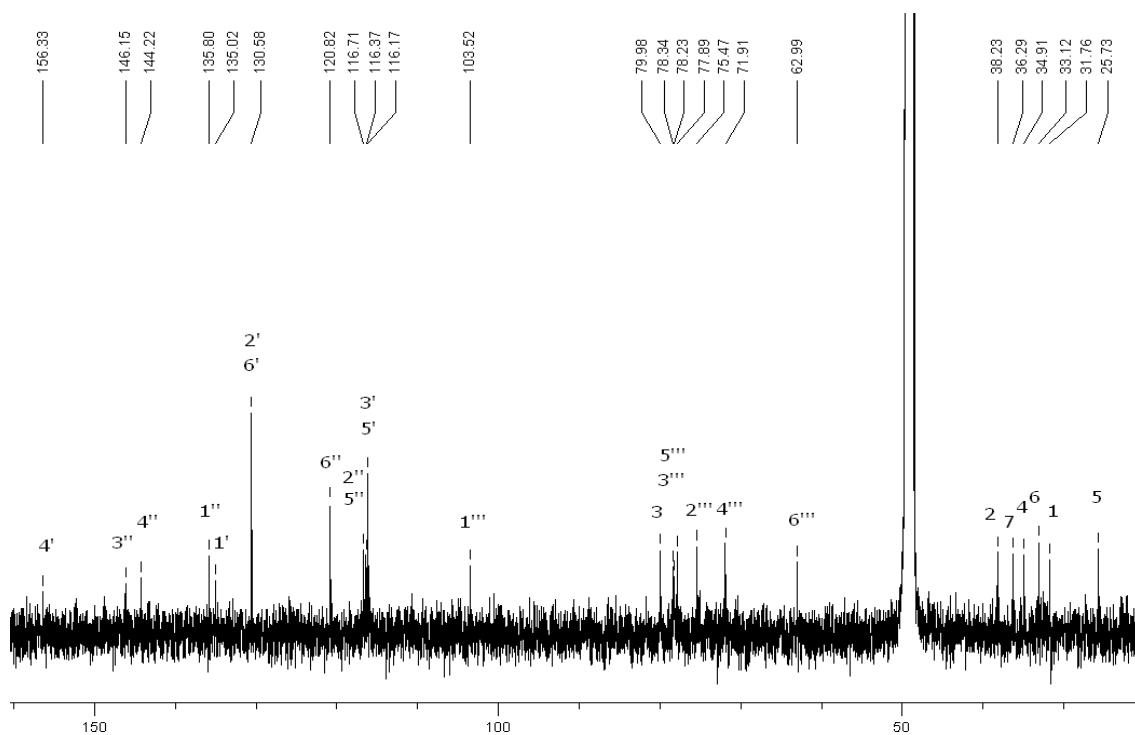
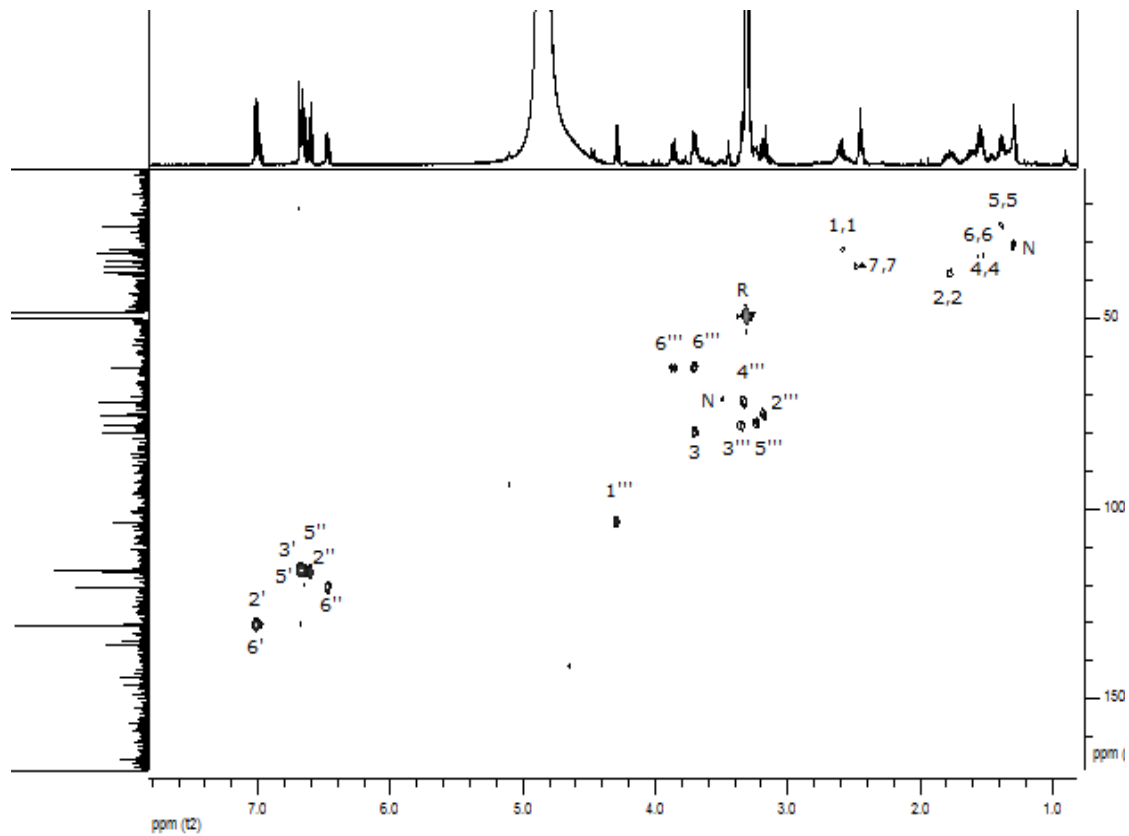
Slika 2.2.98. Signali heptanoidnih protona (bez H-3) u ^1H NMR spektru jedinjenja 28



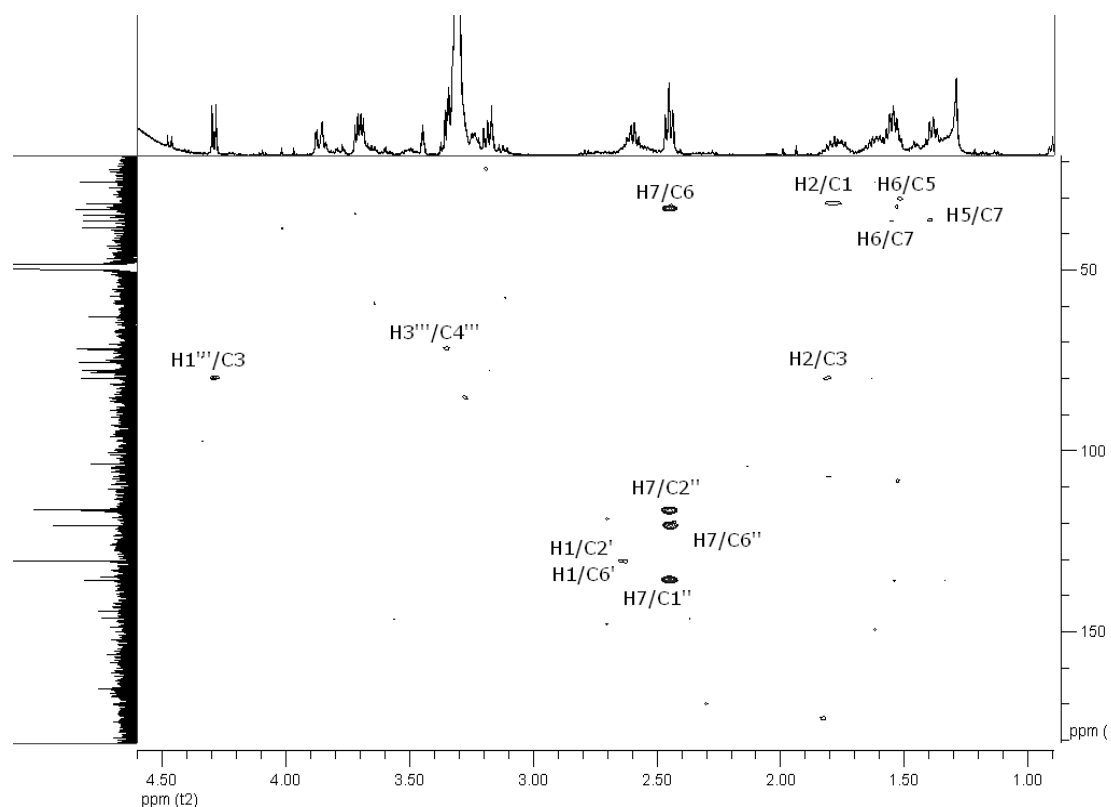
Slika 2.2.99. Signali saharidnih i H-3 protona u ^1H NMR spektru jedinjenja 28



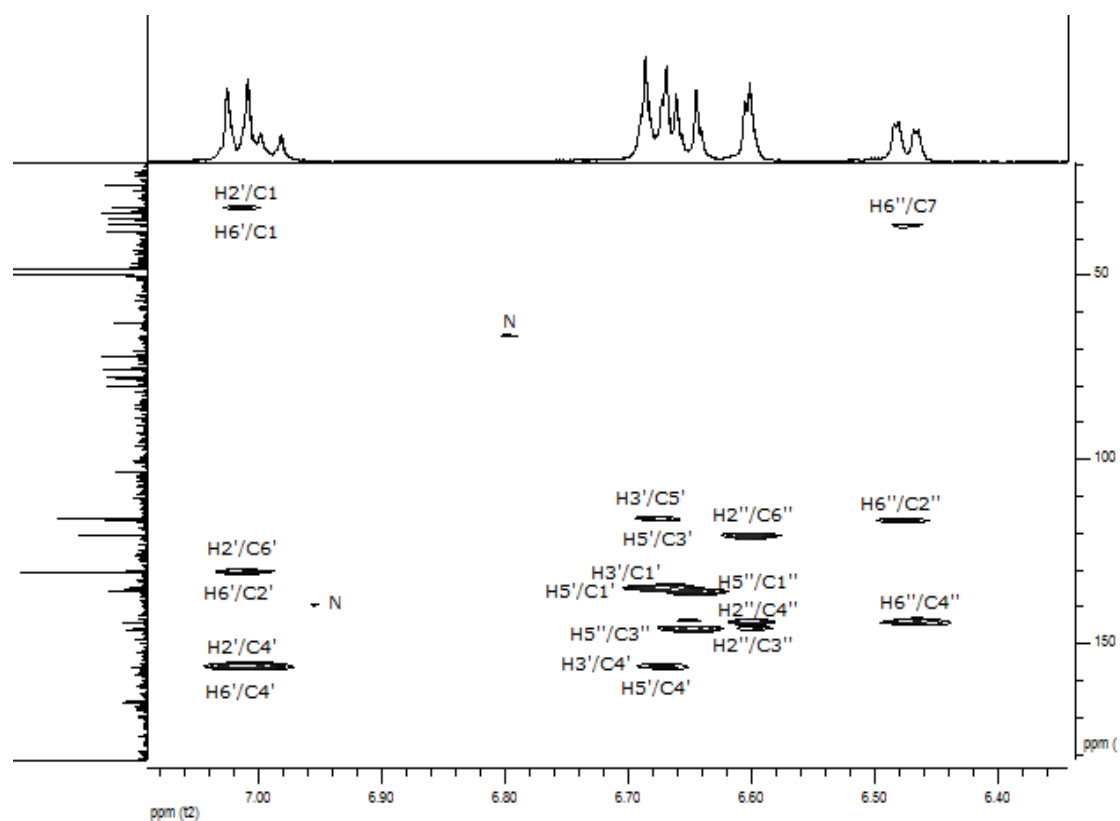
Slika 2.2.100. Signali aromatičnih protona u ^1H NMR spektru jedinjenja 28

Slika 2.2.101. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 28

Slika 2.2.102. HSQC spektar jedinjenja 28



Slika 2.2.103. HMBC korelacije alifatičnih protona jedinjenja 28



Slika 2.2.104. HMBC korelacije aromatičnih protona jedinjenja 28

Tabela 2.2.7. NMR podaci za jedinjenja **27** i **28** (CD₃OD)

C/H	27		28	
	δ_C , tip	δ_H (J u Hz)	δ_C , tip	δ_H (J u Hz)
1	30,0; CH ₂	2,74 brs	31,8; CH ₂	2,60 A ₂ B ₂
2	46,6; CH ₂	2,74 brs	38,2; CH ₂	1,78 m
3	212,1; C	-	80,0; CH	3,71 m
4	48,9; CH ₂ ^a	2,58 dd (16,5; 5,5) 2,79 dd (16,5; 7,0)	34,9; CH ₂	1,60 m
5	76,1; CH	4,17 qui (~ 6,5)	25,7; CH	1,38 qui (~ 7,0)
6	38,6; CH ₂	1,72 m; 1,83 m	33,1; CH ₂	1,55 qui (~ 7,5)
7	31,8; CH ₂	2,54 t (7,5)	36,3; CH ₂	2,45 t (7,5)
1'	133,4; C	-	135,0; C	-
2'	130,5; CH	6,99 d (8,5)	130,6; CH	7,02 d (8,5)
3'	116,4; CH	6,68 d (8,5)	116,2; CH	6,68 d (8,5)
4'	156,7; C	-	156,3; C	-
5'	116,4; CH	6,68 d (8,5)	116,2; CH	6,68 d (8,5)
6'	130,5; CH	6,99 d (8,5)	130,6; CH	7,02 d (8,5)
1''	135,3; C	-	135,8; C	-
2''	116,4; CH	6,67 d (2,0)	116,4; CH	6,60 d (2,0)
3''	146,2; C	-	146,2; C	-
4''	144,3; C	-	144,2; C	-
5''	117,0; CH	6,66 d (8,0)	116,7; CH	6,66 d (8,0)
6''	121,0; CH	6,51 dd (8,0; 2,0)	120,8; CH	6,48 dd (8,0; 2,0)
		Glc_p		Glc_p
1'''	103,5; CH	4,29 d (8,0)	103,5; CH	4,30 d (7,5)
2'''	75,4; CH	3,15 t (8,0)	75,5; CH	3,19 dd (9,0; 7,5)
3'''	78,2; CH	3,32 m	77,9; CH	3,34 m ^a
4'''	71,8; CH	3,32 m	71,9; CH	3,33 m ^a
5'''	78,1; CH	3,25 m	78,3; CH	3,24 m
6'''	62,9; CH ₂	3,71 dd (12,0; 5,5) 3,88 dd (12,0; 2,0)	63,0; CH ₂	3,71 dd (11,5; 5,5) 3,87 dd (11,5; 2,0)

Glc_p – glukopiranozil grupa; ^a signal preklopljen signalom rastvarača (vrednost dobijena iz HSQC spektra)

2.2.2. Strukturno određivanje složenih diarilheptanoida crne jove

Prilikom izolovanja složenih diarilheptanoida koji su bili zastupljeni u maloj količini u kori crne jove korišćeni su slični postupci i uslovi kao pri izolovanju zastupljenijih prostih diarilheptanoida i diarilheptanoid glikozida. Zbog nestabilnosti i lake izomerizacije posebna pažnja je posvećena uslovima čuvanja izolovanih složenih diarilheptanoida (postupci i uslovi razdvajanja i čuvanja dati su u Eksperimentalnom delu).

Složeni diarilheptanoidi izolovani u ovom radu su, radi lakšeg objašnjenja struktura (kao u slučaju jednostavnih – poglavlje 2.2.1), podeljeni u tri grupe na osnovu vrste aril grupa u osnovnom skeletu: 1) diarilheptanoidi sa dve kateholske grupe; 2) sa dve *p*-hidroksifenil grupe i 3) sa jednom kateholskom i jednom *p*-hidroksifenil grupom.

2.2.2.1. Složeni diarilheptanoidi sa dve kateholske grupe u osnovnom skeletu

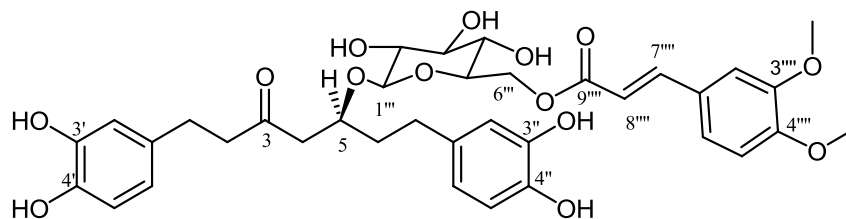
Kateholske grupe diarilheptanoida daju tipičan skup signala u aromatičnoj oblasti ^1H NMR spektra – dublet sa konstantom sprežanja od oko 2 Hz, dublet sa konstantom sprežanja od oko 8 Hz i dvostruki dublet sa obe pomenute konstante sprežanja. U ^{13}C NMR spektru ove grupe su okarakterisane signalima na sledećim hemijskim pomeranjima: ~ 116 ppm (C-2', C-2'', C-5', C-5''), ~ 120 ppm (C-6', C-6''), ~ 134 ppm (C-1', C-1'') i ~ 145 ppm (C-3', C-3'', C-4', C-4''). Za razliku od prostih diarilheptanoida i diarilheptanoid glikozida izolovani složeni diarilheptanoidi pored pomenutih signala u aromatičnim oblastima NMR spektara imaju i druge signale koji potiču od različitih cinamičnih kiselina koje imaju u svojoj strukturi.

Jedinjenje **29** (Slika 2.2.105) je izolovano iz dve podfrakcije, u količini od 3 mg. Prva podfrakcija je bila čist izomer *E*, a druga čist izomer *Z* u trenutku izolovanja. Međutim, stajanjem u kiseloj sredini (mobilna faza semipreparativnog HPLC-a je bila 0,2% HCOOH) i na svetlosti oba izomera su brzo izomerizovala do ravnotežnog odnosa *E/Z* $\sim 3/1$. Na Slici 2.2.106 prikazan je aromatični deo ^1H NMR spektra smeše ovih izomera nastale izomerizacijom čistog *E* izomera stajanjem u kiseloj sredini na svetlosti. Zamenom mravlje kiseline demineralizovanom vodom prilikom ponovnog prečišćavanja spojenih podfrakcija semipreparativnim HPLC-om i čuvanjem jedinjenja

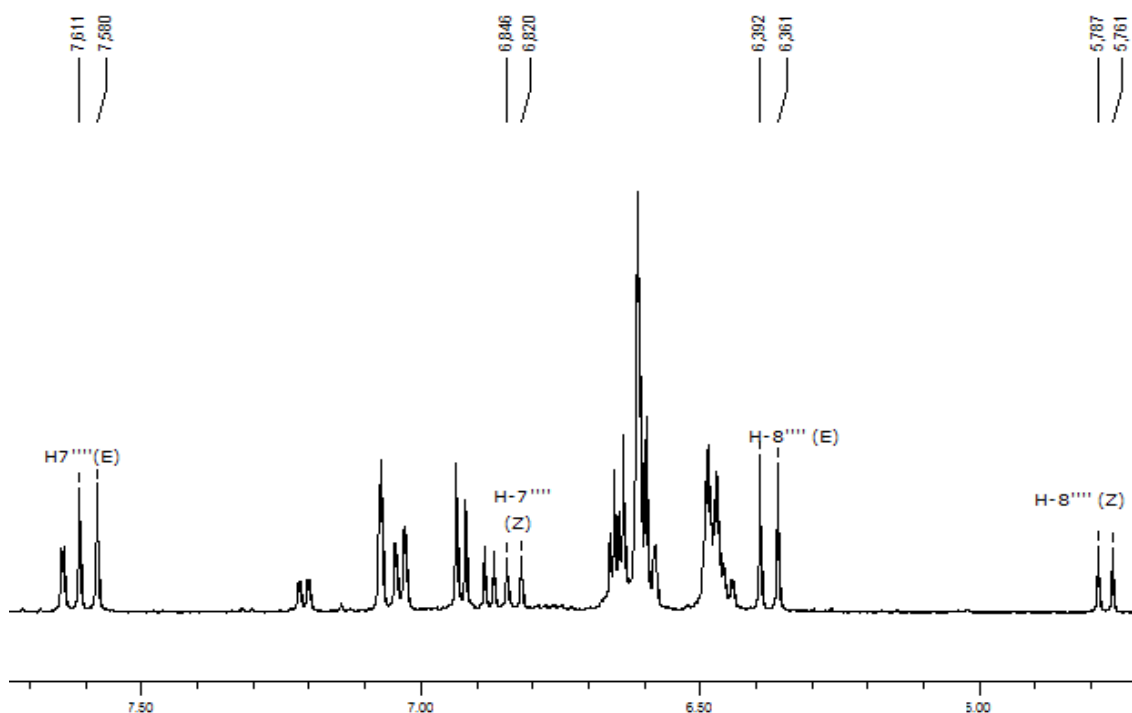
odmah po izolovanju u frižideru (i u mraku), uspešno je sprečena izomerizacija i čisto jedinjenje **29** (*E* izomer) je okarakterisano spektroskopskim tehnikama.

U aromatičnoj oblasti ^1H NMR spektra ovog jedinjenja (**Slika 2.2.105**) uočene su tri grupe signala *d*, *d*, *dd* koje pripadaju 1,2,4-trisupstituisanim aril grupama. Za dve je pretpostavljeno da pripadaju kateholskim grupama na osnovu primera ranije izolovanih prostih diarilheptanoida (poglavljje **2.2.1.1**), a za treću je kasnije utvrđeno da potiče od *E*-3,4-DMC grupe. Monosaharidna jedinica, čiji su signali uočeni u ^1H NMR spektru u intervalu 3-5 ppm, je identifikovana kao D-glukoza takođe na osnovu NMR podataka već poznatih izolovanih jedinjenja. Pomeranje ka višim δ_{H} vrednostima signala glukoznih H-5''' za 0,27 ppm i posebno oba H₂-6''' protona za 0,64, odnosno 0,70 ppm u ^1H NMR spektru jedinjenja **29** u poređenju sa H-5''' i H₂-6''' odgovarajućeg diarilheptanoid glukozida – 5(*S*)-hirsutanonol-5-*O*- β -D-glukopiranozida (**18**), prouzrokovano je esterifikacijom 6'''-OH grupe (**Slike 2.2.105** i **2.2.28**, **Tabele 2.2.2** i **2.2.8**). U ^{13}C NMR spektru su uočena pomeranja signala ka višim δ_{C} vrednostima za 2,0 ppm za C-6''' i ka nižim za 2,5 ppm za C-5''', u poređenju sa spektrom jedinjenja **18** kod kojeg 6'''-OH grupa nije esterifikovana (**Tabele 2.2.2** i **2.2.8**, **Slika 2.2.110**). Konstanta sprežanja od 7,8 Hz za anomerni H-1''' na 4,31 ppm ukazala je na β -konfiguraciju D-glukopiranoze. Dokaz da je β -D-glukopiranoza vezana za C-5 preko C-1''' je HMBC korelacija H-1'''/C-5 (**Slika 2.2.112**). Karakteristični signali za dve metoksi grupe (*s* 3,80 ppm i *s* 3,85 ppm) i dva olefinska vodonika (*d* 6,38 ppm i *d* 7,60 ppm) u ^1H NMR spektru, kao i HMBC korelacije 3'''-OMe,H-5'''/C-3''', 4'''-OMe,H-2''',H-6'''/C-4''', H-7'''/C-1''',C-2''',C-6''',C-8''',C-9''' i H-8'''/C-1''',C-9''' (**Slike 2.2.108** i **2.2.112**) ukazale su na prisustvo 3,4-DMC grupe. Da je ona vezana za C-6''' estarskom vezom dokaz su HMBC korelacije oba H₂-6''' sa karbonilnim C-9''' (**Slika 2.2.112**). Za konfiguraciju dvostruke veze je utvrđeno da je *E* iz konstante sprežanja $J_{\text{H-7'''}/\text{H-8'''}}$ od 16,0 Hz. ^{13}C NMR podaci za jedinjenje **29** su se odlično slagali sa ^{13}C NMR podacima jedinjenja sličnih struktura - 5(*S*)-hirsutanonol-5-*O*- β -D-glukopiranozida (**18**)⁷¹ (**Slika 2.2.28**, **Tabele 2.2.2** i **2.2.8**) i oregonozida B⁷⁰ (Opšti deo, **Slika 1.10**), pošto su delovi molekula jedinjenja **29** zastupljeni u oba ova jedinjenja. Isto tako, δ_{C} vrednosti 3,4-DMC grupe se dobro slažu sa pomeranjima u sličnoj feruloil grupi (razlika u samo jednoj metoksi grupi) u oregonoilu B³¹ (Opšti deo, **Slika 1.10**), što je sve potvrdilo pretpostavljenu strukturu. Kvazimolekulski jon u HR-ESI-MS spektru [M-H]⁻ na *m/z*

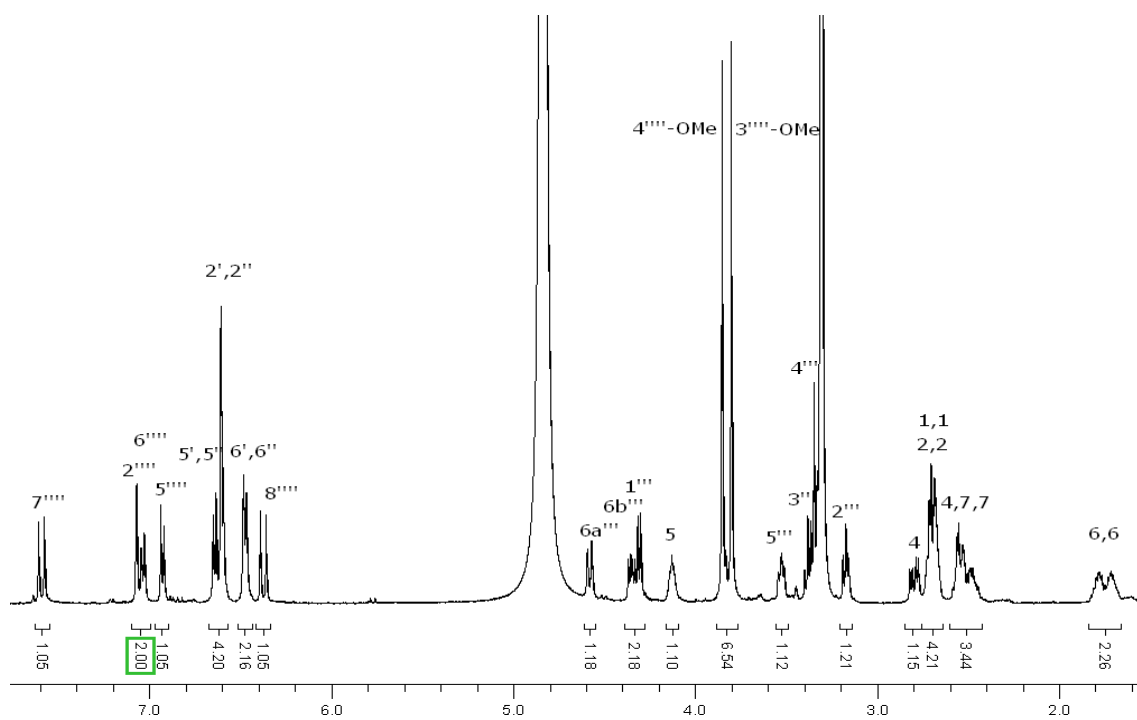
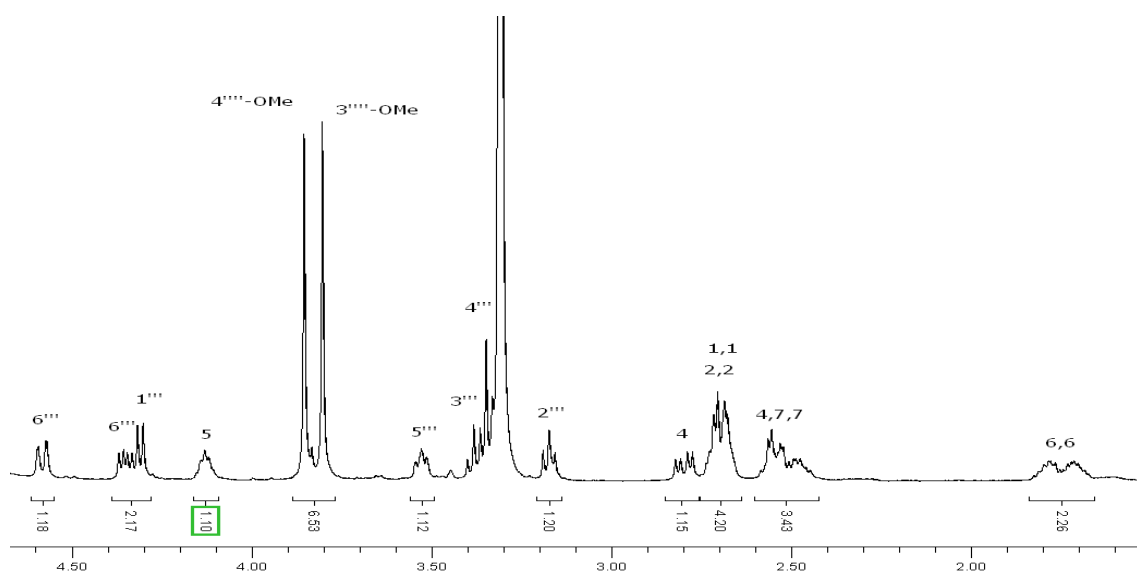
697,2553 (**Slika 2.2.114**) odgovara molekularnoj formuli $C_{36}H_{42}O_{14}$. Konfiguracija na C-5 je određena kao *S* na osnovu CD spektra koji je bio veoma sličan CD spektru 5(*S*)-hirsutanonol-5-*O*- β -D-glukopiranozida (**18**) i na osnovu ^{13}C glikozidacionog pravila, jer je analizom ^{13}C NMR spektara jedinjenja **29** i njegovog aglikona, hirsutanonola (**14**), uočeno da je $\Delta\delta_{C4} > \Delta\delta_{C6}$ ($2,7 > 1,8$) (**Slika 2.2.2**, **Tabele 2.2.1** i **2.2.8**). $[\alpha]_D$ vrednost ovog jedinjenja iznosi +4,0. Kako nije bilo podataka u literaturi o ovom jedinjenju ono se smatra novim prirodnim proizvodom.

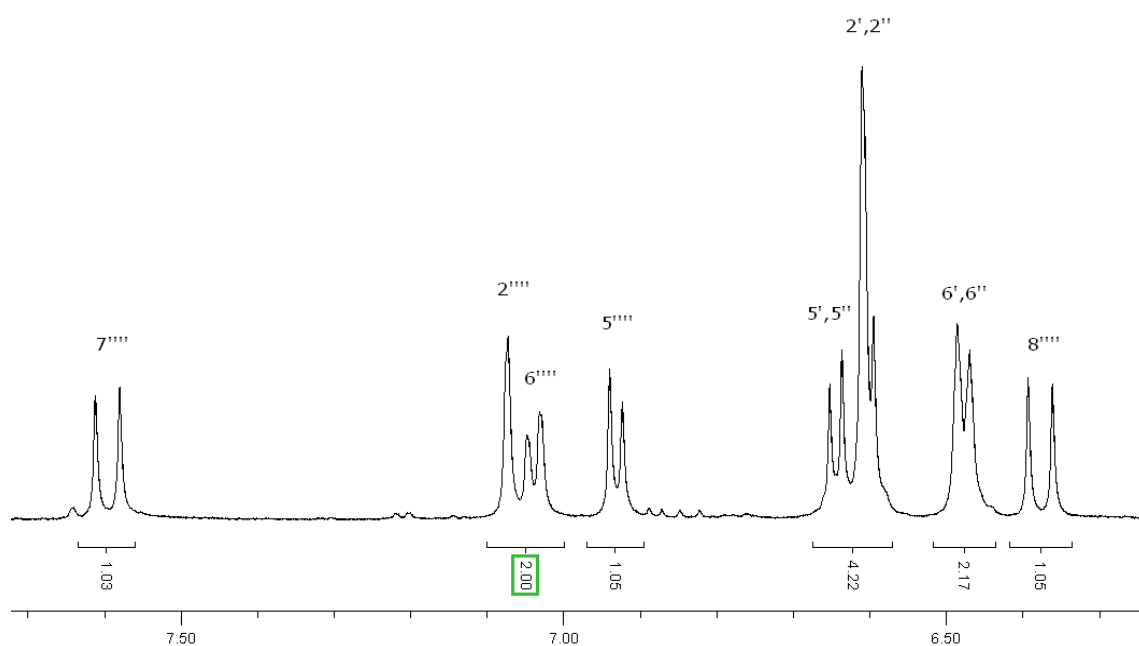


Slika 2.2.105. Strukturna formula jedinjenja **29**

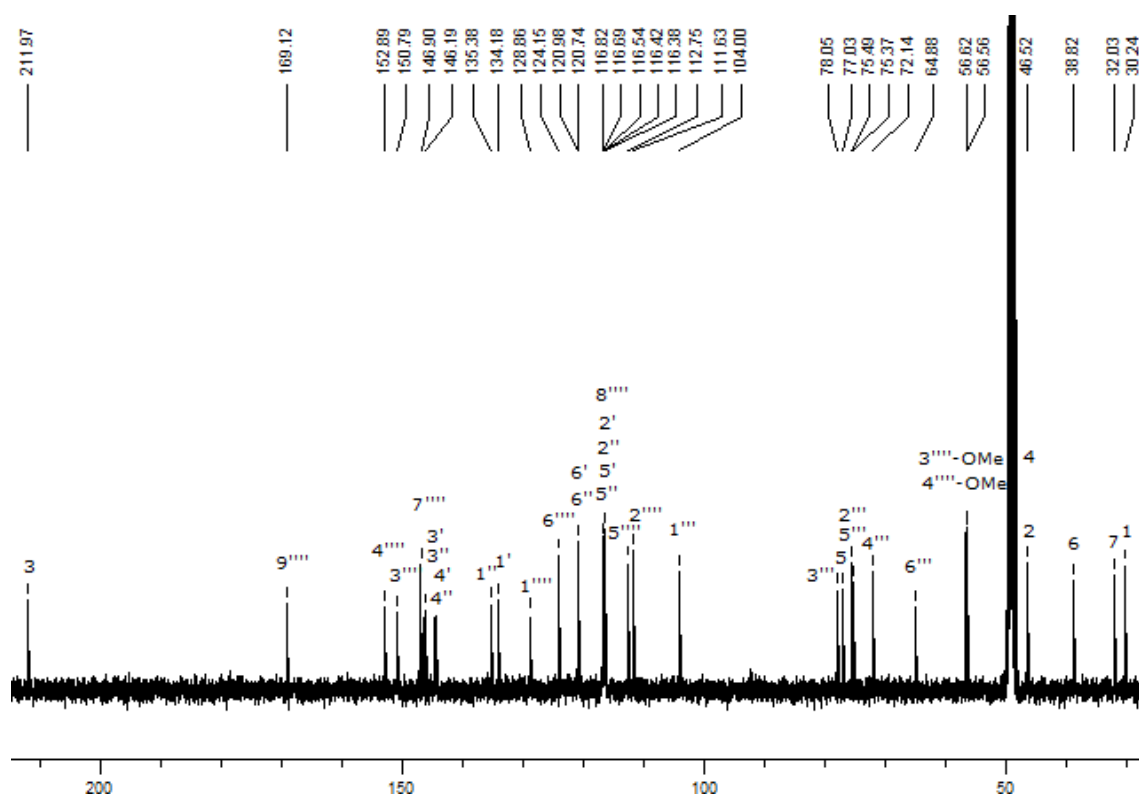


Slika 2.2.106. Deo 1H NMR spektra smeše jedinjenja **29** i njegovog *Z* izomera sa obeleženim signalima olefinskih protona

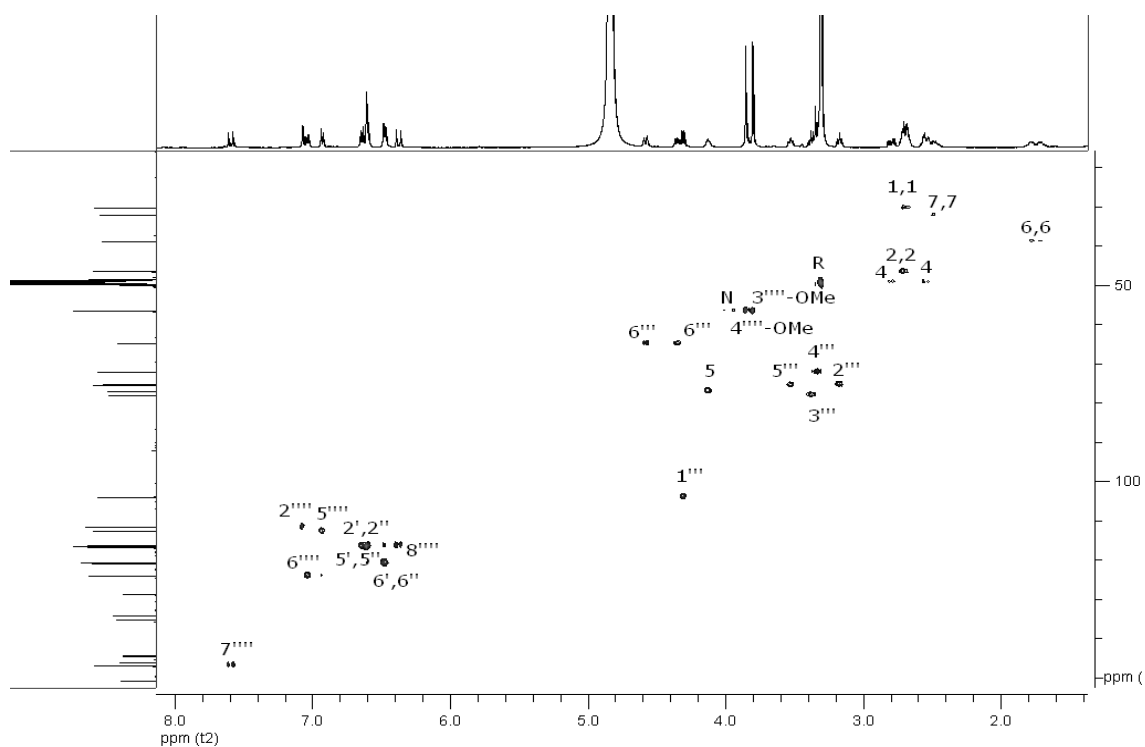
Slika 2.2.107. ^1H NMR spektar jedinjenja 29Slika 2.2.108. Signali alifatičnih protona u ^1H NMR spektru jedinjenja 29



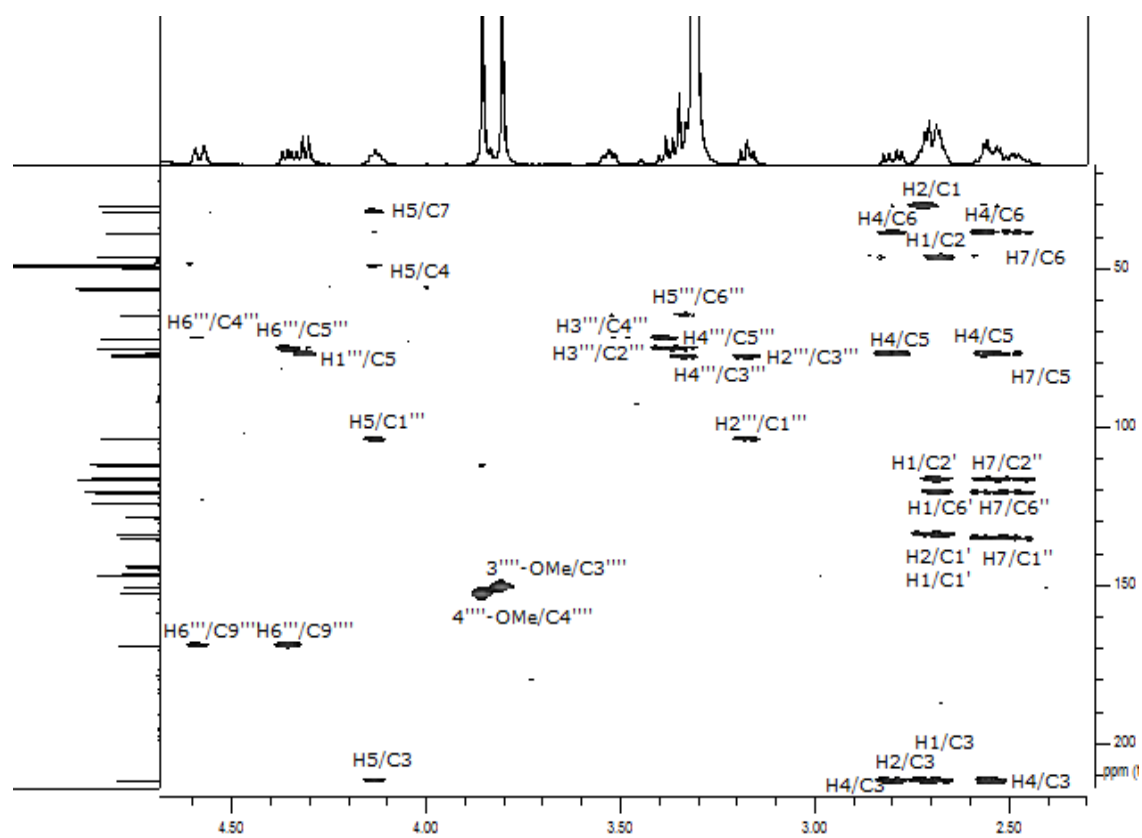
Slika 2.2.109. Signali aromatičnih i olefinskih protona u ^1H NMR spektru jedinjenja **29**



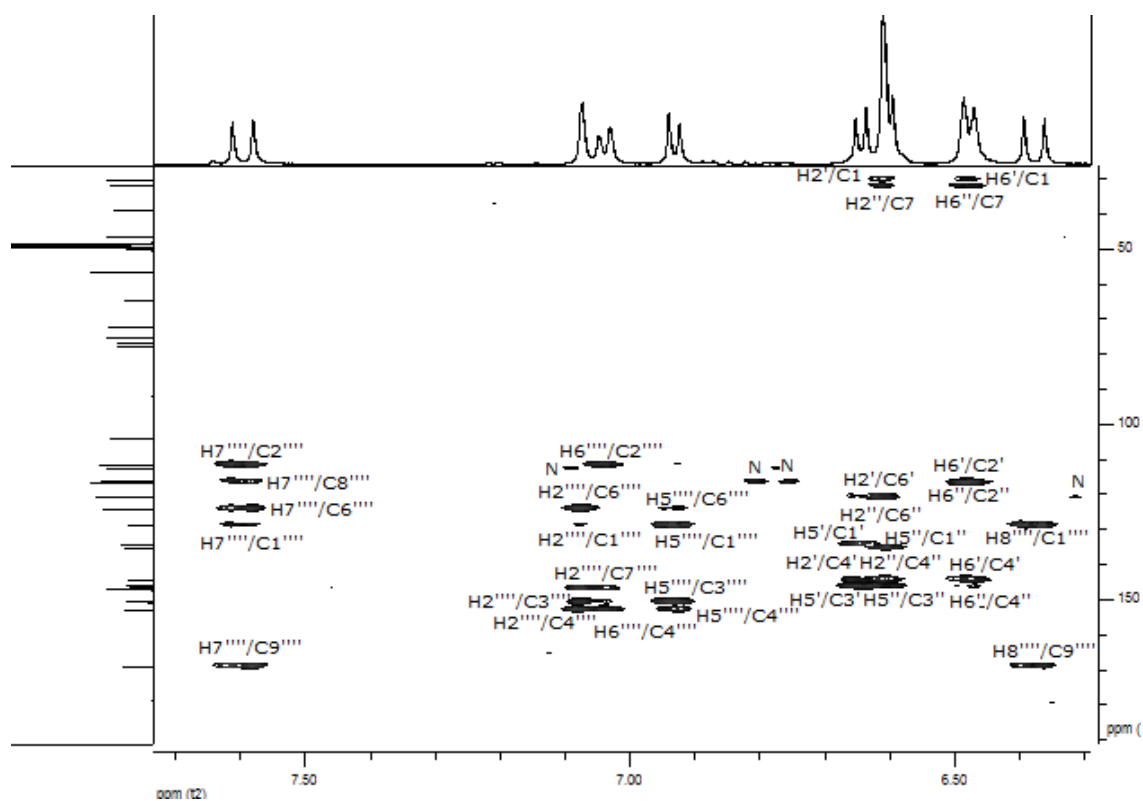
Slika 2.2.110. ^{13}C NMR spektar jedinjenja **29**



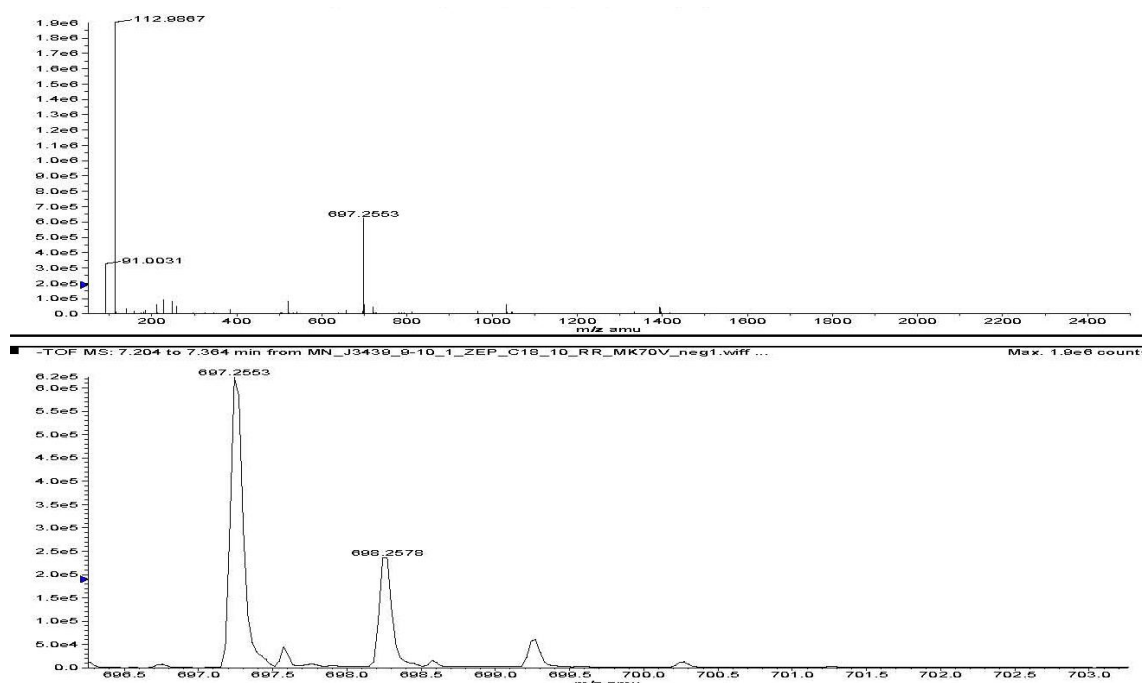
Slika 2.2.111. HSQC spektar jedinjenja 29



Slika 2.2.112. HMBC korelacije alifatičnih protona jedinjenja 29



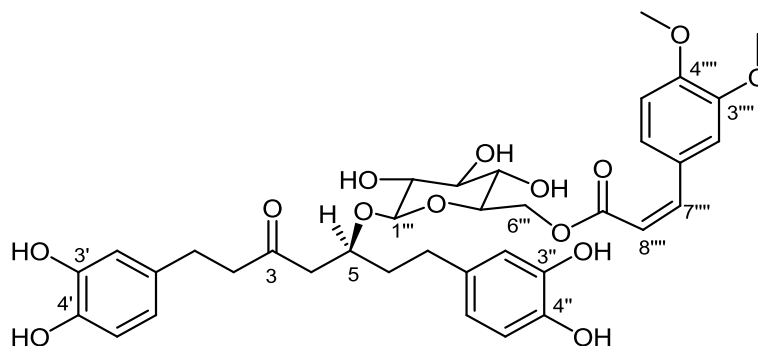
Slika 2.2.113. HMBC korelacije aromatičnih i olefinskih protona jedinjenja 29



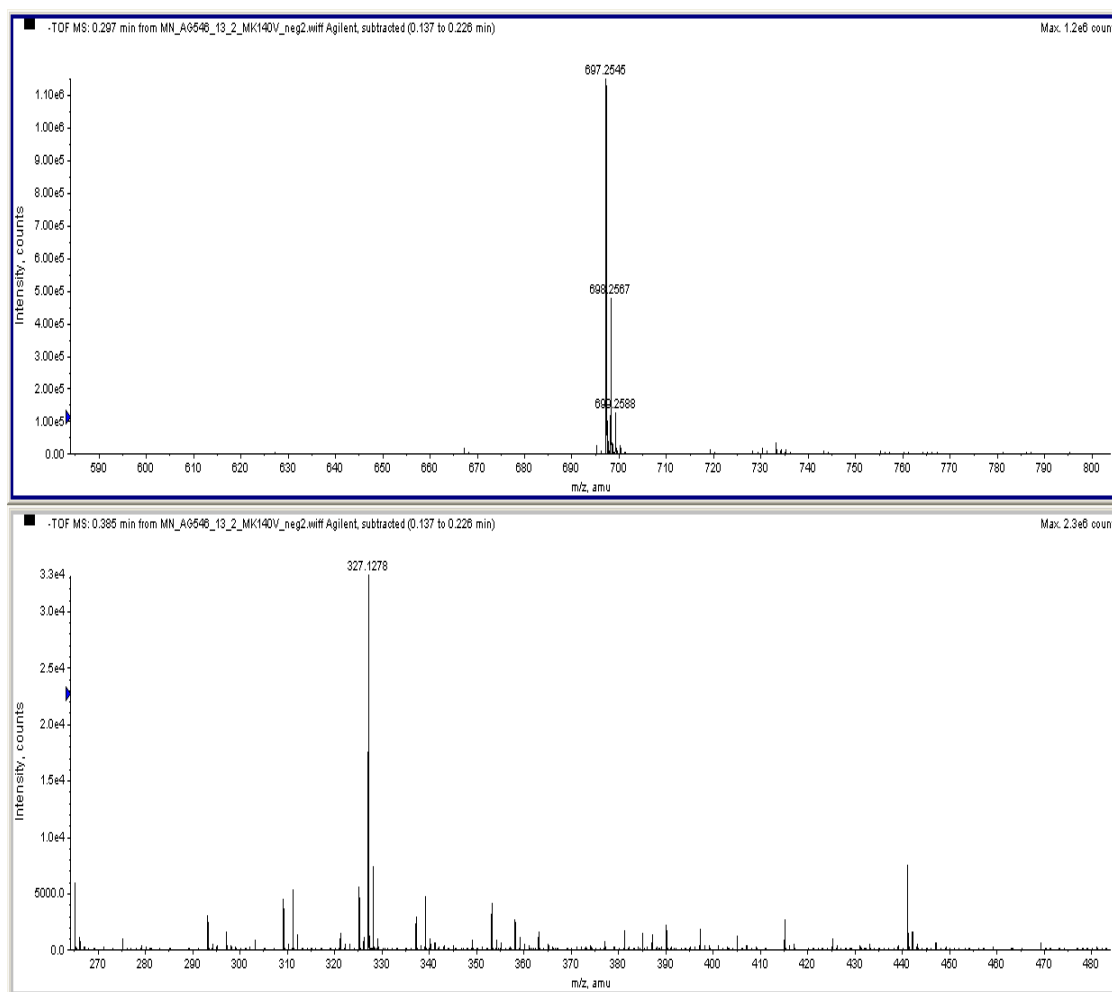
Slika 2.2.114. HR-ESI-MS spektar jedinjenja 29

Jedinjenje **30** (Slika 2.2.115) je izolovano u količini od 3 mg. U HR-ESI-MS spektru ovog jedinjenja (Slika 2.2.116) zapažen je kvazimolekulski jon skoro iste mase kao za jedinjenje **29** što je, zajedno sa blazinom retencionih vremena u HPLC hromatogramu po kom su izolovani, uputilo na izomeriju. ^1H NMR spektar ovog jedinjenja je u heptanoidnom i saharidnom delu (Slika 2.2.116) bio veoma sličan ^1H NMR spektru jedinjenja **29** (Slika 2.2.107). Razlike su uočene u aromatičnom i olefinskom delu: u ^1H NMR spektru jedinjenja **29** (Slika 2.2.109) dubleti na 6,38, 7,07 i 7,60 ppm koji potiču od H-8''', H-2''' i H-7''' redom, se u ^1H NMR spektru jedinjenja **30** nalaze se na 5,77, 7,64 i 6,84 ppm, redom (Slika 2.2.118, Tabela 2.2.8). Objašnjenje za ovako velike razlike u hemijskim pomeranjima leži u činjenici da je konfiguracija na dvostrukoj vezi 3,4-DMC grupe u jedinjenju **30** Z, što potvrđuje i konstanta spreznja ($J_{\text{H-7}'''/\text{H-8}'''}=13,0$ Hz, Slika 2.2.118). Inače prisustvo ove kiseline utvrđeno je na osnovu: 1) iste molekulske formule ovog jedinjenja (tj. kvazimolekulskog jona $[\text{M-H}]^-$ na m/z 697,2545) i njegovog izomera **29**; 2) fragmentacionog jona $[\text{M-GlcDMC}]^-$ na m/z 327,1278 u HR-ESI-MS spektru (Slika 2.2.116); 3) signala za dve metoksi grupe u ^1H NMR spektru (Slika 2.2.116) i 4) HMBC korelacija kao u jedinjenju **29** (Slike 2.2.112, 2.2.113, 2.2.121 i 2.2.122). Pri Z konfiguraciji dvostruke veze Δ^7''' (u jedinjenju **30**), proton H-8''' ima povećanu elektronsku zaštitu usled bolje rezonancije i delokalizacije elektronske gustine u odnosu na H-8''' u jedinjenju **29** pa je njegov signal na nižem hemijskom pomeranju. Proton H-7''' nema smanjenu zaštitu usled anizotropnog efekta karbonilne grupe u položaju C-9''' kao što je to imao H-7''' u jedinjenju **29** te je takođe njegov signal na nižem hemijskom pomeranju. Protoni H-2''' i H-6''' pri Z konfiguraciji dvostruke veze imaju smanjenu zaštitu usled anizotropnog efekta karbonilne grupe i njihovi signali su na većem hemijskom pomeranju nego signali za H-2''' i H-6''' u jedinjenju **29** (E konfiguracija). Ostala strukturalna razmatranja su ista kao za jedinjenje **29** i prikazana su u delu teksta posvećenom ovom jedinjenju. Konfiguracija na C-5 je određena kao S na osnovu CD spektra sličnog CD spektru jedinjenja **29** koji je takođe imao S konfiguraciju na C-5 atomu. S konfiguraciju na C-5 je potvrdilo pravilo ^{13}C glikozidacionog pomeranja, jer je analizom ^{13}C NMR spektara jedinjenja **30** i njegovog aglikona hirsutanonola (**14**) (Slika 2.2.2, Tabele 2.2.1 i 2.2.8) nađeno da je $\Delta\delta_{\text{C}4} > \Delta\delta_{\text{C}6}$ ($2,3 > 1,9$). $[\alpha]_{\text{D}}$ vrednost za ovo jedinjenje iznosi -21,0. Pregledom literature nisu

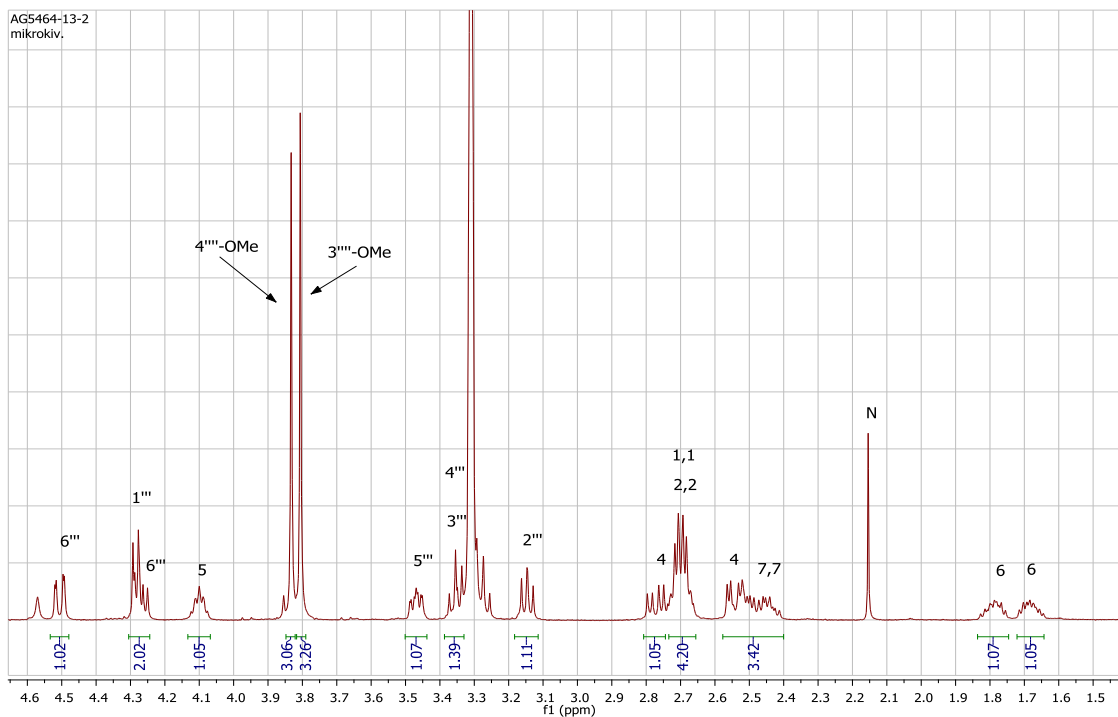
pronađeni podaci o ovom jedinjenju pa je zaključeno da se radi o novom prirodnom proizvodu.



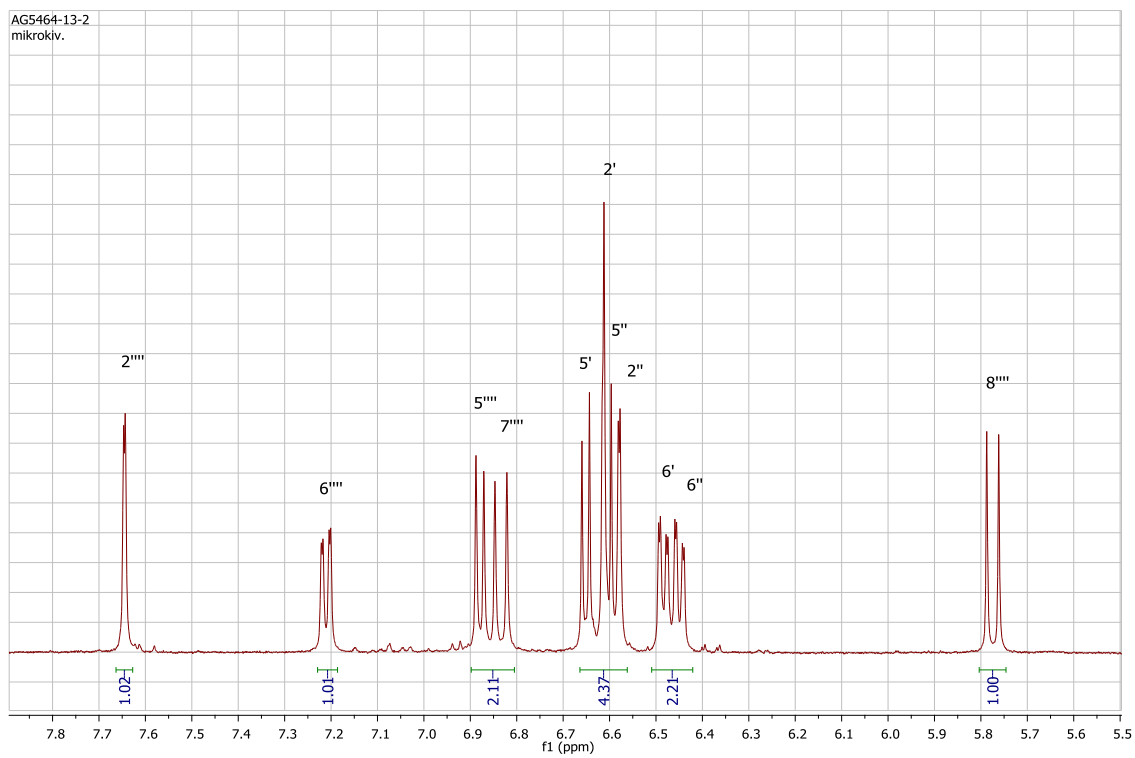
Slika 2.2.115. Strukturna formula jedinjenja 30



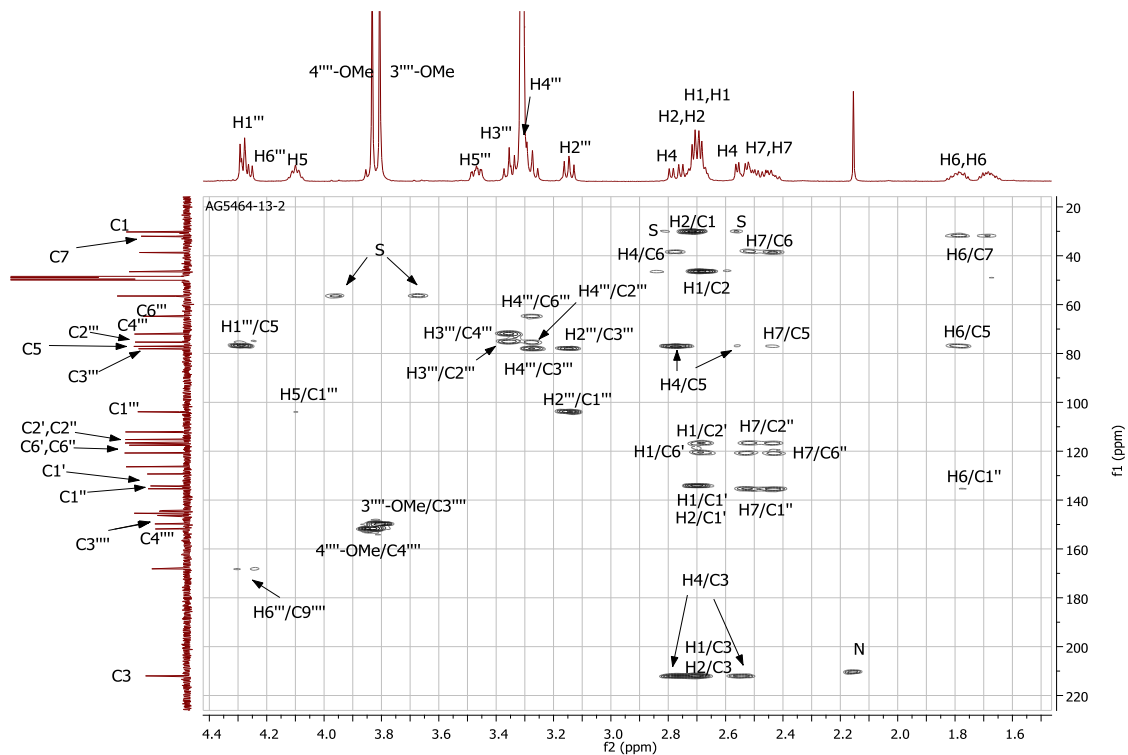
Slika 2.2.116. HR-ESI-MS spektar jedinjenja 30



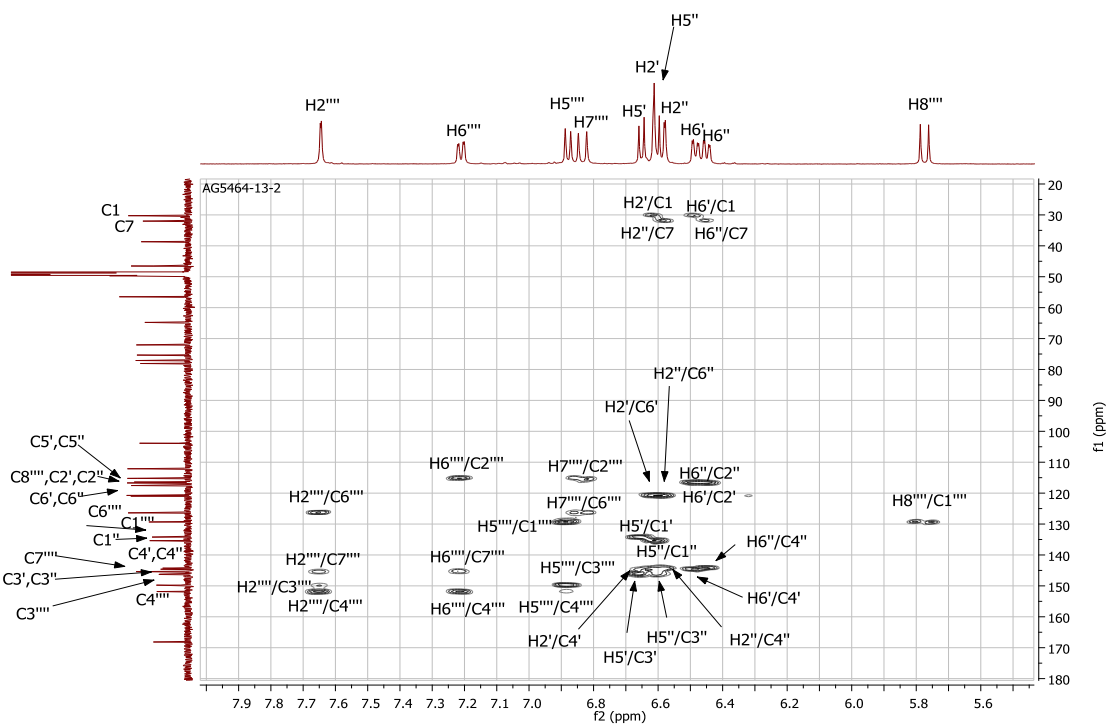
Slika 2.2.117. Signali alifatičnih protona u ¹H NMR spektru jedinjenja 30



Slika 2.2.118. Signali aromatičnih i olefinskih protona u ¹H NMR spektru jedinjenja 30



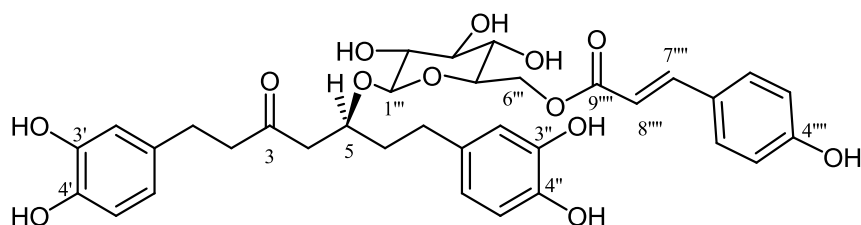
Slika 2.2.121. HMBC korelacije alifatičnih protona jedinjenja 30



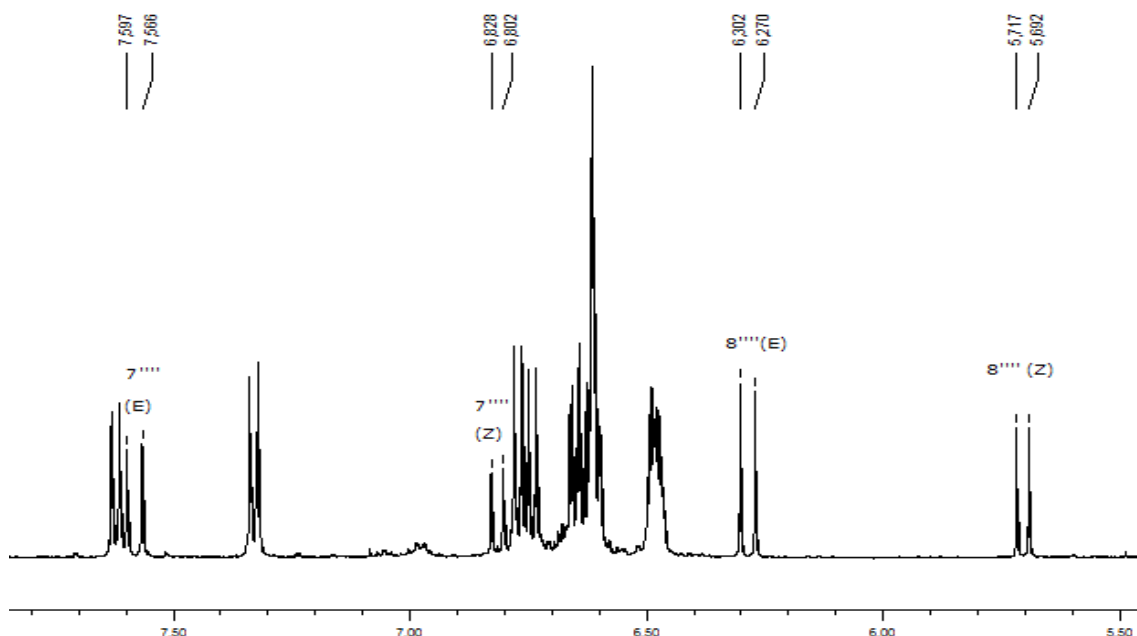
Slika 2.2.122. HMBC korelacije aromatičnih i olefinskih protona jedinjenja 30

Jedinjenje **31** (**Slika 2.2.123**) je izolovano u količini od 3 mg. Slično jedinjenju **29** naknadno je prečišćeno od svog *Z* izomera. Na **Slici 2.2.124** prikazan je deo NMR spektra smeše oba izomera, sa obeleženim olefinskim protonima. Na osnovu analize ^1H i ^{13}C NMR spektara ovog jedinjenja (**Slike 2.2.125** i **2.2.126**) i poređenjem sa NMR spektrima već izolovanih jedinjenja zaključeno je da se radi o složenom diarilheptanoidu sa kateholskim grupama u položajima 1 i 7, keto grupom u položaju 3 i β -D-glukopiranozom u položaju 5 heptanskog niza. Međutim, u aromatičnoj oblasti ^1H NMR spektra, pored karakteristične grupe signala za kateholske grupe (6,4-6,7 ppm) uočeni su i signali AA'BB' spinskog sistema sa dubletima na 6,77, odnosno 7,33 ppm, i konstantom sprezanja od 7,0 Hz. Dubleti na 6,29, odnosno 7,58 ppm, sa konstantom sprezanja od 16,0 Hz uputili su na *E* dvostruku vezu (**Slika 2.2.125**). S obzirom na to da nije bilo NMR signala metoksi grupa pretpostavljeno je da dubleti dvostruke veze i AA'BB' spinski sistem potiču od *p*-kumaroil (*pC*) grupe. Na ovu grupu ukazala je molekulska formula $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{O}_{13}$ izvedena iz HR-ESI-MS spektra (**Slika 2.2.130**), odnosno kvazimolekulski joni $[\text{M}-\text{H}]^-$ na m/z 653,2329 i $[\text{M}+\text{Na}]^+$ na m/z 677,2196, kao i fragmentacioni jon $[\text{M}-\text{Glc}p\text{C}]^+$ na m/z 329,1378. *pC* grupu su potvrdile HMBC korelacije $\text{H}-7''''/\text{C}-2'''',\text{C}-6'''',\text{C}-9''''$, $\text{H}-8''''/\text{C}-2'''',\text{C}-6'''',\text{C}-9''''$, $\text{H}-2''''/\text{C}-4'''',\text{C}-6'''',\text{C}-7''''$ kao i $\text{H}-6''''/\text{C}-2'''',\text{C}-4'''',\text{C}-7''''$ (**Slika 2.2.129**). Konstanta sprezanja od 7,8 Hz za anomerni $\text{H}-1''''$ na 4,31 ppm ukazala je na β -konfiguraciju D-glukoze. U ^1H NMR spektru signal za jedan $\text{H}-6''''$ je preklapljen signalom rastvarača - metanola, ali je u HSQC spektru (**Slika 2.2.127**) uočeno da su signali oba H_2-6'''' pomereni ka višim hemijskim pomeranjima, slično jedinjenju **29**, za 0,5-0,8 ppm, u poređenju sa signalima za H_2-6'''' u ^1H NMR spektru jedinjenja **18** koji ima slobodnu $\text{C}-6''''$ OH grupu (**Slika 2.2.28**). Isto tako je i signal za $\text{H}-5''''$ pomeren za 0,28 ppm ka višim hemijskim pomeranjima u odnosu na signal za $\text{H}-5''''$ u jedinjenju **18** (**Tabele 2.2.2** i **2.2.8**). Ova zapažanja uputila su na estarsku vezu kojom je *pC* grupa vezana za D-glukozu preko $6''''$ -OH grupe, kao kod jedinjenja **29** koje je imalo 3,4-DMC grupu. U ^{13}C NMR spektru jedinjenja **31** signal za $\text{C}-6''''$ je na višem hemijskom pomeranju za 1,9 ppm, a signal za $\text{C}-5''''$ na nižem za 2,5 ppm, u poređenju sa jedinjenjem **18**, što se takođe objašnjava esterifikacijom $6''''$ -OH grupe glukoze⁷¹, kao u slučaju jedinjenja **29** (**Tabele 2.2.2** i **2.2.8**). Ključni dokaz da je *pC* grupa vezana estarskom vezom za $\text{C}-6''''$ je HMBC korelacija $\text{H}-6''''/\text{C}-9''''$ (**Slika 2.2.129**), dok je korelacija $\text{H}-1''''/\text{C}-5$ potvrda da je

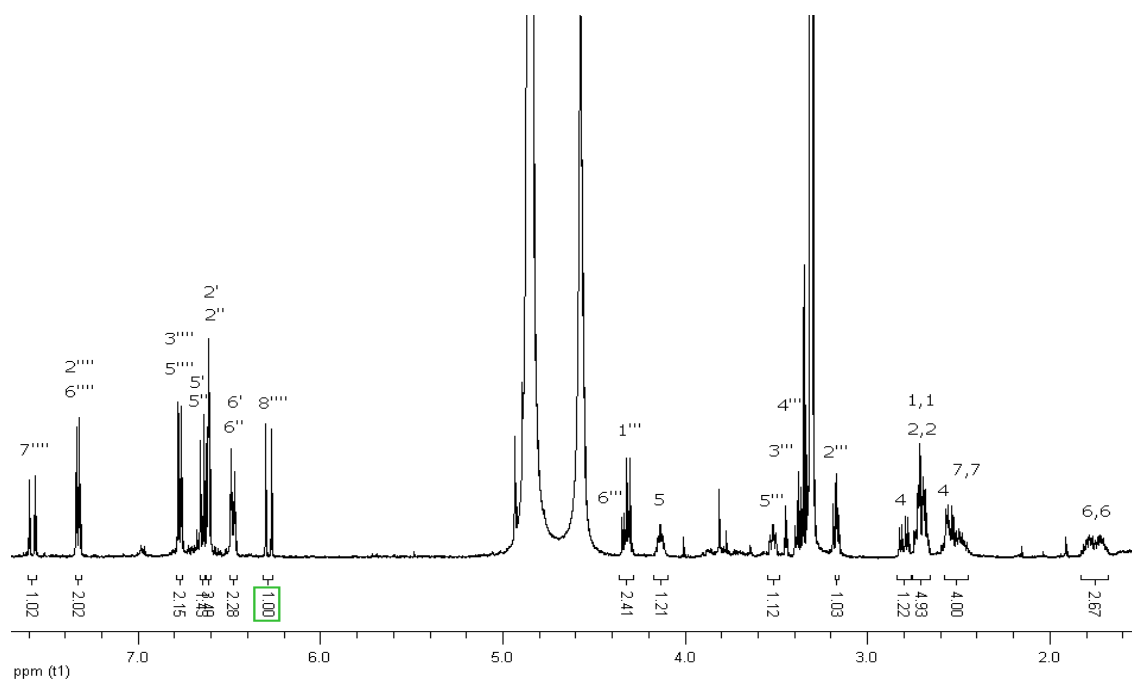
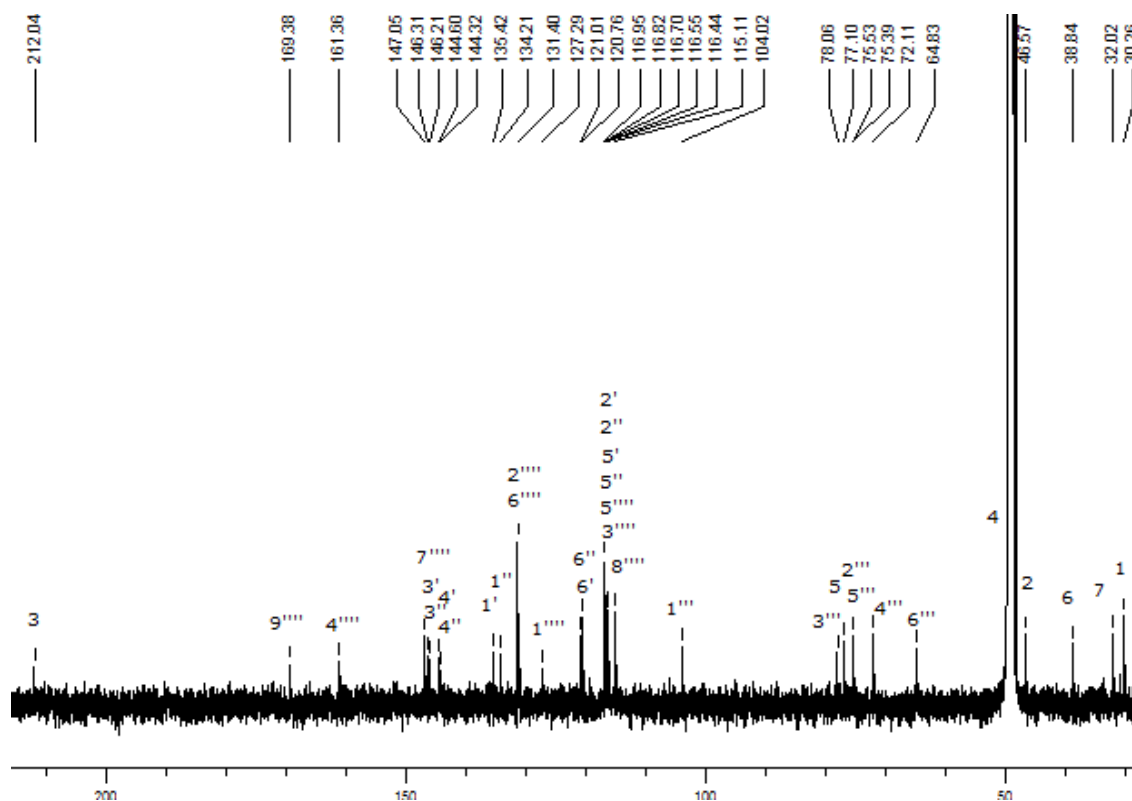
glukozni deo vezan za C-5 preko C-1''' (Slika 2.2.128). Ostale HMBC i HSQC korelacije (Slike 2.2.127-2.2.129) su potvrdile pretpostavljenu strukturu. S konfiguracija na C-5 atomu je ustanovljena na osnovu veoma sličnog CD spektra ovog jedinjenja sa CD spektrom jedinjenja **18** kao i na osnovu pravila ^{13}C glikozidacionog pomeranja, jer je analizom ^{13}C NMR spektara jedinjenja **31** i njegovog aglikona hirsutanonola (**14**) uočeno da je $\Delta\delta_{\text{C}4} > \Delta\delta_{\text{C}6}$ ($2,4 > 1,7$) (Slika 2.2.2, Tabele 2.2.1 i 2.2.8). $[\alpha]_{\text{D}}$ vrednost za jedinjenje **31** iznosi $-7,0$. Pregledom literature nisu pronađeni podaci o ovom jedinjenju pa je zaključeno da se radi o novom prirodnom proizvodu.

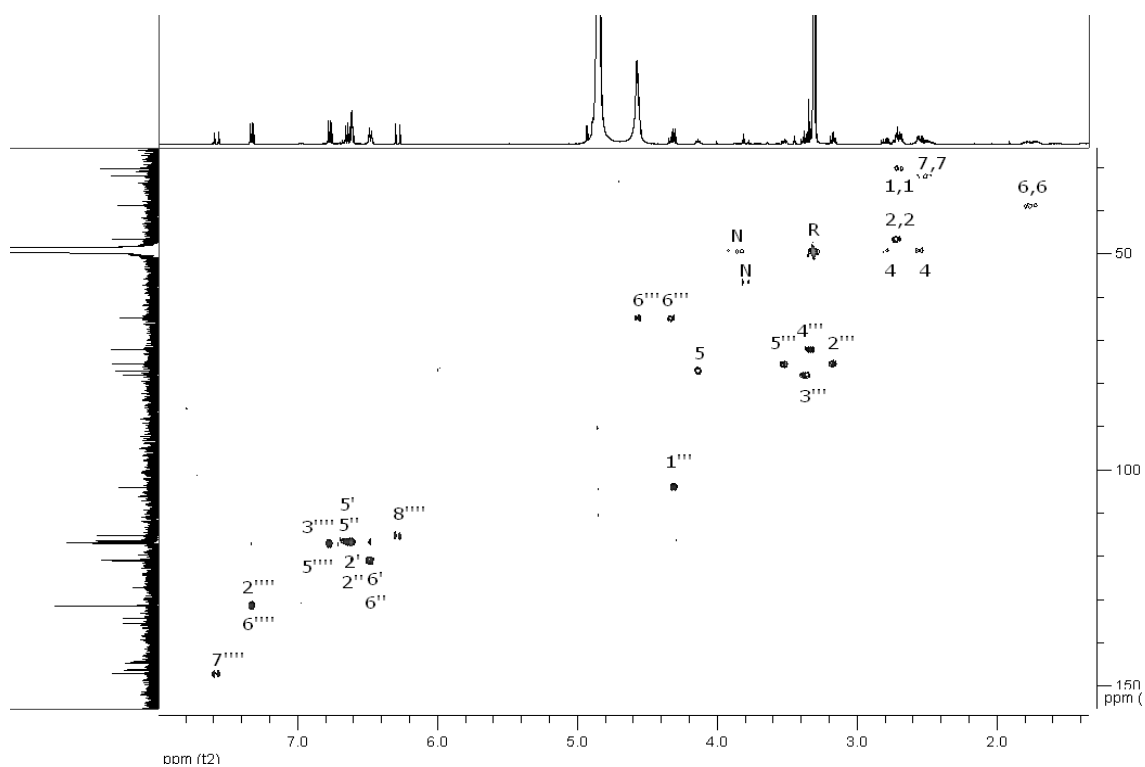


Slika 2.2.123. Strukturna formula jedinjenja **31**

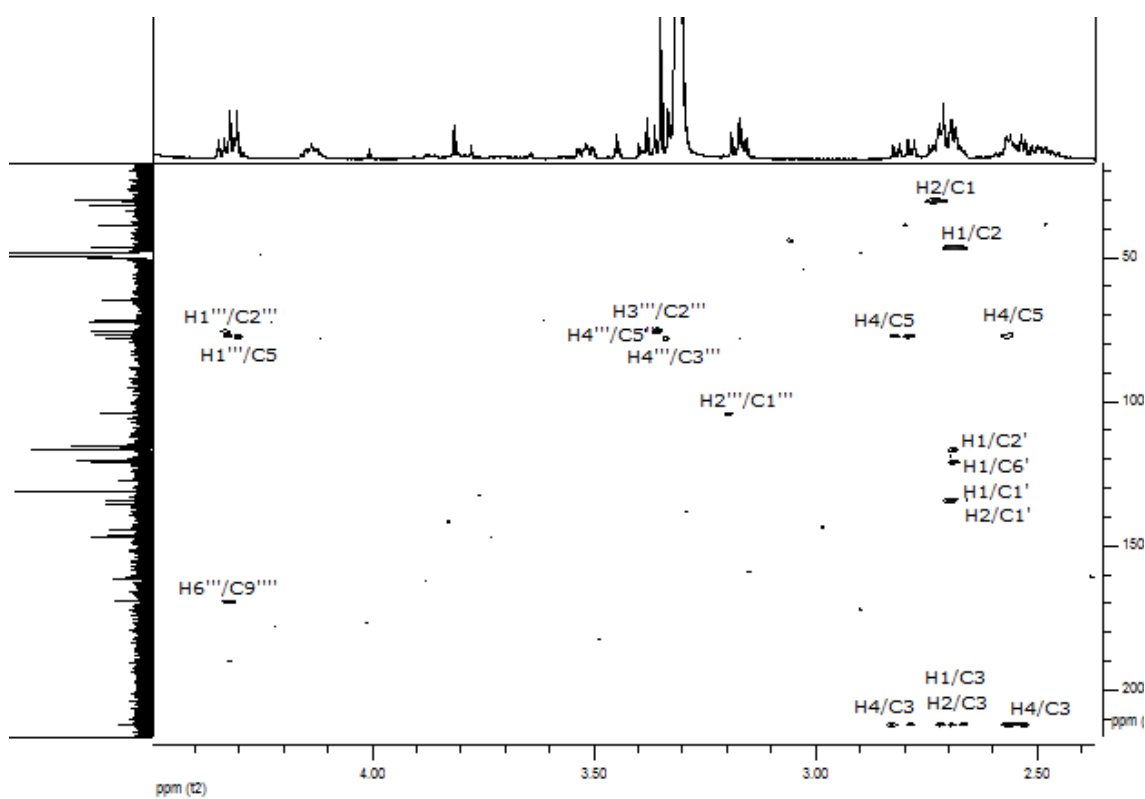


Slika 2.2.124. Deo ^1H NMR spektra smeše jedinjenja **31** i njegovog *Z* izomera sa obeleženim signalima olefinskih protona

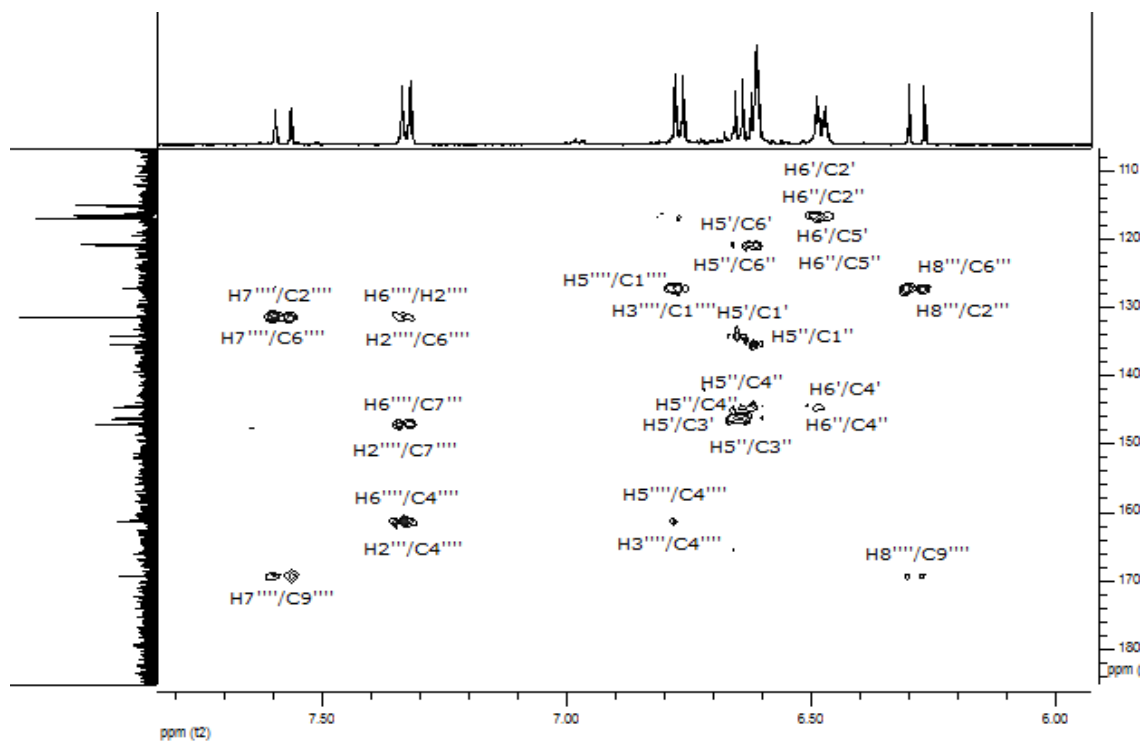
Slika 2.2.125. ^1H NMR spektar jedinjenja 31Slika 2.2.126. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 31



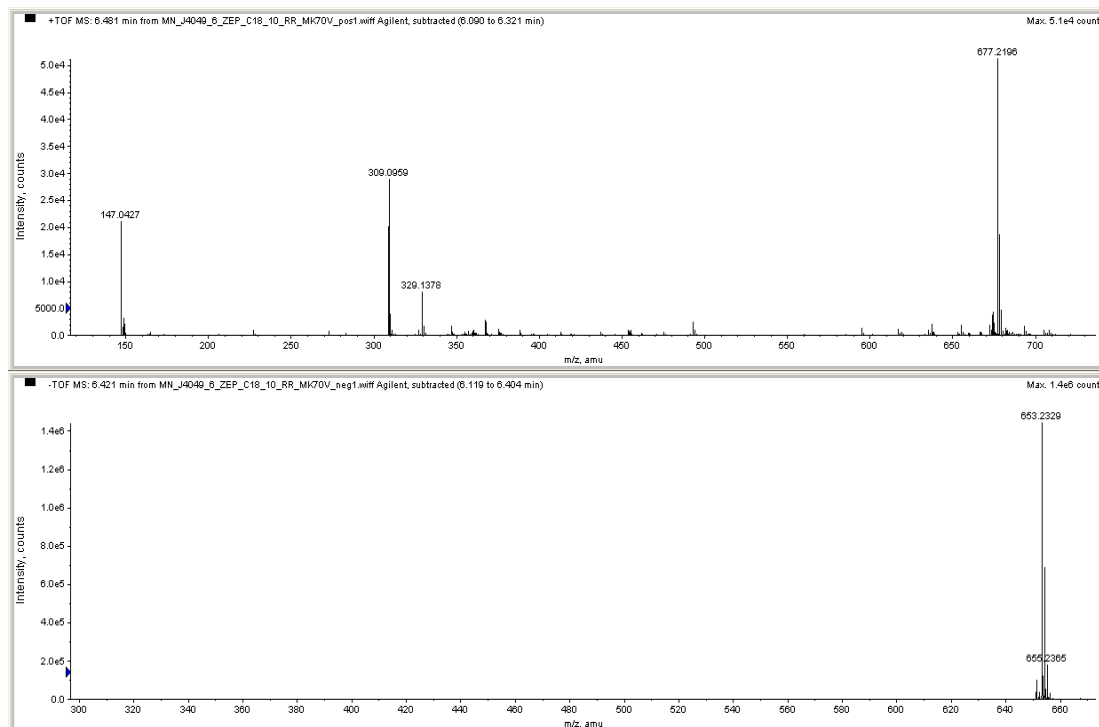
Slika 2.2.127. HSQC spektar jedinjenja 31



Slika 2.2.128. HMBC korelacije alifatičnih protona jedinjenja 31



Slika 2.2.129. HMBC korelacije aromatičnih i olefinskih protona jedinjenja 31



Slika 2.2.130. MS spektar jedinjenja 31 u pozitivnom (gore) i negativnom modu (dole)

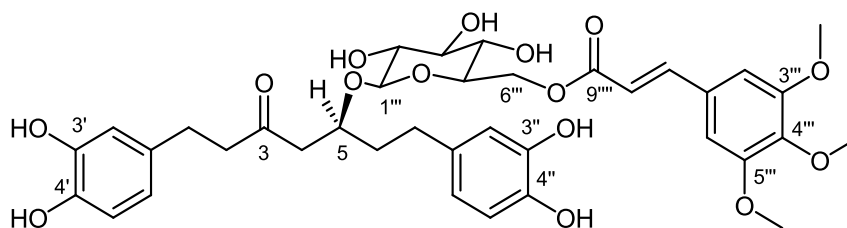
Tabela 2.2.8. ^{13}C i ^1H NMR podaci za jedinjenja **29**, **30** i **31**(CD_3OD)

C/H	29		30		31	
	δ_{C} , tip	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C} , tip	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C} , tip	δ_{H} (J u Hz)
1	30,2; CH_2	2,68 A_2B_2	30,3; CH_2	2,69 A_2B_2	30,3; CH_2	2,69 m
2	46,6; CH_2	2,71 A_2B_2	46,5; CH_2	2,71 A_2B_2	46,6; CH_2	2,72 m
3	212,0; C	-	212,0; C	-	212,0; C	-
4	48,7; CH_2^{a}	2,54 dd (17,0; 5,0) 2,80 dd (17,0; 7,0)	49,0; CH_2^{c}	2,54 dd (16,6; 5,0) 2,77 dd (16,6; 7,2)	49,0; CH_2^{a}	2,56 dd (16,7; 5,0) 2,80 dd (16,7; 7,2)
5	77,0; CH	4,13 m	77,1; CH	4,10 m	77,1; CH	4,14 m
6	38,8; CH_2	1,72 m; 1,78 m	38,7; CH_2	1,68 m; 1,79 m	38,8; CH_2	1,72 m; 1,79 m
7	32,0; CH_2	2,49 m	32,0; CH_2	2,47 m	32,0; CH_2	2,50 m^{c}
1'	134,2; C	-	134,2; C	-	135,4; C	-
2'	116,8; CH^{b}	6,61 d (2,0)	116,7; CH^{a}	6,61 d (1,9)	116,7; CH^{b}	6,61 d (2,0)
3'	146,2; C	-	146,3; C	-	146,3; C	-
4'	144,6; C	-	144,6; C	-	144,6; C	-
5'	116,8; CH^{b}	6,64 d (8,0)	116,7; CH^{a}	6,65 d (8,0)	116,8; CH^{b}	6,65 d (8,0)
6'	120,7; CH	6,48 dd (8,0; 2,0)	120,7; CH	6,48 dd (8,0; 1,9)	121,0; CH	6,48 dd (8,0; 2,0)
1''	135,4; C	-	135,5; C	-	134,2; C	-
2''	116,4; CH^{b}	6,59 d (2,0)	116,4; CH^{a}	6,58 d (1,9)	116,4; CH^{b}	6,61 d (2,0)
3''	146,2; C	-	146,2; C	-	146,2; CH	-
4''	144,3; C	-	144,3; C	-	144,3; C	-
5''	116,4; CH^{b}	6,64 d (8,0)	116,5; CH^{a}	6,60 d (8,0)	116,6; CH^{b}	6,62 d (8,0)
6''	121,0; CH	6,48 dd (8,0; 2,0)	121,0; CH	6,45 dd (8,0; 1,9)	120,8; CH	6,48 dd (8,0; 2,0)
	Glcp		Glcp		Glcp	
1'''	104,0; CH	4,31 d (8,0)	103,9; CH	4,28 d (7,8)	104,0; CH	4,31 d (7,8)
2'''	75,4; CH	3,17 t (8,0)	75,3; CH	3,15 dd (9,0; 7,8)	75,4; CH	3,17 dd (8,9; 7,8)
3'''	78,0; CH	3,38 m	78,1; CH	3,35 t (9,0)	78,1; CH	3,38 t (8,9)
4'''	72,1; CH	3,36 m	72,1; CH	3,27 t (9,2)	72,1; CH	3,33 m
5'''	75,5; CH	3,53 t (8,0)	75,4; CH	3,47 m	75,5; CH	3,52 m
6'''	64,9; CH_2	4,35 dd (12,0; 6,5) 4,58 dd (12,0; 2,0)	64,8; CH_2	4,27 dd (11,9; 6,5) 4,51 dd (11,9; 2,0)	64,8; CH_2	4,33 dd (11,9; 6,4) 4,57 dd (11,9; 2,2) ^a
	E-3,4-DMC		Z-3,4-DMC		pC	
1''''	128,9; C	-	129,3; C	-	127,3; C	-
2''''	111,6; CH	7,07 d (2,0)	115,2; CH	7,65 d (1,8)	131,4; CH	7,33 d (8,5)
3''''	150,8; C	-	149,8; C	-	116,9; CH	6,77 d (8,5)
4''''	152,9; C	-	151,8; C	-	161,4; C	-
5''''	112,8; CH	6,93 d (8,5)	112,1; CH	6,88 d (8,4)	116,9; CH	6,77 d (8,5)
6''''	124,2; CH	7,04 dd (8,5; 2,0)	126,4; CH	7,21 dd (8,4; 1,8)	131,4; CH	7,33 d (8,5)
7''''	146,9; CH	7,60 d (16,0)	145,4; CH	6,83 d (12,9)	147,0; CH	7,58 d (16,0)
8''''	116,5; C^{b}	6,38 d (16,0)	117,6; CH	5,77 d (12,9)	115,1; CH	6,28 d (16,0)
9''''	169,1; C	-	168,1; C	-	169,4; C	-
3''''- OMe	56,6; CH_3	3,80 s	56,6; CH_3	3,81 s	-	-
4''''- OMe	56,6; CH_3	3,85 s	56,5; CH_3	3,83 s	-	-

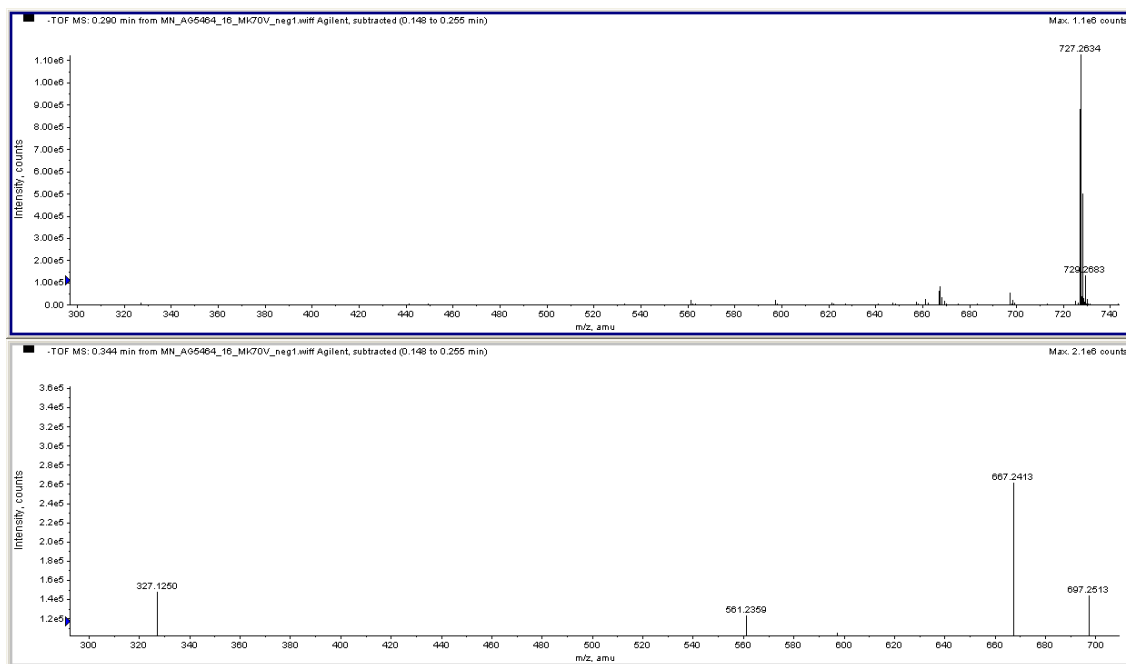
Glcp – glukopiranozil grupa; E-3,4-DMC – E-3,4-dimetoksicinamoil grupa; Z-3,4-DMC – Z-3,4-dimetoksicinamoil grupa; pC – para kumaroil grupa;
^a signali preklapljeni signalom rastvarača – vrednosti dobijene iz HSQC spektra; ^b signali mogu biti međusobno zamenjeni; ^c signal preklapljen signalom jednog od protona H-4

Jedinjenje **32** (**Slika 2.2.131**) je izolovano u količini od 4 mg. Na osnovu NMR spektara i NMR podataka već izolovanih složenih diarilheptanoida **29**, **30** i **31** utvrđeno je da je reč o složenom diarilheptanoidu sa monosaharidom i cinamičnom kiselinom. U HR-ESI-MS spektru (**Slika 2.2.132**) uočen je kvazimolekulski jon $[M-H]^-$ na m/z 727,2634 koji odgovara molekulskoj formuli $C_{37}H_{44}O_{15}$, što je za 30 masenih jedinica više od mase odgovarajućih kvazimolekulskih jona jedinjenja **29** i **30**. Ova razlika je uputila na postojanje jedne metoksi grupe više u odnosu na jedinjenja **29** i **30**. U prilog tome išla je i činjenica da je u 1H NMR spektru (**Slika 2.2.133**) na osnovu integrala pretpostavljeno postojanje tri metoksi grupe, jedne na 3,77 i dve na 3,81 ppm. U ^{13}C NMR spektru (**Slika 2.2.134**) uočen je signal na 61,3 ppm kojeg nije bilo u ^{13}C NMR spektrima jedinjenja **29** i **30**, i signal skoro duplo većeg intenziteta na 56,9 ppm. Ovo je uputilo na tri metoksi grupe simetrično raspoređene u molekulu. Pored dve grupe signala karakteristične za kateholske grupe u aromatičnoj oblasti 1H NMR spektra jedinjenja **32** uočena su dva dubleta istog spinskog sistema na 6,46 i 7,59 ppm, redom, sa konstantom sprezanja od 16,0 Hz i singlet od dva protona na 6,79 ppm (**Slika 2.2.133**). Za dublete je pretpostavljeno da potiču od protona E dvostruke veze cinamične kiseline kao kod jedinjenja **29** i **31**, dok je za singlet smatrano da potiče od $H-2''''$ i $H-6''''$ protona simetrične 3,4,5-trimetoksicinamoil (3,4,5-TMC) grupe na koju su ranije uputile tri metoksi grupe simetrično raspoređene. U HSQC spektru (**Slika 2.2.135**) zapažena je korelacija tog singleta koji potiče od $H-2''''$ i $H-6''''$ sa signalom na 106,8 ppm iz ^{13}C NMR spektra. HMBC korelacije ovih protona ($H-2''''/C-3''''$, $C-4''''$, $H-6''''/C-4''''$, $C-5''''$) sa istim C-atomima sa kojima su pokazale korelacije i metoksi grupe ($3''''-OMe/C-3''''$, $4''''-OMe/C-4''''$, $5''''-OMe/C-5''''$; **Slike 2.2.137** i **2.2.138**) potvrdile su 3,4,5-TMC grupu vezanu za D-glukozu (**Slika 2.2.131**). Korelacije $H-7''''/C-2''''$, $C-8''''$, $C-9''''$, $H-8''''/C-1''''$, $C-7''''$, $C-9''''$ (**Slika 2.2.138**) su dodatni dokaz za ovu grupu. Estarsku vezu ove grupe za $C-6''''$ D-glukoze potvrđuju pomeranja za H_2-6'''' i HMBC korelacija $H-6''''/C-9''''$ (**Slika 2.2.137**), kao što je to bio slučaj sa složenim diarilheptanoidima **29**, **30** i **31** u okviru čijih tumačenja struktura su sva objašnjenja već data. D-Glukopiranoza je prepoznata na osnovu NMR signala jedinjenja **29**, **30** i **31**. Konstanta sprezanja od 7,8 Hz za anomerni $H-1''''$ na 4,30 ppm ukazala je na β -konfiguraciju D-glukopiranoze. Dokaz da je β -D-glukopiranoza vezana za C-5 preko C-1'''' je HMBC korelacija $H-1''''/C-5$ (**Slika 2.2.137**). Kako su heptanoidna i saharidna

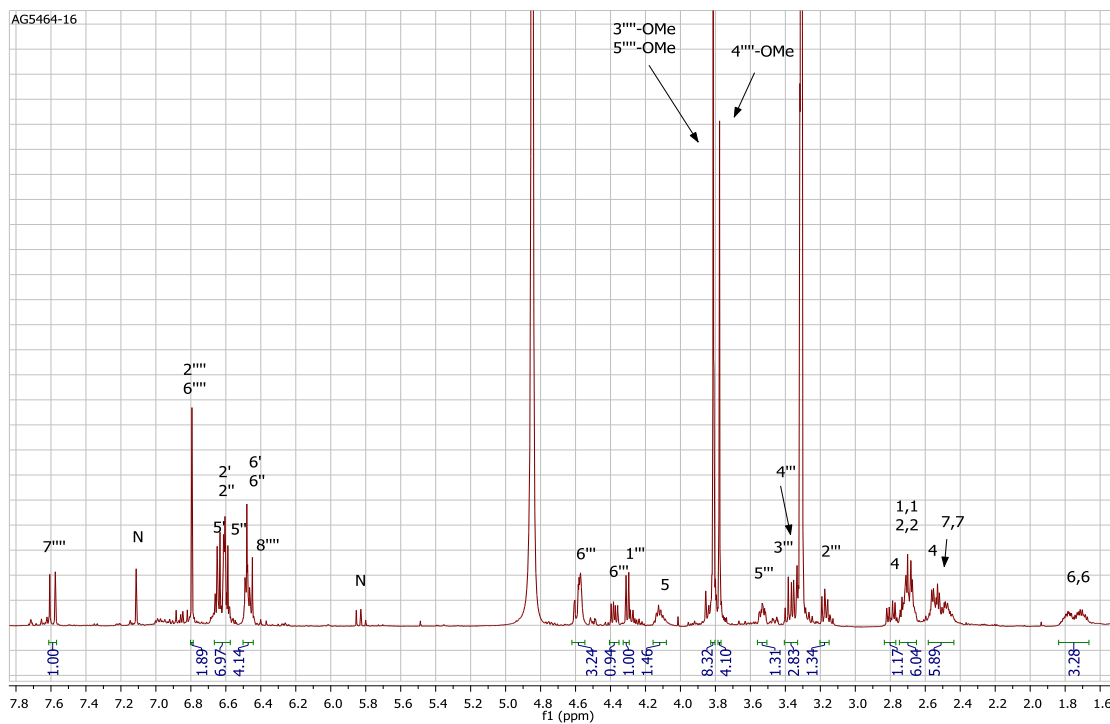
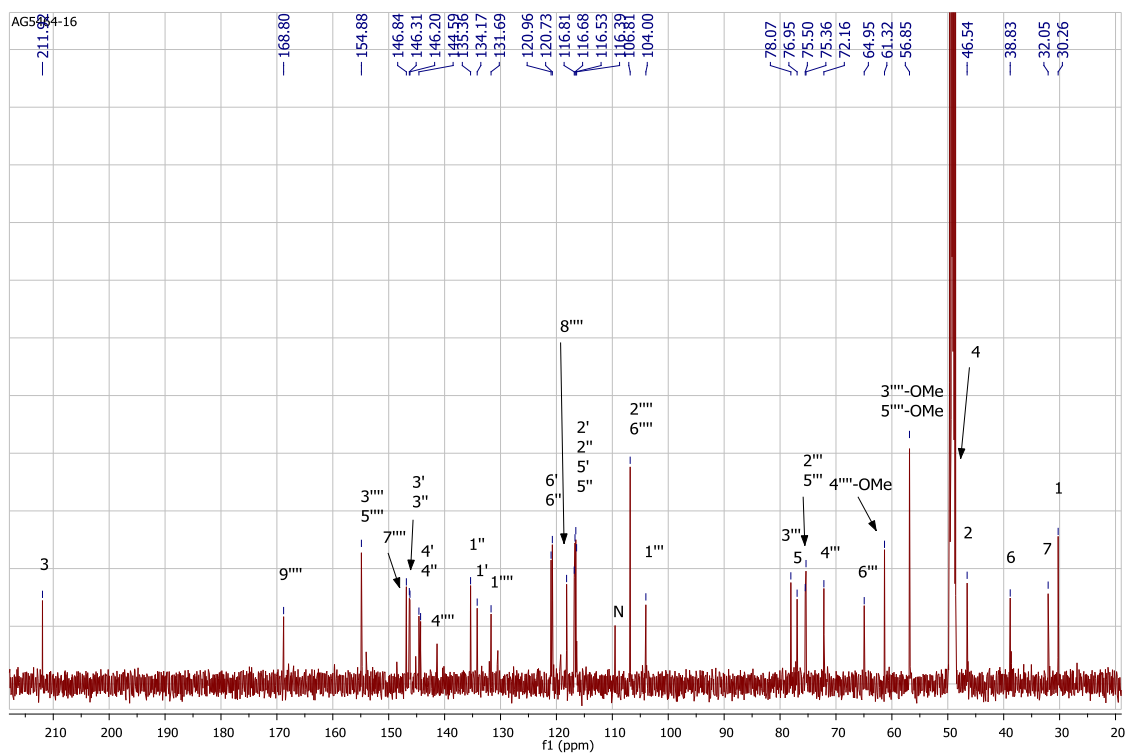
oblast ^1H NMR spektra jedinjenja **32** bile skoro identične onima za jedinjenja **29** i **30**, došlo se do konačne strukture date na **Slici 2.2.131**. S konfiguracija na C-5 je određena na osnovu CD spektra sličnog CD spektrima ostalih jedinjenja slične strukture koji su svi imali *S* konfiguracije na C-5 atomima (ako su imali keto grupu na C-3) i pravila ^{13}C glikozidacionog pomeranja, jer je analizom ^{13}C NMR spektara jedinjenja **32** i njegovog aglikona hirsutanonola (**14**) (**Slika 2.2.2**, **Tabele 2.2.1** i **2.2.9**) nađeno da je $\Delta\delta_{\text{C}4} > \Delta\delta_{\text{C}6}$ ($2,2 > 1,8$). $[\alpha]_{\text{D}}$ vrednost za jedinjenje **32** iznosi $-10,0$. Pregledom literature nisu pronađeni podaci o ovom jedinjenju pa je zaključeno da se radi o novom prirodnom proizvodu.

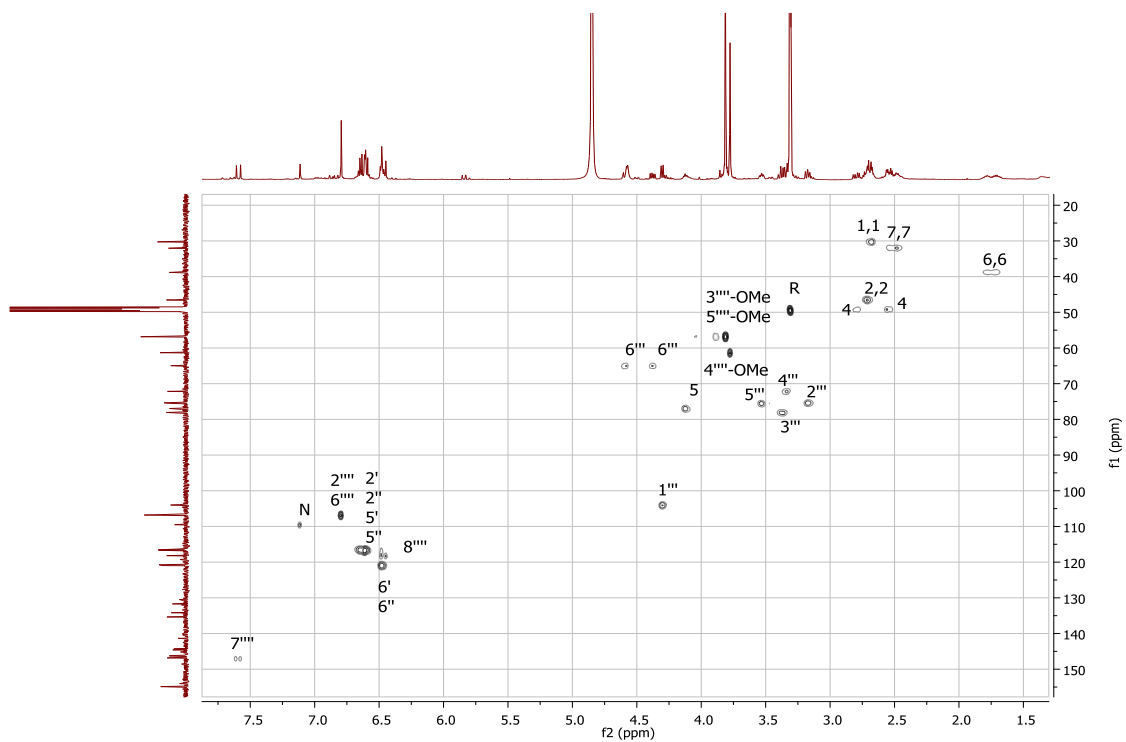


Slika 2.2.131. Strukturna formula jedinjenja **32**

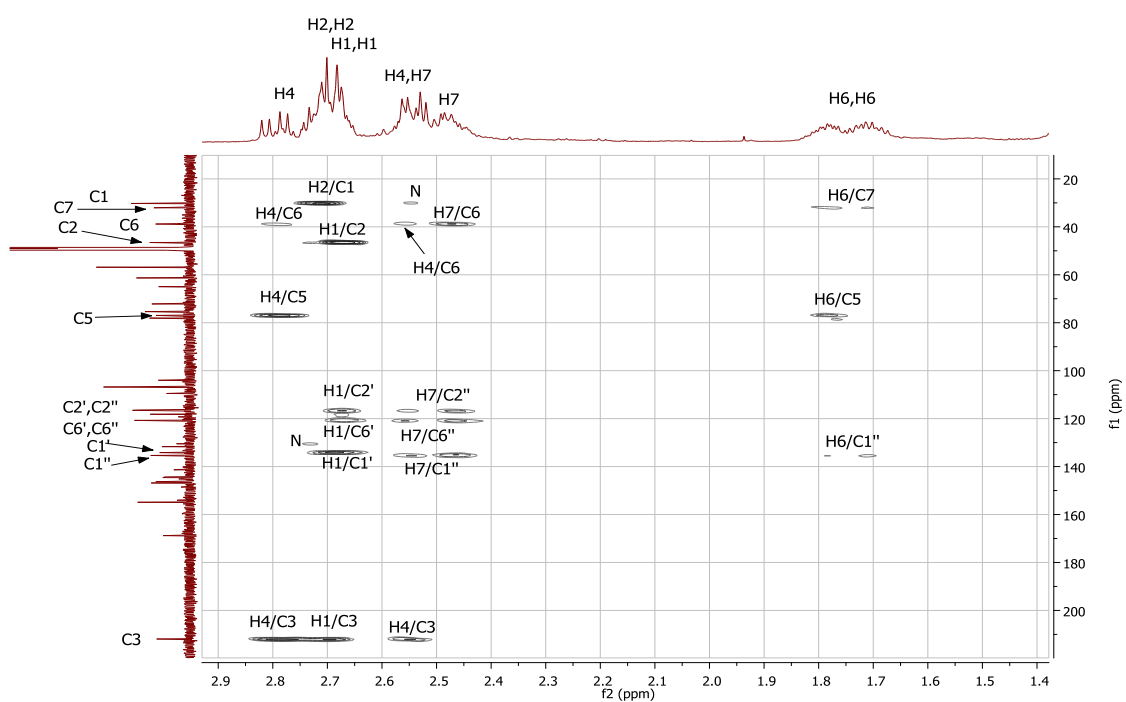


Slika 2.2.132. HR-ESI-MS spektar jedinjenja **32** snimljen u negativnom modu

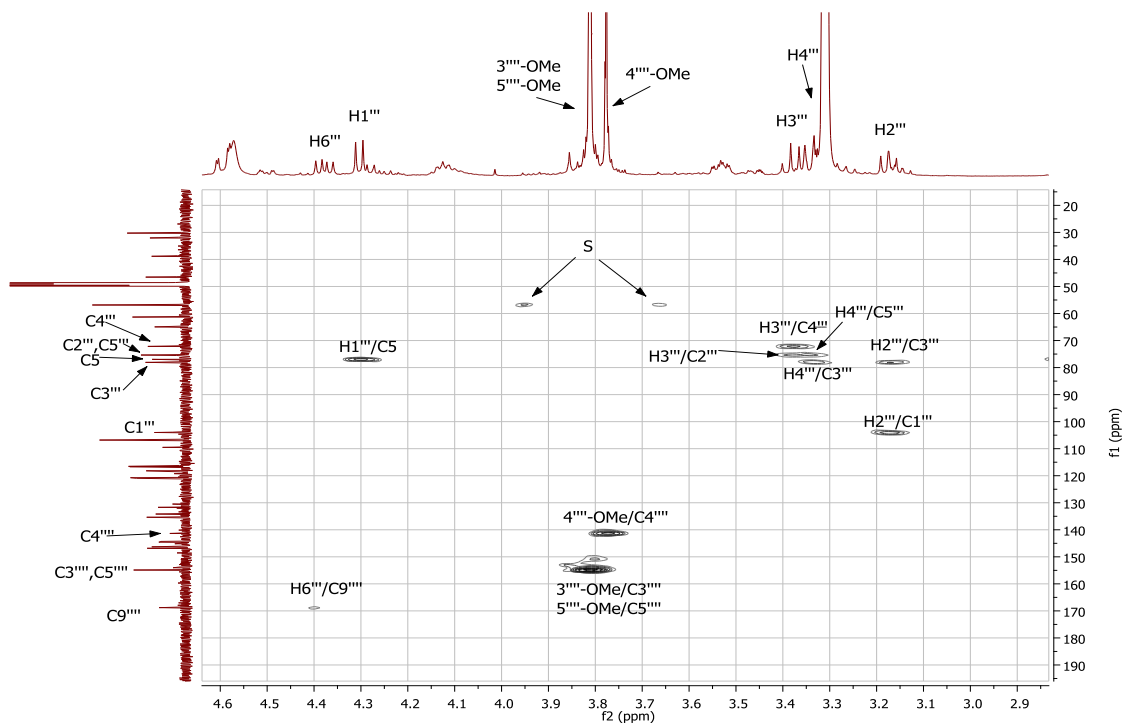
Slika 2.2.133. ^1H NMR spektar jedinjenja 32Slika 2.2.134. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 32



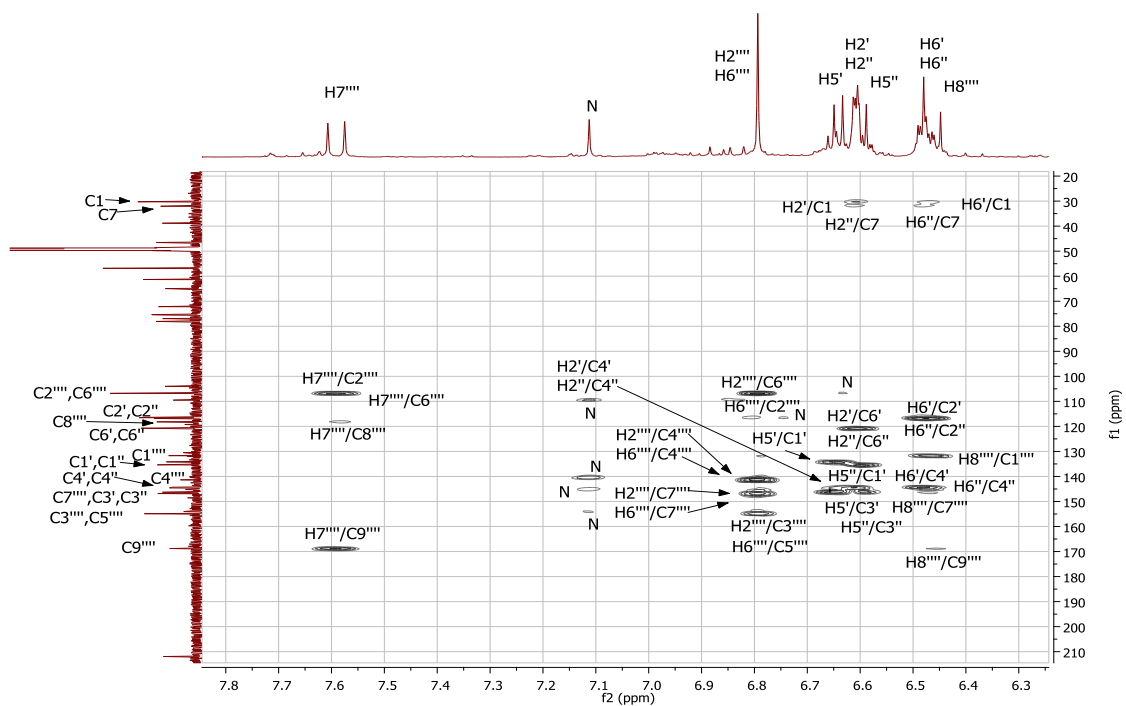
Slika 2.2.135. HSQC spektar jedinjenja 32



Slika 2.2.136. HMBC korelacije heptanoidnih protona (bez H-5) jedinjenja 32

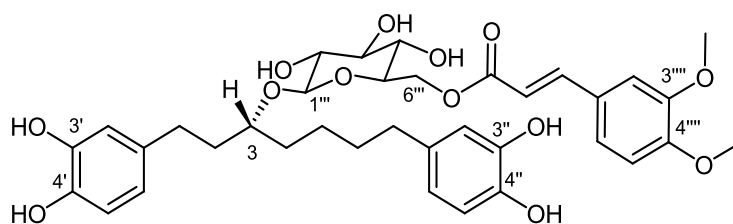


Slika 2.2.137. HMBC korelacije saharidnih i protona metoksi grupa jedinjenja 32

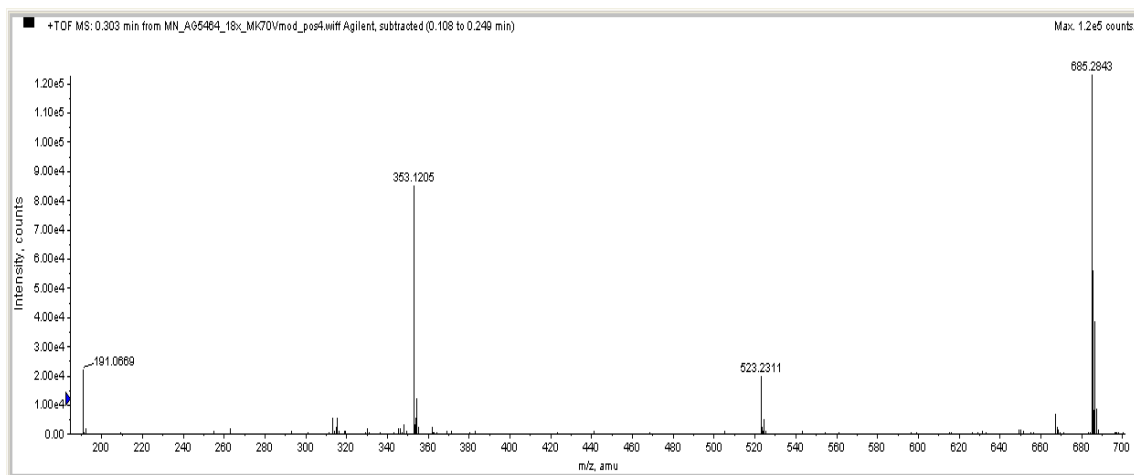


Slika 2.2.138. HMBC korelacije aromatičnih i olefinskih protona jedinjenja 32

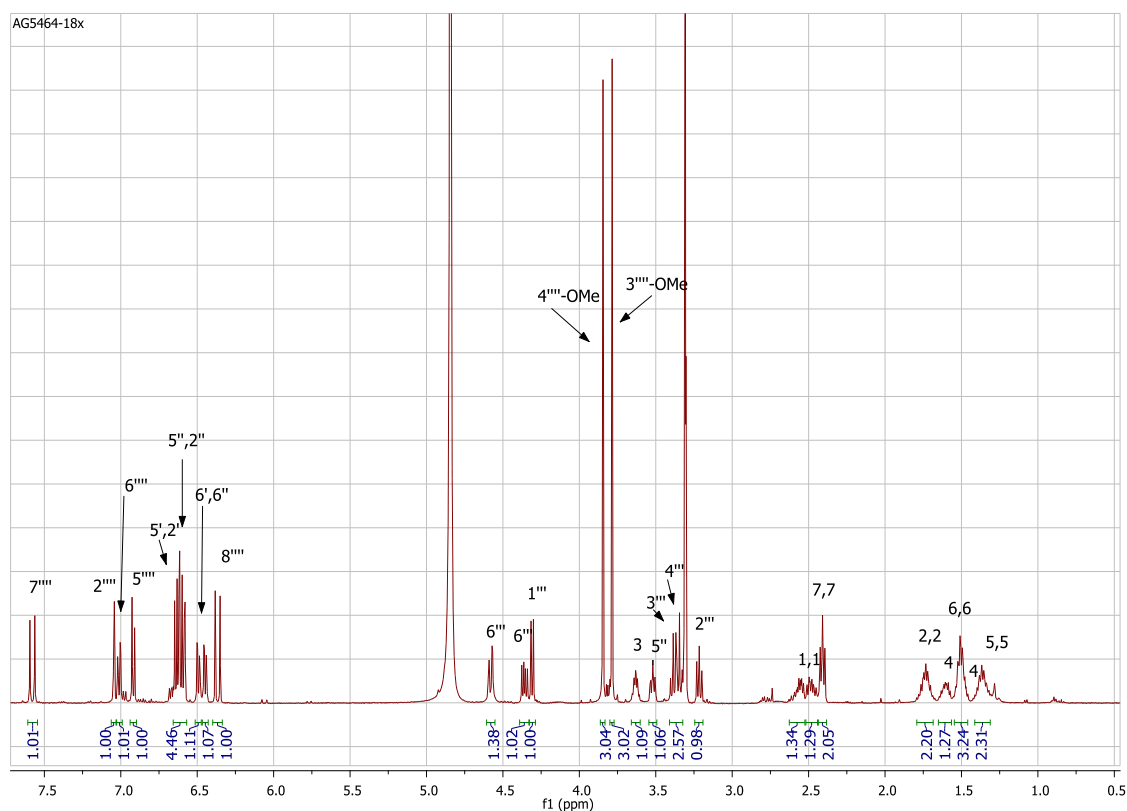
Jedinjenje **33** (Slika 2.2.139) je izolovano u količini od 5 mg. U HR-ESI-MS spektru ovog jedinjenja (Slika 2.2.140) kvazimolekulski jon $[M+H]^+$ na m/z 685,2843 odgovara molekulskoj formuli $C_{36}H_{44}O_{13}$, što je za 14 masenih jedinica manje od molekulske mase jedinjenja **29**. Ova razlika u masama (-O+2H), izostanak signala na preko 210 ppm u ^{13}C NMR spektru (Slika 2.2.142) i veoma sličan aromatični i olefinski deo 1H NMR spektra (Slika 2.2.141) spektru jedinjenja **29** (Slika 2.2.108) uputili su na strukturu (Slika 2.2.135) koja se od jedinjenja **29** (Slika 2.2.105) razlikuje samo po odsustvu keto grupe. Fragmentacioni joni $[DMC]^+$ na m/z 191,0669 i $[GlcDMC]^+$ na m/z 353,1205 (Slika 2.2.140) su potvrdili prisustvo DMC grupe čije se metoksi grupe nalaze u položajima 3 i 4 kao i kod jedinjenja **29**, što su potvrdile HMBC korelacije $3'''-OMe, H-5'''/C-3'''$, $4'''-OMe, H-2'''$, $H-6'''/C-4'''$ (Slike 2.2.144 i 2.2.145). Za konfiguraciju dvostruke veze je utvrđeno da je *E* iz konstante sprežanja $J_{H-7'''/H-8'''}$ od 16,0 Hz. HMBC korelacija $H-3/C-1'''$ je potvrda da je D-glukoza svojom C-1'''-OH vezana za C-3 osnovnog skeleta, a korelacije $H_2-6'''/C-9'''$ da je 3,4-DMC kiselina vezana za C-6''' estarskom vezom (Slika 2.2.144), na šta su ukazale visoke vrednosti za hemijska pomeranja H_2-6''' ($> 4,3$ ppm) u 1H NMR spektru (Slika 2.2.141) kao i kod drugih složenih diarilheptanoida. Na osnovu svega navedenog zaključeno je da je jedinjenje **33** derivat rubranozida A (**22**) (Slika 2.2.54) sa *E*-3,4-DMC kiselinom estarski vezanom za C-6''' D-glukoze. Konfiguracija na C-3 je određena kao *R* na osnovu CD spektra sličnog CD spektru rubranola (**20**) kao i na osnovu ^{13}C glikozidacionog pravila; analizom ^{13}C NMR spektara jedinjenja **33** i njegovog aglikona rubranola (**20**) (Slika 2.2.40, Tabele 2.2.3 i 2.2.9) uočeno je da je $\Delta\delta_{C4} > \Delta\delta_{C2}$ ($2,9 > 2,3$ ppm). $[\alpha]_D$ vrednost za jedinjenje **33** iznosi -11,0. Pregledom literature nisu pronađeni podaci o ovom jedinjenju pa je zaključeno da se radi o novom prirodnom proizvodu.

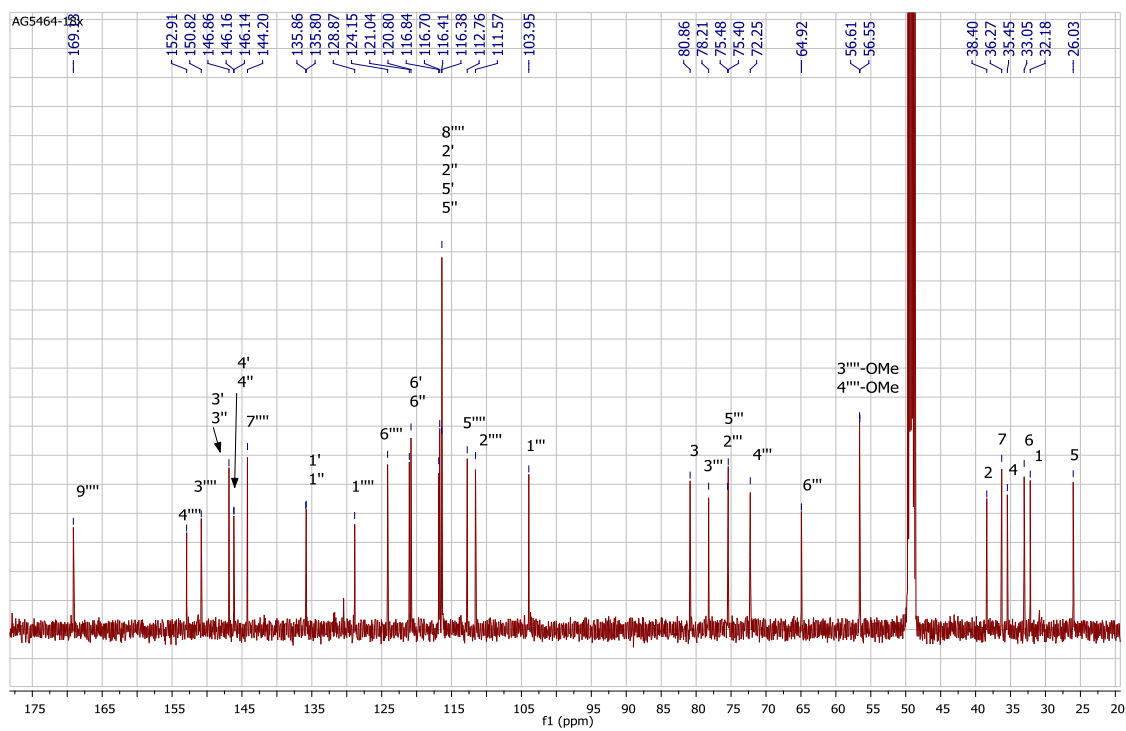
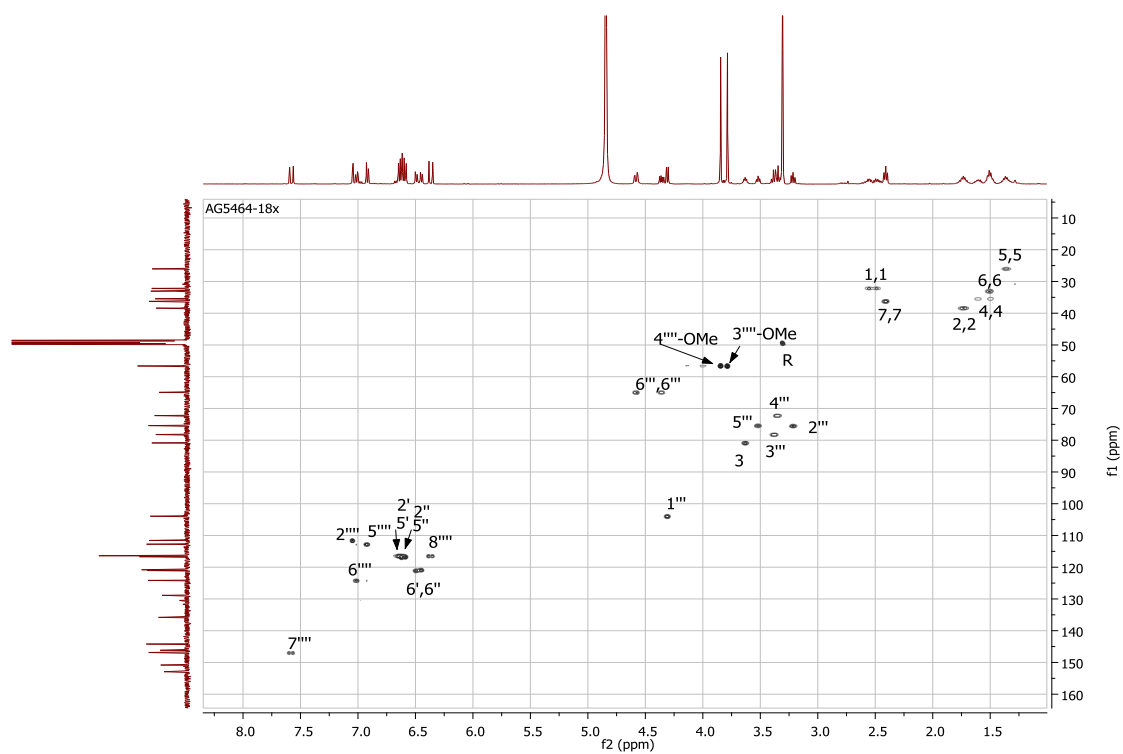


Slika 2.2.139. Strukturna formula jedinjenja **33**



Slika 2.2.140. HR-ESI-MS spektar jedinjenja 33

Slika 2.2.141. ¹H NMR spektar jedinjenja 33

Slika 2.2.142. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 33

Slika 2.2.143. HSQC spektar jedinjenja 33

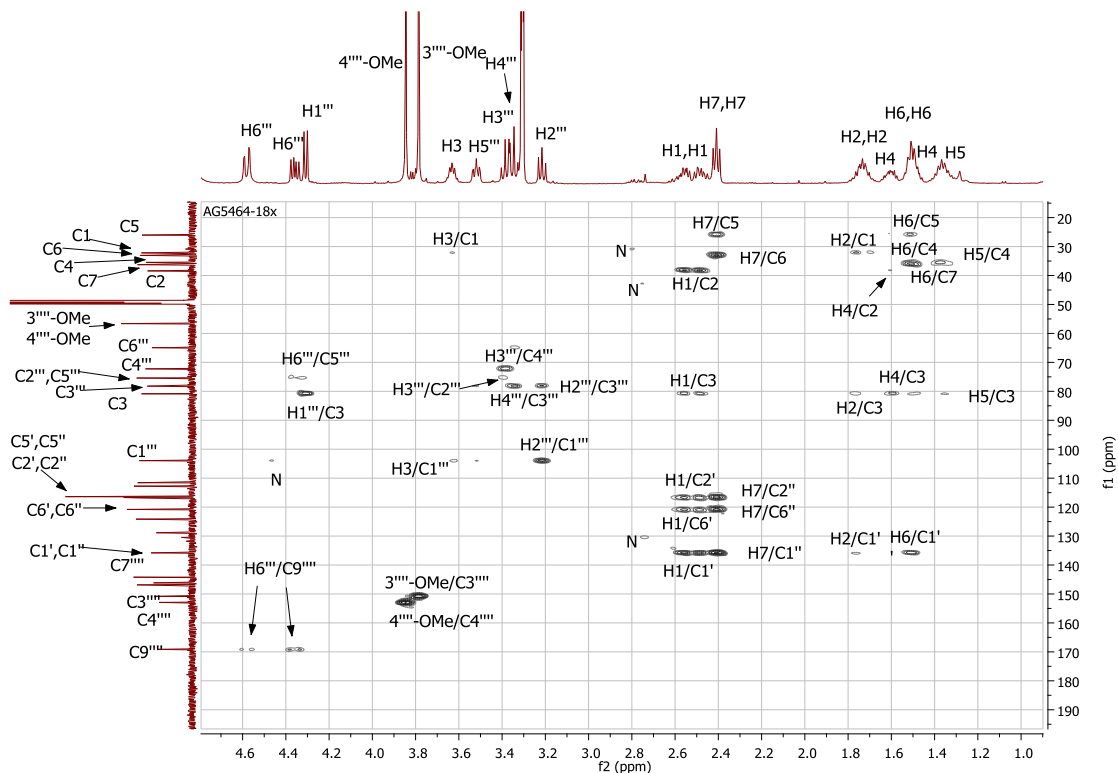
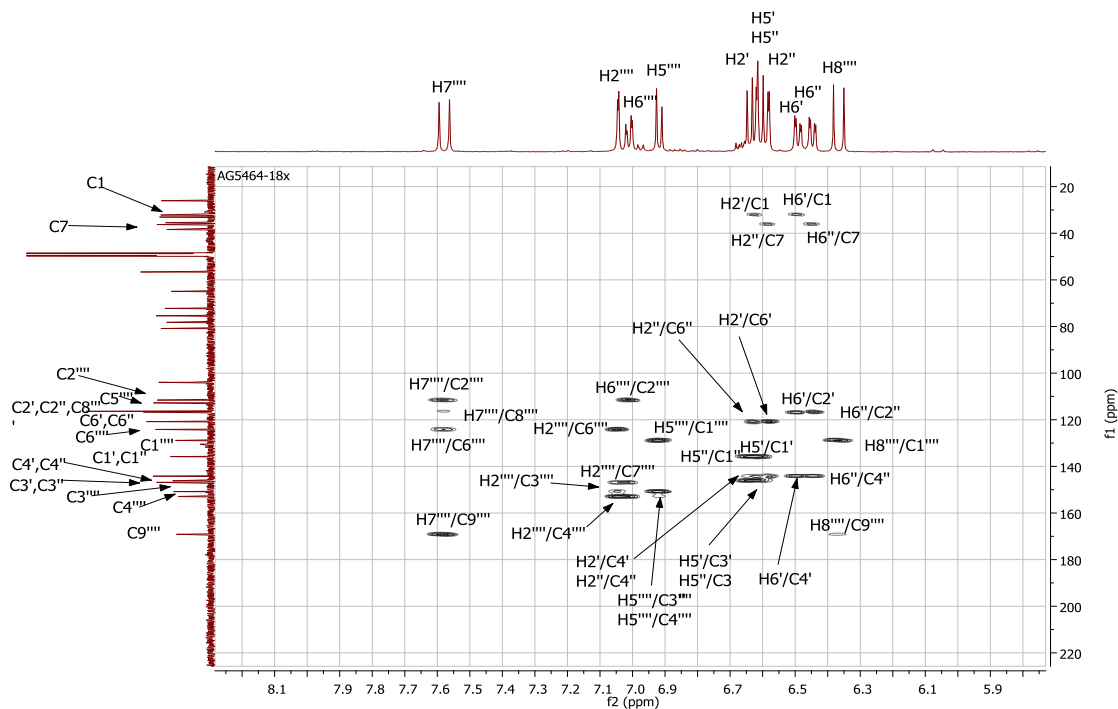
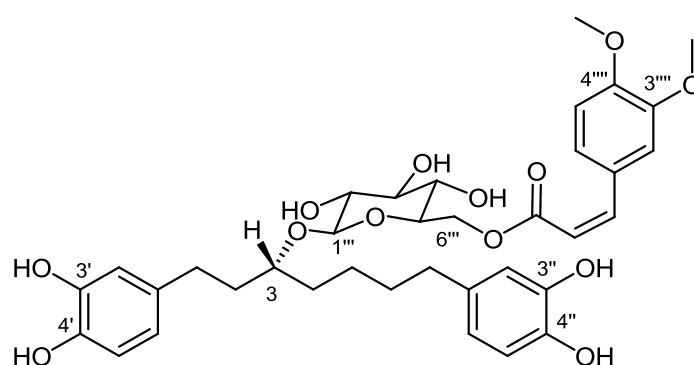
Slika 2.2.144. HMBC korelacije alifatičnih protona jedinjenja **33**Slika 2.2.145. HMBC korelacije aromatičnih i olefinskih protona jedinjenja **33**

Tabela 2.2.9. ^{13}C i ^1H NMR podaci za jedinjenja **32** i **33** (CD_3OD)

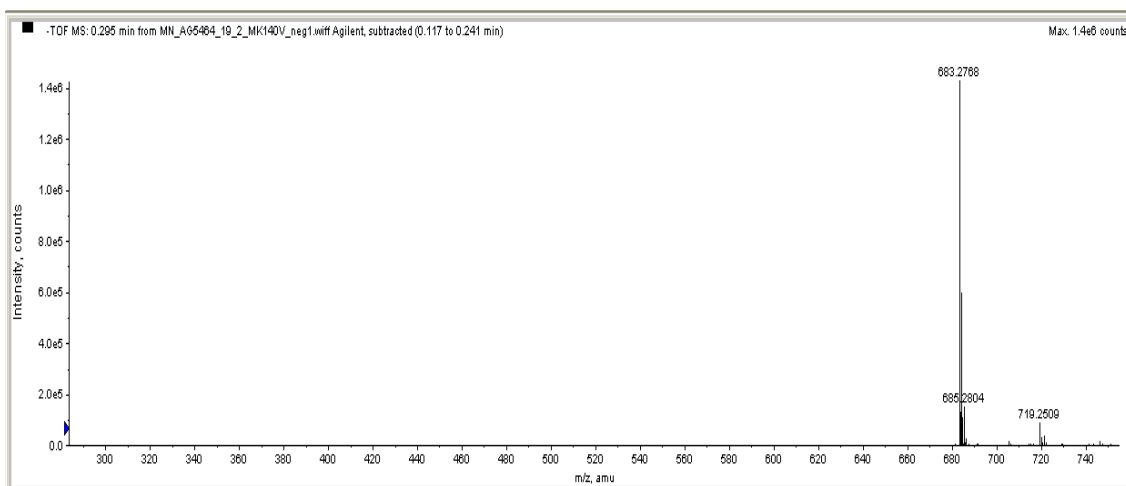
C/H	32		33	
	δ_{C} , tip	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C} , tip	δ_{H} (J u Hz)
1	30,3; CH_2	2,68 A_2B_2	32,2; CH_2	2,49 m; 2,56 m
2	46,5; CH_2	2,70 A_2B_2	38,4; CH_2	1,73 m
3	211,9; C	-	80,9; CH	3,63 m
4	49,0; CH_2^{c}	2,54 dd (16,7; 5,2) 2,80 dd (16,7; 7,0)	35,5; CH_2	1,50 m 1,60 m
5	77,0; CH	4,13 m	26,0; CH_2	1,37 qui
6	38,8; CH_2	1,70 m; 1,78 m	33,1; CH_2	1,51 qui
7	32,1; CH_2	2,49 m	36,3; CH_2	2,41 t (7,5)
1'	134,2; C	-	135,9; C	-
2'	116,7; CH^{b}	6,61 d (2,1)	116,7; CH	6,62 d (2,0)
3'	146,3; C	-	146,9; CH	-
4'	144,6; C	-	146,2; C	-
5'	116,4; CH^{a}	6,64 d (8,0)	116,8; CH^{a}	6,64 d (8,0)
6'	120,8; CH	6,48 dd (8,0; 2,1)	121,0; CH^{b}	6,49 dd (8,0; 2,0)
1''	135,4; C	-	135,8; C	-
2''	116,8; CH^{b}	6,60 d (2,1)	116,4; CH	6,59 d (2,0)
3''	146,2; C	-	146,9; C	-
4''	144,3; C	-	146,1; C	-
5''	116,4; CH^{a}	6,60 d (8,0)	116,4; CH^{a}	6,61 d (8,0)
6''	121,0; CH	6,47 dd (8,0; 2,1)	120,8; CH^{b}	6,45 dd (8,0; 2,0)
	Glcp		Glcp	
1'''	104,0; CH	4,30 d (7,8)	104,0; CH	4,31 d (7,8)
2'''	75,5; CH	3,17 t (8,4)	75,5; CH	3,22 t (8,3)
3'''	78,1; CH	3,38 t (9,0)	78,2; CH	3,38 t (8,9)
4'''	72,2; CH	3,34 m	72,3; CH	3,35 t (9,1)
5'''	75,4; CH	3,53 m	75,4; CH	3,52 m
6'''	65,0; CH_2	4,38 dd (11,8; 6,7) 4,59 dd (11,8; 2,2)	64,9; CH_2	4,36 dd (11,8; 6,6) 4,58 dd (11,8; 2,2)
	E-3,4,5-TMC		E-3,4-DMC	
1''''	131,7; C	-	128,9; C	-
2''''	106,8; CH	6,79 s	111,6; CH	7,04 d (1,9)
3''''	154,9; C	-	150,8; C	-
4''''	141,4; C	-	152,9; C	-
5''''	154,9; CH	-	112,8; CH	6,92 d (8,4)
6''''	106,8; CH	6,79 s	124,2; CH	7,01 dd (8,4; 1,9)
7''''	146,8; CH	7,59 d (16,0)	144,2; CH	7,58 d (16,0)
8''''	118,2; CH	6,46 d (16,0)	116,8; CH	6,37 d (16,0)
9''''	168,8; C	-	169,1; C	-
3''''-OMe	56,9; CH_3	3,81 s	56,6; CH_3	3,79 s
4''''-OMe	61,3; CH_3	3,78 s	56,6; CH_3	3,85 s
5''''-OMe	56,9; CH_3	3,81 s	-	-

Glcp – glukopiranozil grupa; **E-3,4,5-TMC** – E-3,4,5-trimetoksicinamoil grupa; **E-3,4-DMC** – E-3,4-dimetoksicinamoil grupa; ^{a,b} signali mogu biti međusobno zamenjeni; ^c signali preklapljivi signalom rastvarača – vrednosti dobijene iz HSQC spektra

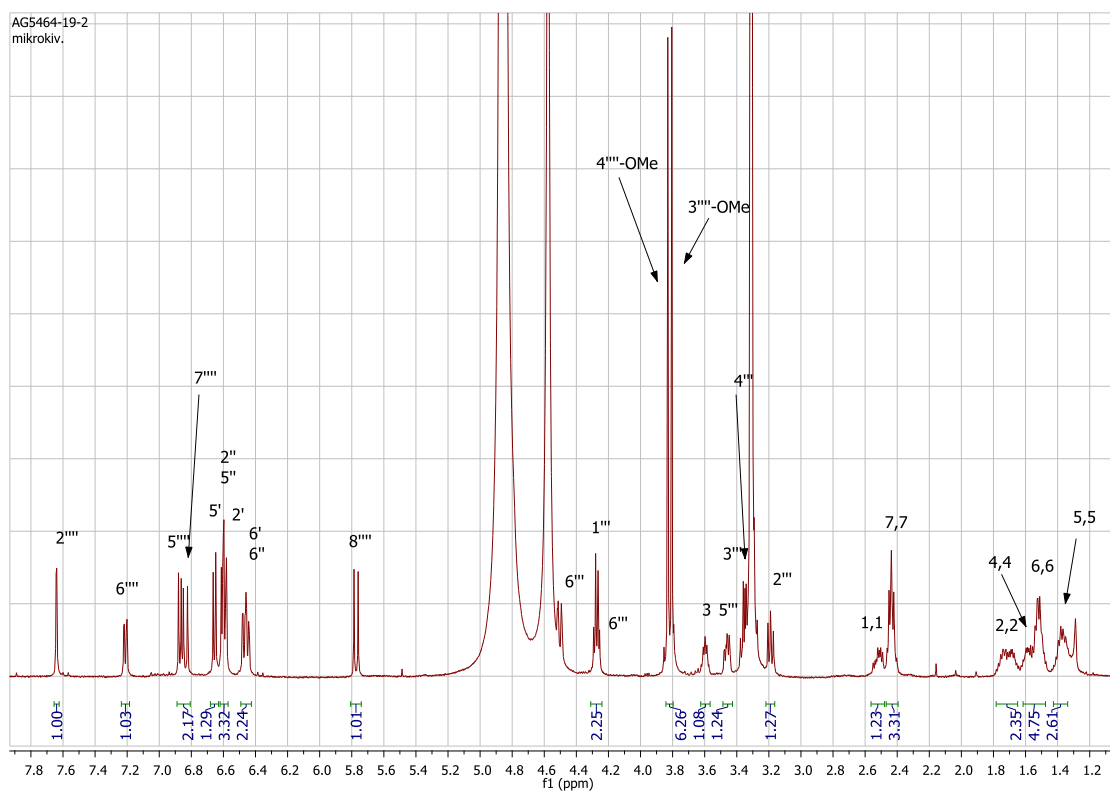
Jedinjenje **34** (Slika 2.2.146) je izolovano u količini od 3 mg. U HR-ESI-MS spektru ovog jedinjenja (Slika 2.2.147) kvazimolekulski jon $[M-H]^-$ na m/z 683,2768 odgovara molekulskoj formuli $C_{36}H_{44}O_{13}$, koju ima i jedinjenje **33**. Poređenjem 1H i ^{13}C NMR spektara ovih jedinjenja uočena je velika sličnost. Heptanoidna i saharidna oblast 1H NMR spektara su bile skoro identične. Razlike su uočene u aromatičnoj oblasti i odnosile su se na signale protona koji potiču od cinamične kiseline, a koji se javljaju zajedno sa signalima protona kateholskih grupa. Pošto su uočeni dubleti protona sa dvostruke veze na 5,77, odnosno 6,84 ppm, čija je konstanta spreznja 13,0 Hz, kao i singleti protona dve metoksi grupe na 3,81, odnosno 3,83 ppm (Slika 2.2.148), zaključeno je da se radi o 3,4-DMC kiselinu sa *Z* konfiguracijom dvostruke veze, tj. da je jedinjenje **34** *Z* izomer jedinjenja **33** (Slike 2.2.139 i 2.2.146). Dodatni dokazi su korelacije u HSQC i HMBC spektrima (Slike 2.2.150-2.2.152) koje su protumačene kod jedinjenja **30** koje takođe ima *Z*-3,4-DMC grupu. Konfiguracija na C-3 je određena kao *R* na osnovu CD spektra sličnog CD spektru rubranola (**20**) i na osnovu pravila ^{13}C glikozidacionog pomeranja jer je, kao i u slučaju rubranozida A (**22**), analizom ^{13}C NMR spektara jedinjenja **34** i odgovarajućeg aglikona rubranola (**20**) (Slika 2.2.40, Tabele 2.2.3 i 2.2.10) uočeno da je $\Delta\delta_{C4} > \Delta\delta_{C2}$ ($3,2 > 2,4$). $[\alpha]_D$ vrednost za jedinjenje **34** iznosi -20,0. Pregledom literature nisu pronađeni podaci o ovom jedinjenju pa je zaključeno da se radi o novom prirodnom proizvodu.

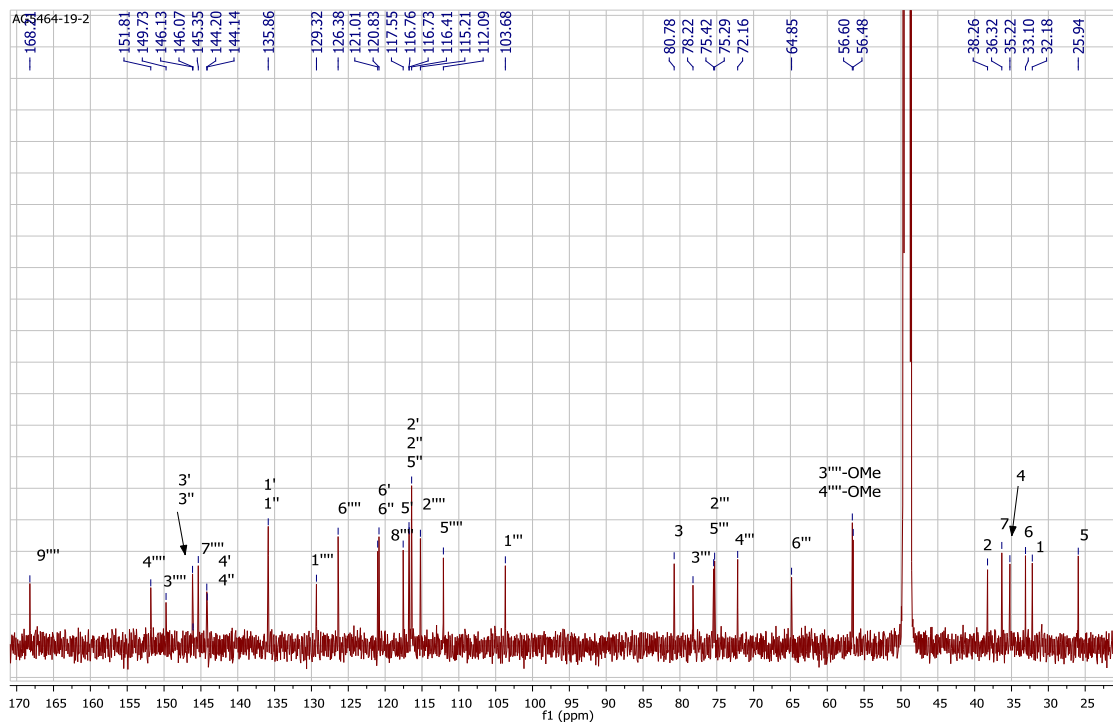


Slika 2.2.146. Strukturna formula jedinjenja **34**

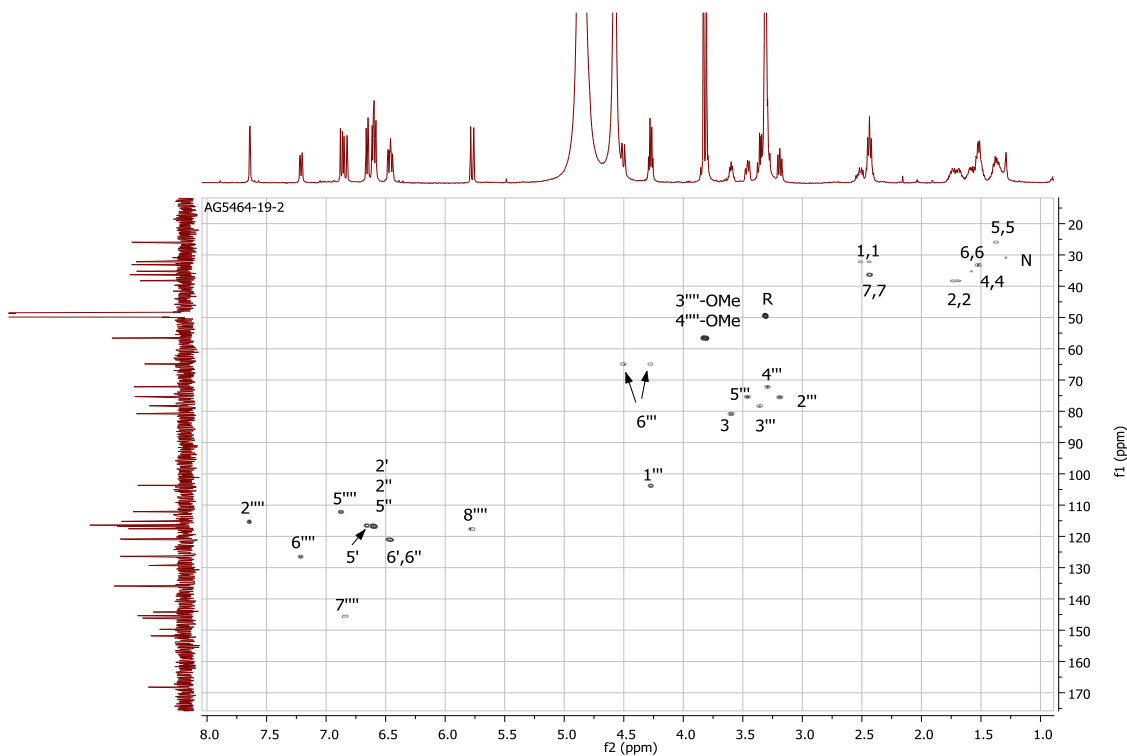


Slika 2.2.147. HR-ESI-MS spektar jedinjenja 34

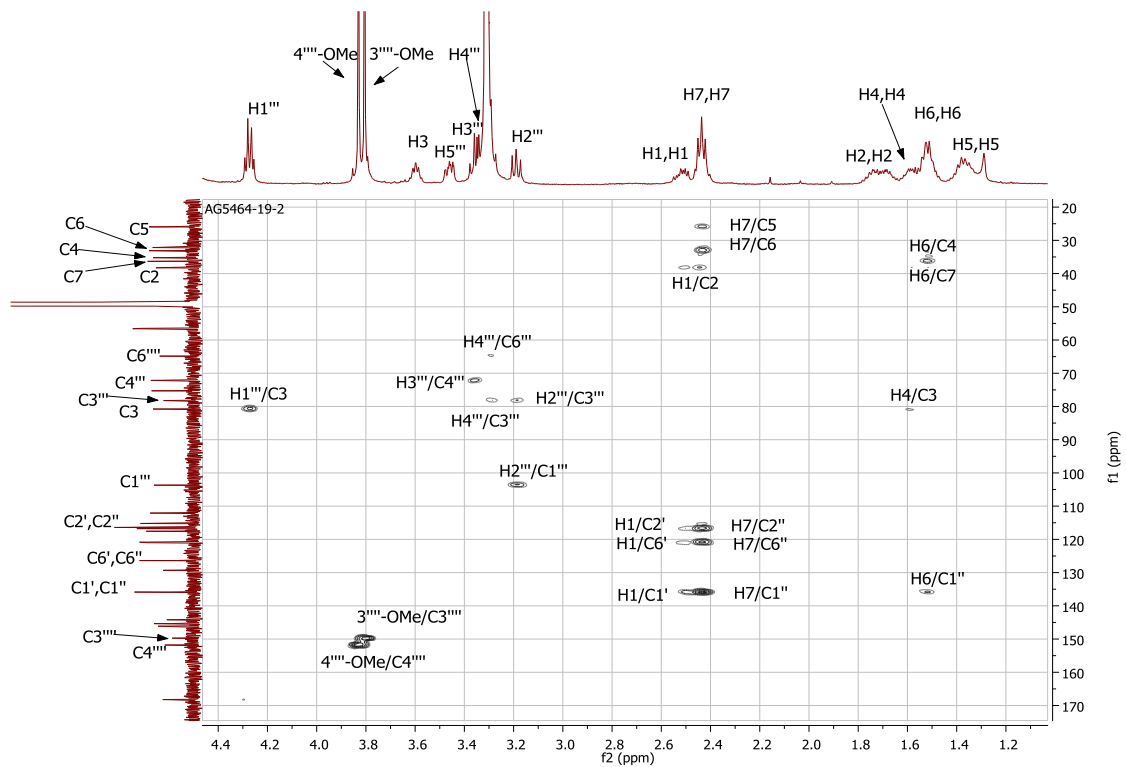
Slika 2.2.148. ¹H NMR spektar jedinjenja 34



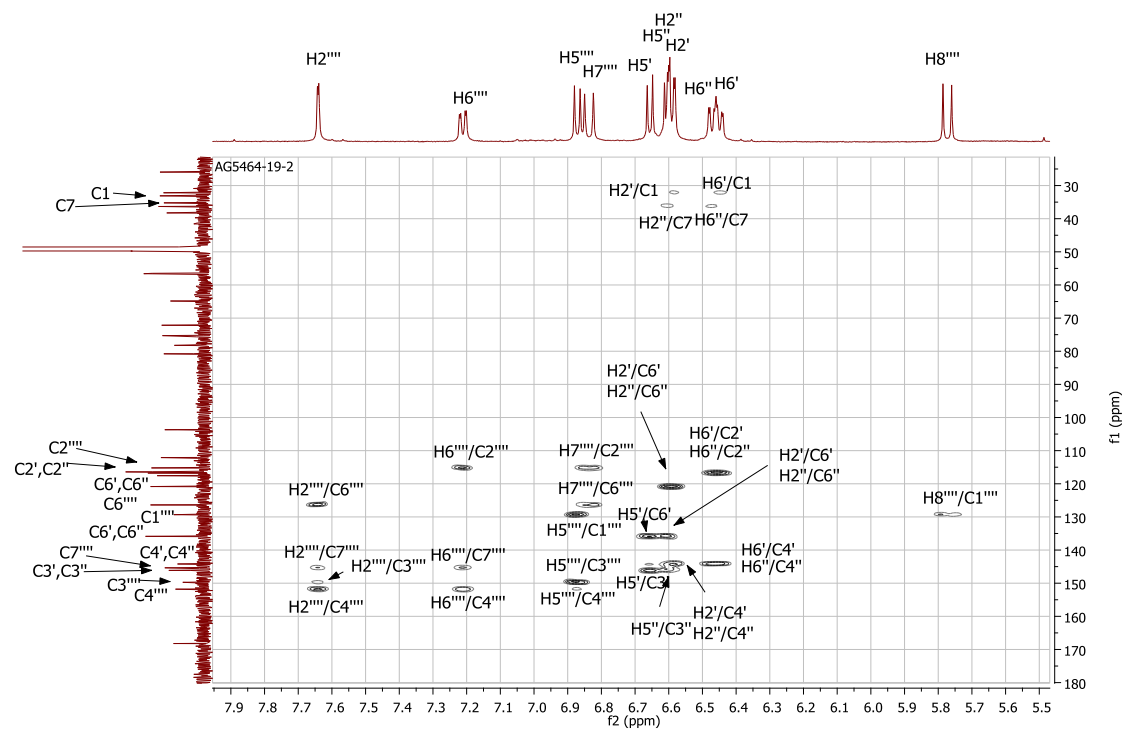
Slika 2.2.149. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 34



Slika 2.2.150. HSQC spektar jedinjenja 34

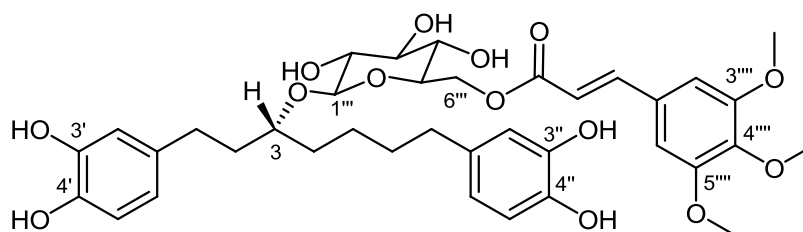


Slika 2.2.151. HMBC korelacije alifatičnih protona jedinjenja 34

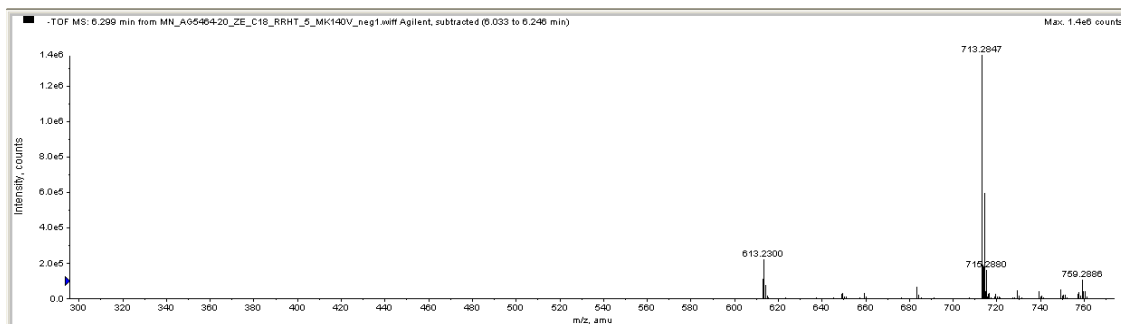


Slika 2.2.152. HMBC korelacije aromatičnih i olefinskih protona jedinjenja 34

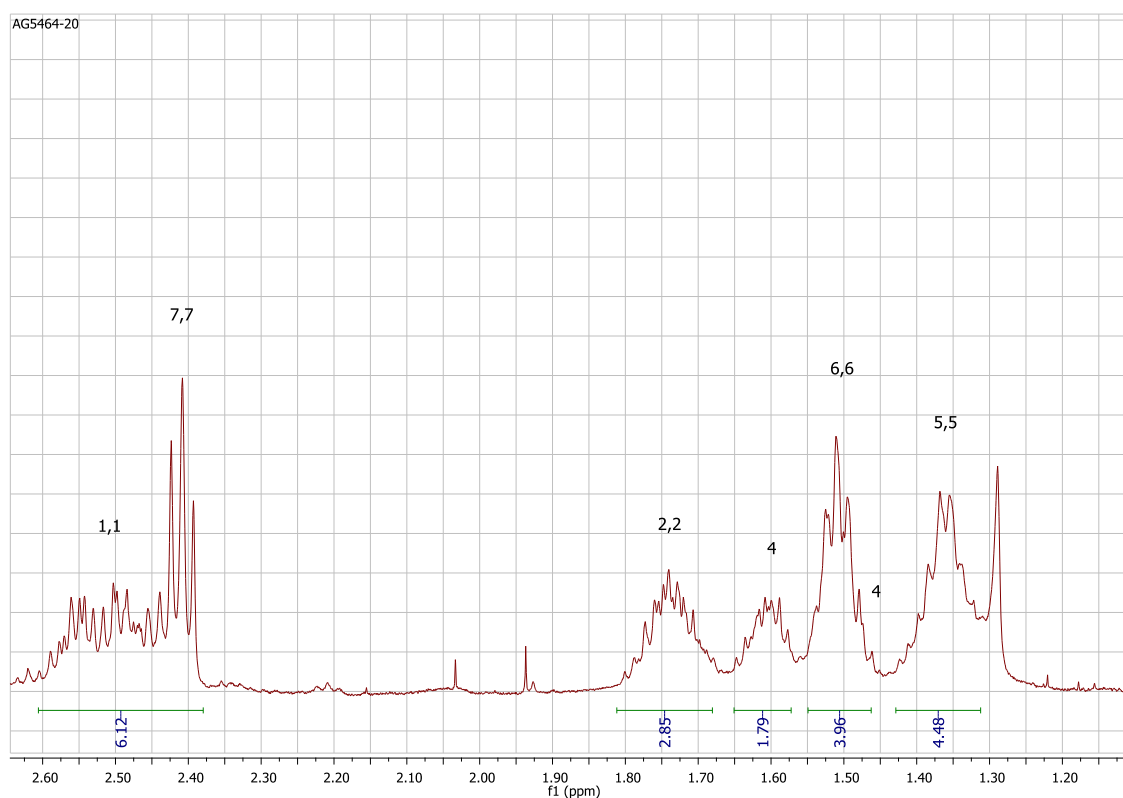
Jedinjenje **35** (Slika 2.2.153) je izolovano u količini od 2 mg. U HR-ESI-MS spektru (Slika 2.2.154) uočen je kvazimolekulski jon $[M-H]^-$ na m/z 713,2847 koji odgovara molekularnoj formuli $C_{37}H_{46}O_{14}$. Masa za 30 jedinica veća od one za jedinjenje **33** uputila je na jednu metoksi grupu više, što je potvrđeno 1H NMR spektrom na osnovu odnosa integrala singleta na 3,77 ppm i 3,80 ppm (1:2). Ostali NMR podaci za jedinjenja **35** i **33** su se odlično slagali, što je uputilo na to da su ostali delovi molekula isti kao kod jedinjenja **33** i da je struktura jedinjenja **35** ona data na Slici 2.2.153. U prilog tome je išlo i slaganje aromatičnih oblasti 1H NMR i HMBC spektara jedinjenja **35** (Slike 2.2.157 i 2.2.161) sa odgovarajućim spektrima jedinjenja **32** (Slike 2.2.133 i 2.2.138), koje takođe ima 3,4,5-TMC grupu, a od jedinjenja **35** se razlikuje po tome što nema keto grupu u položaju 3. HSQC i HMBC spektri su dati na Slikama 2.2.159-2.2.161, a ključne korelacije su obrazložene u delu teksta posvećenom jedinjenju **32**. U NMR spektrima jedinjenja **35** mogli su se prepoznati i signali tragova odgovarajućeg *Z* izomera. Tako je, na primer, lako uočljiv singlet na 7,12 ppm koji potiče od protona H-2''' i H-6''' iz *Z* izomera 3,4,5-TMC kiseline (obežan sa „N“, Slika 2.2.157), kao i singleti protona metoksi grupa uz singlete protona metoksi grupa jedinjenja **35** (Slika 2.2.156). Dodatno prečišćavanje i čuvanje na hladnom i u mraku je rađeno pre merenja optičke rotacije i ispitivanja biološke aktivnosti. Konfiguracija na C-3 je određena kao *R* na osnovu CD spektra sličnog CD spektru aglikona rubranola (**20**) i na osnovu pravila ^{13}C glikozidacionog pomeranja, jer je, kao i u slučaju rubranozida A (**22**), analizom ^{13}C NMR spektara jedinjenja **35** i odgovarajućeg aglikona rubranola (**20**) (Slika 2.2.40, Tabele 2.2.3 i 2.2.10) uočeno da je $\Delta\delta_{C4} > \Delta\delta_{C2}$ ($3,0 > 2,3$). $[\alpha]_D$ vrednost za jedinjenje **35** iznosi -40,0. Pregledom literature nisu pronađeni podaci o ovom jedinjenju pa je zaključeno da se radi o novom prirodnom proizvodu.

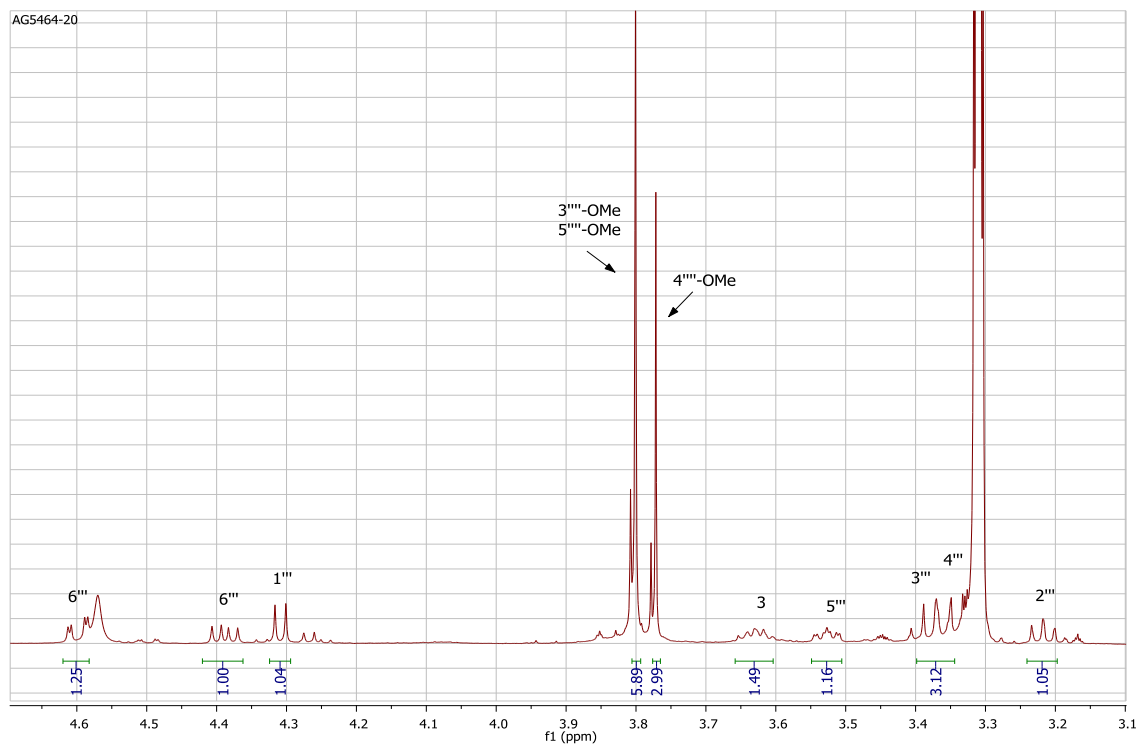


Slika 2.2.153. Strukturna formula jedinjenja **35**

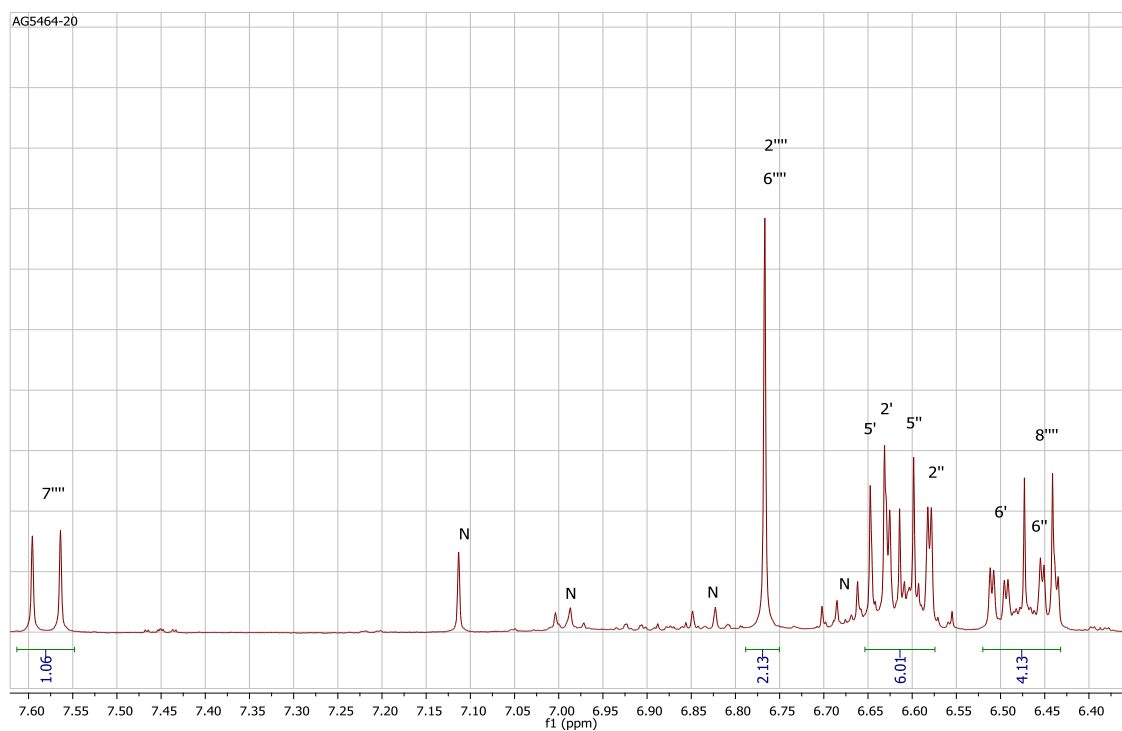


Slika 2.2.154. HR-ESI-MS spektar jedinjenja 35

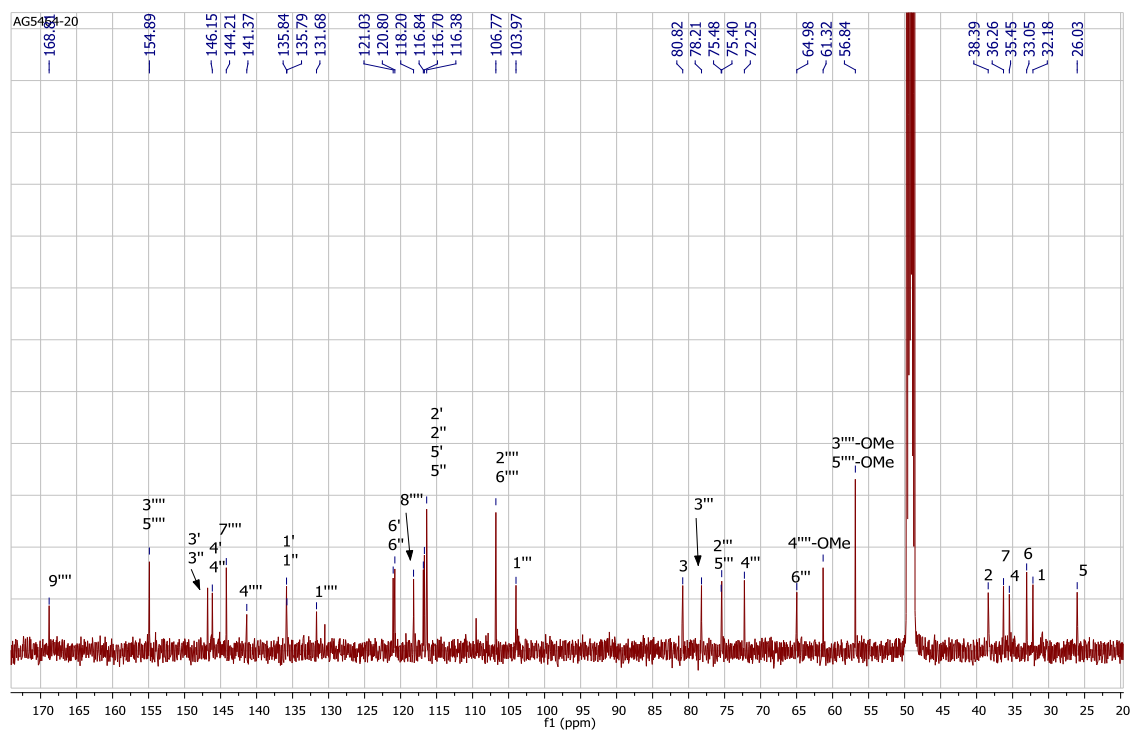
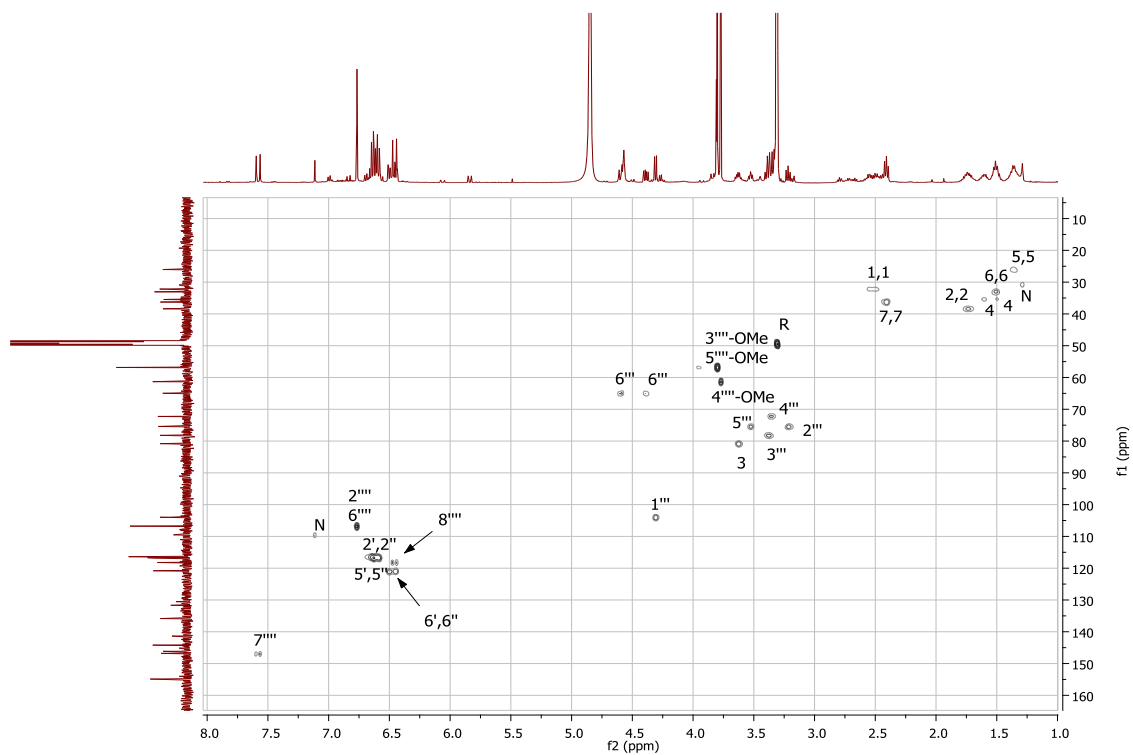
Slika 2.2.155. Signali heptanoidnih protona (bez H-3) u ^1H NMR spektru jedinjenja 35



Slika 2.2.156. Signali saharidnih, H-3 i protona metoksi grupa u ^1H NMR spektru jedinjenja 35



Slika 2.2.157. Signali aromatičnih i olefinskih protona u ^1H NMR spektru jedinjenja 35

Slika 2.2.158. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 35

Slika 2.2.159. HSQC spektar jedinjenja 35

Tabela 2.2.10. ^{13}C i ^1H NMR podaci za jedinjenja **34** i **35** (CD_3OD)

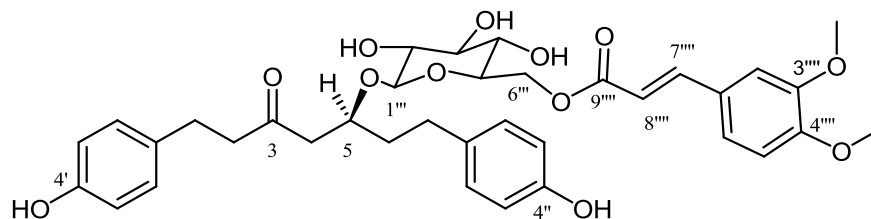
C/H	34		35	
	δ_{C} ; tip	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} ; tip	δ_{H} (J in Hz)
1	32,2; CH_2	2,44 m; 2,52 m	32,2; CH_2	2,50 m; 2,55 m
2	38,3; CH_2	1,71 m	38,4; CH_2	1,74 m
3	80,8; CH	3,60 m	80,8; CH	3,63 m
4	35,2; CH_2	1,52 m; 1,58 m	35,5; CH_2	1,50 m; 1,61 m
5	25,9; CH_2	1,37 m	26,0; CH_2	1,36 m
6	33,1; CH_2	1,53 m	33,1; CH_2	1,51 qui
7	36,3; CH_2	2,44 t (7,5)	36,3; CH_2	2,41 t (7,5)
1'	135,9; C	-	135,8; C	-
2'	116,7; CH^{a}	6,58 d (2,0)	116,7; CH^{a}	6,63 d (2,0)
3'	144,2; C	-	146,2; C	-
4'	144,2; C	-	144,2; C	-
5'	116,4; CH^{a}	6,66 d (8,0)	116,4; CH	6,64 d (8,0)
6'	120,8; CH	6,45 dd (8,0; 2,0)	121,0; CH	6,50 dd (8,0; 2,0)
1''	135,9; C	-	135,8; C	-
2''	116,7; CH^{a}	6,60 d (2,0)	116,8; CH^{a}	6,58 d (2,0)
3''	146,1; CH	-	146,2; CH	-
4''	144,2; C	-	144,2; C	-
5''	116,4; CH^{a}	6,61 d (8,0)	116,4; CH	6,61 d (8,0)
6''	121,0; CH	6,47 dd (8,0; 2,0)	120,8; CH	6,45 dd (8,0; 2,0)
	GlcP		GlcP	
1'''	103,7; CH	4,27 d (7,6)	104,0; CH	4,31 d (7,8)
2'''	75,4; CH	3,19 brt (8,4)	75,4; CH^{b}	3,22 brt (8,4)
3'''	78,2; CH	3,36 m	78,2; CH	3,37 m
4'''	72,2; CH	3,34 m	72,3; CH	3,35 m
5'''	75,3; CH	3,46 m	75,5; CH^{b}	3,53 m
6'''	64,9; CH_2	4,27 dd (11,8; 6,7) 4,50 dd (11,8; 2,0)	65,0; CH_2	4,39 dd (11,8; 6,6) 4,60 dd (11,8; 2,2)
	Z-3,4-DMC		E-3,4,5-TMC	
1''''	129,3; C	-	131,7; C	-
2''''	115,2; CH	7,64 d (1,8)	106,8; CH	6,77 s
3''''	149,7; C	-	154,9; C	-
4''''	151,8; C	-	141,4; C	-
5''''	112,1; CH	6,87 d (8,4)	154,9; CH	-
6''''	126,4; CH	7,21 dd (8,4; 1,8)	106,8; CH	6,77 s
7''''	145,4; CH	6,84 d (12,9)	144,8; CH	7,58 d (15,9)
8''''	117,6; CH	5,77 d (12,9)	118,2; CH	6,46 d (15,9)
9''''	168,2; C	-	168,8; C	-
3''''-OMe	56,6; CH_3	3,81 s	56,8; CH_3	3,80 s
4''''-OMe	56,5; CH_3	3,83 s	61,3; CH_3	3,77 s
5''''-OMe	-	-	56,8; CH_3	3,80 s

GlcP – glukopiranozil grupa; **Z-3,4-DMC** – Z-3,4-dimetoksicinamoil grupa; **E-3,4,5-TMC** – E-3,4,5-trime-toksicinamoil grupa; ^{a,b} signali mogu biti međusobno zamenjeni

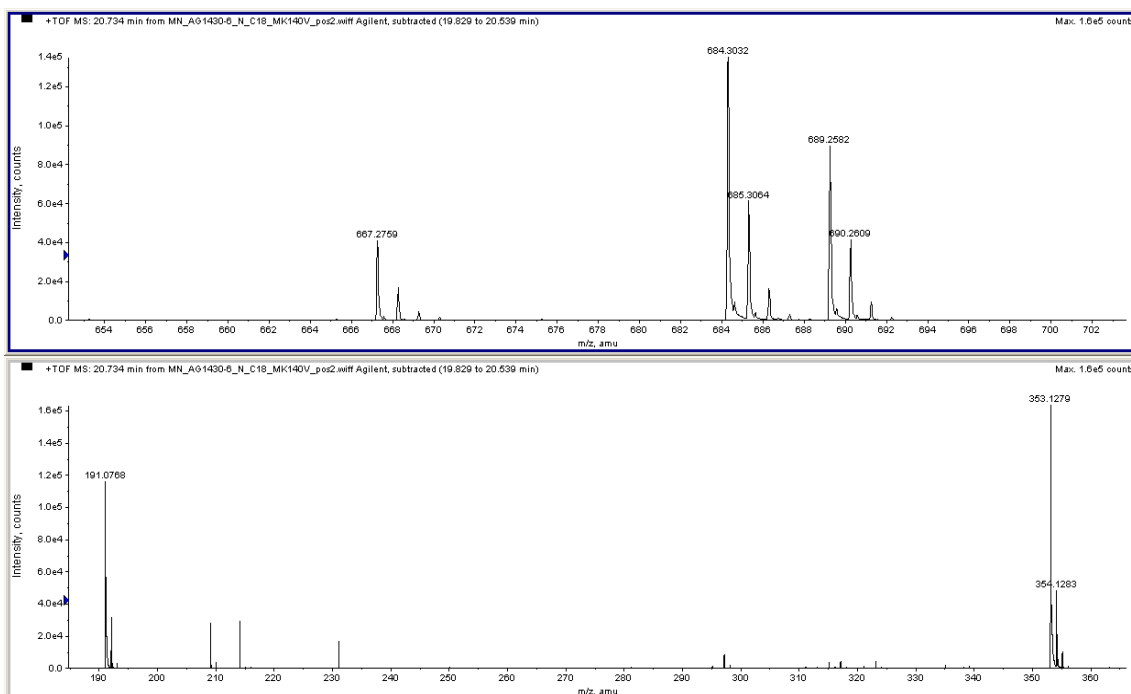
2.2.2.2. Složeni diarilheptanoidi sa dve *p*-hidroksifenil grupe u osnovnom skeletu

Iz CHCl₃/MeOH ekstrakta kore crne jove izolovana su dva jedinjenja koja pripadaju ovoj grupi, **36** i **37**. Njihove karakteristike u ¹H NMR spektrima su signali AA'BB' spinskih sistema u aromatičnoj oblasti na 6,8-7,1 ppm, a u ¹³C NMR spektrima simetrični signali na ~ 116 ppm (C-3', C-3'', C-5', C-5''), ~ 130 ppm (C-2', C-2'', C-6', C-6''), ~ 134 ppm (C-1', C-1'') i na ~ 156 ppm (C-4', C-4''). Pored ovih signala u aromatičnim oblastima NMR spektara javljaju se i signali odgovarajućih H/C atoma cinamičnih kiselina (3,4-DMC i *p*C) estarski vezanih za glukoznu jedinicu.

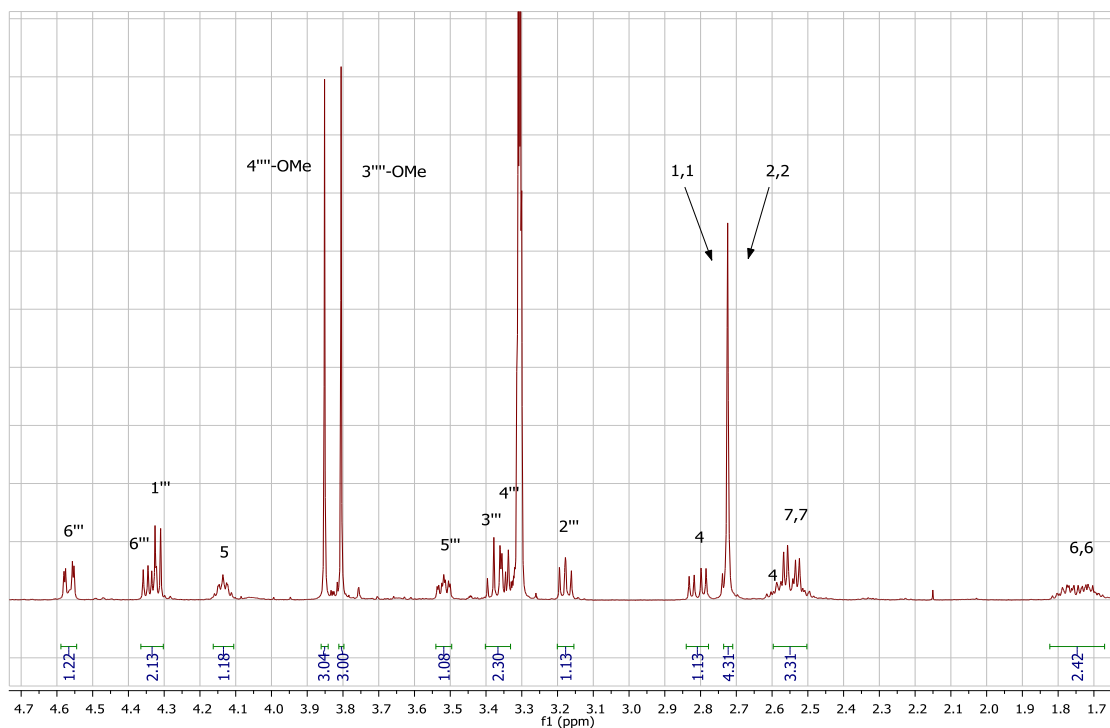
Jedinjenje **36** (Slika 2.2.162) je izolovano u količini od 3 mg. Na osnovu kvazimolekulskog jona [M+H]⁺ na *m/z* 667,2759 u HR-ESI-MS spektru (Slika 2.2.163) izvedena je molekulska formula C₃₆H₄₂O₁₂. Analizom NMR spektara (Slike 2.2.164-2.2.169) uočeno je slaganje heptanoidnih i saharidnih oblasti sa odgovarajućim delovima NMR spektara jedinjenja **29** (Tabele 2.2.8 i 2.2.11). Razlika u aromatičnoj oblasti ¹H NMR spektra u odnosu na jedinjenje **29** je pojava signala dva AA'BB' spinska sistema umesto signala dve kateolske grupe (dva skupa *d*, *d*, *dd*), što je, zajedno sa podatkom o masi jedinjenja **36** manjoj za 32 jedinice (-2O) od mase jedinjenja **29**, uputilo na to da su u položajima 1 i 7 *p*-hidroksifenil grupe. Potvrda ovih grupa u položajima 1 i 7 su HMBC korelacije H-7/C-1'', H-2'', H-6''/C-7, H-1/C-1', H-2', H-6'/C-1 (Slike 2.2.168 i 2.2.169). Preostali dubleti na 6,37, 6,93, 7,08 i 7,59 ppm, kao i dvostruki dublet na 7,06 ppm (Tabela 2.2.11) pripadaju *E*-3,4-DMC grupi, kao kod jedinjenja **29**, što je potvrđeno HR-ESI-MS spektrom, tj. jonima [M+H]⁺ na *m/z* 667,2759, [GlcDMC]⁺ na *m/z* 353,1279 i [DMC]⁺ na *m/z* 191,0768 (Slika 2.2.163). Konfiguracija na C-5 je određena kao *S* na osnovu CD spektra koji je bio veoma sličan CD spektru platifilozida (**1**) i na osnovu pravila ¹³C glikozidacionog pomeranja, jer je analizom ¹³C NMR spektara jedinjenja **36** i hirsutanonola (**14**) (Slika 2.2.4, Tabele 2.2.1 i 2.2.11) nađeno da je Δδ_{C4} > Δδ_{C6} (2,3 > 1,7 ppm). Pošto ¹³C NMR podaci za aglikon ovog jedinjenja – platifilonol nisu bili dostupni, za poređenje je korišćeno naj-sličnije jedinjenje – hirsutanonol (**14**). [α]_D vrednost za jedinjenje **36** iznosi +12,0. Kako za ovo jedinjenje nema podataka u literaturi, ono se smatra novim prirodnim proizvodom.



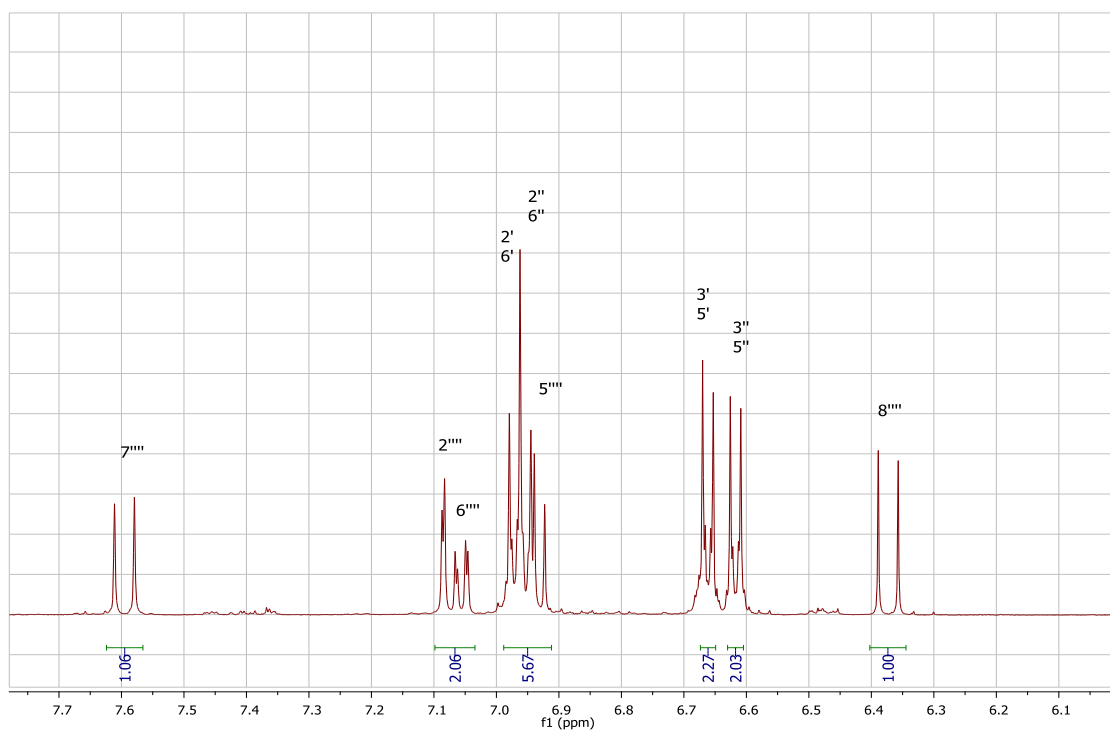
Slika 2.2.162. Strukturna formula jedinjenja 36



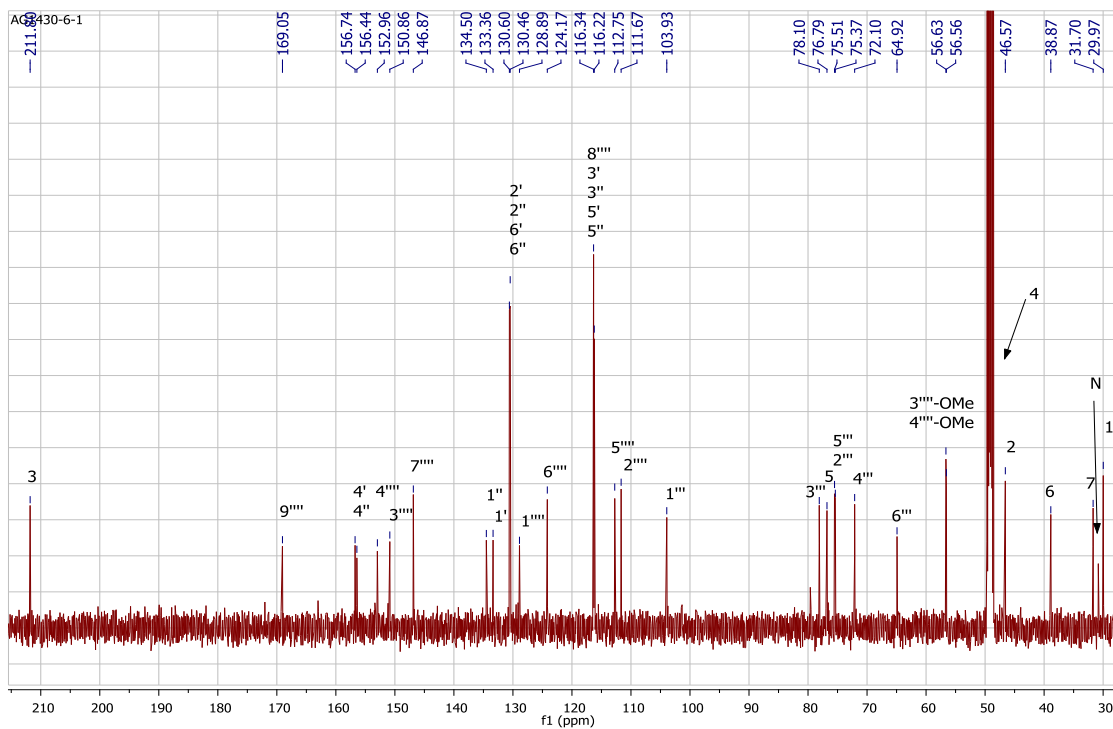
Slika 2.2.163. Maseni spektri jedinjenja 36 snimljeni u pozitivnom (gornji) i negativnom modu (donji spektar)



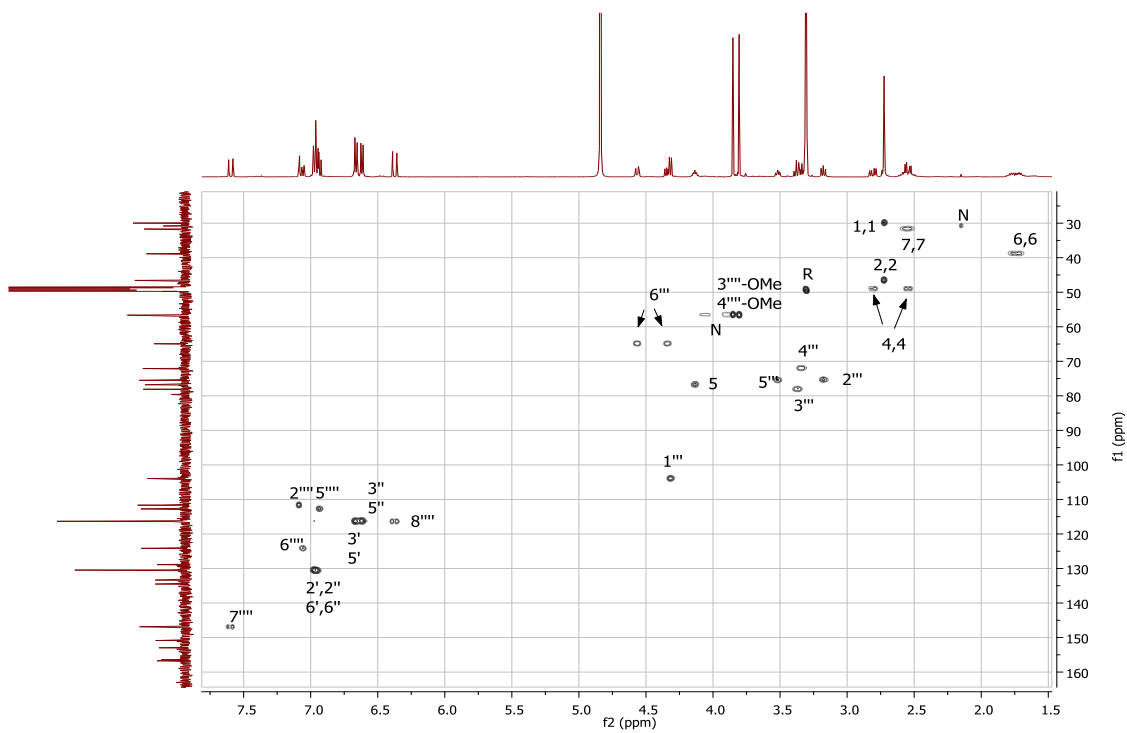
Slika 2.2.164. Signali alifatičnih protona u ^1H NMR spektru jedinjenja 36



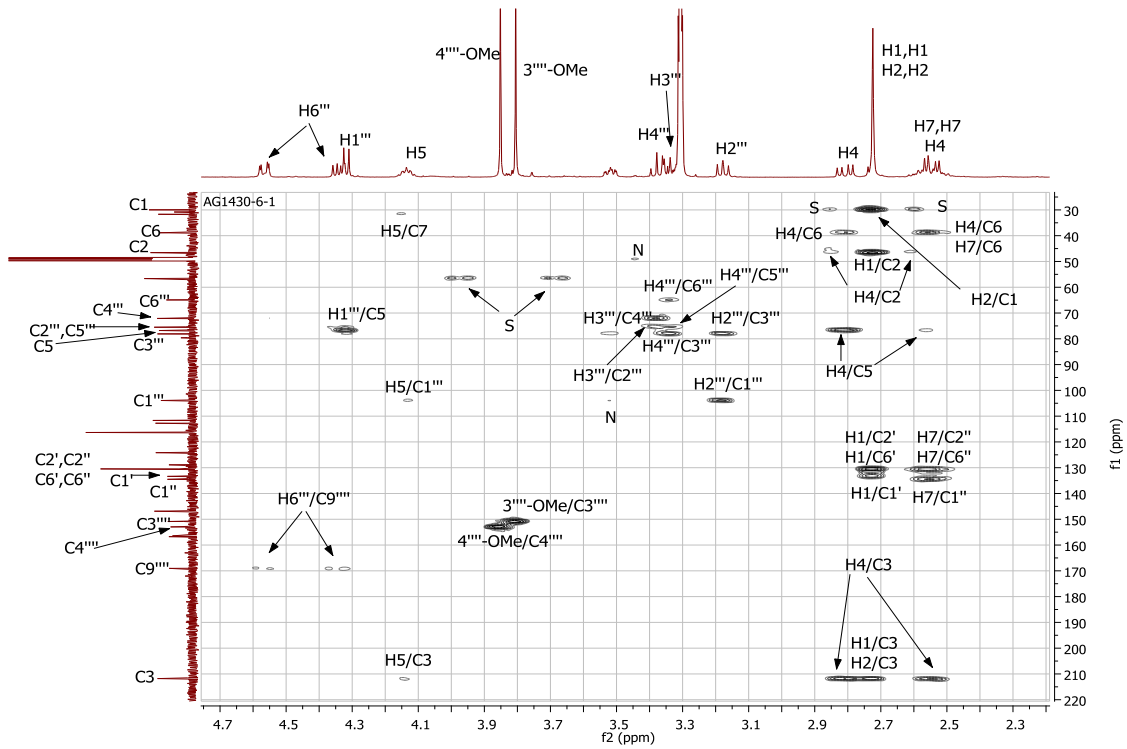
Slika 2.2.165. Signali aromatičnih i olefinskih protona u ^1H NMR spektru jedinjenja 36



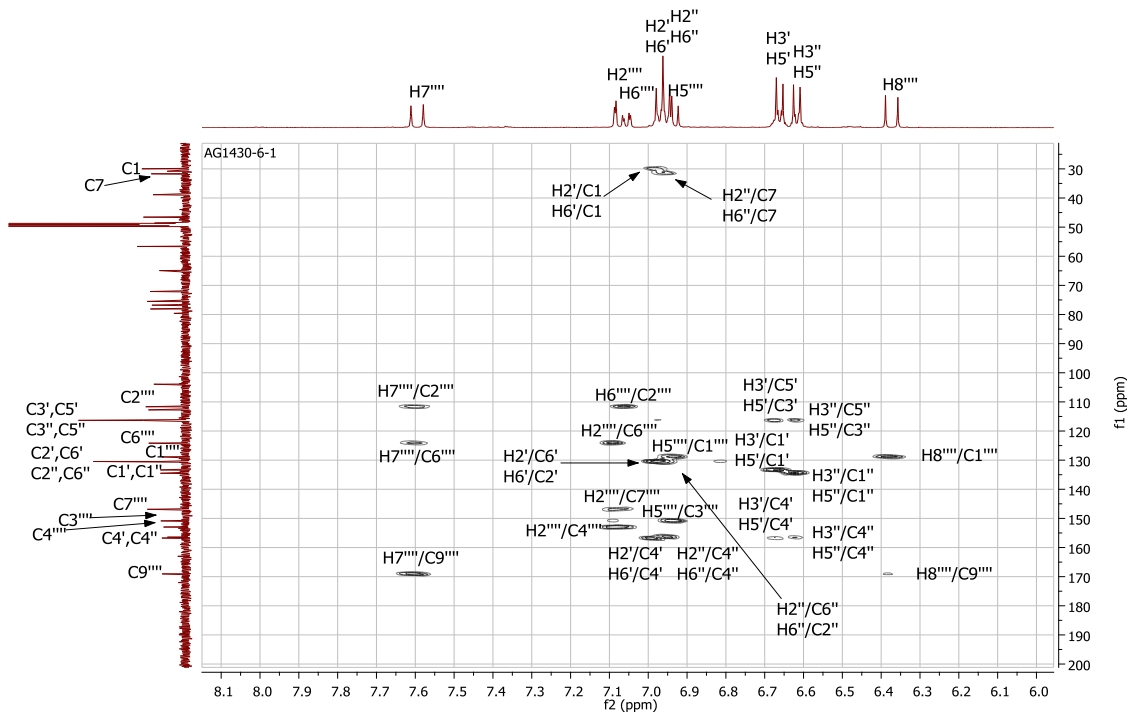
Slika 2.2.166. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 36



Slika 2.2.167. HSQC spektar jedinjenja 36

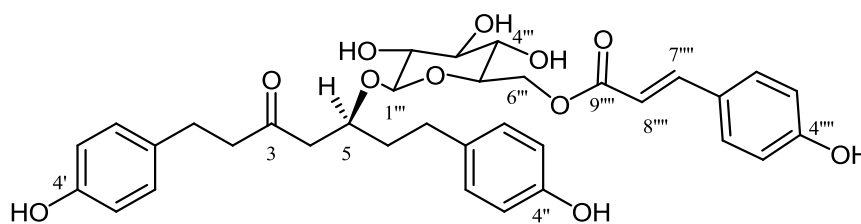


Slika 2.2.168. HMBC korelacije alifatičnih protona jedinjenja 36

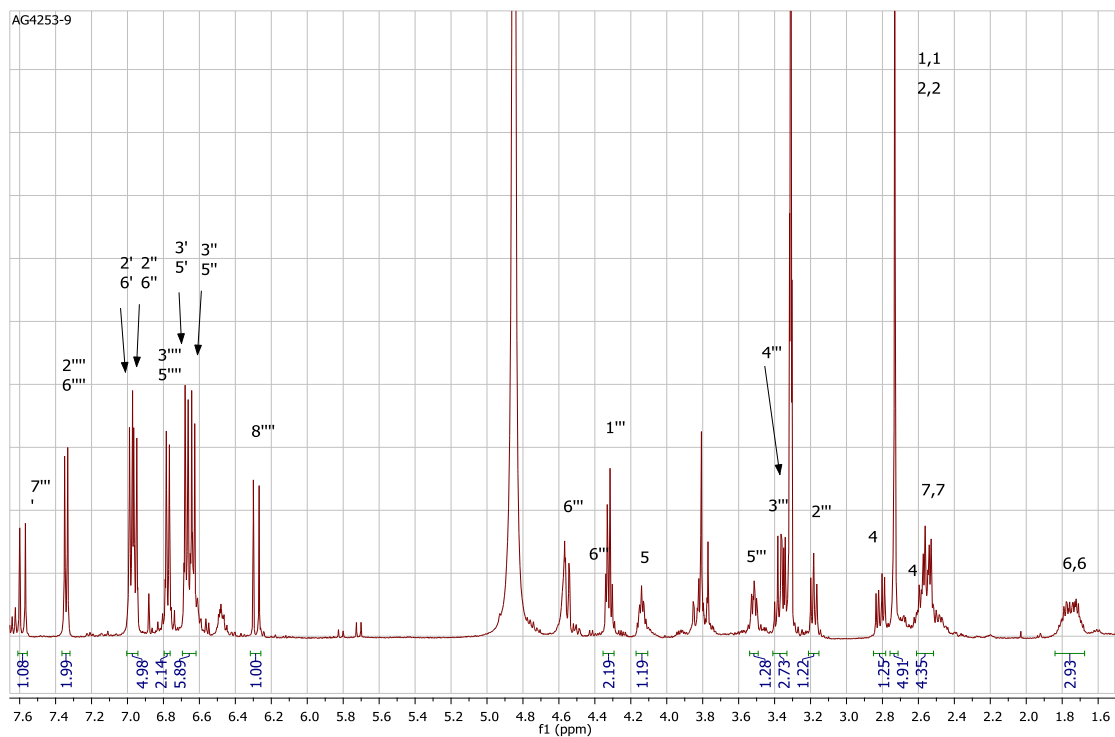
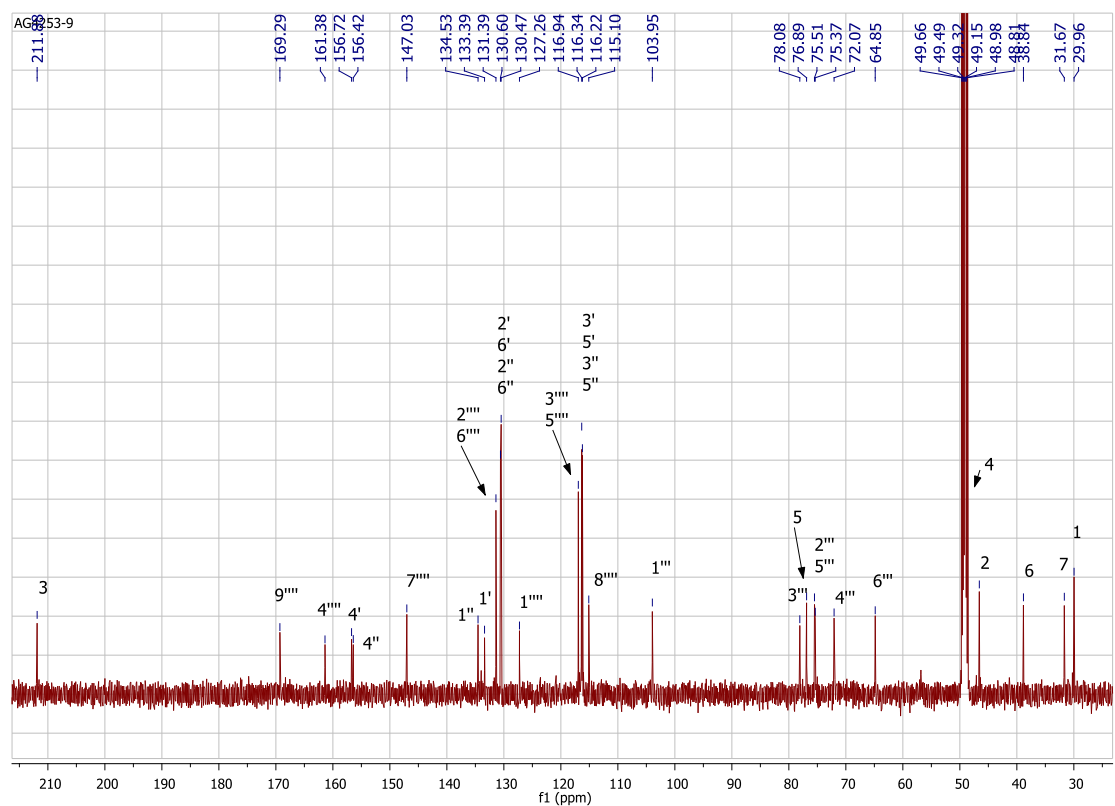


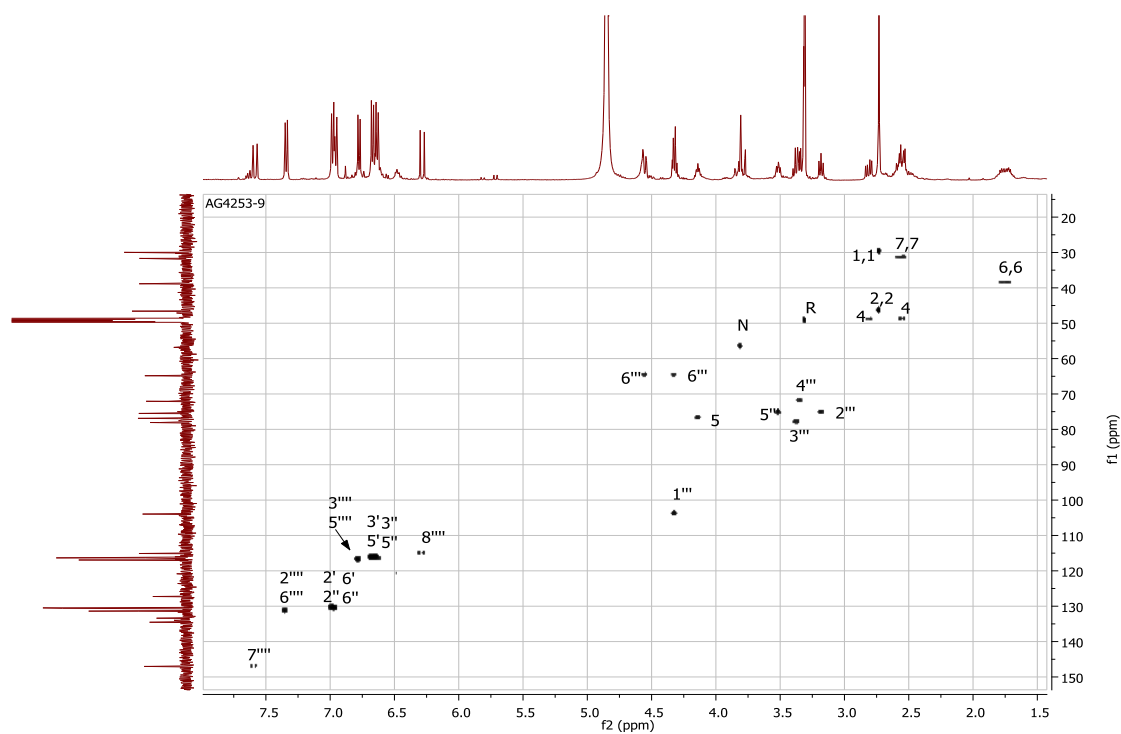
Slika 2.2.169. HMBC korelacije aromatičnih i olefinskih protona jedinjenja 36

Jedinjenje **37** (Slika 2.2.170) je izolovano u količini od 5 mg. U aromatičnoj oblasti ^1H NMR spektra (Slika 2.2.171) ovog jedinjenja uočena su tri AA'BB' spinska sistema. Na osnovu ^1H NMR podataka već izolovanih složenih diarilheptanoida (npr. **1** i **36**, Slike 2.1.2 i 2.2.162) za dva je pretpostavljeno da potiču od protona *p*-hidroksifenil grupa u položajima 1 i 7 heptanskog niza, a za treći da potiče od protona *p*-kumaroil (*p*C) grupe koja je estarski vezana za C-6''', kao kod jedinjenja **31** (Slika 2.2.123). Potvrda pretpostavljene strukture dobijena je iz HR-ESI-MS spektra (Slika 2.2.176), jer je kvazimolekulski jon $[\text{M}-\text{H}]^-$ na 621,2383 ukazao na molekulska formulu $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{O}_{11}$, tj. 2 kiseonikova atoma manje od jedinjenja **31**. HSQC i HMBC korelacije (Slike 2.2.173-2.2.175) su bile veoma slične korelacijama za jedinjenje **31** (Slike 2.2.127-2.2.129). Pored toga, diarilheptanoidni i saharidni deo je isti kao kod jedinjenja **36** (Slike 2.2.162 i 2.2.170) pa se strukturna objašnjenja ovog dela molekula mogu naći u delu teksta o ovom jedinjenju. Kao i kod jedinjenja **36**, *S* konfiguracija na C-5 atomu je ustanovljena na osnovu sličnosti CD spektra sa spektrom platifilozida (**1**), kao i na osnovu pravila ^{13}C glikozidacionog pomeranja. Naime, analizom ^{13}C NMR spektara jedinjenja **37** i hirsutanonola (**14**) (Slika 2.2.2, Tabele 2.2.1 i 2.2.11), korišćenog kao najbližijeg aglikona, nađeno je da je $\Delta\delta_{\text{C}4} > \Delta\delta_{\text{C}6}$ ($2,4 > 1,8$ ppm). $[\alpha]_{\text{D}}$ vrednost za jedinjenje **37** iznosi - 32,0. Pregledom literature nisu pronađeni podaci o ovom jedinjenju pa je zaključeno da se radi o novom prirodnom proizvodu.

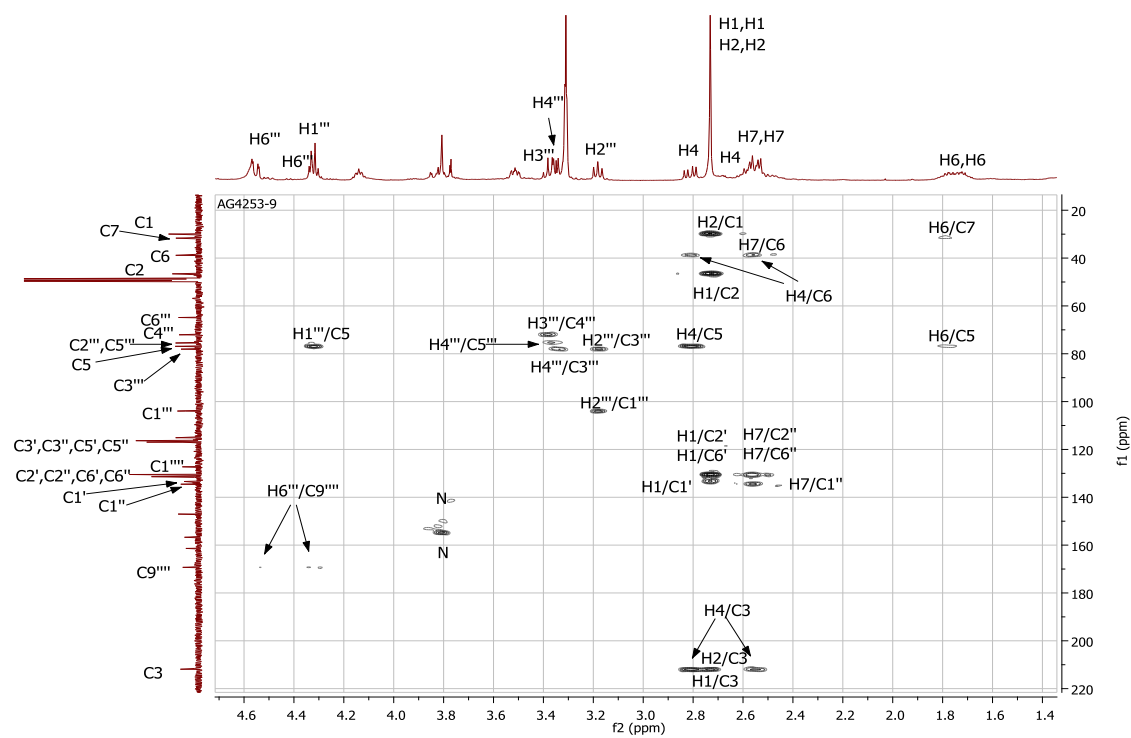


Slika 2.2.170. Strukturna formula jedinjenja **37**

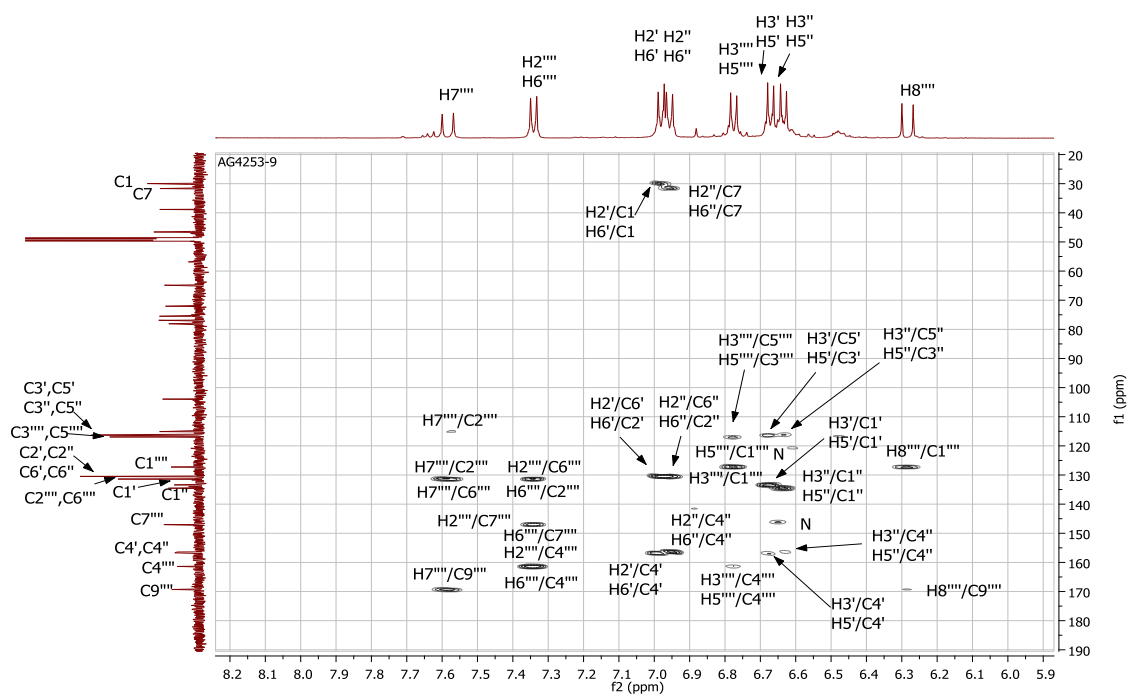
Slika 2.2.171. ^1H NMR spektar jedinjenja 37Slika 2.2.172. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 37



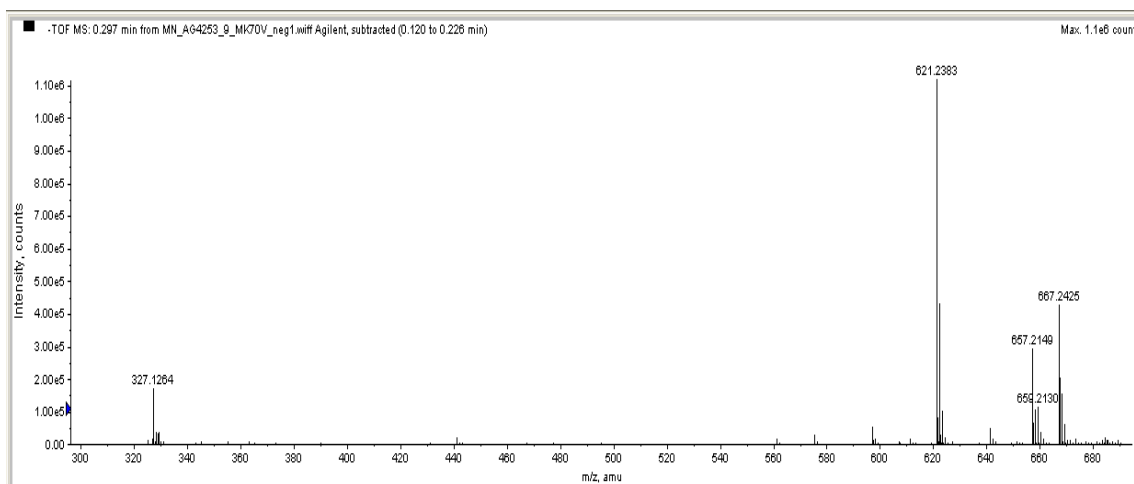
Slika 2.2.173. HSQC spektar jedinjenja 37



Slika 2.2.174. HMBC korelacije alifatičnih protona jedinjenja 37



Slika 2.2.175. HMBC korelacije aromatičnih i olefinskih protona jedinjenja 37



Slika 2.2.176. HR-ESI-MS spektar jedinjenja 37

Tabela 2.2.11. ^{13}C i ^1H NMR podaci za jedinjenja **36** i **37** (CD_3OD)

C/H	36		37	
	δ_{C} , tip	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C} , tip	δ_{H} (J u Hz)
1	30,0; CH_2	2,73 brs	30,0; CH_2	2,73 brs
2	46,6; CH_2	2,73 brs	46,6; CH_2	2,73 brs
3	211,8; C	-	211,9; C	-
4	49,0; CH_2^{c}	2,55 dd (16,6; 5,5) 2,81 dd (16,6; 7,7)	49,0; CH_2^{c}	2,56 dd (16,6; 5,4) 2,81 dd (16,6; 7,1)
5	76,8; CH	4,14 m	76,9; CH_2	4,14 m
6	38,9; CH_2	1,75 m	38,8; CH_2	1,75 m
7	31,7; CH_2	2,55 m ^d	31,7; CH_2	2,55 m ^d
1'	133,4; C	-	133,4; C	-
2'	130,6; CH^{a}	6,97 d (8,5)	130,6; CH^{a}	6,98 d (8,5)
3'	116,4; CH^{b}	6,66 d (8,5)	116,3; CH^{b}	6,67 d (8,5)
4'	156,7; C	-	156,7; C	-
5'	116,4; CH^{b}	6,66 d (8,5)	116,3; CH^{b}	6,67 d (8,5)
6'	130,6; CH^{a}	6,97 d (8,5)	130,6; CH^{a}	6,98 d (8,5)
1''	134,5; C	-	134,5; C	-
2''	130,5; CH^{a}	6,95 d (8,5)	130,5; CH^{a}	6,96 d (8,5)
3''	116,2; CH^{b}	6,66 d (8,5)	116,2; CH^{b}	6,63 d (8,5)
4''	156,4; C	-	156,4; C	-
5''	116,2; CH^{b}	6,66 d (8,5)	116,2; CH^{b}	6,63 d (8,5)
6''	130,5; CH^{a}	6,95 d (8,5)	130,5; CH^{a}	6,96 d (8,5)
	Glcp		Glcp	
1'''	103,9; CH	4,32 d (7,8)	104,0; CH	4,32 d (7,8)
2'''	75,4; CH	3,18 t (8,4)	75,4; CH	3,18 t (8,4)
3'''	78,1; CH	3,37 m	78,1; CH	3,37 m
4'''	72,1; CH	3,36 m	72,1; CH	3,36 m
5'''	75,5; CH	3,52 m	75,5; CH	3,51 m
6'''	64,9; CH_2	4,34 dd (11,8; 6,6) 4,56 dd (11,8; 2,2)	64,9; CH_2	4,32 dd (11,9; 6,3) 4,55 dd (11,9; 2,1)
	E-3,4-DMC		pC	
1''''	128,9; C	-	127,3; C	-
2''''	111,7; CH	7,08 d (1,9)	131,4; CH	7,34 d (8,6)
3''''	150,9; C	-	116,9; CH	6,77 d (8,6)
4''''	153,0; C	-	161,4; C	-
5''''	112,8; CH	6,93 d (8,3)	116,9; CH	6,77 d (8,6)
6''''	124,2; CH	7,06 dd (8,3; 1,9)	131,4; CH	7,34 d (8,6)
7''''	146,9; CH	7,59 d (15,9)	147,0; CH	7,58 d (15,9)
8''''	116,3; CH^{b}	6,37 d (15,9)	115,1; CH	6,28 d (15,9)
9''''	169,0; C	-	169,3; C	-
3''''-OMe	56,6; CH_3	3,81 s	-	-
4''''-OMe	56,6; CH_3	3,85 s	-	-

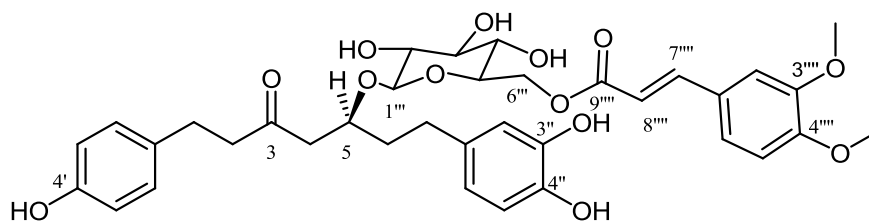
Glcp – glukopiranozil grupa; **E-3,4-DMC** – E-3,4-dimetoksicinamoil grupa; **pC** – para kumaroil grupa; ^{a,b} signali mogu biti međusobno zamenjeni; ^c signali preklapljeni signalom rastvarača – vrednosti dobijene iz HSQC spektra; ^d signal preklapljen signalom jednog od protona H-4

2.2.2.3. Složeni diarilheptanoidi sa jednom *p*-hidroksifenil i jednom kateholskom grupom u osnovnom skeletu

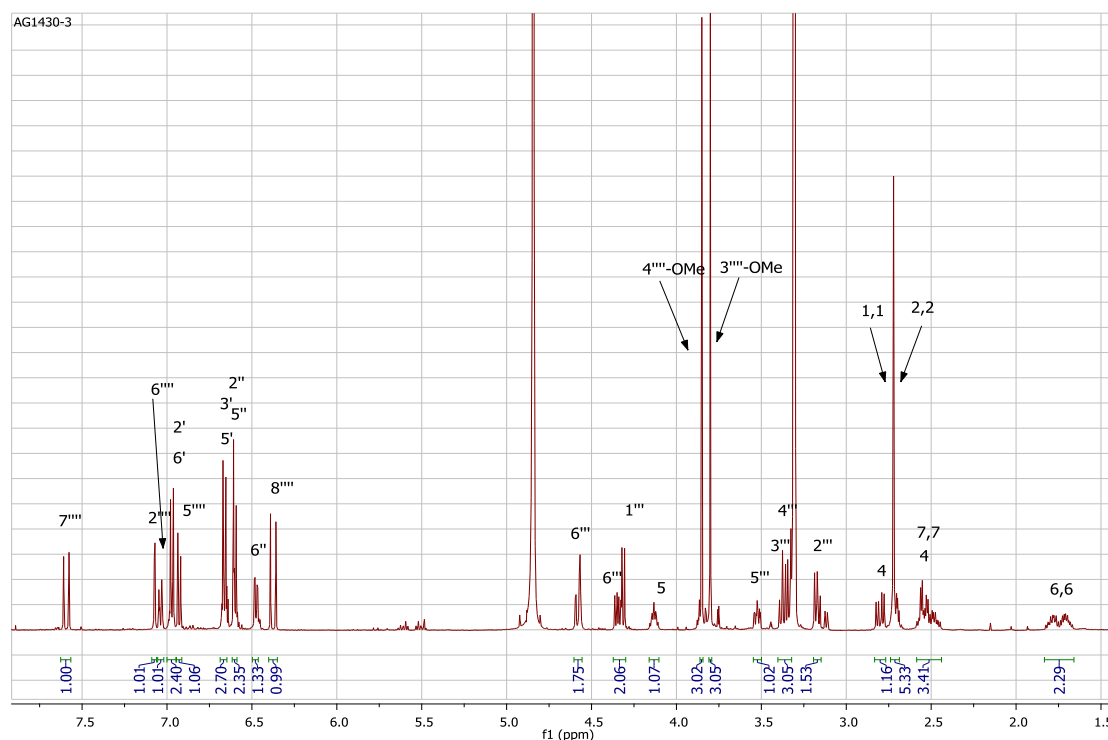
Ovo je grupa složenih diarilheptanoida koju čine četiri jedinjenja izolovana iz crne jove. U aromatičnim oblastima njihovih ^1H NMR spektara zapažaju se dva skupa signala (*d, d, dd*) karakteristična za 1,2,4-trisupstituisane aril grupe. Jedan potiče od kateholske grupe, a drugi od 3,4-DMC kiseline (u *E* ili *Z* obliku). Isto tako se uočavaju i signali AA'BB' spinskog sistema koji potiču od *p*-hidroksifenil grupe osnovnog skeleta.

Jedinjenje **38** (Slika 2.2.177) je izolovano u količini od 5 mg. Na osnovu poređenja NMR spektara ovog jedinjenja (Slike 2.2.178-2.2.185) i NMR spektara već izolovanih jedinjenja **29-37** zaključeno je da se radi o složenom diarilheptanoidu. U ^1H NMR spektru je uočen singlet od četiri protona ($\text{H}_2\text{-1}$ i $\text{H}_2\text{-2}$) na 2,72 ppm za koji je ranije pomenuto (u odeljcima **2.1** i **2.2** o jedinjenjima **1, 2, 3, 24, 25** i **27**) da se javlja ukoliko je u položaju 1 *p*-hidroksifenil, a u položaju 3 nekonjugovana keto grupa (Slika 2.2.178). Dubleti protona *p*-hidroksifenil grupe su uočeni na 6,68, odnosno 6,99 ppm (Tabela 2.2.12). Kateholska grupa je pretpostavljena na osnovu skupa signala *d, d, dd* koji se nalaze u oblasti 6,45-6,62 ppm ^1H NMR spektra (Slika 2.2.179), a njeno prisustvo je potvrđeno poređenjem sa ^1H NMR spektrima izolovanih složenih diarilheptanoida **29, 30, 31** i **32**. Položaj kateholske grupe (C-7) utvrđen je na osnovu HMBC korelacija H-7/C-1'', C-2'', H-2''/C-7 i H-6''/C-7 (Slike 2.2.182, 2.2.184 i 2.2.185, Tabela 2.2.12). Preostali signali u aromatičnoj oblasti ^1H NMR spektra (Slika 2.2.179) pripisani su *E*-3,4-DMC grupi na osnovu ^1H NMR spektara jedinjenja **29, 33** i **36** (Slike 2.2.109, 2.2.141, 2.2.165 i 2.2.179, Tabele 2.2.8, 2.2.9, 2.2.11 i 2.2.12), a dodatni dokaz je fragmentacioni jon $[\text{M-GlcDMC}]^+$ na m/z 327,1272 u HR-ESI-MS spektru (Slika 2.2.186). D-Glukopiranoza je prepoznata na osnovu NMR podataka sličnih podacima ostalih izolovanih složenih diarilheptanoida. β -Konfiguracija na anomernom C-atomu je određena na osnovu konstante kuplovanja od 7,8 Hz dubleta anomernog protona na 4,31 ppm. Signali za oba $\text{H}_2\text{-6}''$, na višim hemijskim pomeranjima u odnosu na diarilheptanoid glukozide sa slobodnom $6''\text{-OH}$ grupom (npr. platifilozid (**1**), Slika 2.1.4) dokaz su da je $6''\text{-OH}$ u ovom jedinjenju esterifikovana *E*-3,4-DMC kiselinom kao kod jedinjenja **29, 33** i **36**. HMBC korelacije oba $\text{H}_2\text{-6}''$ sa karbonylnim C-9''' (Slika 2.2.183) su potvrda položaja 3,4-DMC grupe. D-Glukoza je vezana za C-5 heptanskog skeleta preko C-1''' (HMBC korelacija H-1'''/C-5; Slika 2.2.183). Kvazimolekulski jon

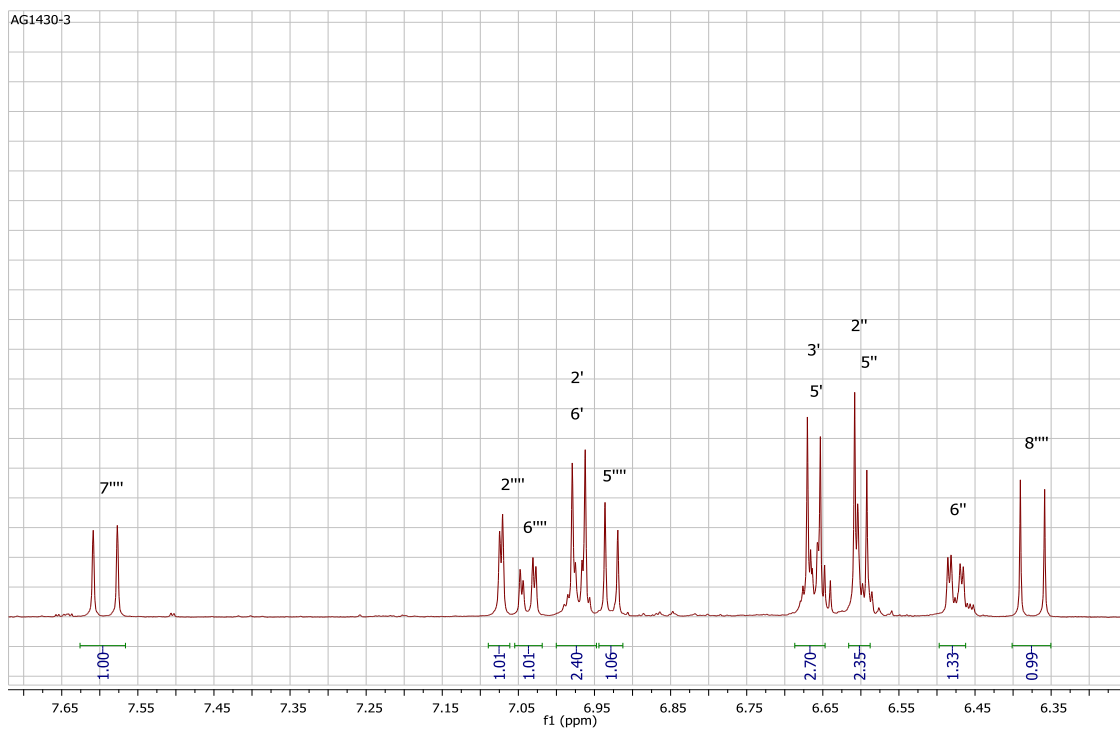
[M-H]⁻ na m/z 681,2594 uočen u HR-ESI-MS spektru (Slika 2.2.186) je potvrdio pretpostavljenu strukturu (Slika 2.2.177). Kao kod jedinjenja 29, 33 i 36, za konfiguraciju dvostruke veze je utvrđeno da je *E* na osnovu konstante sprezanja $J_{H-7''''/H-8''''} = 16,0$ Hz. Na Slici 2.2.185 dat je deo HMBC spektra na osnovu kojeg se razlikuju C-1 i C-7 atomi čiji su signali bliski u ¹³C NMR spektru (Slika 2.2.180, Tabela 2.2.12). Konfiguracija na C-5 je određena kao *S* na osnovu CD spektra koji je bio veoma sličan CD spektru platifilozida (1). Pravilom ¹³C glikozidacionog pomeranja ona je potvrđena, jer je poređenjem ¹³C NMR spektara jedinjenja 38 i njegovog aglikona⁷⁸ nađeno da je $\Delta\delta_{C4} > \Delta\delta_{C6}$ (2,5 > 1,8). $[\alpha]_D$ vrednost za jedinjenje 38 iznosi -2,5. Kako za ovo jedinjenje nema podataka u literaturi, ono se smatra novim prirodnim proizvodom.



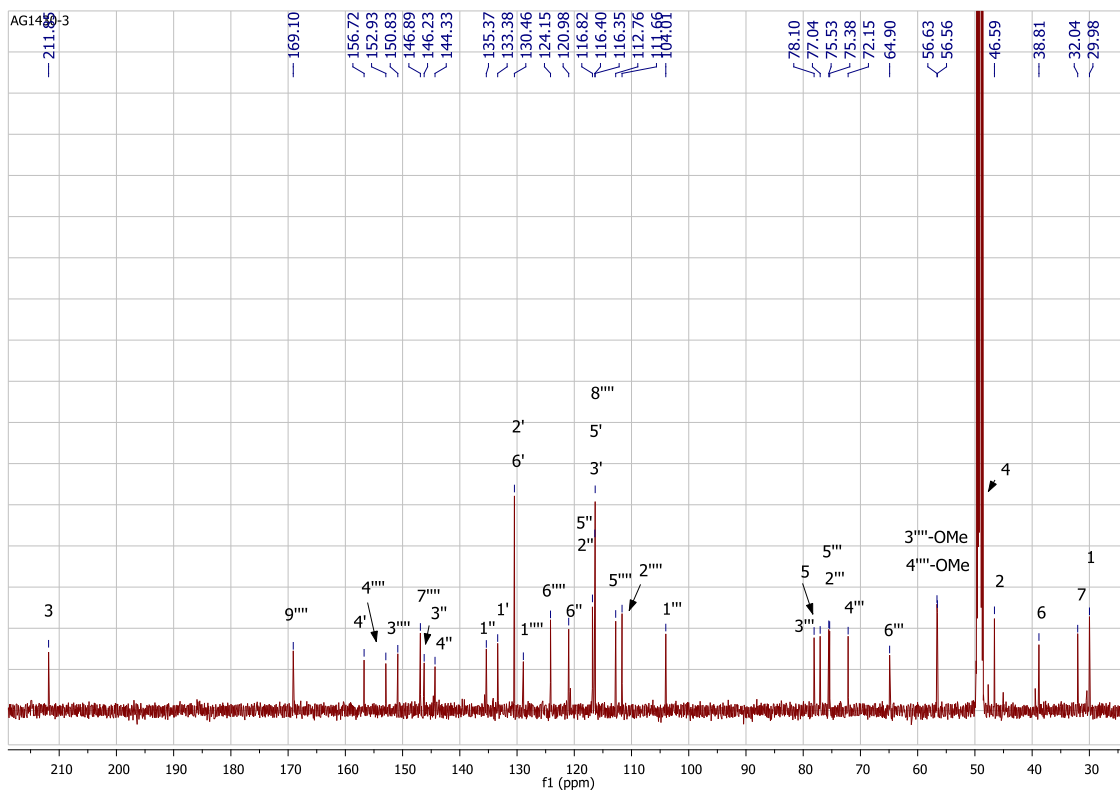
Slika 2.2.177. Strukturna formula jedinjenja 38



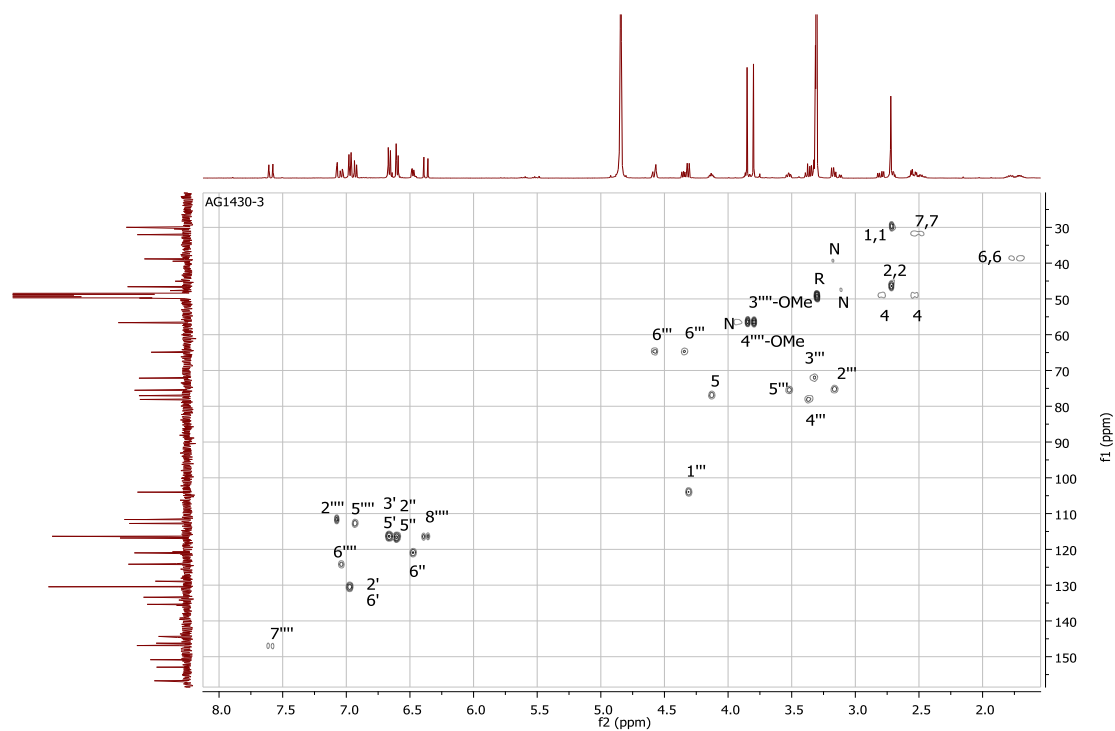
Slika 2.2.178. ¹H NMR spektar jedinjenja 38



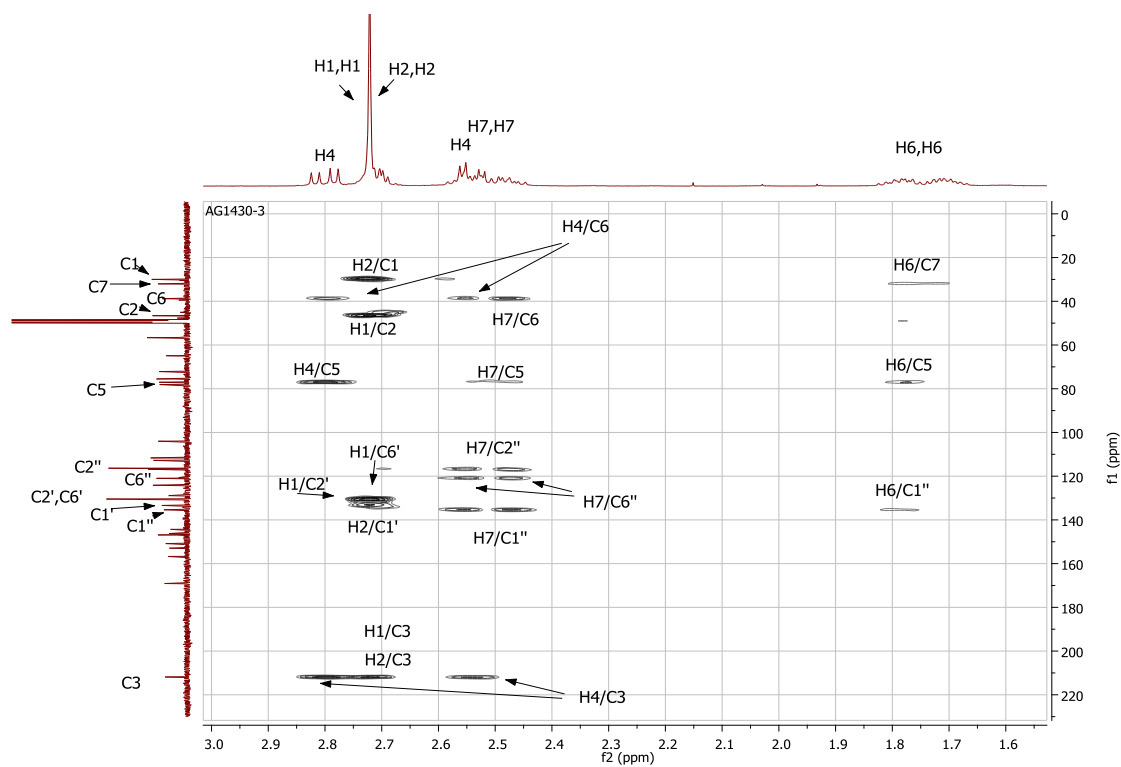
Slika 2.2.179. Signali aromatičnih i olefinskih protona u ^1H NMR spektru jedinjenja **38**



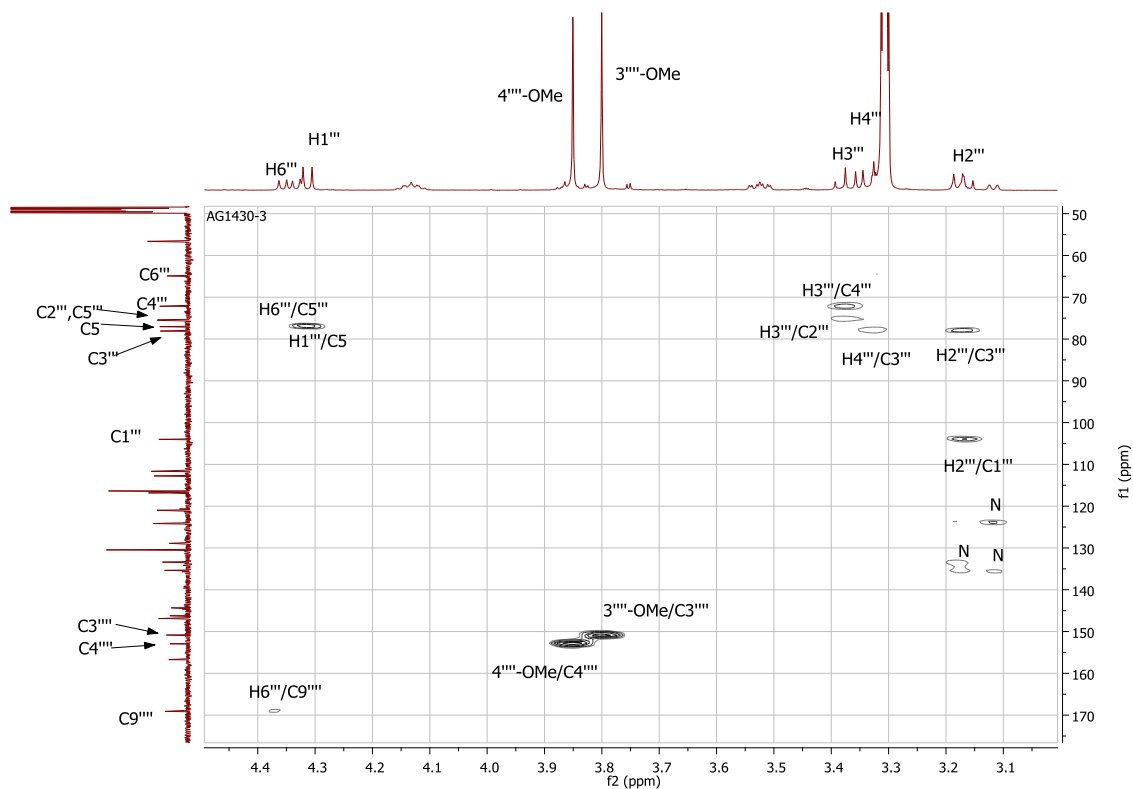
Slika 2.2.180. ^{13}C NMR spektar jedinjenja **38**



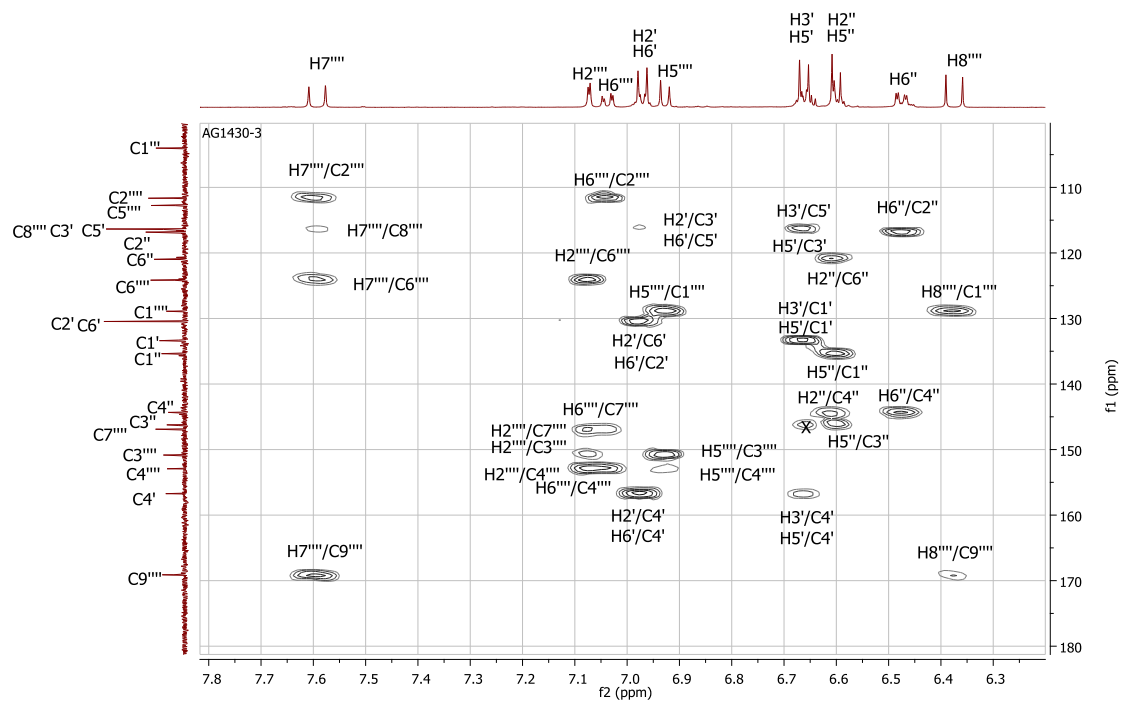
Slika 2.2.181. HSQC spektar jedinjenja 38



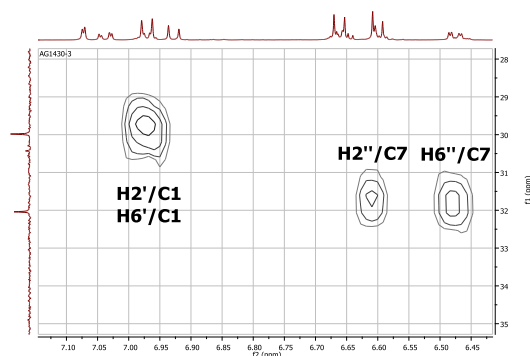
Slika 2.2.182. HMBC korelacije heptanoidnih protona (bez H-5) jedinjenja 38



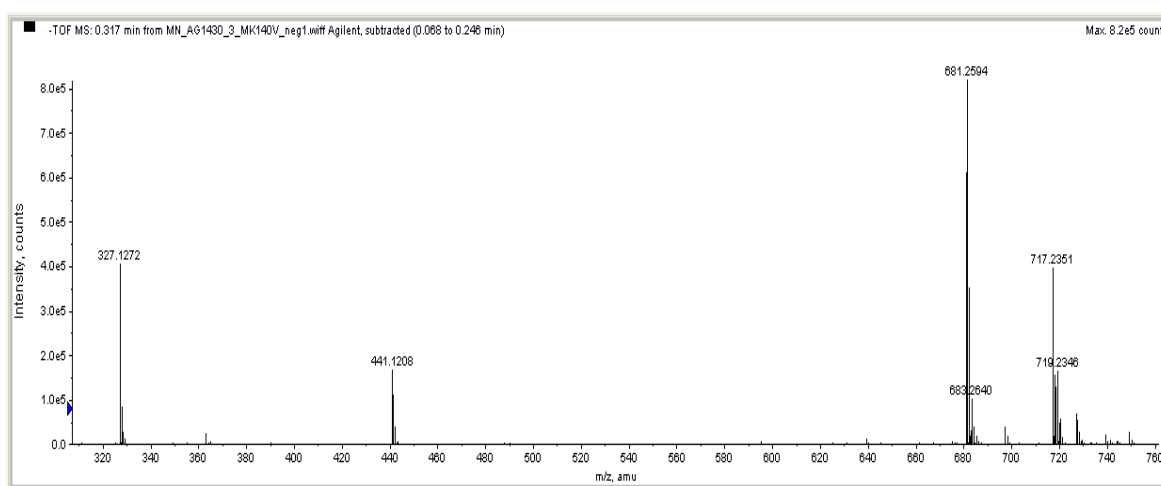
Slika 2.2.183. HMBC korelacije saharidnih i protona metoksi grupa jedinjenja 38



Slika 2.2.184. HMBC korelacije aromatičnih i olefinskih protona jedinjenja 38



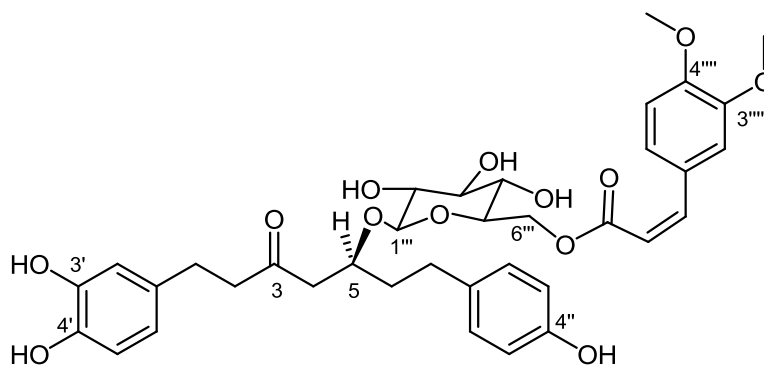
Slika 2.2.185. HMBC korelacije ključne za razlikovanje C-1 od C-7 u jedinjenju **38**



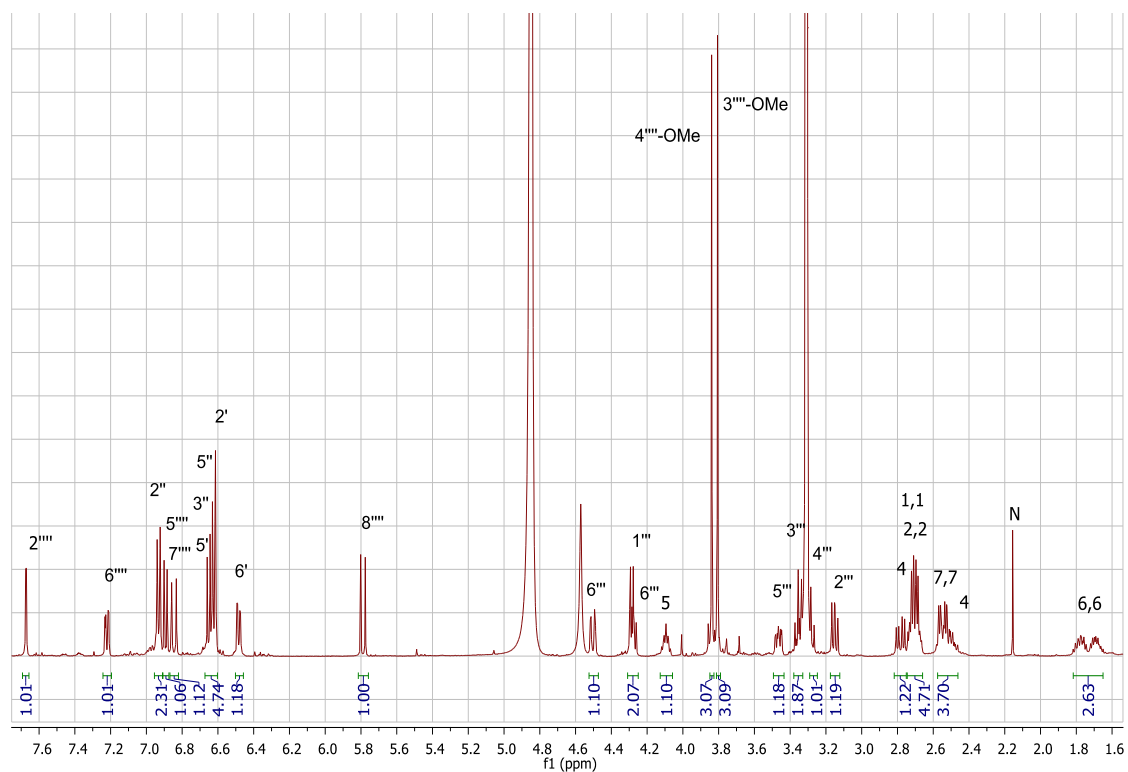
Slika 2.2.186. HR-ESI-MS spektar jedinjenja **38**

Jedinjenje **39** (Slika 2.2.187) je izolovano u količini od 1,5 mg. Na osnovu NMR spektara zaključeno je da se radi o složenom diarilheptanoidu. Ista molekulska formula kao za jedinjenje **38** – $C_{36}H_{42}O_{13}$, dobijena na osnovu kvazimolekuskog jona $[M-H]^-$ na m/z 681,2586 u HR-ESI-MS spektru (Slika 2.2.196) uputila je, zajedno sa sličnim NMR spektima, na izomer jedinjenja **38**. Kako je u delu 1H NMR spektra sa hemijskim pomeranjima nižim od 3 ppm (Slika 2.2.189) izostao singlet od četiri protona H_{2-1} i H_{2-2} (za razliku od jedinjenja **1**, **2**, **3**, **24**, **25**, **27** i **37**), i kako je u ^{13}C NMR spektru uočen signal keto grupe na 211,5 ppm (Slika 2.2.192), zaključeno je da se u položaju 1 heptanskog skeleta nalazi kateholska, a da je u položaju 7 *p*-hidroksifenil grupa (Slika 2.2.187), suprotno jedinjenju **38**. Ovo je dokazano odgovarajućim HMBC

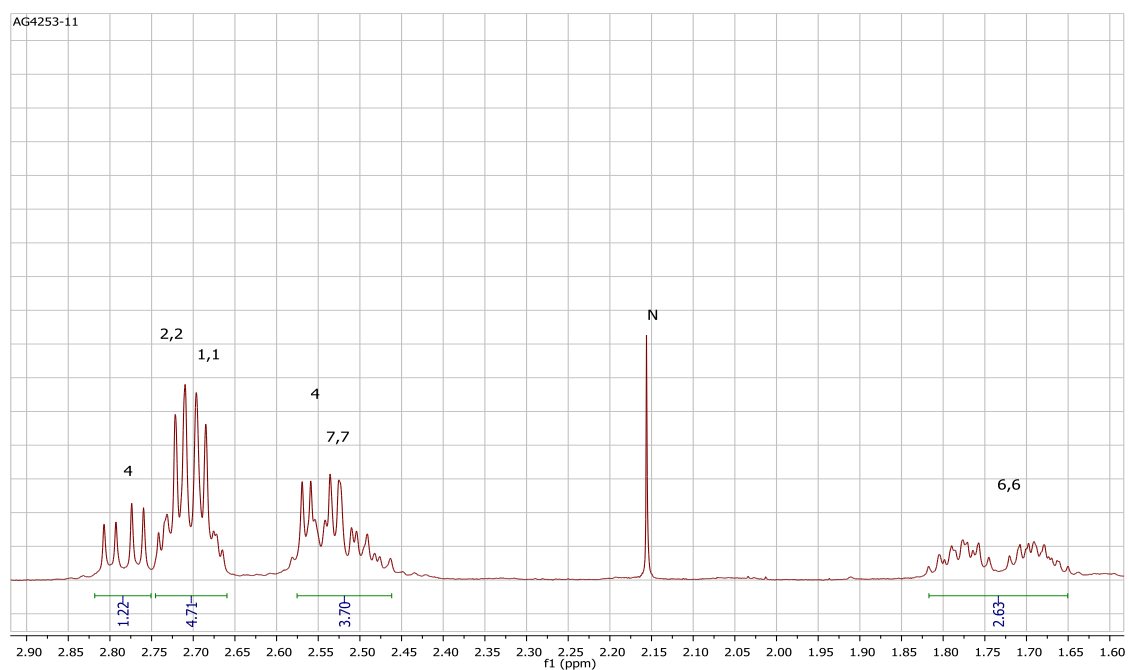
korelacijama H-1/C-1',C-2',C-6', H-7/C-1'',C-2'',C-6'', H-2'/C-1 i H-2''/C-7 (**Slike 2.2.194 i 2.2.195**). Signali za protone dve metoksi grupe u ^1H NMR spektru na 3,81, odnosno 3,84 ppm (**Slika 2.2.190**) su, zajedno sa podatkom o masi i jonu $[\text{M-OGlcDMC}]^-$ na m/z 311,1315 (**Slika 2.2.196**), uputili na 3,4-DMC kiselinu. U aromatičnoj oblasti ^1H NMR spektra uočeni dodatni skup signala *d, d, dd* karakterističan za 1,2,4-trisupstituisanu aril grupu bio je potvrda 3,4-DMC kiseline (**Slika 2.2.191**). Međutim, izgled aromatičnog dela ^1H NMR spektra (**Slika 2.2.191**) je bio drugačiji nego kod jedinjenja **38** (**Slika 2.2.179**) koje ima *E*-3,4-DMC kiselinu. Dublet koji potiču od protona dvostruke veze 3,4-DMC kiseline ($\delta_{\text{H-7}''''}$ 6,87, $\delta_{\text{H-8}''''}$ 5,79, $J_{\text{H-7}''''/\text{H-8}''''}$ =13,0 Hz; **Slika 2.2.191**) slagali su se sa onima iz jedinjenja **30**, što je uputilo na *Z* dvostruku vezu. Isto važi i za dublet koji potiče od H-2'''' koji je u ^1H NMR spektru jedinjenja **39** na 7,67 ppm, dok je u ^1H NMR spektrima jedinjenja sa *E* konfiguracijom dvostruke (**29, 33, 36, 38**) veze na $\sim 7,1$ ppm. Konfiguracija na C-5 je određena kao *S* na osnovu CD spektra sličnog drugim strukturno sličnim diarilheptanoidima sa *S* konfiguracijom na C-5 (ukoliko imaju keto grupu na C-3). Pravilom ^{13}C glikozidacionog pomeranja ona je potvrđena jer je poređenjem ^{13}C NMR spektara jedinjenja **39** i hirsutanonola (**14**) (**Slika 2.2.2, Tabele 2.2.1 i 2.2.12**), kao jedinjenja najbližnjeg aglikonu, uočeno da je $\Delta\delta_{\text{C}4} > \Delta\delta_{\text{C}6}$ ($2,8 > 2,3$). $[\alpha]_{\text{D}}$ vrednost za jedinjenje **39** iznosi -10,0. Pregledom literature nisu pronađeni podaci o ovom jedinjenju pa je zaključeno da se radi o novom prirodnom proizvodu.



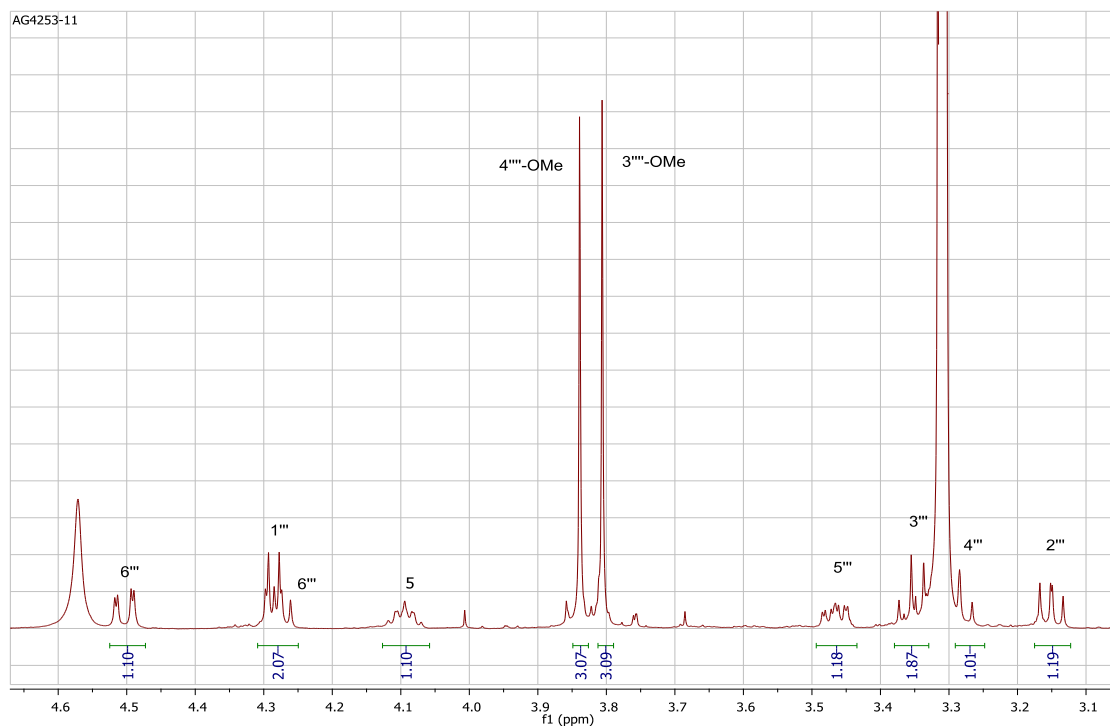
Slika 2.2.187. Strukturna formula jedinjenja **39**



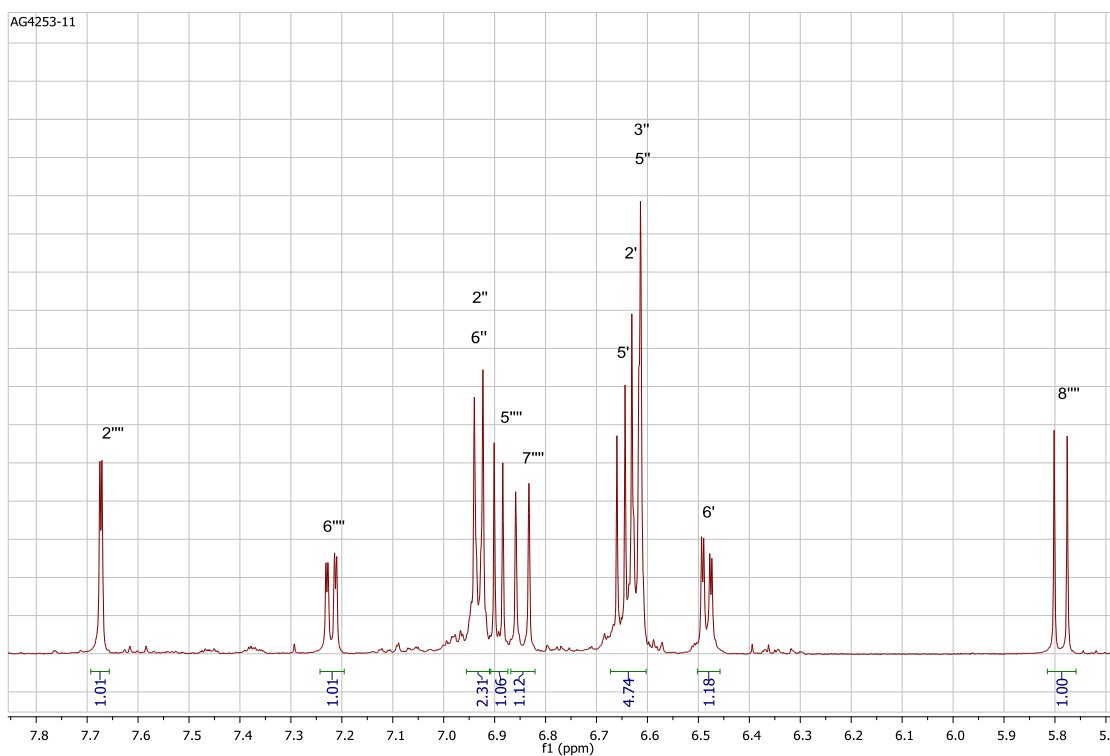
Slika 2.2.188. ^1H NMR spektar jedinjenja 39



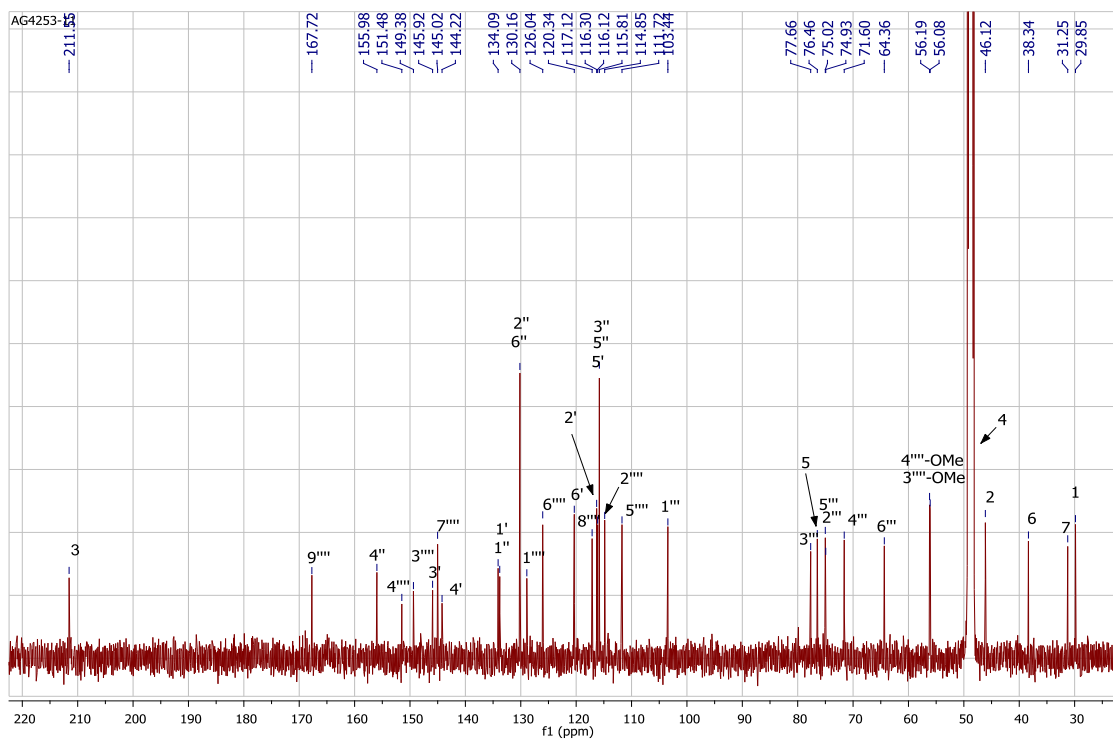
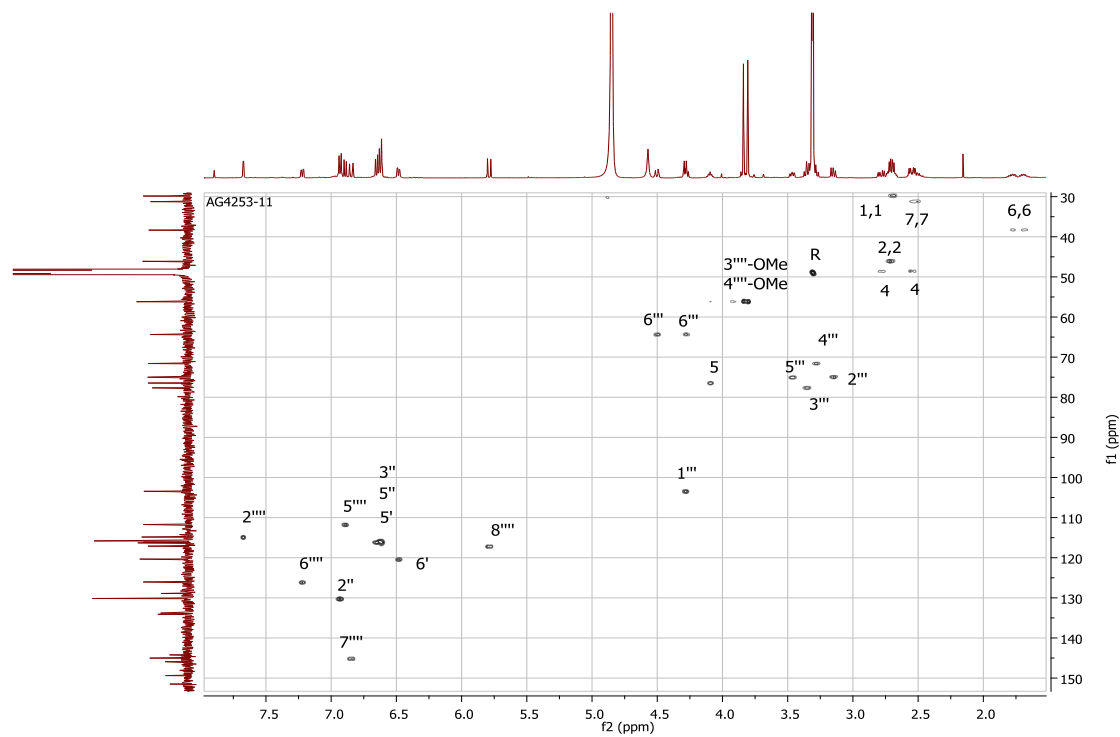
Slika 2.2.189. Signali heptanoidnih protona (bez H-5) u ^1H NMR spektru jedinjenja 39



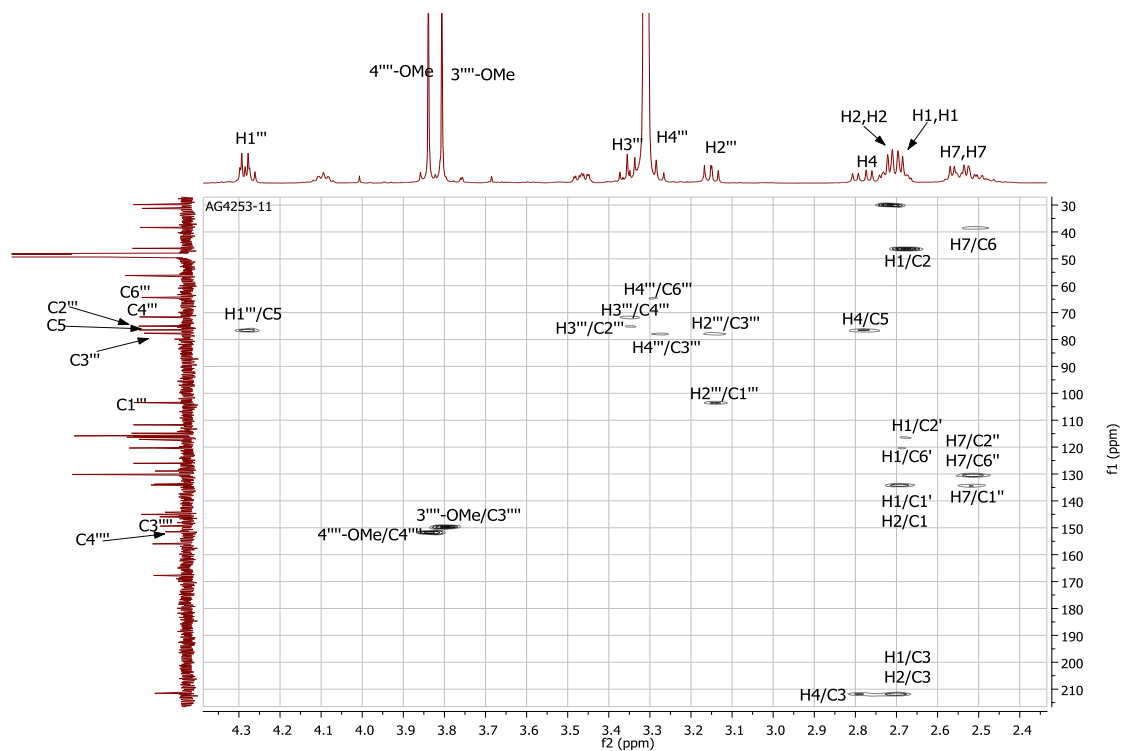
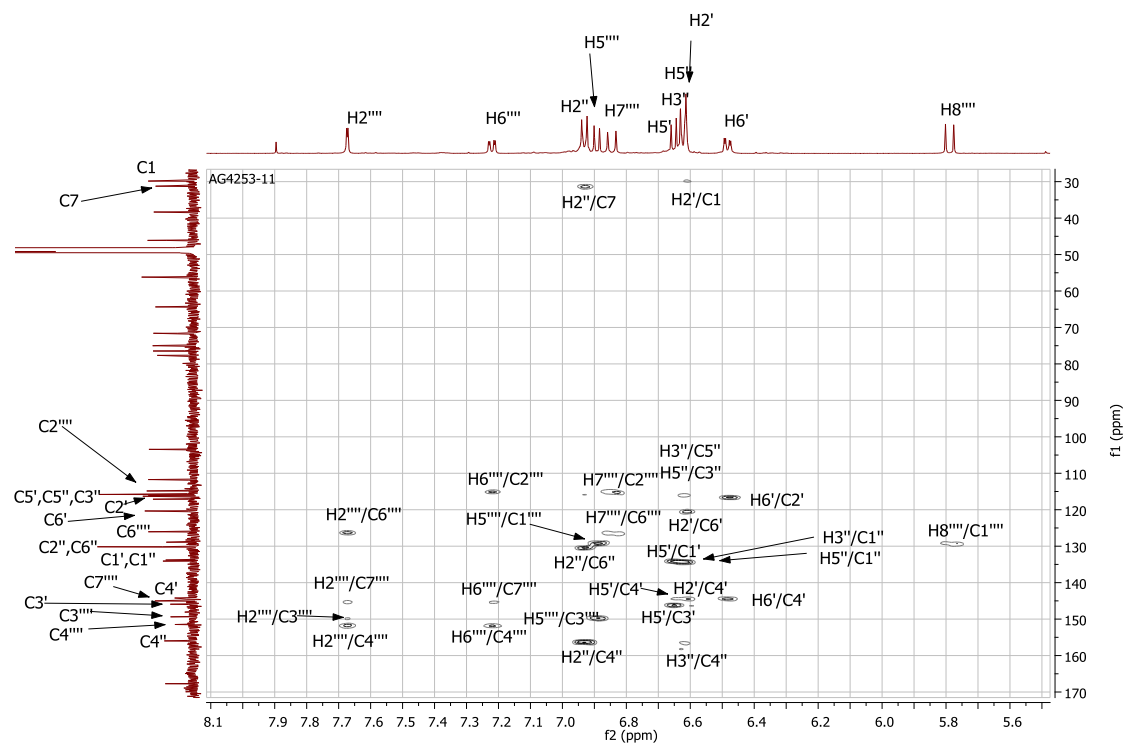
Slika 2.2.190. Signali saharidnih, H-5 i protona metoksi grupa u ^1H NMR spektru jedinjenja 39

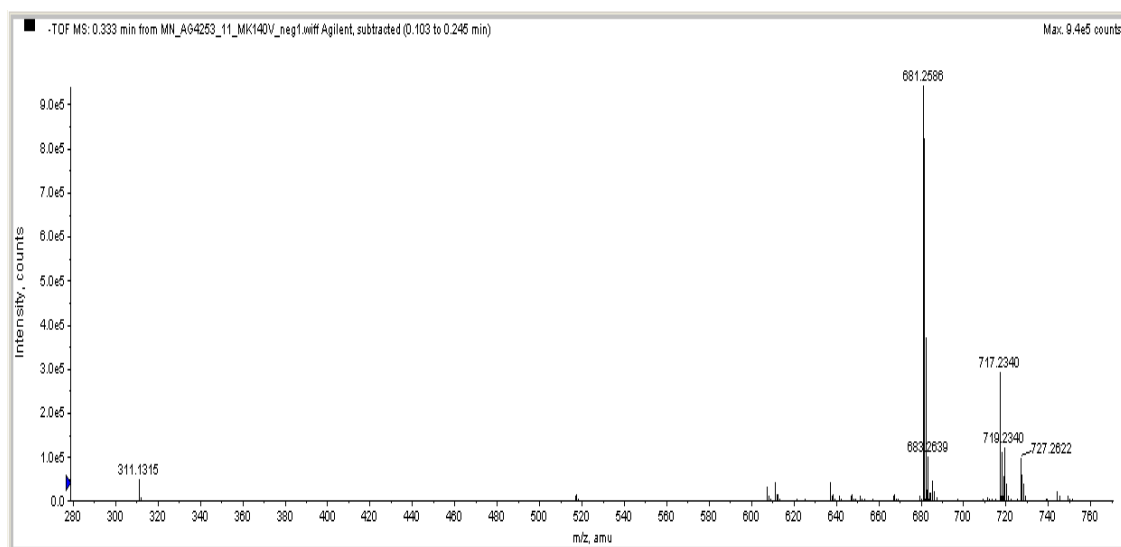


Slika 2.2.191. Signali aromatičnih i olefinskih protona u ^1H NMR spektru jedinjenja 39

Slika 2.2.192. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 39

Slika 2.2.193. HSQC spektar jedinjenja 39

Slika 2.2.194. HMBC korelacije alifatičnih protona jedinjenja **39**Slika 2.2.195. HMBC korelacije aromatičnih i olefinskih protona jedinjenja **39**



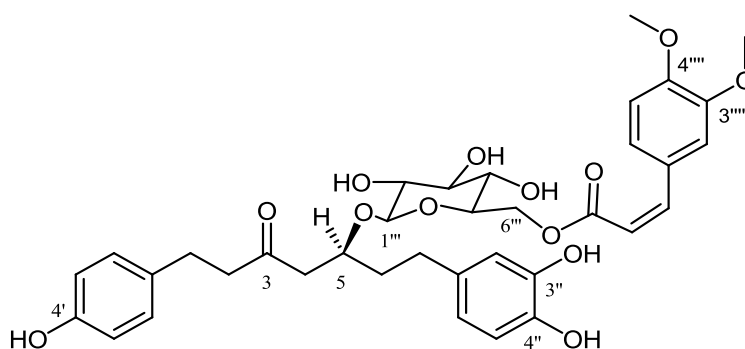
Slika 2.2.196. HR-ESI-MS spektar (negativan mod) jedinjenja 39

Tabela 2.2.12. ^{13}C i ^1H NMR podaci za jedinjenja **38** i **39** (CD_3OD)

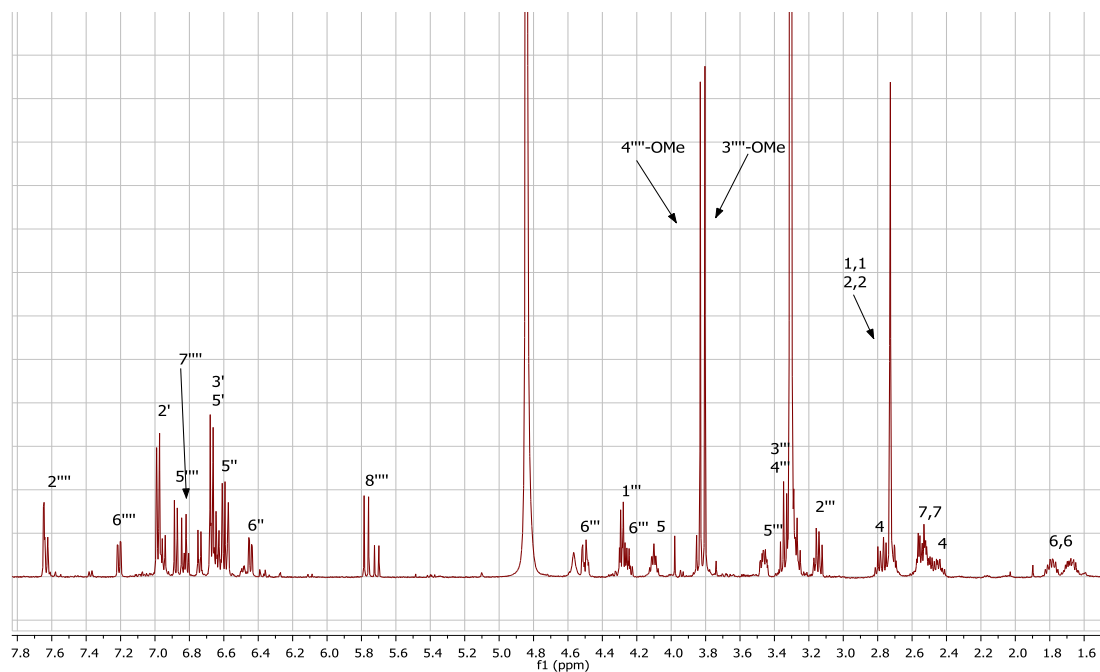
C/H	38		39	
	δ_{C} , tip	δ_{H} (J u Hz)	δ_{C} , tip	δ_{H} (J u Hz)
1	30,0; CH_2	2,72 brs	29,9; CH_2	2,69 A_2B_2
2	46,6; CH_2	2,72 brs	46,1; CH_2	2,72 A_2B_2
3	211,9; C	-	211,6; C	-
4	49,0; CH_2^{a}	2,54 dd (16,5; 5,2) 2,80 dd (16,5; 7,1)	48,6; CH_2^{a}	2,55 dd (16,6; 5,2) 2,78 dd (16,6; 7,2)
5	77,0; CH	4,13 m	76,5; CH	4,09 m
6	38,8; CH_2	1,71 m; 1,78 m	38,3; CH_2	1,69 m; 1,78 m
7	32,0; CH_2	2,50 m	31,3; CH_2	2,55 m^{b}
1'	133,4; C	-	133,8; C	-
2'	130,5; CH	6,97 d (8,5)	116,3; CH	6,62 d (2,0)
3'	116,4; CH	6,66 d (8,5)	145,9; C	-
4'	156,7; C	-	144,2; C	-
5'	116,4; CH	6,66 d (8,5)	116,1; CH	6,66 d (8,0)
6'	130,5; CH	6,97 d (8,5)	130,3; CH	6,48 dd (8,0; 2,0)
1''	134,4; C	-	134,1; C	-
2''	116,8; CH	6,61 d (2,1)	130,2; CH	6,93 d (8,5)
3''	146,2; C	-	115,8; CH	6,62 d (8,5)
4''	144,3; C	-	156,0; C	-
5''	116,4; CH	6,60 d (8,0)	115,8; CH	6,62 d (8,5)
6''	121,0; CH	6,48 dd (8,0; 2,1)	130,2; CH	6,93 d (8,5)
	Glc		Glc	
1'''	104,0; CH	4,31 d (7,8)	103,4; CH	4,28 d (7,8)
2'''	75,4; CH	3,18 dd (9,0; 7,8)	74,9; CH	3,15 dd (9,0; 7,8)
3'''	78,1; CH	3,38 t (9,0)	77,7; CH	3,36 t (9,0)
4'''	72,1; CH	3,33 t (9,3)	71,6; CH	3,28 m
5'''	75,5; CH	3,52 m	75,0; CH	3,47 m
6'''	64,9; CH_2	4,35 dd (11,8; 6,6) 4,58 dd (11,8; 2,2)	64,3; CH_2	4,28 dd (11,9; 6,4) 4,50 dd (11,9; 2,1)
	E-3,4-DMC		Z-3,4-DMC	
1''''	128,9; C	-	128,9; C	-
2''''	111,7; CH	7,07 d (1,9)	111,7; CH	7,67 d (2,0)
3''''	150,8; C	-	149,4; C	-
4''''	152,9; C	-	151,5; C	-
5''''	112,8; CH	6,93 d (8,4)	114,9; CH	6,89 d (8,5)
6''''	124,2; CH	7,04 dd (8,4; 1,9)	126,0; CH	7,22 dd (8,5; 2,0)
7''''	146,9; CH	7,59 d (15,9)	145,0; CH	6,85 d (13,0)
8''''	116,4; CH	6,37 d (15,9)	117,1; CH	5,79 d (13,0)
9''''	169,1; C	-	167,7; C	-
3''''-OMe	56,6; CH_3	3,80 s	56,2; CH_3	3,81 s
4''''-OMe	56,6; CH_3	3,85 s	56,1; CH_3	3,84 s

Glc – glukopiranozil grupa; **E-3,4-DMC** – E-3,4-dimetoksicinamoil grupa; **Z-3,4-DMC** – Z-3,4-dimetoksicinamoil grupa; ^a signali preklapljeni signalom rastvarača – vrednosti dobijene iz HSQC spektra; ^b signal preklapljen signalom jednog od protona H-4

Pored navedenih izolovanih jedinjenja, dva jedinjenja koja nisu u potpunosti bila prečišćena strukturno su određena na osnovu poređenja NMR spektara smeše i NMR spektara prethodno identifikovanih diarilheptanoida. Tako je struktura jedinjenja **40** (Slika 2.2.197) određena na osnovu ^1H NMR spektra datog na Slici 2.2.198. Iako je u pitanju smeša najmanje dva jedinjenja signali najzastupljenijeg jedinjenja su se u heptanoidnom i saharidnom delu ^1H NMR spektra odlično poklopili sa signalima jedinjenja **38** (Slika 2.2.178). Razlike su uočene u aromatičnom delu ^1H NMR spektra; dublet na $\sim 5,8$ ppm sa konstantom sprezanja od 13,0 Hz, karakterističan za H-8 $'''$ u složenim diarilheptanoidima sa *Z* konfiguracijom dvostruke veze u cinamičnim kiselinama (**30**, **34**, **39**), ukazao je na ovaj strukturni element u jedinjenju **40**. Kako su već izolovani parovi izomera na dvostrukoj vezi cinamične kiseline (jedinjenja **29** i **30**, i **33** i **34**) po analogiji su prepoznati signali *Z* izomera jedinjenja **38**. Pored toga, jedinjenje **40** je u toku HPLC hromatografije eluirano (u smeši) odmah nakon jedinjenja **38**, sa malom razlikom u retencionom vremenu, što je išlo u prilog činjenici da su u pitanju izomeri. Zbog male količine i nedovoljne čistoće nije određena $[\alpha]_D$ vrednost niti je ispitivana biološka aktivnost jedinjenja **40**. U literaturi nema podataka o ovom jedinjenju, pa se ono, iako nije potpuno okarakterisano, smatra novim prirodnim proizvodom.

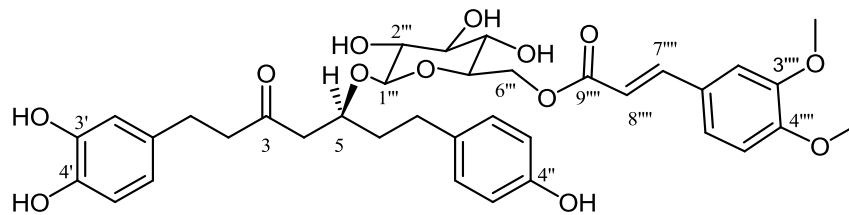


Slika 2.2.197. Strukturna formula jedinjenja **40**

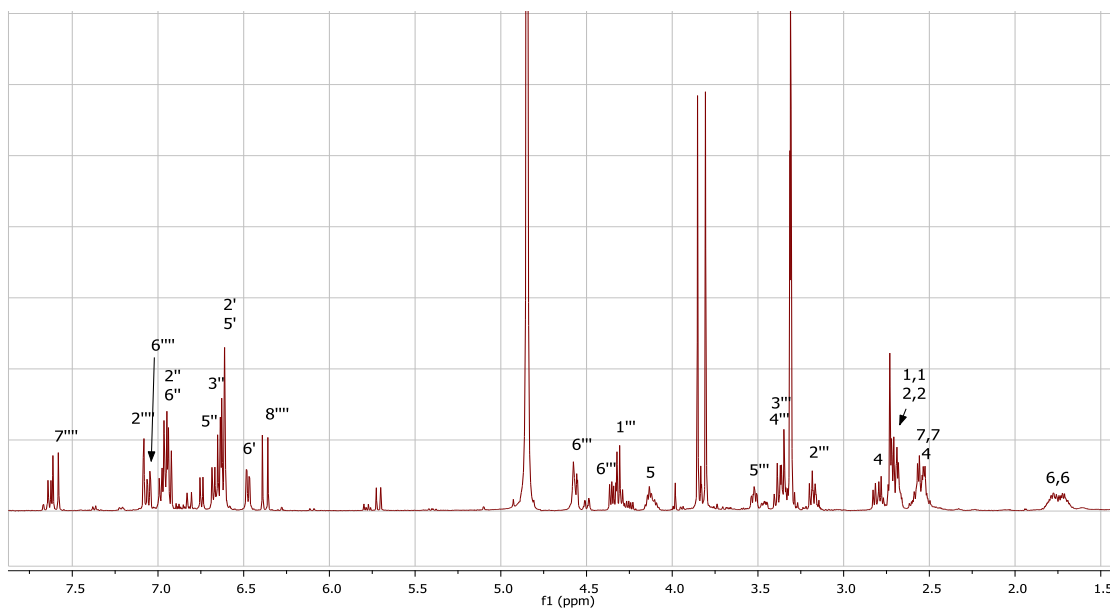
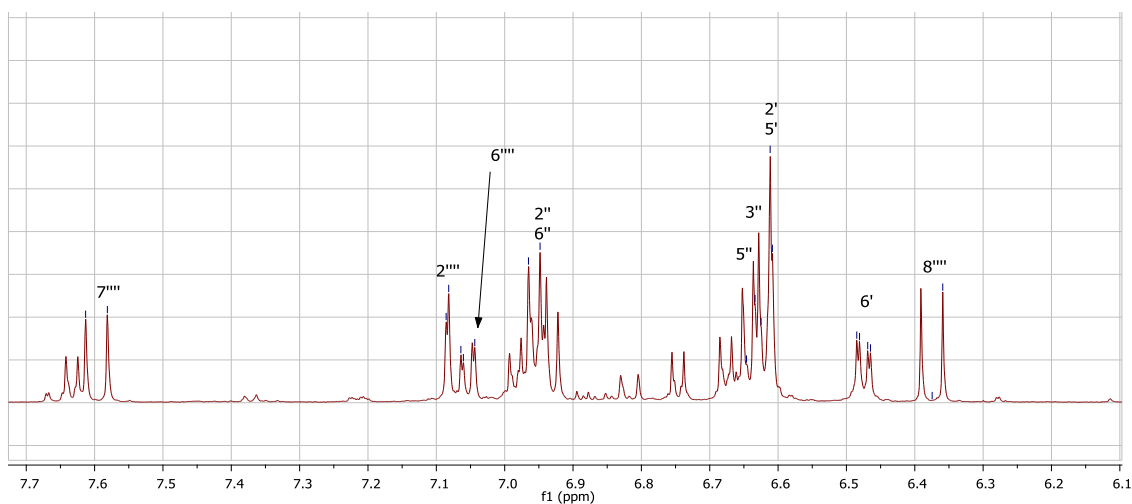


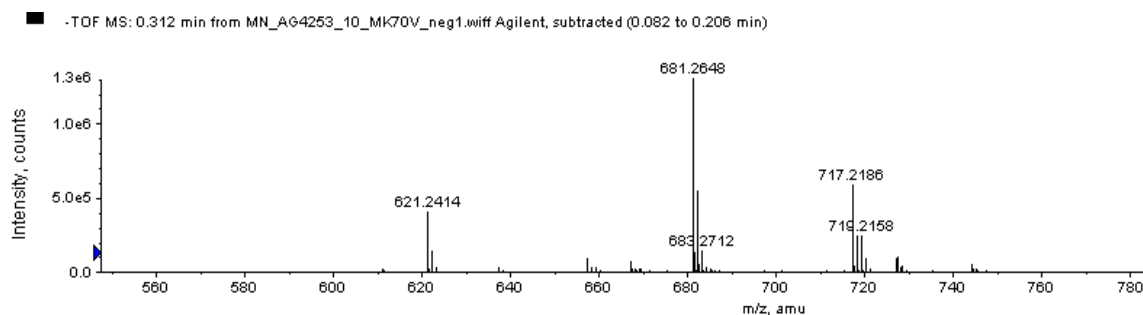
Slika 2.2.198. ^1H NMR spektar smeše iz kojeg su prepoznati signali jedinjenja **40**

Drugo jedinjenje identifikovano iz smeše na osnovu NMR (**Slike 2.2.200** i **2.2.201**) i HR-ESI-MS spektara (**Slika 2.2.202**) je jedinjenje **41** (**Slika 2.2.199**). U ^1H NMR spektru (**Slika 2.2.200**) su prisutni karakteristični signali koji su ranije uočeni u ^1H NMR spektrima već poznatih izolovanih složenih diarilheptanoida. Na osnovu HR-ESI-MS spektra, kvazimolekulski jon $[\text{M-H}]^-$ na m/z 681,2586 je uputio na istu molekulska formulu kao za jedinjenje **38** (kvazimolekulski jon $[\text{M-H}]^-$ na m/z 681,2591; **Slika 2.2.186**). Pored toga, velika sličnost ^1H NMR spektara jedinjenja **38** i **41** (**Slike 2.2.179** i **2.2.200**) potvrdila je da su oni izomeri. Kako su uočeni prepoznatljivi dubleti protona dvostruke veze na 6,37, odnosno 7,60 ppm, sa konstantom sprezanja od 16,0 Hz i singleti protona dve metoksi grupe na 3,81, odnosno 3,85 ppm, jasno je bilo da je kiselinasti deo kojim je esterifikovana D-glukoza *E*-3,4-DMC kiselina, kao kod jedinjenja **38**. Razlika je uočena u heptanoidnom delu ^1H NMR spektra gde je izostao singlet za $\text{H}_2\text{-1}$ i $\text{H}_2\text{-2}$ što je ukazalo da u položaju 1 nije *p*-hidroksifenil grupa, već kateholska, kao što se vidi iz strukturne formule na **Slici 2.2.199**, a što je obrazloženo u odeljcima **2.1** i **2.2**, za jedinjenja **1**, **2**, **3**, **24**, **25** i **27**. Zbog male količine i nedovoljne čistoće nije određena optička rotacija niti je ispitivana biološka aktivnost jedinjenja **41**. U literaturi nema podataka o ovom jedinjenju, pa se ono, iako nije potpuno okarakterisano, smatra novim prirodnim proizvodom.



Slika 2.2.199. Strukturna formula jedinjenja 41

Slika 2.2.200. ^1H NMR spektar smeše iz koje su prepoznati signali jedinjenja 41Slika 2.2.201. Signali aromatičnih i olefinskih protona jedinjenja 41 u ^1H NMR spektru smeše



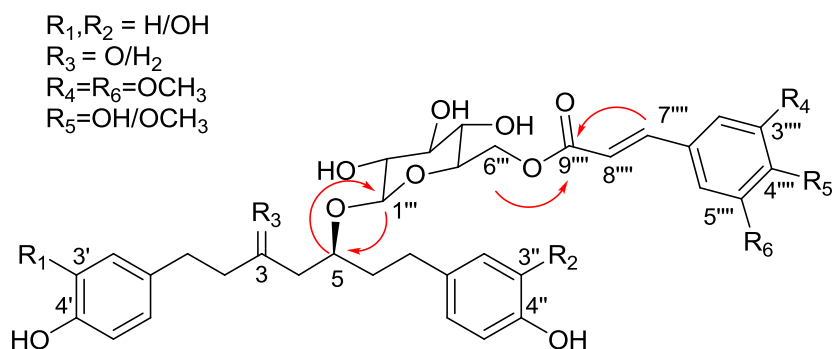
Slika 2.2.202. HR-ESI-MS spektar jedinjenja 41

2.3. Strukturne karakteristike diarilheptanoida izolovanih iz zelene i crne jove

Iz zelene i crne jove izolovano je ukupno 39 jedinjenja (Slike 2.1.1 i 2.2.1) od čega je 19 novih prirodnih proizvoda, 6 iz zelene (**3**, **7**, **8**, **9**, **11** i **13**) i 13 (**19**, **27**, **29-39**) iz crne. Još dva nova, jedinjenja **40** i **41**, nisu potpuno okarakterisana, jer nisu izolovana dovoljno čista, ali im je struktura određena.

Svi diarilheptanoidi izolovani iz kore zelene jove imaju zajedničku karakteristiku da su aril grupe isključivo *p*-hidroksifenil grupe i da uopšte nema kateholških grupa kao kod drugih jova (crna, siva, crvena i dr.). Među izolovanim jedinjenjima najviše je bilo diarilheptanoid glikozida (**1**, **2**, **3**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9**, **10**, **11**), jedan prosti diarilheptanoid (**4**) i jedan složeni (**3**), sa galnom kiselinom estarski vezanom za monosaharid. Dva jedinjenja su imala dvostruku vezu na heptanskom nizu (**4** i **9**). Isto tako, za zelenu jovu su karakteristični disaharidi (**2**, **6**, **7**, **8**, **9**, **11**) u kojima je prvi monosaharid, onaj koji je vezan za heptanski niz, uvek D-glukoza, dok je drugi najčešće D-apioza, a sreće se i L-arabinoza. Drugi monosaharidi su za D-glukozu isključivo vezani $\beta(1-6)$ glikozidnim vezama. Diarilheptanoidi sa fenolnim kiselinama u svojoj strukturi nisu karakteristični za zelenu jovu, mada je jedan takav izolovan (**3**). Dva izolovana jedinjenja (**12** i **13**) ne pripadaju grupi diarilheptanoida. Šest jedinjenja izolovanih iz kore zelene jove su izolovani ranije iz biljne vrste *Betula platyphylla* var. *japonica*⁴⁶ (**1**, **2**, **4**, **6**, **10**, **12**) i četiri iz *Betula papyrifera*⁴⁴ (**1**, **4**, **5**, **12**) ukazujući na hemotaksonomsku vezu *A. viridis* sa ovim biljnim vrstama i potvrđujući blisku vezu rodova *Alnus* i *Betula* u okviru porodice Betulaceae.

Diarilheptanoidi izolovani iz kore crne jove su znatno raznovrsniji po strukturi. Oni od aril grupa imaju i *p*-hidroksifenil i kateholske grupe, a daleko brojniji su oni sa katehol-skim grupama. U heptanskom nizu mogu imati i keto grupe i dvostruke veze. Mogu biti prosti diartilheptanoidi, diartilheptanoid glikozidi i složeni - diartilheptanoid glikozidi sa fenolnim (cinamičnim) kiselinama estarski vezanim za monosaharid (D-glukozu). Za crnu jovu nisu karakteristični disaharidni diartilheptanoidi; tačnije, nijedan disaharidni glikozid nije ni izolovan, već isključivo monosaharidi, gde dominiraju D-glukozidi, a sreću se još samo i D-ksilozidi. Ipak, glavna karakteristika diartilheptanoidnog sastava jesu složeni diartilheptanoid glikozidi. Karakteristične korelacije u HMBC spektrima svih novih složenih diartilheptanoida (**29-41**) date su na **Slici 2.2.203**. D-Glukoza nije dokazana samo NMR spektroskopijom u kombinaciji sa literaturnim podacima nego i tačnom hromatografijom sa elektrohemijom detekcijom hidrolizata novih jedinjenja (postupak kisele hidrolize dat u Eksperimentalnom delu u poglavlju **3.3.2**), uz pomoć standarda D-glukoze. Iako su iz drugih vrsta jova izolovani i ksilozidi sa vezanim fenolnim kiselinama³¹, ovde to nije bio slučaj. Od fenolnih kiselina to su isključivo bile cinamične kiseline i one su po pravilu bile estarski vezane za C-6''' D-glukoze. Odlika ovih složenih diartilheptanoida je da su pri normalnim uslovima nestabilni i da brzo izomerizuju na dvostrukoj vezi dajući smešu izomera *E:Z* ~ 3:1. Ono što se dalo pretpostaviti na osnovu odnosa izomera je da su složeni diartilheptanoidi sa *Z* dvostrukom vezom nestabilniji i da brže prelaze u smešu izomera pomenutog odnosa. Najveći broj prostih diartilheptanoida i diartilheptanoid glikozida izolovanih iz crne jove (*A. glutinosa*) bio je ranije izolovan iz *A. japonica*^{31,50} (**1, 14, 15, 16, 17, 18, 24, 25, 26**) ukazujući na hemotaksonomsku bliskost ove dve biljne vrste.



Slika 2.2.203. Ključne HMBC korelacije u novim složenim diartilheptanoidima

2.4. Biološke aktivnosti

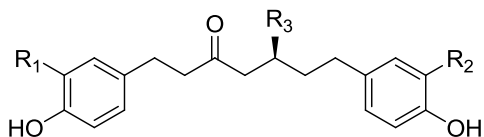
2.4.1. Citotoksična aktivnost prema NCI-H460 ćelijskoj liniji kancera pluća

U ranijim istraživanjima diarilheptanoidi su pokazali citotoksičnu aktivnost prema različitim humanim tumorskim ćelijskim linijama: SNU-1 (tumor želuca), SNU-354 (tumor jetre), SNU-4 (tumor debelog creva)⁴³, A-549 (adenokarcinom pluća), DLD-1 (adenokarcinom debelog creva)⁴⁴, Caco-2 (adenokarcinom debelog creva), PC3 (adenokarcinom prostate) i MCF7 (adenokarcinom mlečnih žlezda).⁴⁵

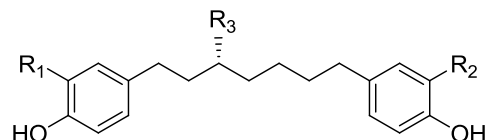
In vitro citotoksična aktivnost većine izolovanih diarilheptanoida iz kore crne jove je ispitivana na ćelijskoj liniji humanog ne-sitnoćelijskog karcinoma pluća (NCI-H460), njenoj odgovarajućoj, na lekove višestruko rezistentnoj, varijanti (eng. Multi-Drug Resistant, MDR) (NCI-H460/R), kao i na normalnim humanim keratinocitima (HaCaT) sulforodamin B (SRB) metodom. U ovom testu ispitivani su poznati diarilheptanoidi platifilozid (**1**), acerozid VII (**5**), hirsutanonol (**14**), 5(S)-O-metil-hirsutanonol (**15**), hirsutenon (**16**), oregonin (**17**), **18**, rubranol (**20**), rubranozid A (**22**), **23**, **24**, alnuzid A (**25**), alnuzid B (**26**) i nova jedinjenja **29-39** (Slika 2.4.1).

Rezultati prikazani u **Tabeli 2.4.1** su izraženi kao koncentracije jedinjenja koje inhibiraju rast ćelija za 50% (IC₅₀). Odnos između IC₅₀ vrednosti dobijenih na HaCaT i NCI-H460 ćelijama za određeno jedinjenje su izraženi kao selektivni indeks (SI). Veća SI vrednost označava bolju selektivnost, tj. bolje dejstvo na tumorske ćelije i/ili manju citotoksičnost na normalne ćelije. Kurkumin, poznati diarilheptanoid sa širokim spektrom bioloških aktivnosti koji je pokazao citotoksičnu aktivnost u ranijim istraživanjima^{29,30}, korišćen je kao pozitivna kontrola. Od izolovanih jedinjenja, hirsutenon (**16**), jedinjenje **24** i alnuzid B (**26**) su pokazali najizraženiji citotoksični efekat na NCI-H460 ćelije sa IC₅₀ vrednostima u opsegu 14,9 – 19,2 μM, pokazujući jaču aktivnost od kurkumina čija je IC₅₀ vrednost bila 38,4 μM. Novi diarilheptanoidi, **31** i **37**, su bili aktivniji na obe tumorske ćelijske linije u poređenju sa kurkuminom (**Tabela 2.4.1**). Oni su takođe pokazali dobru selektivnost sa SI vrednostima od 2,7, odnosno 1,6. Kurkumin nije pokazao selektivnost s obzirom na to da je efikasniji pri nižim koncentracijama na normalnim HaCaT ćelijama. Dobru aktivnost, a najbolju selektivnost pokazao je 5(S)-O-metilhirsutanonol (**15**) sa SI vrednošću 4,8. Acerozid

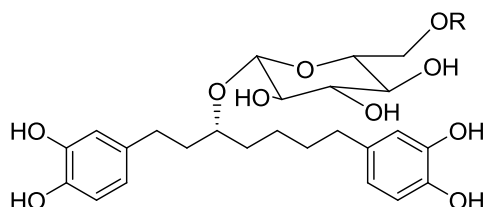
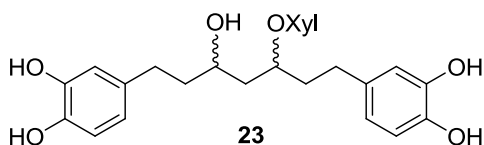
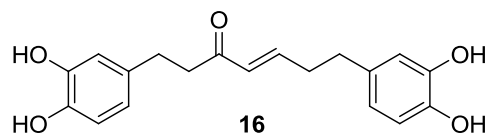
VII (5) je pokazao najslabiji citotoksični potencijal ($IC_{50} \geq 100 \mu M$; **Tabela 2.4.1**). Mshvildadze i saradnici (2007) su u svojim istraživanjima sprovedenim na diarilheptanoidima takođe našli slabo anti-tumorsko dejstvo acerozida VII.⁴⁴



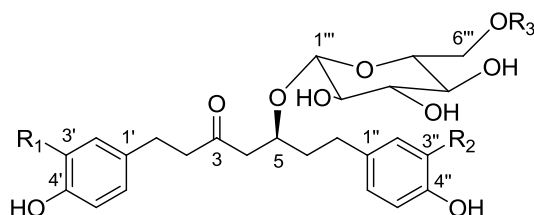
- 1:** $R_1=R_2=H$; $R_3=\beta$ -D-Glcp
14: $R_1=R_2=R_3=OH$
15: $R_1=R_2=OH$; $R_3=OCH_3$
17: $R_1=R_2=OH$; $R_3=\beta$ -D-Xylp
18: $R_1=R_2=OH$; $R_3=\beta$ -D-Glcp
24: $R_1=R_2=H$; $R_3=\beta$ -D-Xylp
25: $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=\beta$ -D-Xylp
26: $R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=\beta$ -D-Xylp



- 5:** $R_1=R_2=H$; $R_3=\beta$ -D-Glcp
20: $R_1=R_2=OH$; $R_3=OH$
22: $R_1=R_2=OH$; $R_3=\beta$ -D-Glcp



- 33:** $R=E$ -3,4-DMC
34: $R=Z$ -3,4-DMC
35: $R=E$ -3,4,5-TMC

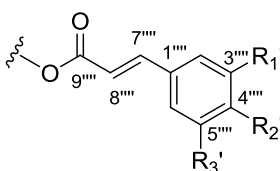


- 29:** $R_1=R_2=OH$; $R_3=E$ -3,4-DMC
30: $R_1=R_2=OH$; $R_3=Z$ -3,4-DMC
31: $R_1=R_2=OH$; $R_3=pC$
32: $R_1=R_2=OH$; $R_3=E$ -3,4,5-TMC
36: $R_1=R_2=H$; $R_3=E$ -3,4-DMC
37: $R_1=R_2=H$; $R_3=pC$
38: $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=E$ -3,4-DMC
39: $R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=Z$ -3,4-DMC

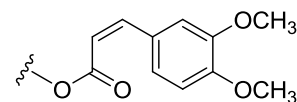
pC: $R_1'=R_3'=H$; $R_2'=OH$

E-3,4-DMC: $R_1'=R_2'=OCH_3$; $R_3'=H$

E-3,4,5-TMC: $R_1'=R_2'=R_3'=OCH_3$



Z-3,4-DMC:



Slika 2.4.1. Diarilheptanoidi kojima je ispitivana citotoksična aktivnost prema NCI-H460 ćelijama

Tabela 2.4.1. Citotoksični efekat diarilheptanoida prema senzitivnim i rezistentnim ćelijskim linijama tumora pluća, kao i prema normalnim humanim keratinocitima izražen u IC₅₀ vrednostima (date u μM)

Jedinjenje	NCI-H460 ^{a,e}	NCI-H460/R ^{b,e}	HaCaT ^{c,e}	SI ^d
1	28,1 ± 1,3	24,6 ± 2,9	8,7 ± 2,3	0,3
5	100,0 ± 3,1	144,1 ± 3,4	-	-
14	61,4 ± 2,5	40,0 ± 5,7	-	-
15	29,7 ± 0,7	52,1 ± 2,9	141,9 ± 1,7	4,8
16	19,2 ± 0,3	17,1 ± 2,2	43,2 ± 1,9	2,3
17	36,0 ± 0,3	33,8 ± 2,5	-	-
18	42,4 ± 1,7	45,8 ± 1,9	-	-
20	95,8 ± 0,4	145,8 ± 3,1	-	-
22	86,0 ± 2,0	72,1 ± 1,8	-	-
23	66,1 ± 3,0	76,1 ± 1,3	-	-
24	14,9 ± 1,1	21,2 ± 3,9	10,0 ± 1,1	0,7
25	29,7 ± 3,2	57,5 ± 1,9	-	-
26	17,8 ± 1,9	18,1 ± 1,6	40,5 ± 2,0	2,3
29	53,4 ± 2,4	46,9 ± 4,4	-	-
30	46,9 ± 1,4	55,3 ± 2,4	-	-
31	27,8 ± 1,8	45,0 ± 0,4	76,3 ± 3,1	2,7
32	41,9 ± 4,1	35,7 ± 3,5	-	-
33	86,4 ± 2,1	108,6 ± 0,9	-	-
34	65,6 ± 2,8	65,3 ± 1,5	-	-
35	48,3 ± 1,6	62,1 ± 0,5	81,8 ± 1,3	1,7
36	36,7 ± 1,0	51,2 ± 4,2	-	-
37	19,9 ± 1,1	25,0 ± 2,7	31,3 ± 1,4	1,6
38	60,7 ± 2,2	79,8 ± 0,5	-	-
39	40,5 ± 1,4	39,1 ± 4,5	-	-
Kurkumin	38,4 ± 2,9	56,7 ± 2,1	7,1 ± 0,8	0,2

^a sezitivne tumorske ćelije

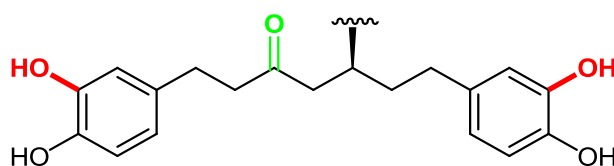
^b ćelije višestruko rezistentne na lekove

^c normalni humani keratinociti

^d Selektivni indeks definisan kao odnos IC₅₀ vrednosti za HaCaT i NCI-H460

^e IC₅₀ vrednosti su računane iz tri nezavisna eksperimenta (srednja vrednost ± standardna devijacija)

Prilikom ispitivanja odnosa struktura/aktivnost utvrđene su dve osnovne pravilnosti. Prva je ta da prisustvo keto grupe u položaju 3 pojačava citotoksičnu aktivnost testiranih diarilheptanoida (**Slika 2.4.2**). Ovo je u saglasnosti sa istraživanjima Choi-a i saradnika (2008).⁴³ Druga je da prisustvo hidroksilnih grupa u položajima 3' i 3'' smanjuje citotoksičnu aktivnost, ali u manjem stepenu nego što to čini odsustvo 3-keto grupe (**Slika 2.4.2**). Tako aktivnost platifilozida (**1**), jedinjenja **18** i rubranozida A (**22**) opada u sledećem nizu: **1** > **18** > **22**. Platifilozid ima keto grupu u položaju 3, a ne poseduje 3'-OH ni 3''-OH. Jedinjenje **18** uz iste ostale delove molekula ima dodatne 3'-OH i 3''-OH pa ima slabije dejstvo, a rubranozid A nema 3-keto grupu i ima 3'-OH i 3''-OH, te ima najslabiju aktivnost u pomenutom nizu (**Slike 2.4.1** i **2.4.2**, **Tabela 2.4.1**). Isto objašnjenje važi i za slabljenje aktivnosti u nizu novih jedinjenja: **36** > **29** > **33**. Acerozid VII (**5**), rubranol (**20**), rubranozid A (**22**) i jedinjenje **33** nemaju 3-keto grupu i zato su pokazali slabiju aktivnost od njima odgovarajućih jedinjenja koja je imaju: platifilozid (**1**), hirsutanonol (**14**), **18** i **29**, potvrđujući prvu pravilnost (**Slike 2.4.1** i **2.4.2**, **Tabela 2.4.1**). Platifilozid i jedinjenja **24** i **36** koja poseduju 3-keto grupu, a nemaju 3'-OH i 3''-OH u svojoj strukturi, pokazala su jaču aktivnost od njima odgovarajućih jedinjenja koja imaju i 3-keto, ali i dodatne 3'-OH i 3''-OH: jedinjenje **18**, oregonin (**17**) i jedinjenje **29**, što potvrđuje drugu pravilnost. Prisustvo jedne od OH grupa, bilo na 3' ili 3'', takođe negativno utiče na aktivnost. Parovi jedinjenja **24** i **25**, i **36** i **38**, potvrđuju da prisustvo 3''-OH značajno smanjuje aktivnost (**Slika 2.4.1**, **Tabela 2.4.1**). Acerozid VII (**5**) i rubranol (**20**) su pokazali najslabiju aktivnost, što je očekivano s obzirom na to da oba nemaju 3-keto grupu i da rubranol još ima 3'-OH i 3''-OH grupe potvrđujući obe utvrđene pravilnosti. Statistički značaj ovih rezultata je dat u **Tabeli 2.4.2**. Određeni supstituenti u položaju 5 zajedno sa 3-keto grupom pozitivno utiču na citotoksičnu aktivnost diarilheptanoida prema NCI-H460 ćelijama. Tako u zavisnosti od supstituenta na C-5 aktivnost opada u sledećem nizu: OMe>OXyl≥OGlc>OH (**Slika 2.4.1**, **Tabela 2.4.1**).



Slika 2.4.2. Uticaj 3-keto i 3'- i 3''- hidroksilnih grupa na citotoksičnu aktivnost ka NCI-H460 ćelijama: zelena boja - pozitivan uticaj, crvena boja – negativan uticaj

Prisustvo monosaharidnih supstituenata D-ksiloze i D-glukoze ima sličan uticaj, ali uopšteno diarilheptanoid glikozidi imaju jače citotoksične aktivnosti od odgovarajućih aglikona: **17** > **14**, **18** > **14**, **22** > **20**. Pozitivan uticaj dodatne cinamoil grupe je takođe uočen u slučaju *pC* i 3,4,5-TMC grupe (**31,32** > **18**, **35** > **22**), dok 3,4-DMC grupe (*Z* i *E*) ne utiču na aktivnost ili je neznatno pojačavaju. Konačno, među novim diarilheptanoidima, jedinjenja **37** i **31** su bila najpotentniji inhibitori rasta tumorskih ćelija, efikasniji od kurkumina, a oba u svojoj strukturi imaju 3-keto i *pC* grupu. Aktivniji je **37** pošto u svojoj strukturi nema 3'-OH i 3''-OH grupe, potvrđujući pravilnost da ove grupe negativno utiču na citotoksičnu aktivnost.

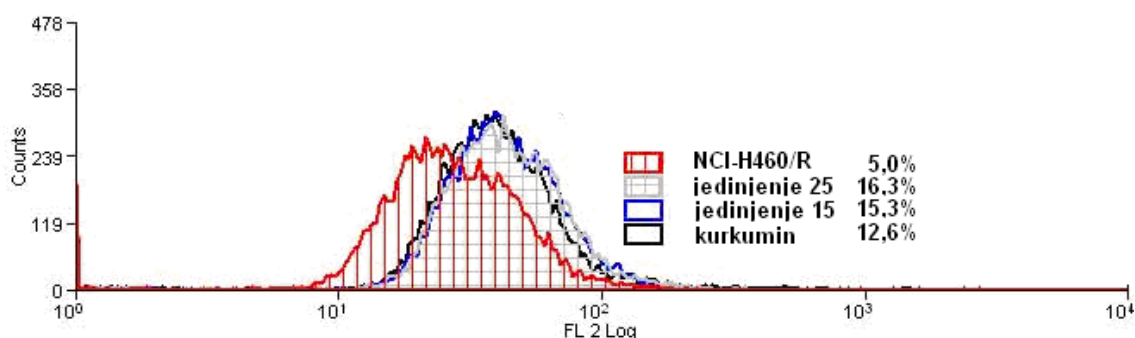
Tabela 2.4.2. Statistička analiza za odnos struktura/aktivnost: IC₅₀ vrednosti za diarilheptanoide testirane na NCI-H460 ćelijama

	1	5	14	15	16	17	18	19	20	22	23	24	25	26	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
1		**	**	/	/	/	**	**	/	**	**	*	/	/	**	**	**	**	**	**	/	/	**	/
5	**		**	**	**	**	**	**	**	/	**	**	**	**	/	**	**	/	**	**	**	**	**	**
14	**	**		**	**	**	**	/	**	**	/	**	**	**	**	*	**	**	/	/	**	**	/	**
15	/	**	**		/	/	*	**	/	**	**	**	/	*	**	**	**	**	**	**	**	/	/	**
16	/	**	**	/		**	**	**	/	**	**	/	*	/	**	**	**	**	**	**	**	**	/	**
17	/	**	**	/	**		/	**	/	**	**	**	/	**	**	/	/	**	**	*	/	*	**	/
18	**	**	**	*	**	/		/	**	**	**	**	/	**	**	/	/	**	**	/	/	**	**	/
19	**	**	/	**	**	**	/		**	**	/	**	**	**	**	/	/	**	/	/	**	**	/	**
20	/	**	**	/	/	/	**	**		**	**	*	/	/	**	**	**	**	**	**	**	/	/	**
22	**	/	**	**	**	**	**	**	**		**	**	**	**	**	**	**	/	**	**	**	**	**	**
23	**	**	/	**	**	**	**	/	**	**		**	**	**	**	/	*	**	/	/	**	**	/	**
24	*	**	**	**	/	**	**	**	*	**	**		**	/	**	**	**	**	**	**	**	**	/	**
25	/	**	**	/	*	/	/	**	/	**	**	**		*	**	**	*	**	**	**	**	/	/	**
26	/	**	**	*	/	**	**	**	/	**	**	/	*		**	**	**	**	**	**	**	**	/	**
30	**	/	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**		**	**	*	**	**	**	**	**	**
31	**	**	*	**	**	/	/	/	**	**	/	**	**	**	**		/	**	/	/	*	**	/	/
32	**	**	**	**	**	/	/	/	**	**	*	**	*	**	**	/		**	*	/	/	**	**	/
33	**	/	**	**	**	**	**	**	**	/	**	**	**	**	*	**	**		**	**	**	**	**	**
34	**	**	/	**	**	**	**	/	**	**	/	**	**	**	**	/	*	**		/	**	**	/	**
35	**	**	/	**	**	*	/	/	**	**	/	**	**	**	**	/	/	**	/		**	**	/	/
36	/	**	**	/	**	/	/	**	/	**	**	**	/	**	**	*	/	**	**	**	**		/	**
37	/	**	**	/	/	*	**	**	/	**	**	/	/	/	**	**	**	**	**	**	**	/		**
38	**	**	/	**	**	**	**	/	**	**	/	**	**	**	**	/	**	**	/	/	**	**		**
39	/	**	**	/	**	/	/	**	/	**	**	**	/	**	**	/	/	**	**	/	/	**	**	

Statistički značaj: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, / nema značaja

Veoma aktivni diarilheptanoidi platifilozid i **24** su pokazali neselektivno delovanje kao i kurkumin (niske SI vrednosti), pošto su efikasno inhibirali i rast HaCaT keratinocita. S druge strane, 5(*S*)-*O*-metilhirsutanonol, hirsutenon, alnuzid B i nova jedinjenja **31**, **35** i **37**, koja su takođe pokazala značajnu citotoksičnu aktivnost ka tumorskim ćelijama, pokazala su nisku citotoksičnost ka HaCaT ćelijama, tj. značajnu selektivnost, što pokazuju nešto više SI indeksa u **Tabeli 2.4.1**.

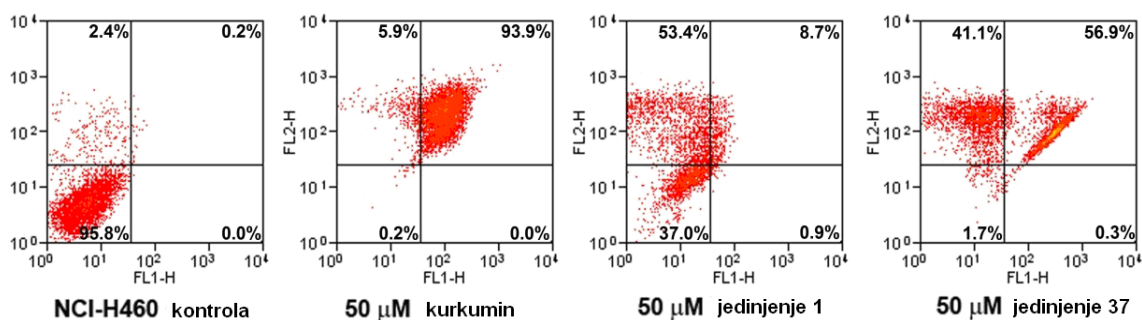
Acerozid VII, 5(*S*)-*O*-metilhirsutanonol, alnuzid A, rubranol i nova jedinjenja **31**, **35** i **36** su, kao i pozitivna kontrola kurkumin, pokazali slabiju citotoksičnu aktivnost ka MDR ćelijama NCI-H460/R (**Tabela 2.4.1**). Efekat ostalih diarilheptanoida nije zavisio od prisustva MDR fenotipa. Znajući da kurkumin moduliše MDR inhibirajući aktivnost P-glikoproteina (P-gp)^{80,81}, ispitano je da li izolovani diarilheptanoidi interaguju sa P-gp koji je prekomerno eksprimiran u membrani NCI-H460/R ćelija.⁸¹ Rezultati su pokazali da su jedino 5(*S*)-*O*-metilhirsutanonol i alnuzid A inhibirali funkciju P-gp. Njihova sposobnost da povećaju akumulaciju P-gp supstrata doksorubicina je uporediva sa kurkuminom (**Slika 2.4.3**).



Slika 2.4.3. Akumulacija doksorubicina kod višestruko rezistentnih ćelija (NCI-H460/R) i istih ćelija tretiranih diarilheptanoidima alnuzidom A (**25**), 5(*S*)-*O*-metilhirsutanonolom (**15**) i pozitivnom kontrolom kurkuminom

Ćelijska smrt kod NCI-H460 ćelija koje su tretirane kurkuminom, platifilozidom i novim jedinjenjem **37** je procenjena pomoću dvostrukog bojenja aneksinom V (AV) i propidijum jodidom (PI) (**Slika 2.4.4**). Jedinjenje **37** je najaktivnije među novim jedinjenjima, a platifilozid (**1**) je njemu odgovarajući diarilheptanoid bez *pC* grupe i to je bio razlog njihovog odabira. Rezultati dobijeni posle tretmana ovim jedinjenjima u koncentraciji od 50 μ M u trajanju od 72 h su pokazali da je kurkumin indukovao apoptozu u skoro svim ćelijama, platifilozid (**1**) je indukovao nekrozu u 50% ćelija, dok

je jedinjenje **37** indukovalo u 50% ćelija apoptozu i u 50% ćelija nekrozu (**Slika 2.4.4**), što znači da *pC* grupa značajno doprinosi povećanju smrtnosti NCI-H460 tumorskih ćelija.

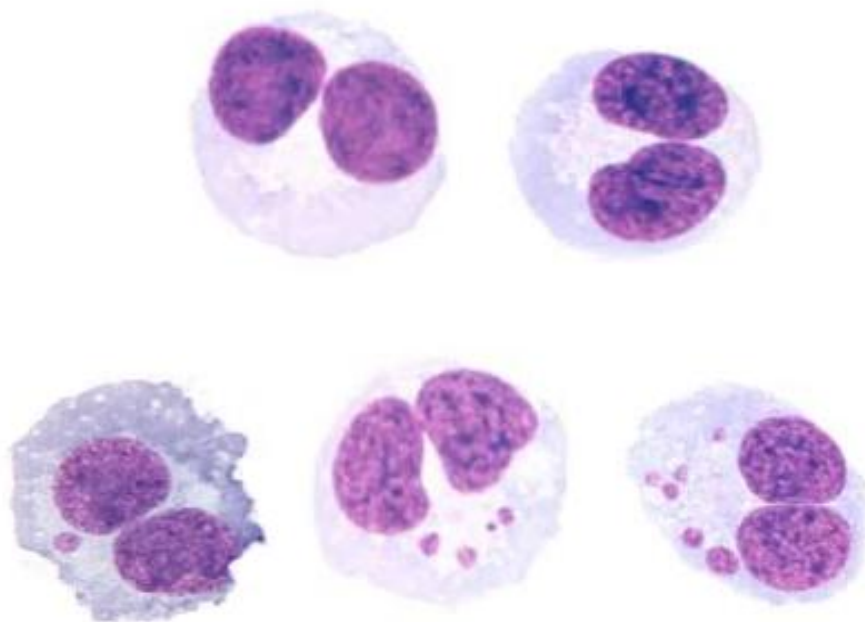


Slika 2.4.4. Analiza ćelijske smrti netretiranih NCI-H460 ćelija i NCI-H460 ćelija tretiranih sa 50 μM kurkumina, platifilozida (**1**) i novog jedinjenja **37** u trajanju od 72 h; uzorci analizirani na kanalu za zelenu fluorescenciju (Aneksin-V-FITC, FL1-H) i kanalu za crvenu fluorescenciju (propidijum jodid, FL2-H) protočnom citometrijom; vijabilne (žive) ćelije (AV-PI-), ćelije u ranoj apoptozi (AV+PI-), ćelije u kasnoj apoptozi i nekrozi (AV+PI+), sekundarno nekrotične (mrtve) ćelije (AV-PI+)

U zaključku, novi diarilheptanoidi **37** i **31**, kao i poznati platifilozid (**1**), 5*S*-*O*-metilhirsutanonol (**15**), hirsutenon (**16**), platifilonol-5-*O*- β -D ksilopiranozid (**24**), alnuzid A (**25**) i alnuzid B (**26**) su pokazali značajan citotoksični efekat ($\text{IC}_{50} < 30 \mu\text{M}$) kod ćelija ne-sitnoćelijskog karcinoma pluća, dok su 5(*S*)-*O*-metilhirsutanonol (**15**), hirsutenon (**16**), alnuzid B (**26**) i nova jedinjenja **31**, **35** i **37** pokazali dobru selektivnost. Novo jedinjenje **37** je efikasno indukovalo ćelijsku smrt. Pozitivan uticaj na citotoksičnu aktivnost ima 3-keto grupa, kao i pojedine grupe u položaju 5: metoksi, glukozil, ksilozil i *p*-kumaroilglukozil, dok negativan uticaj imaju hidroksilne grupe u položajima 3' i 3''. Jedinjenja 5(*S*)-*O*-metilhirsutanonol (**15**) i alnuzid B (**26**) zaslužuju da budu dalje ispitivana kao agensi sa potencijalom za prevazilaženje višestruke rezistencije na lekove, pošto je uočeno da modulišu P-gp aktivnost, povećavajući akumulaciju doksorubicina. Imajući u vidu značaj kurkumina kao antitumorskog agensa, novi diarilheptanoidi **37** i **31**, koji su pokazali bolju inhibitornu aktivnost i selektivnost u ovom istraživanju, predstavljaju nova prirodna jedinjenja sa značajnim potencijalom u borbi protiv malignih oboljenja.

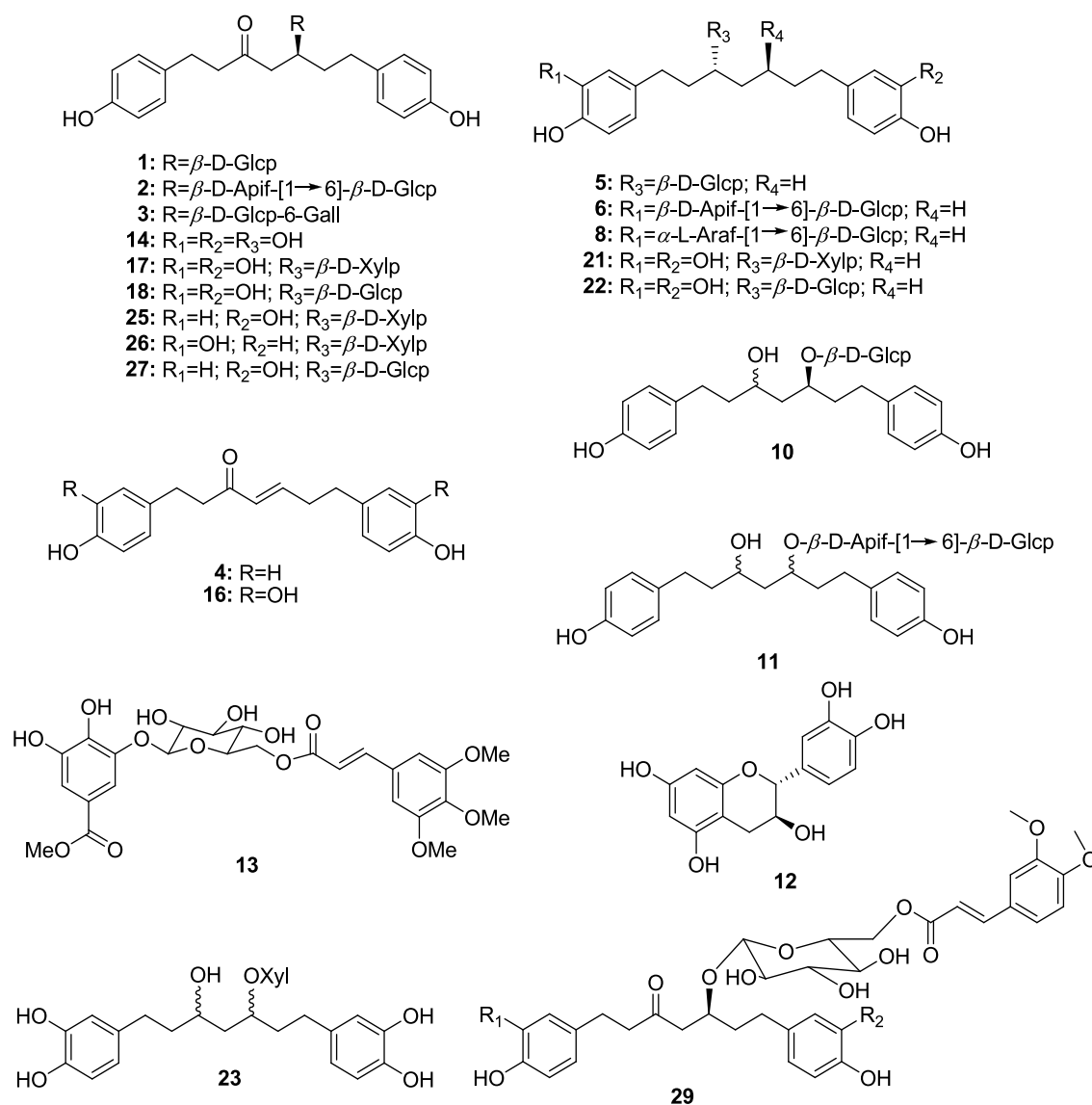
2.4.2. Protektivni efekat na DNK humanih limfocita

Protektivni efekat izolovanih jedinjenja na DNK humanih limfocita određen je mikronukleus testom pri blokadi ćelijske deobe (eng. cytokinesis block micronucleus - CBMN). Mikronukleusi su mala zasebna jedra (**Slika 2.4.5**) koja sadrže hromosome ili njihove fragmente, a nastaju prilikom oštećenja hromozoma fizičkim ili hemijskim putem. Detekcija mikronukleusa u perifernim limfocitima je pouzdan metod za praćenje štetnih uticaja različitih agenasa na hromosome čoveka. Ovaj test je uveden od strane Kantrimana i Hedla⁸², a kasnije je unapređen razvojem CBMN eseja.⁸³ Kod ove metode u ćelijsku kulturu dodaje se citohalasin B, agens koji sprečava deobu ćelije (inhibitor polimerizacije aktina). Kako ovo blokiranje utiče samo na razdeljivanje ćerki ćelija, ali ne na mitozu (podelu hromozomskog materijala), rezultujuća populacija ćelija se sastoji od ćelija sa jednim jedrom (mononuklearne), dva (binuklearne), ili više jedara (multi-nuklearne). Da bi se osiguralo da su ćelije prošle samo kroz jednu mitozu posle tretmana, mikronukleusi se obično prate i beleže samo u binuklearnim ćelijama.



Slika 2.4.5. Binuklearne ćelije bez mikronukleusa (gore) i sa mikronukleusima (dole)

U ovom testu, u njegovoj modifikovanoj varijanti (CBMN esej)⁸⁴, ispitano je 13 jedinjenja iz crne i 11 jedinjenja iz zelene jove u dva odvojena eksperimenta (Slika 2.4.6). Ostala izolovana jedinjenja nisu ispitana jer u trenutku ispitivanja nisu bila izolovana u dovoljnim količinama. Platifilozid (1) i acerozid VII (5), jedinjenja izolovana i iz crne i iz zelene jove, ispitana su u oba eksperimenta.



Slika 2.4.6. Jedinjenja ispitana u CBMN esej

Kulture limfocita su tretirane jedinjenjima crne jove u koncentracijama od 1,0 i 2,0 $\mu\text{g/mL}$, a jedinjenjima zelene jove u koncentracijama 0,5, 1,0 i 2,0 $\mu\text{g/mL}$. U oba ispitivanja, amifostin WR-2721 dodat u jednu kulturu u koncentraciji od 1,0 $\mu\text{g/mL}$, je bio pozitivna kontrola, a mitomicin C (MMC) u koncentraciji 0,1 $\mu\text{g/mL}$, dodat u drugu kulturu, je bio negativna kontrola. Amifostin WR-2721 je radioprotektant, derivat fosforilovanog cisteamina originalno razvijenog od strane američkog vojnog instituta US Army Walter Reed Institute (Washington, DC). On se metaboliše enzimom alkalna fosfataza do aktivnog sulfhidrilnog jedinjenja sposobnog za "hvatanje" slobodnih radikala (nastalih štetnim zračenjem) i na taj način sprečava ćelijska oštećenja.⁸⁵ MMC je klastogeni agens korišćen u proučavanjima osetljivosti ćelija na hromozomska oštećenja.⁸⁶ On deluje kao bifunkcionalni i trifunkcionalni alkilujućii agens koji stvara unakrsne veze u DNK lancu što izaziva hromozomske aberacije.⁸⁷ Stoga, MMC je sposoban da indukuje hromozomske aberacije *in vitro*⁸⁸, DNK oštećenja⁸⁹ i stvaranje mikronukleusa.

CBMN test se može uraditi na tri načina. Prvi podrazumeva da se odredi potencijal izolovanih jedinjenja za sprečavanje nastanka mikronukleusa koji nisu neposredno pretrpeli oštećenja nekim tretmanom, a uzimajući u obzir da izvestan broj mikronukleusa postoji u limfocitima zbog prisustva različitih štetnih agenasa u životnoj sredini. Drugi način je da se limfociti tretiraju ispitivanim jedinjenjima, pa onda nekim fizičkim (npr. zračenjem) ili hemijskim agensom (npr. mitomicinom C) koji vrši oštećenja hromozoma i stvara mikronukleuse. Treći podrazumeva da se ispitivana jedinjenja dodaju limfocitima po dejstvu fizičkog ili hemijskog agensa čime bi se onda određivala sposobnost reparacije hromozomskog materijala.⁹⁰ U ovom radu CBMN esej je izveden na prvi način tako da je određen potencijal nekih od izolovanih jedinjenja za sprečavanje nastanka mikronukleusa i za reparaciju već oštećenog hromozomskog materijala.

2.4.2.1. Protektivni efekat diarilheptanoida crne jove na DNK humanih limfocita

Jedinjenja iz kore crne jove koja su ispitana u ovom testu su: platifilozid (**1**), acerozid VII (**5**), hirsutanonol (**14**), hirsutenon (**16**), oregonin (**17**), jedinjenje **18**, rubranozid B (**21**), rubranozid A (**22**), jedinjenje **23**, alnuzid A (**25**), alnuzid B (**26**) i nova jedinjenja **27** i **29** (**Slika 2.4.6**, **Tabela 2.4.3**). Sva ova jedinjenja su indukovala smanjenje broja mikronukleusa u limfocitima, postigavši bolji efekat pri koncentraciji od 1,0 µg/mL nego 2,0 µg/mL. Najjaču aktivnost pokazao je hirsutanonol, koji je pri koncentraciji od 1,0 µg/mL izazvao smanjenje broja mikronukleusa za 63,6%. Dalje slede: novo jedinjenje **29** sa smanjenjem broja mikronukleusa za 56,0%, oregonin za 52,8%, platifilozid za 42,8%, hirsutenon za 39,6%, pa novo jedinjenje **27** sa smanjenjem broja mikronukleusa za 34,4% (**Tabela 2.4.3**). Veoma važan rezultat je da su ova jedinjenja pokazala jače dejstvo od pozitivne kontrole amifostina WR-2721, koji je pri istoj koncentraciji smanjio broj mikronukleusa za 17,2%. Čak su i jedinjenje **18**, rubranozid B, rubranozid A, jedinjenje **23**, alnuzid A i alnuzid B pokazali jači efekat od amifostina, dok je jedino acerozid VII imao slabije dejstvo. Negativna kontrola – MMC, u koncentraciji od 0,1 µg/mL, pokazao je porast broja mikronukleusa za 30% u odnosu na kontrolne ćelije.

Analizom odnosa struktura/aktivnost, uočeno je da diarilheptanoidi koji su pokazali izraženu aktivnost u ovom testu imaju u svojoj strukturi 3-keto grupu i obe kateholske grupe kao aromatične. Mnogi flavonoidi i drugi sekundarni metaboliti sa izraženim antioksidativnim dejstvom imaju kateholske i keto grupe u svojoj strukturi.⁹¹ Kako je ranije pokazano da je protektivni efekat u ovom eseju u direktnoj vezi sa antioksidativnom aktivnošću^{84,92}, očekivano je bilo da hirsutanonol (**14**), oregonin (**17**) i novo jedinjenje **29** (**Slika 2.4.6**) pokažu najbolje aktivnosti.

Tabela 2.4.3. Učestalost mikronukleusa u 1000 binuklearnih ćelija, procenat binuklearnih ćelija, učestalost mikronukleusa po binuklearnoj ćeliji i frekvencija mikronukleusa, određivani u ćelijskoj kulturi humanih limfocita tretiranih različitim koncentracijama diarilheptanoida iz crne jove

Jedinjenje	Koncentracija µg/mL	MN/1000 Bn ćelija (s.v. + SE) ^a	% Bn ćelija sa MN (s.v. + SE) ^b	MN/Bn ćeliji (s.v. + SE) ^c	Frekvencija MN (%) ^d
Kontrola	-	25,0 ± 0,7	1,92 ± 0,11	1,31 ± 0,03	100,0
Amifostin	1,0	20,7 ± 0,4 ^f	1,80 ± 0,04	1,22 ± 0,03	82,8
MMC	0,1	32,5 ± 1,0 ^{fh}	2,91 ± 0,10	1,10 ± 0,01	130,0
1	1,0	14,3 ± 0,7 ^{fhj}	1,31 ± 0,11	1,10 ± 0,02	57,2
	2,0	16,6 ± 1,1 ^{fi,j}	1,49 ± 0,09	1,13 ± 0,11	66,4
5	1,0	21,6 ± 0,7 ^{g,j}	1,50 ± 0,10	1,09 ± 0,09	86,4
	2,0	22,3 ± 1,4 ^j	1,41 ± 0,10	1,22 ± 0,01	89,2
14	1,0	9,1 ± 0,3 ^{fh,j}	0,71 ± 0,10	1,29 ± 0,21	36,4
	2,0	10,5 ± 0,5 ^{fh,j}	0,79 ± 0,03	1,21 ± 0,10	42,0
16	1,0	15,1 ± 0,6 ^{fh,j}	1,69 ± 0,10	1,18 ± 0,09	60,4
	2,0	16,5 ± 1,5 ^{fi,j}	1,72 ± 0,11	1,31 ± 0,10	66,0
17	1,0	11,8 ± 1,7 ^{fh,j}	1,02 ± 0,11	1,21 ± 0,11	47,2
	2,0	14,3 ± 1,6 ^{fh,j}	1,61 ± 0,22	1,09 ± 0,14	57,2
18	1,0	19,2 ± 0,9 ^{fj}	1,82 ± 0,18	1,34 ± 0,04	76,8
	2,0	22,1 ± 0,6 ^{g,j}	2,16 ± 0,27	1,22 ± 0,04	88,4
21	1,0	16,9 ± 1,0 ^{fi,j}	1,40 ± 0,11	1,22 ± 0,02	67,6
	2,0	18,6 ± 1,3 ^{fj}	1,61 ± 0,10	1,20 ± 0,04	74,4
22	1,0	18,8 ± 1,5 ^{fj}	1,56 ± 0,11	1,22 ± 0,10	75,2
	2,0	20,9 ± 1,1 ^{g,j}	1,58 ± 0,17	1,39 ± 0,09	83,6
23	1,0	19,2 ± 0,9 ^{fj}	1,10 ± 0,10	1,33 ± 0,10	76,8
	2,0	20,4 ± 0,9 ^{fj}	1,52 ± 0,04	1,20 ± 0,03	81,6
25	1,0	16,8 ± 1,9 ^{fj}	1,49 ± 0,19	1,20 ± 0,09	67,2
	2,0	17,3 ± 1,4 ^{fj}	1,50 ± 0,11	1,29 ± 0,08	69,2
26	1,0	18,1 ± 2,8 ^j	1,70 ± 0,12	1,21 ± 0,11	72,4
	2,0	19,0 ± 1,2 ^{fj}	1,62 ± 0,14	1,31 ± 0,12	76,0
27	1,0	13,9 ± 1,4 ^{fg,j}	1,11 ± 0,09	1,27 ± 0,10	55,6
	2,0	17,9 ± 0,8 ^{fi,j}	1,53 ± 0,04	1,21 ± 0,03	71,6
29	1,0	11,0 ± 0,5 ^{fh,j}	0,93 ± 0,09	1,20 ± 0,10	44,0
	2,0	13,0 ± 0,5 ^{fh,j}	1,10 ± 0,03	1,11 ± 0,11	52,0

^aMN/1000 Bn ćelija - učestalost mikronukleusa u 1000 binuklearnih ćelija (ispitivana za svaku konc.); ^b% Bn ćelija sa mikronukleusima; ^cMN/Bn ćeliji - učestalost mikronukleusa po binuklearnoj ćeliji; ^dFrekvencija MN - učestalost mikronukleusa u ćelijskim kulturama limfocita tretiranih različitim koncentracijama diarilheptanoida.data kao procenat u odnosu na kontrolnu grupu; ^eRazlika je smatrana statistički značajnom između podataka parova i izvedena je analizom varijanse (One-way ANOVA) kojoj je sledio Tukey test. Statistička razlika je smatrana značajnom za p < 0,01; ^fU poređenju sa kontrolnom grupom, statistički značajna razlika p < 0,01; ^gU poređenju sa kontrolnom grupom, statistički značajna razlika p < 0,05; ^hU poređenju sa amifostinom – WR 2721, statistički značajna razlika p < 0,01; ⁱU poređenju sa amifostinom – WR 2721, statistički značajna razlika p < 0,05; ^jU poređenju sa mitomicinom C, statistički značajna razlika p < 0,01

Neznatno slabija aktivnost jedinjenja **16** može se objasniti time što je 3-keto grupa konjugovana. Rubranozid B (**21**), rubranozid A (**22**), jedinjenje **23**, alnuzid A (**25**), alnuzid B (**26**) i novo jedinjenje **27**, kojima nedostaje jedan od navedenih strukturnih parametara bitnih za dobru aktivnost, bilo 3-keto grupa, bilo jedna od kateholskih grupa, su shodno tome pokazala nešto slabiju aktivnost, ali takođe jaču od pozitivne kontrole amifostina WR-2721 u istoj koncentraciji (**Tabela 2.4.3**). U prilog svemu navedenom ide i činjenica da je jedinjenje koje je pokazalo najslabije dejstvo, acerozid VII (**5**), nema nijednu od navedenih bitnih grupa (**Slika 2.4.6**). Izuzeci od ovog pravila su platifilozid (**1**) koje nema kateholske grupe, a pokazalo je dobru aktivnost i jedinjenje **18** koje ima sve bitne strukturne parametre, a pokazalo je relativno slabo protektivno dejstvo.

2.4.2.2. Protektivni efekat diarilheptanoida zelene jove na DNK humanih limfocita

Jedinjenja iz kore zelene jove koja su ispitana u ovom testu su platifilozid (**1**), platifilenon (**4**), acerozid VII (**5**), acerozid VIII (**6**), (+)-katehin (**12**), jedinjenja **2** i **10**, i nova jedinjenja **3**, **8**, **11** i **13** (**Slika 2.4.6**, **Tabela 2.4.4**). Prilikom njihovog ispitivanja korišćene su iste kontrole; MMC u koncentraciji od 0,1 µg/mL je predstavljao negativnu kontrolu i pokazao je porast broja mikronukleusa za 31,4% u odnosu na kontrolne netretirane ćelije, dok je amifostin WR-2721 u koncentraciji od 1,0 µg/mL predstavljao pozitivnu kontrolu i pokazao je smanjenje broja mikronukleusa za 19,3% u odnosu na kontrolne netretirane ćelije. Slično ispitivanju jedinjenja izolovanih iz crne jove, sva ispitivana jedinjenja izolovana iz zelene jove su takođe pokazala najbolju aktivnost u koncentraciji od 1,0 µg/mL (**Tabela 2.4.4**). U svim ispitivanim koncentracijama diarilheptanoidi su pokazali statistički značajno smanjenje broja binuklearnih limfocita sa mikronukleusima. Među ispitanim jedinjenjima, novo jedinjenje **8** je pokazalo najjaču aktivnost smanjujući frekvenciju mikronukleusa za 66,3%. Dalje slede takođe nova jedinjenja **3** i **13** sa smanjenjem frekvencije mikronukleusa od 51,5% i 47,0%, redom. U poređenju efekta dejstva amifostina WR-2721 (1,0 µg/mL) sa efektom dejstva jedinjenja **8** i **3** (u koncentracijama 0,5, 1,0 i 2,0 µg/mL) na ćelijske kulture limfocita postoji statistički značajna razlika u frekvencijama mikronukleusa ($p < 0,01$). Statistički značajna razlika u frekvencijama mikronukleusa ($p < 0,05$) postoji i između efekta dejstva amifostina WR-2721 (1,0 µg/mL) sa efektom dejstva novog jedinjenja **13** (1,0

$\mu\text{g/mL}$). Tretman platifilozidom (**1**), platifilenonom (**4**), (+)-kate-hinom (**12**) i novim jedinjenjem **11** u koncentraciji od $1,0 \mu\text{g/mL}$ je smanjio frekvenciju mikronukleusa za 40,8%, 36,4%, 30,7% i 24,6%, redom. Mada sa slabijom aktivnošću od novih jedinjenja **8**, **3** i **13**, ova jedinjenja su pokazala višu aktivnost od amifostina WR-2721 pri istoj koncentraciji (**Tabela 2.4.4**).

Razmatrajući odnos strukture i aktivnosti jedinjenja izolovanih iz zelene jove, bilo je očekivano da nova jedinjenja **3** i **13** pokažu dobru aktivnost. Jedinjenje **13** nije diarilheptanoid, ali jeste polifenol koji u svojoj strukturi ima metil-galat za koji se zna da je dobar antioksidans. Diarilheptanoid **3** nema kateholske grupe, ali ima dodatnu galnu kiselinu vezanu za glukozu što može pozitivno uticati na protektivnu aktivnost (uz 3-keto grupu). Značajan pozitivan uticaj galne kiseline vidi se u poređenju aktivnosti ovog jedinjenja sa srodnim jedinjenjem bez molekula galne kiseline – platifilozidom, koje ima značajno slabiju aktivnost. Iznenadjuća je dobra aktivnost koju je pokazalo novo jedinjenje **8** koje nema ni 3-keto grupu, ni kateholske grupe, kao i najslabija aktivnost jedinjenja **2** koje ima 3-keto grupu. Dobra aktivnost (+)-katehina (**12**) je očekivana jer je iz ranijih radova bilo poznato da je on dobar antioksidans zahvaljujući kojem, pored još nekih jedinjenja, zeleni čaj ima pozitivno dejstvo na ljudski organizam.

Tabela 2.4.4. Učestalost mikronukleusa u 1000 binuklearnih ćelija, procenat binuklearnih ćelija, učestalost mikronukleusa po binuklearnoj ćeliji i frekvencija mikronukleusa, određivani u ćelijskoj kulturi humanih limfocita tretiranih različitim koncentracijama diarilheptanoida iz zelene jove

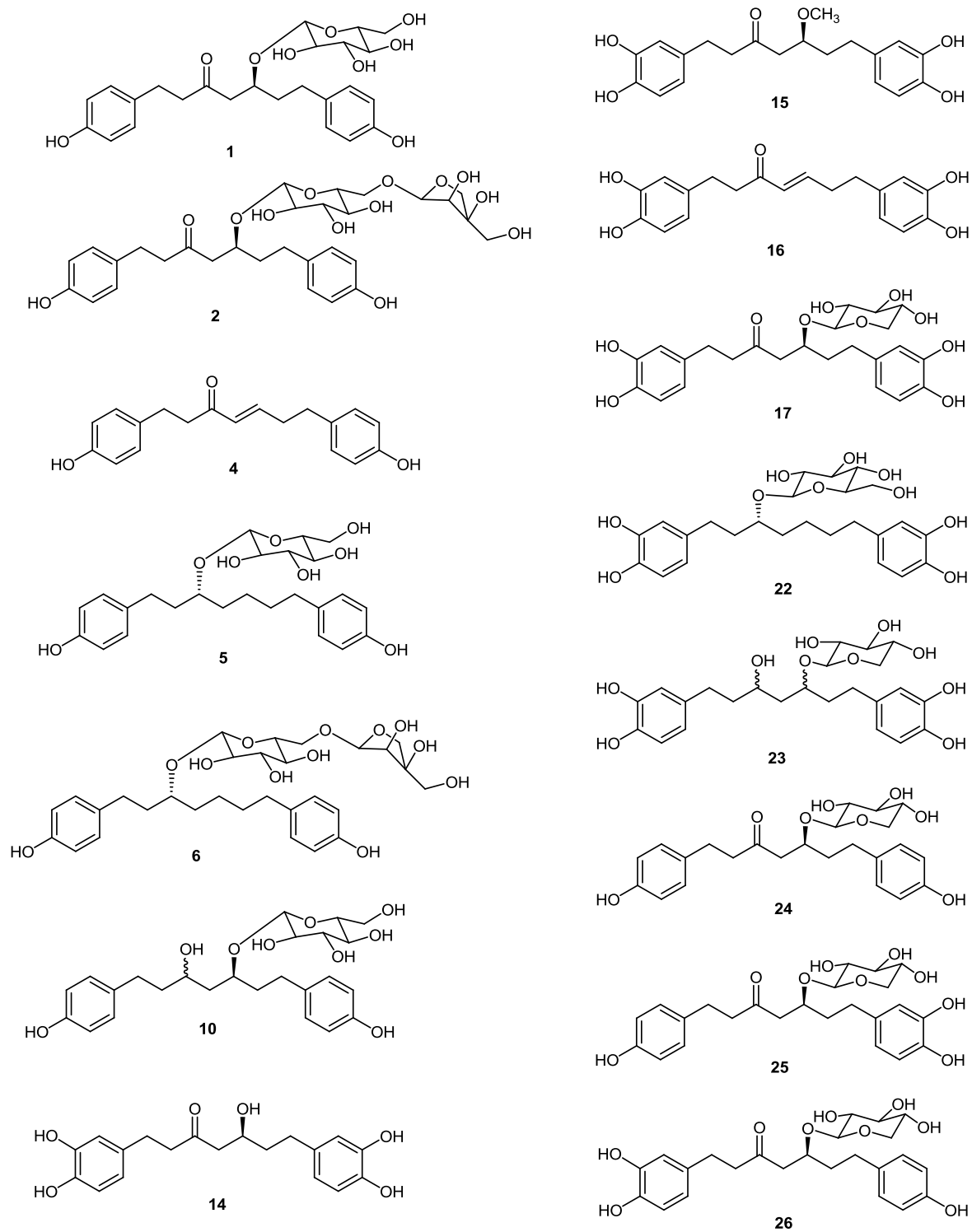
Jedinjenje	Koncentracija µg/mL	MN/1000 Bn ćelija (s.v. + SE) ^a	% Bn ćelija sa MN (s.v. + SE) ^b	MN/Bn ćeliji (s.v. + SE) ^c	Frekvencija MN (%) ^d
Kontrola	/	26,4 ± 0,8	2,1 ± 0,1	1,19 ± 0,06	100%
Amifostin	1,0	21,3 ± 1,7 ^g	1,9 ± 0,1	1,11 ± 0,05	80,7%
MMC	0,1	34,7 ± 1,8 ^h	3,0 ± 0,2	1,17 ± 0,04	131,4%
1	0,5	15,5 ± 0,7 ^{f,g,j}	1,4 ± 0,1	1,08 ± 0,02	62,3%
	1,0	14,3 ± 0,7 ^{f,g,j}	1,3 ± 0,1	1,08 ± 0,02	59,2%
	2,0	16,6 ± 1,1 ^{f,i,j}	1,5 ± 0,1	1,10 ± 0,07	68,4%
2	0,5	27,1 ± 1,0 ^k	2,3 ± 0,1	1,11 ± 0,04	102,6%
	1,0	26,7 ± 2,5 ^k	2,2 ± 0,3	1,16 ± 0,07	101,1%
	2,0	30,7 ± 2,0 ⁱ	2,6 ± 0,2	1,20 ± 0,03	116,3%
3	0,5	15,3 ± 1,5 ^{f,i,j}	1,2 ± 0,2	1,29 ± 0,06	57,9%
	1,0	12,8 ± 1,0 ^{f,h,j}	1,1 ± 0,1	1,22 ± 0,04	48,5%
	2,0	18,4 ± 0,9 ^{f,j}	1,6 ± 0,1	1,08 ± 0,09	69,7%
4	0,5	20,5 ± 0,5 ^{f,j}	1,7 ± 0,1	1,20 ± 0,02	77,6%
	1,0	16,8 ± 0,4 ^{f,i,j}	1,5 ± 0,1	1,11 ± 0,04	63,6%
	2,0	21,2 ± 0,5 ^{f,j}	1,8 ± 0,1	1,18 ± 0,07	80,3%
5	0,5	24,7 ± 2,0 ^k	2,1 ± 0,2	1,18 ± 0,04	93,6%
	1,0	23,8 ± 1,6 ^j	2,0 ± 0,2	1,19 ± 0,02	90,1%
	2,0	25,3 ± 3,3 ^k	2,1 ± 0,3	1,10 ± 0,03	95,8%
6	0,5	22,1 ± 2,6 ^j	1,9 ± 0,2	1,11 ± 0,05	83,7%
	1,0	21,0 ± 1,3 ^{g,j}	1,8 ± 0,1	1,22 ± 0,07	79,5%
	2,0	23,3 ± 1,5 ^j	2,0 ± 0,1	1,17 ± 0,07	88,2%
8	0,5	11,0 ± 0,9 ^{f,h,j}	1,0 ± 0,1	1,02 ± 0,04	41,7%
	1,0	8,9 ± 1,0 ^{f,h,j}	0,7 ± 0,1	1,21 ± 0,06	33,7%
	2,0	11,1 ± 0,7 ^{f,h,j}	0,9 ± 0,1	1,26 ± 0,06	42,0%
10	0,5	25,5 ± 2,3 ^k	2,1 ± 0,2	1,12 ± 0,03	96,6%
	1,0	24,9 ± 0,6 ^j	1,9 ± 0,1	1,30 ± 0,03	94,3%
	2,0	26,2 ± 2,2 ^k	2,3 ± 0,2	1,21 ± 0,04	99,2%
11	0,5	21,2 ± 0,4 ^{f,j}	1,6 ± 0,1	1,39 ± 0,08	80,3%
	1,0	19,9 ± 0,2 ^{f,j}	1,7 ± 0,1	1,21 ± 0,05	75,4%
	2,0	21,9 ± 0,2 ^{f,j}	1,7 ± 0,1	1,22 ± 0,01	82,9%
12	0,5	20,7 ± 0,3 ^{f,j}	1,7 ± 0,1	1,21 ± 0,10	78,4%
	1,0	18,3 ± 0,5 ^{f,j}	1,6 ± 0,1	1,19 ± 0,09	69,3%
	2,0	22,0 ± 0,6 ^{f,j}	1,5 ± 0,1	1,41 ± 0,11	83,3%
13	0,5	18,6 ± 0,4 ^{f,j}	1,7 ± 0,1	1,09 ± 0,06	70,4%
	1,0	14,0 ± 1,0 ^{f,i,j}	1,2 ± 0,1	1,11 ± 0,02	53,0%
	2,0	21,8 ± 0,5 ^{f,j}	1,8 ± 0,1	1,22 ± 0,05	82,6%

^aMN/1000 Bn ćelija - učestalost mikronukleusa u 1000 binuklearnih ćelija (ispitivana za svaku konc.); ^b% Bn ćelija sa mikronukleusima; ^cMN/Bn ćeliji - učestalost mikronukleusa po binuklearnoj ćeliji; ^dFrekvencija MN - učestalost mikronukleusa u ćelijskim kulturama limfocita tretiranih različitim koncentracijama diarilheptanoida data kao procenat u odnosu na kontrolnu grupu; ^eRazlika je smatrana statistički značajnom između podataka parova i izvedena je analizom varijanse (One-way ANOVA) kojoj je sledio Tukey test. Statistička razlika je smatrana značajnom za $p < 0.01$ i $p < 0.05$; ^fU poređenju sa kontrolnom grupom, statistički značajna razlika $p < 0,01$; ^gU poređenju sa kontrolnom grupom, statistički značajna razlika $p < 0,05$; ^hU poređenju sa amifostinom - WR 2721, statistički značajna razlika $p < 0,01$; ⁱU poređenju sa amifostinom - WR 2721, statistički značajna razlika $p < 0,05$; ^jU poređenju sa mitomicinom C, statistički značajna razlika $p < 0,01$; ^kU poređenju sa mitomicinom C, statistički značajna razlika $p < 0,05$

2.4.3. Antimikrobna aktivnost

Antibakterijska aktivnost ekstrakata jove je ispitivana u ranijim istraživanjima na.^{20,93} Metanolni ekstrakt crvene jove (*Alnus rubra*) je pokazao antibakterijsku aktivnost ka gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama. Kao dve glavne komponente ovog ekstrakta odgovorne za aktivnost navedeni su diarilheptanoidi hirsutanonol i njegov ksilozid oregonin, a značajna antibakterijska aktivnost utvrđena je ka *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*.⁹³ Kako su ova dva jedinjenja među zastupljenijim i u ekstraktima crne jove, posebno oregonin koga ima u velikoj količini, očekivano je bilo da u našim radovima ova jedinjenja, ali i drugi strukturno slični diarilheptanoidi pokažu antibakterijsku aktivnost i prema drugim sojevima bakterija. Osim toga, u istraživanjima Midltona i saradnika²⁰ ekstrakti crne jove su ispitivani na antibakterijsku aktivnost, ali pojedinačna jedinjenja izolovana iz crne i zelene jove do sada nisu ispitivana niti u antibakterijskim, niti u antifungalnim testovima. U pomenutom ispitivanju metanolni ekstrakt crne jove je bio aktivan na sledećih osam bakterijskih sojeva: *Citrobacter freundii* NCTC 9750, *Escherichia coli* NCIMB 8110, *Escherichia coli* NCIMB 4174, *Klebsiella aerogenes* NCTC 9528, *Lactobacillus plantarum* NCIMB 6376, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6750, *Staphylococcus aureus* NCTC 10788 i *Staphylococcus aureus* NCTC 11940, sa najvišom aktivnošću na *E. coli* (NCIMB 8110) sa MIC vrednošću od 0,125 mg/mL.

U antimikrobnom ispitivanju testirana su ona jedinjenja iz zelene i crne jove koja su izolovana u većoj količini. Iz zelene jove to su bila jedinjenja: platifilozid (**1**), **2**, platifilenon (**4**), acerozid VII (**5**), acerozid VIII (**6**) i novo jedinjenje **10**. Iz crne jove su ispitivana sledeća jedinjenja: platifilozid (**1**), acerozid VII (**5**), hirsutanonol (**14**), 5(S)-O-metilhirsutanonol (**15**), hirsutenon (**16**), oregonin (**17**), rubranozid A (**22**), **23**, **24**, alnuzid A (**25**) i alnuzid B (**26**) (**Slika 2.4.7**).



Slika 2.4.7. Diarilheptanoidi ispitivani u testovima antimikrobnih aktivnosti

Tabela 2.4.5. Antibakterijska aktivnost prema gram-negativnim bakterijama izražena u MIC vrednostima (mg/mL)

Jedinjenje \ Bakterijska vrsta	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>K. pneumoniae</i>
1	0,625	0,625	0,313	0,625	0,078
2	0,625	0,625	0,313	0,625	0,078
4	0,156	0,156	0,156	0,313	0,156
5	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625
6	0,625	0,625	0,313	0,625	0,313
10	0,313	0,313	0,313	0,625	0,313
14	0,156	0,313	0,313	0,313	0,625
15	0,156	0,313	0,313	0,313	0,625
16	0,078	0,156	0,156	0,313	0,156
17	0,156	0,156	0,313	0,156	0,078
22	0,156	0,313	0,313	0,313	0,313
23	0,156	0,313	- ^a	- ^a	0,625
24	0,625	0,313	0,625	0,313	0,625
25	0,156	0,313	0,313	0,313	0,625
26	0,313	0,313	0,313	0,313	0,625
Amikacin	0,005	0,007	0,050	0,008	0,008
Hloramfenikol	0,062	0,125	0,250	0,043	0,062

^a aktivnost jedinjenja 23 nije ispitana na date sojeve zbog nedovoljne količine; zelena boja - bolja aktivnost bar od jednog standarda

Za određivanje antimikrobnog dejstva ispitivanih jedinjenja na gram-pozitivne bakterije, gram-negativne bakterije i gljivice korišćen je mikrodilucioni metod dvostrukog razblaženja.⁹⁴ Gram-negativne bakterije su bile: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) i *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031). Gram-pozitivne su bile: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Clostridium sporogenes* (ATCC 19404), *Streptosporangium longisporum* (ATCC 25212), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240), *Sarcina lutea* (ATCC 9341), *Micrococcus luteus* (ATCC 15307) i *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Gljivice korišćene u testu su bile: *Candida albicans* (ATCC 10231), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), *Penicillium species*,

Trichoderma viride, *Fusarium proliferatum* (izolovane iz cveta nevena), *Fusarium semitectum* (izolovan iz kukuruzne svile), *Fusarium tricinctum* (izolovan iz lista nane), *Fusarium equiseti* (izolovan iz rastavića). Rezultati su prikazani redom u **Tabelama 2.4.5, 2.4.6 i 2.4.7.**

Od ispitanih petnaest diarilheptanoida i diarilheptanoid glikozida kojima je tretirano pet gram-negativnih i sedam gram-pozitivnih sojeva bakterija najbolju antibakterijsku aktivnost prema gram-negativnim bakterijama (posmatrajući sve ispitane sojeve) pokazala su jedinjenja platifilenon (**4**) (iz zelene jove), hirsutenon (**16**) i oregonin (**17**) (iz crne jove) (**Slika 2.4.7**). Što se tiče pojedinačno sojeva najjaču aktivnost prema *E. coli* pokazao je hirsutenon sa MIC vrednošću od 0,078 mg/mL, prema *P. vulgaris* pokazali su platifilenon, hirsutenon i oregonin sa MIC vrednostima od 0,156 mg/mL, prema *P. aeruginosa* jedinjenja platifilenon i hirsutenon sa MIC vrednostima od po 0,156 mg/L, prema *S. enteritidis* oregonin sa MIC vrednošću od 0,156 mg/mL i prema *K. pneumoniae* platifilozid (**1**), jedinjenje **2** i oregonin sa MIC vrednostima od po 0,078 mg/mL (**Tabela 2.4.5**). Poređenjem sa standardima uočeno je da su prema soju *P. aeruginosa* platifilenon i hirsutenon pokazali višu aktivnost od hloramfenikola. Hirsutenon je pokazao aktivnost blisku hloramfenikolu na soj *E. coli*, jedinjenje **2** i oregonin na soj *K. pneumoniae*, a platifilenon, hirsutenon i oregonin su pokazali aktivnost blisku hloramfenikolu na soj *P. vulgaris* (**Tabela 2.4.5**).

Slično je zapaženo i prilikom ispitivanja antibakterijske aktivnosti prema gram-pozitivnim bakterijama. Mala razlika u odnosu na antibakterijsku aktivnost prema gram-negativnim bakterijama je u tome što je oregonin pokazao neznatno jaču aktivnost od jedinjenja sa dvostrukom vezom, platifilenona i hirsutenona, i što se uz ova jedinjenja kao znatno aktivno ističe i jedinjenje **2**. Ono ima u položaju 3 keto, a u položaju 5 disaharidnu apiofuranozil-glukopiranozil grupu, a nema kateholske grupe u položajima 1 i 7 već *p*-hidroksifenil (**Slika 2.4.7**). Što se tiče pojedinačno sojeva najjaču aktivnost prema *S. lutea* imao je oregonin sa MIC vrednošću od 0,078 mg/mL, prema *S. aureus* imao je hirsutenon sa MIC vrednošću 0,039 mg/mL, kao i platifilenon, rubranozid A i jedinjenje **23** sa MIC vrednostima od po 0,078 mg/mL. Prema *M. flavus* najjaču aktivnost imao je platifilenon sa MIC vrednošću od 0,078 mg/mL, prema *S. longisporum*, *C. sporogenes* i *M. luteus* oregonin sa MIC vrednošću od 0,078 mg/mL i prema *B. subtilis* platifilenon i oregonin sa MIC vrednošću od 0,078 mg/mL (**Tabela 2.4.6**).

Poređenjem sa antibiotskim standardima uočeno je da je prema soju *S. lutea* oregonin pokazao višu aktivnost i od amikacina i od hloramfenikola. Isto jedinjenje je pokazalo znatno višu aktivnost od hloramfenikola prema *C. sporogenes*, a nešto nižu, ali takođe višu prema istom soju, pokazali su platifilozid (**1**), acerozid VIII (**6**) i jedinjenja **2** i **10**. Oregonin je pokazao minimalno nižu aktivnost od amikacina i hloramfenikola prema soju *S. longisporum*. Hirsutenon je pokazao antibakterijsku aktivnost nešto nižu od amikacina prema soju *M. luteus*. Platifilenon i oregonin su pokazali takođe nešto nižu aktivnost od amikacina prema soju *B. subtilis* (**Tabela 2.4.6**).

Tabela 2.4.6. Antibakterijska aktivnost prema gram-pozitivnim bakterijama izražena u MIC vrednostima (mg/mL)

Bakterijska vrsta Jedinjenje	<i>S. lutea</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. flavus</i>	<i>S. longisporum</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>
1	0,156	0,625	0,313	0,156	0,156	0,156	0,313
2	0,156	0,625	0,156	0,156	0,156	0,156	0,313
4	0,156	0,078	0,078	0,156	0,313	0,078	0,156
5	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625
6	0,313	0,625	0,313	0,156	0,156	0,313	0,625
10	0,313	0,625	0,313	0,156	0,156	0,156	0,625
14	0,313	0,313	0,313	0,313	0,625	0,313	0,156
15	0,313	0,313	0,625	0,313	0,625	0,313	0,156
16	0,156	0,039	0,156	0,313	0,313	0,156	0,078
17	0,078	0,156	0,156	0,078	0,078	0,078	0,313
22	0,313	0,078	0,313	0,313	0,313	0,313	0,156
23	0,625	0,078	_ ^a	_ ^a	_ ^a	_ ^a	_ ^a
24	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	0,313	0,625
25	0,313	0,313	0,625	0,313	0,313	0,313	0,156
26	0,625	0,625	0,625	0,313	0,625	0,625	0,625
Amikacin	0,002	0,011	0,002	0,065	0,015	0,042	0,065
Hloramfenikol	0,125	0,015	0,031	0,066	0,250	0,015	0,020

^a aktivnost jedinjenja **23** nije ispitana na date sojeve zbog nedovoljne količine; zelena boja - bolja aktivnost bar od jednog standarda

Prilikom određivanja antifungalne aktivnosti ispitivanim diarilheptanoidima i diarilheptanoid glikozidima je tretirano osam sojeva gljivica i zapažena je značajna aktivnost. Prema nekim sojevima visoku aktivnost, u nekim slučajevima i višu od standardnih antimikotika flukonazola i nistatina, pokazala su skoro sva ispitivana jedinjenja (**Tabela 2.4.7**). Slično antibakterijskim aktivnostima, platifilenon (**4**), hirsutenon (**16**) i oregonin (**17**) su, generalno, pokazali daleko najjaču aktivnost. Što se tiče sojeva pojedinačno, najjaču aktivnost, čak jaču od oba standarda antimikotika nistatina i flukonazola, prema soju *C. albicans* pokazali su platifilenon i hirsutenon, oba sa dvostrukom vezom na heptanskom nizu diarilheptanoidnog skeleta. Čak je i velika većina ostalih jedinjenja (njih devet od petnaest) imala MIC vrednost istu kao standardni antimikotik flukonazol, a sva jaču od nistatina prema *C. albicans*. Slično je i sa sojem *S. cerevisiae*, prema kojem je najjaču aktivnost pokazao platifilenon, jaču od oba standarda antimikotika, dok je većina ispitanih jedinjenja bila podjednako dobra kao flukonazol, a sva bolja od nistatina. Posmatrajući *Penicilium sp.*, devet od petnaest ispitanih jedinjenja je imalo jednako dobru aktivnost kao flukonazol, a nešto nižu od nistatina. Platifilenon je pokazalo najjaču aktivnost i prema *F. semitectum*, jaču od oba standardna antimikotika, dok je još osam ispitanih jedinjenja imalo jednako dobru aktivnost kao flukonazol. Hirsutenon je pokazao najjaču aktivnost i prema *T. viride*, jaču od oba standardna antimikotika, dok su platifilenon i rubranozid A imali jaču aktivnost od flukonazola, a jednako dobru kao nistatin. Jedanaest ispitanih jedinjenja je pokazalo jednako dobru aktivnost kao flukonazol prema soju *T. viride*. Prema soju *F. tricinctum* sva ispitana jedinjenja su imala jaču ili jednaku aktivnost flukonazolu, a slabiju od nistatina. Prema soju *F. equiseti* pet jedinjenja je pokazalo višu aktivnost od oba standarda, dok je jedno bilo jednako po aktivnosti nistatinu, a aktivnije od flukonazola, dok su sva ostala bila jača od flukonazola. Prema soju *F. proliferatum* četiri jedinjenja su pokazala jaču aktivnost od oba standarda antimikotika, dok su sva ostala pokazala aktivnost jednaku aktivnosti oba standardna antimikotika (**Tabela 2.4.7**).

Najsenzitivnije gljivične vrste ka ispitivanim diarilheptanoidima bile su *Fusarium equiseti*, *Fusarium proliferatum* i *Candida albicans* prema kojima su 5, 4, odnosno 2 diarilheptanoida, pokazala jaču aktivnost od oba standarda antimikotika, a u slučaju vrsta *Fusarium proliferatum* i *Candida albicans* svih 15, odnosno 9 diaril-

heptanoida je imalo jaču aktivnost od jednog, a jednaku drugom standardnom antimikotiku (**Tabela 2.4.7**).

Tabela 2.4.7. Antifungalna aktivnost izražena u MIC vrednostima (mg/mL)

Vrsta gljivice Jedinjenje	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>F. semitectum</i>	<i>T. viride</i>	<i>F. tricinctum</i>	<i>F. equiseti</i>	<i>F. proliferatum</i>
1	0,625	0,313	0,313	0,313	0,625	0,156	0,00244	0,156
2	0,313	0,313	0,313	0,625	0,313	0,156	0,0195	0,156
4	0,156	0,156	0,156	0,078	0,156	0,156	0,00061	0,078
5	0,313	0,625	0,156	0,313	0,313	0,156	0,313	0,313
6	0,313	0,313	0,313	0,625	0,313	0,156	0,00061	0,313
10	0,313	0,313	0,313	0,625	0,625	0,156	0,00061	0,313
14	0,313	0,625	0,156	0,313	0,313	0,156	0,156	0,313
15	0,313	0,625	0,156	0,313	0,313	0,313	0,156	0,313
16	0,156	0,313	0,313	0,313	0,078	0,313	0,00061	0,313
17	0,313	0,313	0,156	0,313	0,313	0,156	0,00975	0,156
22	0,313	0,313	0,313	0,625	0,156	0,313	0,00061	0,313
23	0,625	0,625	0,156	0,313	0,313	0,156	0,156	0,313
24	0,313	0,625	0,156	0,625	0,313	0,313	0,313	0,313
25	0,625	0,625	0,156	0,625	0,313	0,156	0,313	0,313
26	0,625	0,625	0,156	0,313	0,313	0,313	0,156	0,313
Nistatin	2,500	1,250	0,039	0,156	0,156	0,00244	0,00244	0,313
Flukonazol	0,313	0,313	0,156	0,313	0,313	0,313	0,625	0,313

-crvena boja - bolja aktivnost od oba standarda; plava boja - bolja ili jednaka aktivnost od jednog standarda, jednaka drugom; zelena boja - aktivnost bolja ili jednaka jednom od standarda, slabija od drugog

Strukturne karakteristike jedinjenja koja su pokazala najbolje antimikrobne aktivnosti, platifilenona, hirsutenona i oregonina, za koje se pretpostavlja da su odgovorne za date aktivnosti su: Δ^4 dvostruka veza, keto grupa u položaju 3, obe kateholske grupe i 5-ksilopiranozil grupa. Pojedinačno nijedna od ovih grupa nije dovoljna, ali neke od kombinacija ove tri grupe, kao što je kombinacija prve, druge i treće u hirsutenonu (**16**), i druge, treće i četvrte u oregoninu (**17**) daju jedinjenja sa dobrim antibakterijskim i posebno antifungalnim aktivnostima. Za platifilenon (**4**) to su samo prve dve i stoga je pretpostavka da je Δ^4 dvostruka veza najbitniji strukturni element, pošto kombinacije bilo kojih drugih dveju grupa ne daju jedinjenja sa dobrim antimikrobnim aktivnostima. Tako hirsutanonol (**14**) i 5(*S*)-*O*-metilhirsutanonol (**15**) (Slika 2.4.7) imaju u svojoj strukturi i 3-keto i obe kateholske grupe, jedinjenje **24** ima 3-keto i 5-ksilopiranozil grupu, a jedinjenje **23** ima obe kateholske i 5-ksilopiranozil funkciju, a nemaju značajniju antibakterijsku ni antifungalnu aktivnost.

Posmatrajući antimikrobnu aktivnost u globalu, kao najbolji antibiotici i antimikotici ističu se platifilenon (**4**), hirsutenon (**16**) i oregonin (**17**), što je u skladu sa radom Saksene i saradnika koji su za oregonin utvrdili da ima najjaču aktivnost od svih izolovanih jedinjenja crvene jove.⁹³ Kako je oregonin daleko najzastupljenije jedinjenje hloroformsko-metanolnog (1:1) ekstrakta crne jove, i kako i hirsutenona ima u značajnoj količini, moglo bi se zaključiti da bi ekstrakt crne jove mogao poslužiti kao značajan prirodni antibiotik i antimikotik.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Aparati i hemikalije

Optička rotacija $[\alpha]_D^{20}$ je određivana polarimetrom *Rudolph Research Analytical AUTOPOL® IV*. Kao rastvarač je korišćen metanol.

UV spektri su snimani na spektrofotometru *GBC Cintra 40* i na analitičkim LC/DAD sistemima *Agilent Technologies 1100* i *Agilent Technologies 6210*.

IR spektri su snimani na spektrometrima *Perkin-Elmer FT IR 1725X* i *ThermoScientific Nicolet 6700 FT-IR*, tehnikom KBr pilule.

CD spektri su snimani na *JASCO J-815* spektropolarimetru.

NMR spektri su snimani na spektrometrima *Varian Gemini 2000* (200 MHz za ^1H), *Bruker AMX 500* i *Bruker Avance III 500* (500 MHz za ^1H). Uzorci su snimani na sobnoj temperaturi i u NMR kovetama prečnika 5 mm. Kao rastvarač korišćen je CD_3OD i njegovi signali su korišćeni kao referentni. Hemijska pomeranja δ su izražena u ppm jedinicama, a konstante kuplovanja (J) u Hz.

Maseni spektri visoke rezolucije snimani su na LC/MS sistemu *Agilent Technologies 6210 Time-of-flight* u uslovima elektrosprej jonizacije. Metanolni rastvori čistih jedinjenja su u struji mobilne faze (0,2 % mravlja kiselina/acetonitril=50:50), protoka 0,2 mL/min, unošeni u maseni spektrometar pomoću *Agilent Technologies 1200 Series HPLC* instrumenta (*Agilent Technologies, Waldbronn, Germany*), opremljenog binarnom pumpom, autosamplrom, kolonskim kompartmentom (sa ZDV ćelijom umesto kolone) i DAD detektorom. Maseni spektri su snimani u pozitivnom i negativnom modu u sledećim uslovima: napon kapilare 4000 V, temperatura gasa 350 °C, protok gasa za sušenje 12 L/min, pritisak nebulajzera 45 psig, napon fragmentora 140 V, opseg masa 100–3200 m/z . Za sakupljanje i obradu podataka korišćen je *MassHunter Workstation* software.

Za hromatografiju na koloni (CC) korišćen je silika gel veličine 0,063-0,200 mm. Analitička tankoslojna hromatografija (TLC) rađena je na aluminijumskim pločama debljine 0,25 mm (*Silica gel 60 F₂₅₄, Merck, Germany*). Za semipreparativno

razdvajanje tečnom hromatografijom korišćen je *Agilent Technologies 1100* sistem sa DAD detektorom, a za određivanje D-glukoze u hidrolizatima novih jedinjenja korišćen je *Dionex ICS 3000 DP* sistem sa elektrohemijskim detektorom.

Standard D-(+)-glukoze je komercijalni proizvod (Tokyo Chemical Industry, TCI, Belgium). Natrijum hidroksid i natrijum-acetat trihidrat su nabavljeni od kompanije Merck, Germany). Svi vodeni rastvori su pripremljeni u ultračistoj dejonizovanoj vodi (Ultrapure TKA).

Kurkumin (prah) je komercijalni proizvod kompanije Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Germany. Rastvoren je u apsolutnom etanolu u koncentraciji od 20 mM i njegovi štokovi su čuvani na -20 °C. Doksorubicin (DOX) je komercijalni proizvod (EBEWE Arzneimittel GmbH, Vienna, Austria). Rastvoren je u dejonizovanoj vodi i 1 mM rastvor je čuvan na -20 °C. Za ispitivanje citotoksične aktivnosti ispitivani diarilheptanoidi su takođe rastvoreni u apsolutnom etanolu u koncentraciji od 20 mM i čuvani su na -20 °C. Njihovi radni rastvori u koncentraciji od 1 mM su pripremljeni razblaživanjem dejonizovanom vodom.

RPMI 1640 medijum, MEM (minimalni esencijalni medijum, engl. Minimum Essential Medium), rastvor penicilin–streptomycin, rastvor smeše antibiotik–antimikotik, L-glutamin i tripsin/EDTA su komercijalno dostupni proizvodi (PAA, Vienna, Austria). Fetalni goveđi serum (FBS), sulforodamin B (SRB) i dimetil–sulfoksid (DMSO) su proizvodi kompanije Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Germany. Medijum za odvajanje limfocita (Lymphocyte separation medium) proizvodi ICN Biomedicals, Costa Mesa, California, USA. 3-(4,5-dimetil-2-tizolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolijum bromid (MTT sredstvo) je proizvod kompanije Sigma, St. Louis, Missouri, USA. Propidijum-jodid (PI) je proizvod kompanije Roche Applied Science, Basel, Switzerland, a RNAza A je proizvod kompanije Invitrogen Life Technologies, California, USA.

Amifostin (S-2[3-aminopropilamino]-etilfosfotionska kiselina (98%)) je komercijalni proizvod kompanije Marligen-Biosciences, USA. Mitomicin C je komercijalni proizvod kompanije Invitrogen-Gibco-BRL, Vienna, Austria. RPMI 1640 Medium je komercijalni proizvod kompanije Invitrogen-Gibco-BRL, Vienna, Austria. Fitoheماغlutinin je komercijalni proizvod kompanije Invitrogen-Gibco-BRL, Austria. Citohalasin B je komercijalni proizvod kompanije Invitrogen-Gibco-BRL, Vienna,

Austria). Sredstvo za bojenje slajdova u CBMN eseju - alkalni Giemsa (2%) je komercijalni proizvod kompanije Sigma-Aldrich, Vienna, Austria. Amikacin i hloramfenikol su komercijalni proizvodi kompanije Galenika AD, Srbija, a nistatin i flukonazol kompanije Hemofarm, Srbija. Miler Hinton (Mueller Hinton) medijum je komercijalni proizvod kompanije Biolab, Hungary.

U procesu ekstrakcije i frakcionisanja početnih ekstrakata od rastvarača su najčešće korišćeni hloroform, metilen-hlorid i metanol. Svi rastvarači su pre korišćenja prečišćavani destilacijom i prema potrebi sušeni anhidrovanim natrijum-sulfatom.

3.2. Biljni materijal i postupak frakcionisanja ekstrakata

3.2.1. Biljni materijal

Biljni materijal je sakupljen na dve lokacije u Srbiji: kora zelene jove na Staroj planini, a kora crne jove u Prijepolju, obe jula 2010. godine. Identifikaciju su izvršili profesori Petar Marin i Milan Veljić, sa Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Herbarijumski primerci za *A. viridis* subsp. *viridis* – zelenu jovu i *A. glutinosa* – crnu jovu, zavedeni su pod brojevima No. 16681, odnosno 16621, u herbarijumu Botaničkog instituta i Botaničke bašte Jevremovac, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu.

3.2.2. Ekstrakcija i frakcionisanje ekstrakta kore zelene jove

Kora zelene jove je osušena na vazduhu, usitnjena, sprašena, izmerena u količini od 150,0 g i ekstrahovana sistemom rastvarača $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:1 (4×1 L, 24 h) na sobnoj temperaturi u mraku, uz pomoć ultrazvučnog kupatila u poslednjem satu svake ekstrakcije. Vršene su 4 ekstrakcije, što znači da je posle svake pojedinačne čvrsti ostatak posle ceđenja potapan u novu količinu sistema rastvarača. Spojeni ekstrakti su upareni na rotacionom vakuum uparivaču i dobijeno je 31,0 g ekstrakta, što čini prinos ekstrakcije od 20,7%.

Polovina sirovog ekstrakta kore zelene jove (15,5 g) je frakcionisana gradijentno na stubu silika gela dimenzija $65 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$. Početni elucioni sistem bio je 100% metilen-hlorid, a posle je gradijentno povećavana polarnost povećanjem udela metanola

sve do 60%. Tok hromatografije dat je u **Tabeli 3.2.1**. Dobijeno je 220 frakcija od približno 15 mL. Ovako dobijene frakcije su analizirane tankoslojnom hromatografijom uz UV detekciju na 254 nm i slične frakcije su spojene u veće iz kojih su potom izolovana čista jedinjenja semipreparativnom HPLC hromatografijom. Različiti odnosi CH₂Cl₂/MeOH su korišćeni kao mobilna faza u TLC analizama.

Tabela 3.2.1. Tok kolonske hromatografije prilikom razdvajanja ekstrakta kore zelene jove

Zapremina sistema eluenta (mL)	Metilen-hlorid (%)	Metanol (%)
200	100	0
600	90	10
800	85	15
800	80	20
600	75	25
800	70	30
700	65	35
400	60	40
600	50	50
400	40	60

3.2.3. Ekstrakcija i frakcionisanje ekstrakta kore crne jove

Izolovanje iz kore crne jove rađeno je dva puta, pošto su u prvom navratu izolovana zastupljena jedinjenja, a u drugom ona manje zastupljena. Oba puta ekstrakcija je rađena na isti način. Kora je osušena na vazduhu, usitnjena, sprášena, izmerena u količini od 100,0 g i ekstrahovana sistemom CHCl₃/MeOH 1:1 (4 × 1 L, 24 h) na sobnoj temperaturi u mraku, uz pomoć ultrazvučnog kupatila u poslednjem satu svake ekstrakcije. Vršene su četiri ekstrakcije, što znači da je posle svake pojedinačne čvrsti ostatak posle ceđenja potapan u novu količinu sistema rastvarača (1 L). Spojeni ekstrakti su upareni na rotacionom vakuum uparivaču i dobijeno je 24,0 g ekstrakta prilikom prve ekstrakcije (prinos ekstrakcije od 24,0%) i 23,2 g prilikom druge (prinos ekstrakcije 23,2%).

U prvom izolovanju iz kore crne jove akcenat je bio na onim diarilheptanoidima i njihovim glikozidima – jedinjenjima zastupljenim u većoj količini u kori crne jove i stabilnim pri normalnim uslovima (oznake frakcija sa „J“). Drugo izolovanje iz kore crne jove je rađeno sa ciljem da se izoluju složeni, manje zastupljeni, nestabilni

diarilheptanoidi, a pogodni uslovi za njihovo izolovanje su bili ustanovljeni na osnovu podataka iz prvog izolovanja. Spojene frakcije iz drugog izolovanja su nosile oznake „AG“ na početku svoga imena, ispred brojeva koji su označavali broj početne i poslednje frakcije koja je spojena. Prilikom prvog izolovanja polovina sirovog ekstrakta kore crne jove (12,0 g) je frakcionisana gradijentno na stubu silika gela dimenzija 60×5 cm. Početni elucioni sistem bio je 100% metilen-hlorid, a posle je povećavana polarnost povećanjem udela metanola sve do 50%. Tok hromatografije dat je u **Tabeli 3.2.2**. Dobijeno je 200 frakcija od po približno 15 mL.

Tabela 3.2.2. Tok kolonske hromatografije prilikom prvog razdvajanja ekstrakta kore crne jove (izolovanje zastupljenih diarilheptanoida)

Zapremina sistema eluenta (mL)	Metilen-hlorid (%)	Metanol (%)
200	100	0
200	97	3
1200	95	5
200	92	8
200	88	12
600	85	15
200	83	17
600	80	20
400	75	25
600	70	30
200	67	33
200	65	35
400	60	40

Prilikom drugog izolovanja 11,6 g ekstrakta je frakcionisano gradijentno na stubu silika gela dimenzija 54×5 cm. Početni elucioni sistem bio je 100% metilen-hlorid, a potom je povećavana polarnost povećanjem udela metanola sve do 50%. Tok hromatografije dat je u **Tabeli 3.2.3**. Dobijeno je 180 frakcija od po približno 15 mL. Frakcije dobijene sa kolone silika gela iz oba izolovanja su analizirane tankoslojnom hromatografijom uz UV detekciju na 254 nm i slične frakcije su spojene u veće iz kojih su potom izolovana čista jedinjenja semipreparativnom reversno-faznom HPLC hromatografijom. Pri TLC analizama različiti odnosi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ su korišćeni kao mobilna faza.

Tabela 3.2.3. Tok kolonske hromatografije prilikom drugog razdvajanja ekstrakta kore crne jove (izolovanje manje zastupljenih diarilheptanoida)

Zapremina sistema eluent (μL)	Metilen-hlorid (%)	Metanol (%)
250	100	0
350	92	8
800	90	10
400	88	12
400	86	14
400	84	16
400	82	18
400	80	20
200	78	22
200	75	25
400	70	30
200	65	35
400	60	40
400	50	50

3.3. Izolovanje čistih jedinjenja

3.3.1. Razdvajanje frakcija ekstrakata zelene i crne jove

Razdvajanje frakcija koje su dobijene frakcionisanjem ekstrakata kore zelene i crne jove na silika gelu rađeno je semipreparativnom reversno-faznom tečnom hromatografijom na HPLC sistemu *Agilent Technologies 1100*. Korišćena je kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 (250 × 9,4 mm; 5 μm), na 25 °C, pri konstantnom protoku od 4 mL/min. Detekcija je vršena na tri talasne dužine, 280, 320 i 254 nm. Kao mobilna faza je korišćen sistem koji se sastojao od 0,2% mravlje kiseline u vodi (A) i acetonitrila (B), pri izolovanju diarilheptanoida iz zelene jove i zastupljenih diarilheptanoida iz crne jove, i sistem koji se sastojao od vode (A) i acetonitrila (B) u drugom delu izolovanja iz kore crne jove pri izolovanju manje zastupljenih složenih diarilheptanoida koji su bili skloni izomerizaciji u kiselim uslovima. HPLC programi koji su korišćeni su JOVA2PREP za razdvajanje frakcija ekstrakta crne (Tabela 3.3.1) i JOVA3PREP za razdvajanje frakcija ekstrakta zelene jove (Tabela 3.3.2). Prilikom izolovanja diarilheptanoida iz crne jove zastupljenih u maloj količini, frakcije iz kolektora su odmah po

završetku svakog HPLC razdvajanja presipane u odgovarajuće epruvete obmotane aluminijumskom folijom (da bi bile zaštićene od svetlosti) i čuvane su u frižideru na + 4 °C, sve u cilju sprečavanja izomerizacije na dvostrukoj vezi cinamične kiseline.

Tabela 3.3.1. HPLC program JOVA2PREP

Vreme (min)	0	20	30	35	36
% B	20	30	60	80	20

Tabela 3.3.2. HPLC program JOVA3PREP

Vreme (min)	0	20	25	28	31
% B	15	25	40	70	100

Za razdvajanje jedinjenja iz frakcija crne jove, koja su se u osnovnom hromatogramu (dobijenom HPLC programom JOVA2PREP) javljala u vidu pikova vrlo bliskih retencionih vremena (koji su se delimično i preklapali), korišćeni su specijalno dizajnirani HPLC programi dati u **Tabelama 3.3.3 i 3.3.4.**

Tabela 3.3.3. HPLC program za razdvajanje izomera - jedinjenja **25 i 26**

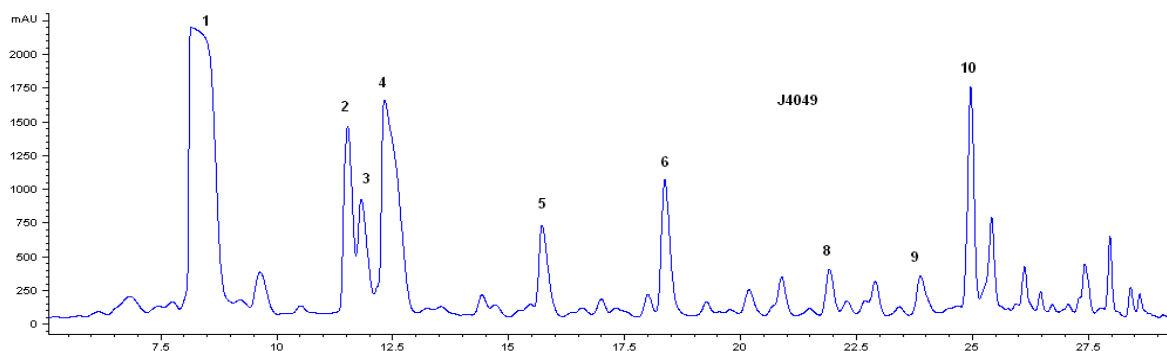
Vreme (min)	0	20	22	30	31
% B	20	22	40	80	20

Tabela 3.3.4. HPLC program za razdvajanje diarilheptanoida **18 i 23**

Vreme (min)	0	20	22	26	27
% B	17	18	40	80	20

U oba slučaja rastvarač B bio je acetonitril (rastvarač A – 0,2% HCOOH). Detekcione talasne dužine, protok i temperatura su bili isti kao kod razdvajanja ekstrakata po programima JOVA2PREP i JOVA3PREP.

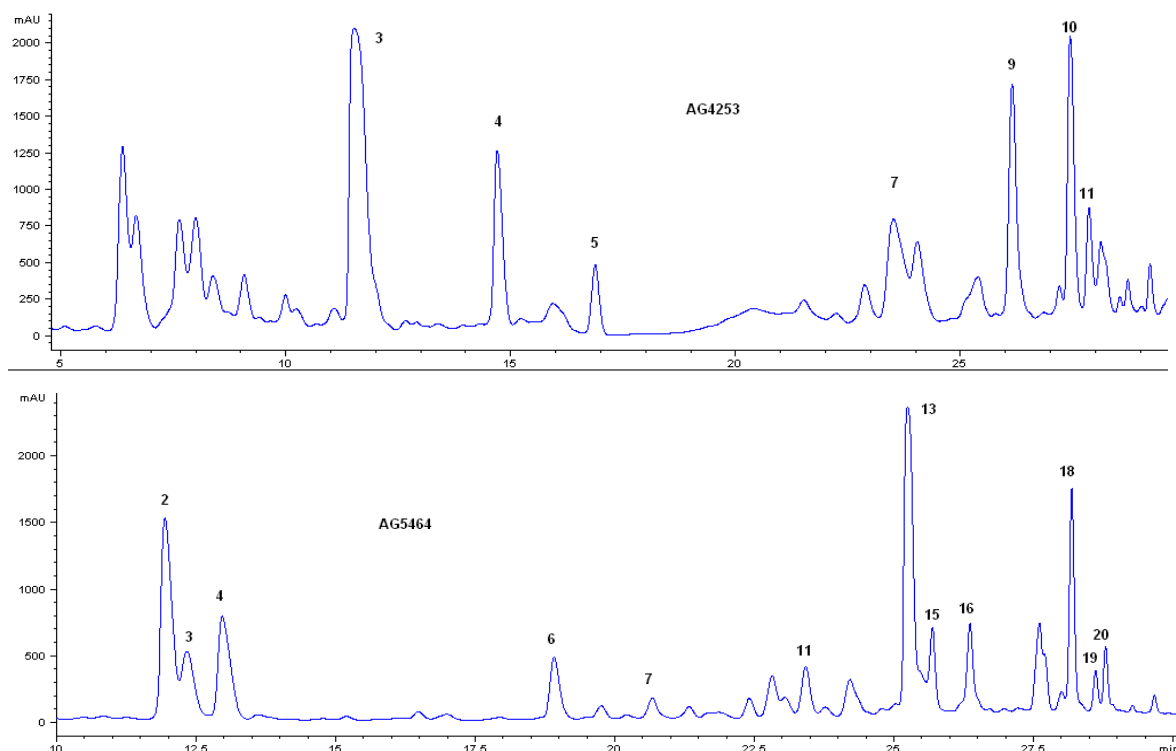
Zastupljeniji diarilheptanoidi crne jove izolovani su iz sledećih spojenih frakcija sa kolone silika gela: **J2633** (**J2633/3** – jedinjenje **14**, **J2633/4** – jedinjenje **24**, **J2633/6** – jedinjenje **15**) **J3439** (**J3439/9-10/1** – jedinjenje **29**), **J4049** (**J4049/2/2** – jedinjenje **25**, **J4049/2/3** – jedinjenje **26**, **J4049/4** – jedinjenje **1**, **J4049/5** – jedinjenje **21**, **J4049/6** – jedinjenje **31**, **J4049/8**, jedinjenje **5**, **J4049/9** – jedinjenje **16**), **J5057** (**J5057/1** – jedinjenje **17**, **J5057/3** – jedinjenje **27**, **J5057/10** – jedinjenje **28**) i **J6676** (**J6676/3/2** – jedinjenje **23** i **J6676/5** – jedinjenje **22**). Spojene frakcije su dobile nazive po broju prve i poslednje spojene frakcije sa kolone silika gela, a oznaka „J” koja prethodi potiče od srpskog naziva za biljke ovog roda - „jova”. Spojena frakcija **J5865** je sadržala već izolovana jedinjenja iz spojenih frakcija **J4049** i **J5057** i korišćena je za obogaćivanje postojećih. Nisu sva jedinjenja bila zastupljena samo u jednoj od pomenutih spojenih frakcija; neka ista jedinjenja su izolovana iz susednih frakcija i na taj način su obogaćivana. Na **Slici 3.3.1.** je prikazan primer HPLC hromatograma frakcije iz koje je izolovan najveći broj jedinjenja.



Slika 3.3.1. HPLC hromatogrami frakcija **J4049**

Manje zastupljeniji diarilheptanoidi crne jove izolovani su iz sledećih spojenih frakcija sa kolone silika gela: **AG1430** (**AG1430/3** – jedinjenje **38**, **AG1430/4/2** – jedinjenje **40** (nije izolovano čisto, samo identifikovano iz smeše), **AG1430/6/1** – jedinjenje **36**, **AG1430/8/1** – jedinjenje **19**), **AG4253** (**AG4253/7** – jedinjenje **20**, **AG4253/9** – jedinjenje **37**, **AG4253/10** – jedinjenje **41** (nije izolovano čisto, identifikovano iz smeše), **AG4253/11** – jedinjenje **39**) i **AG5464** (**AG5464/13/1** –

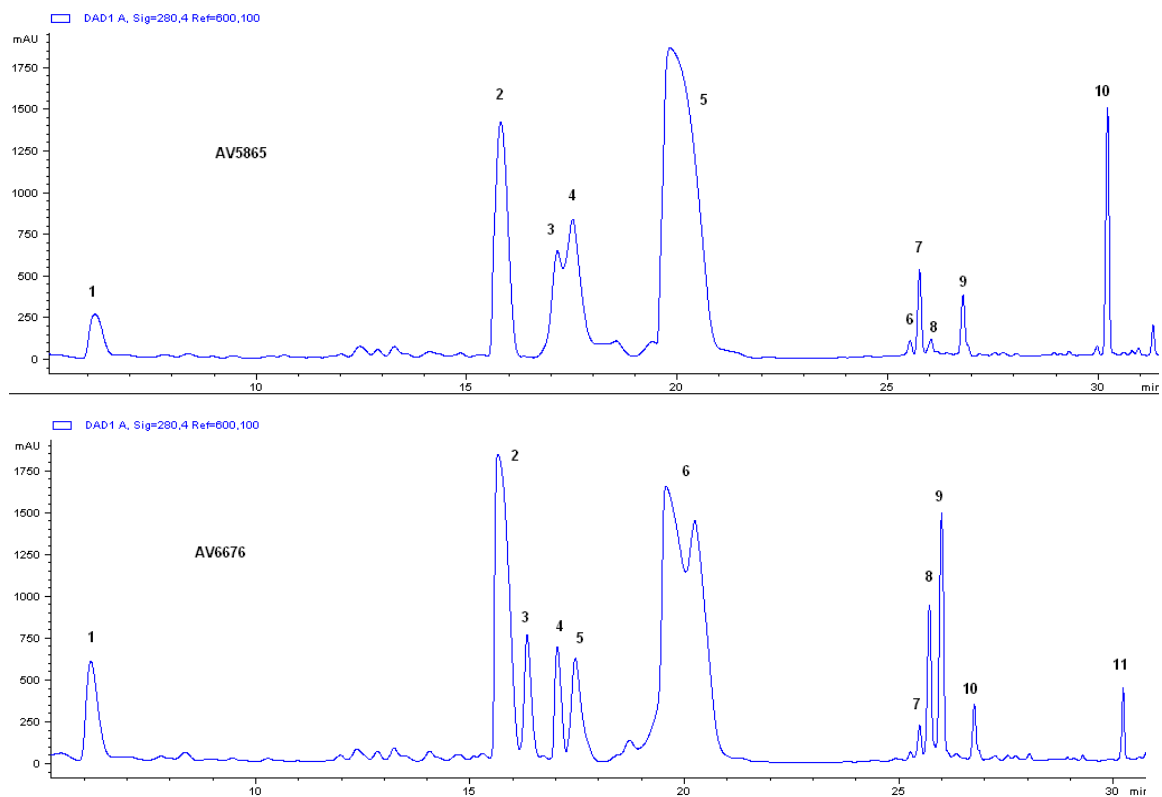
jedinjenje **29**, **AG5464/13/2** – jedinjenje **30**, **AG5464/16** – jedinjenje **32**, **AG5464/18** – jedinjenje **33**, **AG5464/19/2** – jedinjenje **34**, **AG5464/20** – jedinjenje **35**). Iz frakcije **AG3141** izolovani su diarilheptanoidi koji su već bili izolovani iz drugih frakcija. Frakcije su dobile imena po prvim slovima latinskog naziva biljke (*Alnus glutinosa* – „AG”) i rednih brojeva prve i poslednje iz grupe sličnih frakcija (dobijenih sa kolone silika gela) spojenih u datu veliku. Na **Slici 3.3.2** dati su HPLC hromatogrami frakcija iz kojih je izolovan najveći broj novih diarilheptanoida i brojevima obeležena izolovana jedinjenja.



Slika 3.3.2. HPLC hromatogrami frakcija **AG4253** i **AG5464**

Jedinjenja iz kore zelene jove su izolovana semipreparativnom HPLC hromatografijom iz sledećih spojenih frakcija: **AV5865** (**AV5865/6** – jedinjenje **7**, **AV5865/7** – jedinjenje **8**), **AV6676** (**AV6676/1** – jedinjenje **12**, **AV6676/2** – jedinjenje **10**, **AV6676/6** – jedinjenje **1**, **AV6676/9** – jedinjenje **6**, **AV6676/10/2** – jedinjenje **5**, **AV6676/11/2** – jedinjenje **4**), **AV88105** (**AV88105/2** – jedinjenje **11**, **AV88105/11/2** – jedinjenje **13**), **AV106117** (**AV106117/5X** – jedinjenje **9**), **AV130141** (**AV130141/4** – jedinjenje **2**) i **AV142159** (**AV142159/8** – jedinjenje **3**). Iz frakcija **AV7787** i

AV118129 su izolovana jedinjenja ista kao u frakcijama koje su im prethodile. Spojene frakcije su dobile nazive po brojevima prve i poslednje spojene frakcije sa kolone silika gela, a oznaka „AV” koja prethodi brojevima potiče od prvih slova latinskog naziva za ovu biljnu vrstu - *Alnus viridis*. Često su se u susednim frakcijama nalazila ista jedinjenja, pa su se jedinjenja koja su u jednoj frakciji bila slabo zastupljena mogla naći u većim količinama u drugoj, i na taj način su obogaćivana. Na **Slici 3.3.3** dati su primeri HPLC hromatograma semipreparativnog razdvajanja jedinjenja iz spojenih frakcija dobijenih frakcionisanjem početnog ekstrakta kore zelene jove na koloni silika gela.



Slika 3.3.3. HPLC hromatogrami frakcija **AV5865** i **AV6676**

3.3.2. Dokazivanje D-glukoze u složenim diarilheptanoidima crne jove

Prisustvo D-glukoze u složenim diarilheptanoidima crne jove, za koju su estarski vezane cinamične kiseline, određeno je kiselom hidrolizom jedinjenja i HPLC analizom. Svako od novih jedinjenja za koje je dokazivano prisustvo D-glukoze izmereno je u količini od oko 1 mg i svako je pojedinačno hidrolizovano 30 min u aparaturi za refluksovanje na 100 °C pomoću 2 M HCl (1,0 mL). Posle hlađenja svaka reakciona

smeša je neutralisana do pH 7 čvrstim NaHCO₃, proceđena kroz HPLC 0,45 µm filter i hromatografisana na DIONEX ICS 3000 DP tečno-hromatografskom sistemu. Standardni rastvor D-glukoze je pripremljen u ultra čistoj vodi u koncentraciji od 20 µg/mL sa dodatih 70 mg NaCl (pošto je tolika količina NaCl zaostajala u hidrolizatima posle neutralizacije). D-Glukoza u jedinjenjima je dokazana poređenjem sa retencionim vremenom standarda. Standardi njenih epimera D-manoze i D-galaktoze su imali drugačija retencionna vremena i tako su isključeni. Specijalizovani program za analizu monosaharida je dat u **Tabeli 3.3.5**. Rastvarač A je bio 600 mM NaOH, B je bio 600 mM NaOAc i C ultra čista voda. Protok je bio 0,7 mL/min. Pre analize sistem je pre-kondicioniran početnim sistemom rastvarača - 15% A, 85% C u vremenu od 30 min. Korišćen je elektrohemijski detektor kod kojeg je kao radna elektroda korišćena zlatna elektroda, a kao referentna Ag/AgCl elektroda.

Tabela 3.3.5. Specijalizovani HPLC program za analizu monosaharida

Vreme (min)	% A	% B	% C
0	15	0	85
5	15	0	85
5,1	15	2	83
12	15	2	83
12,1	15	4	81
20	15	4	81
20,1	20	20	60
30	20	20	60

3.3.3. Spektroskopski podaci za nova jedinjenja

U ovom poglavlju dati su spektroskopski podaci za nova jedinjenja **3, 7, 8, 9, 11, 13, 19, 27, 29-39**. Za pojedina nova jedinjenja (**7, 9, 13, 19**) CD, UV i IR spektri nisu mogli biti snimljeni zbog toga što su izolovana u maloj količini ili zbog toga što nisu bila dovoljno čista.

3: $[\alpha]_D^{22}$ -38,0 (c 0,10, MeOH); CD (H₂O:MeOH/9:1, c $2,00 \times 10^{-4}$ M) $[\theta]_{222}$ +5126,2, $[\theta]_{235}$ 0, $[\theta]_{272}$ +2180,0; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 218 (4,01), 276 (3,78) nm; IR (MeOH) ν_{\max} 3295, 2929, 1700, 1654, 1609, 1598, 1515, 1453, 1360, 1234, 1073, 1015 cm⁻¹; ¹H NMR i ¹³C NMR podaci dati u **Tabeli 2.1.2**; HR-ESI-MS m/z 627,2085 [M-H]⁻ (izračunato za C₃₂H₃₆O₁₃-H, 628,2078).

7: $[\alpha]_D^{22}$ -51,0 (c 0,10, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 224 (3,90), 278 (3,55) nm; IR (MeOH) ν_{\max} 3348, 2929, 1614, 1513, 1448, 1359, 1233, 1076, 1042 cm⁻¹; ¹H NMR i ¹³C NMR podaci dati u **Tabeli 2.1.4**; HR-ESI-MS m/z 593,2649 [M-H]⁻ (izračunato za C₃₀H₄₂O₁₂-H, 593,2647). CD spektar nije snimljen.

8: $[\alpha]_D^{22}$ -91,1 (c 0,09, MeOH); CD (H₂O:MeOH/9:1, c $2,00 \times 10^{-4}$ M) $[\theta]_{228}$ -2583,0, $[\theta]_{245}$ 0, $[\theta]_{276}$ +271,7; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 224 (3,88), 278 (3,57) nm; IR (MeOH) ν_{\max} 3350, 2931, 1614, 1515, 1452, 1362, 1237, 1076, 1044 cm⁻¹; ¹H NMR i ¹³C NMR podaci dati u **Tabeli 2.1.4**; HR-ESI-MS m/z 593,2606 [M-H]⁻ (izračunato za C₃₀H₄₂O₁₂-H, 593,2604).

9: ¹H NMR i ¹³C NMR podaci dati u **Tabeli 2.1.5**; HR-ESI-MS m/z 591,2497 [M-H]⁻ (izračunato za C₃₀H₄₀O₁₂-H, 591,2466). $[\alpha]_D^{22}$ vrednost nije određena, a CD, UV i IR spektri nisu snimljeni zbog nedovoljne čistoće.

11: $[\alpha]_D^{22}$ -48,0 (c 0,10, MeOH); CD (H₂O:MeOH/9:1, c $2,00 \times 10^{-4}$ M) $[\theta]_{227}$ -2458,3, $[\theta]_{246,290}$ 0, $[\theta]_{277}$ +803,7; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 226 (3,92), 278 (3,67) nm; IR (MeOH) ν_{\max} 3313, 2939, 1613, 1514, 1452, 1365, 1238, 1060, 1015 cm⁻¹; ¹H NMR i ¹³C NMR podaci dati u **Tabeli 2.1.5**; HR-ESI-MS m/z 609,2576 [M-H]⁻ (izračunato za C₃₀H₄₂O₁₃-H, 609,2547).

13: $[\alpha]_D^{22}$ -57,0 (c 0,03, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 218 (4,22), 270 (3,93), 300 (3,77) nm; ^1H NMR i ^{13}C NMR podaci dati u **Tabeli 2.1.7**; HR-ESI-MS m/z : 567,1724 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (izračunato za $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{O}_{13}+\text{H}$, 567,1713); CD i IR spektri nisu snimljeni zbog male količine.

19: ^1H NMR i ^{13}C NMR podaci dati u **Tabeli 2.2.3**; HR-ESI-MS m/z : 491,1924 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (izračunato za $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{O}_{10}-\text{H}$: 491,1916). $[\alpha]_D^{22}$ vrednost nije određena, a CD, UV i IR spektri nisu snimljeni zbog nedovoljne čistoće.

27: $[\alpha]_D^{22}$ +7.5 (c 0,67, MeOH); CD ($\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}/9:1$, c $2,00 \times 10^{-4}$ M) $[\theta]_{230}$ -978,0, $[\theta]_{262}$ 0, $[\theta]_{285}$ +765,8; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 222 (3,62), 281 (3,16) nm; IR (MeOH) ν_{\max} 3343, 2926, 1703, 1610, 1515, 1445, 1366, 1241 cm^{-1} ; ^1H NMR i ^{13}C NMR podaci dati u **Tabeli 2.2.7**; HR-ESI-MS m/z : 491,1924 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (izračunato za $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{O}_{10}-\text{H}$: 491,1916).

29: $[\alpha]_D^{22}$ +4,0 (c 1,00, MeOH); CD ($\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}/9:1$, c $1,43 \times 10^{-4}$ M) $[\theta]_{220}$ -631,5, $[\theta]_{240}$ 0, $[\theta]_{285}$ +3870,0, $[\theta]_{311}$ +4408,9; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ), 230 (sh) (4,15), 287 (4,02), 324 (4,05) nm; IR (MeOH) ν_{\max} 3261, 2921, 1701, 1630, 1600, 1514, 1444, 1359, 1257, 1164, 1079, 830 cm^{-1} ; ^1H NMR i ^{13}C NMR podaci dati u **Tabeli 2.2.8**; HR-ESI-MS m/z : 697,2553 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (izračunato za $\text{C}_{36}\text{H}_{42}\text{O}_{14}-\text{H}$: 697,2512).

30: $[\alpha]_D^{22}$ -21,0 (c 1,00, MeOH); CD ($\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}/9:1$, c $1,43 \times 10^{-4}$ M) $[\theta]_{220}$ -20295,5, $[\theta]_{230}$ 0, $[\theta]_{244}$ +28807,8, $[\theta]_{288}$ +6564,8, $[\theta]_{300}$ 0, $[\theta]_{329}$ -9636,7; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ), 222 (sh) (4,31), 286 (4,11), 310 (4,04) nm; IR (MeOH) ν_{\max} 3372, 2926, 1701, 1630, 1602, 1514, 1451, 1369, 1259, 1166, 1080, 828 cm^{-1} ; ^1H NMR i ^{13}C NMR podaci dati u **Tabeli 2.2.8**; HR-ESI-MS m/z : 697,2545 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (izračunato za $\text{C}_{36}\text{H}_{42}\text{O}_{14}-\text{H}$: 697,2502).

31: $[\alpha]_D^{22}$ -7,0 (c 1,00, MeOH); CD (H₂O:MeOH/9:1, c $1,43 \times 10^{-4}$ M) $[\theta]_{223}$ +21538,1, $[\theta]_{313}$ +20986,2, $[\theta]_{357}$ 0; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ), 224 (sh) (4,51), 287 (4,37), 312 (4,31) nm; IR (MeOH) ν_{\max} 3344, 2920, 1702, 1633, 1600, 1511, 1441, 1376, 1258, 1168, 1076, 817 cm⁻¹; ¹H NMR i ¹³C NMR podaci dati u **Tabeli 2.2.8**; HR-ESI-MS m/z : 653,2329 [M-H]⁻ (izračunato za C₃₄H₃₈O₁₃-H: 653,2240); m/z : 677,2196 [M+Na]⁺ (izračunato za C₃₄H₃₈O₁₃+Na: 677,2205).

32: $[\alpha]_D^{22}$ -21,0 (c 1,00, MeOH); CD (H₂O:MeOH/9:1, c $1,43 \times 10^{-4}$ M) $[\theta]_{227}$ 0, $[\theta]_{238}$ +10854,0, $[\theta]_{299}$ +12679,3, $[\theta]_{368}$ 0; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ), 223 (4,44), 290 (4,19), 310 (4,14) nm; IR (MeOH) ν_{\max} 3398, 2925, 1704, 1631, 1606, 1587, 1513, 1452, 1382, 1281, 1250, 1182, 1124, 817 cm⁻¹; ¹H NMR i ¹³C NMR podaci dati u **Tabeli 2.2.9**; HR-ESI-MS m/z : 727,2634 [M-H]⁻ (izračunato za C₃₇H₄₄O₁₅-H: 727,2607).

33: $[\alpha]_D^{22}$ -11,0 (c 1,00, MeOH); CD (H₂O:MeOH/9:1, c $1,43 \times 10^{-4}$ M) $[\theta]_{223}$ +14576,5, $[\theta]_{246}$ +9649,6, $[\theta]_{293}$ +23816,4, $[\theta]_{326}$ +30144,2; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ), 220 (4,39), 232 (sh) (4,27), 288 (4,14), 322 (4,11) nm; IR (MeOH) ν_{\max} 3421, 2931, 1691, 1631, 1602, 1515, 1448, 1344, 1260, 1188, 1140, 1082, 1022, 811 cm⁻¹; ¹H NMR i ¹³C NMR podaci dati u **Tabeli 2.2.9**; HR-ESI-MS m/z : 685,2843 [M+H]⁻ (izračunato za C₃₆H₄₄O₁₃+H: 685,2855).

34: $[\alpha]_D^{22}$ -20,0 (c 1,00, MeOH); CD (H₂O:MeOH/9:1, c $1,43 \times 10^{-4}$ M) $[\theta]_{225}$ +44337,9, $[\theta]_{246}$ +29902,2, $[\theta]_{261}$ 0, $[\theta]_{270}$ -10151,0, $[\theta]_{282}$ 0, $[\theta]_{294}$ -15550,7; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ), 224 (sh) (4,33), 288 (4,18), 310 (4,14) nm; IR (MeOH) ν_{\max} 3354, 2923, 1698, 1630, 1604, 1515, 1451, 1377, 1272, 1141, 1079, 819 cm⁻¹; ¹H NMR i ¹³C NMR podaci dati u **Tabeli 2.2.10**; HR-ESI-MS m/z : 683,2768 [M-H]⁻ (izračunato za C₃₆H₄₄O₁₃-H: 683,2709).

35: $[\alpha]_D^{22}$ -40,0 (c 1,00, MeOH); CD (H₂O:MeOH/9:1, c $1,43 \times 10^{-4}$ M) $[\theta]_{221}$ 0, $[\theta]_{245}$ +33146,4, $[\theta]_{263}$ 0, $[\theta]_{285}$ +8975,8, $[\theta]_{300}$ 0, $[\theta]_{339}$ -8429,1; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ), 224 (sh) (4,46), 289 (4,20), 310 (4,14) nm; IR (MeOH) ν_{\max} 3395, 2925, 2853, 1697, 1631, 1606, 1587, 1512, 1453, 1380, 1281, 1124, 1081, 815 cm⁻¹; ¹H NMR i ¹³C NMR podaci dati u **Tabeli 2.2.10**; HR-ESI-MS m/z : 713,2847 [M-H]⁻ (izračunato za C₃₇H₄₆O₁₄-H: 713,2815).

36: $[\alpha]_D^{22}$ +12,0 (c 2,00, MeOH); CD (H₂O:MeOH/9:1, c $1,43 \times 10^{-4}$ M) $[\theta]_{221}$ +849,1, $[\theta]_{225}$ 0, $[\theta]_{228}$ -1347,1, $[\theta]_{237}$ 0, $[\theta]_{283}$ +3515,3, $[\theta]_{322}$ +2408,9, $[\theta]_{368}$ 0; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ), 223 (sh) (4,36), 246 (sh) (3,93) 287 (4,10), 322 (4,13) nm; IR (MeOH) ν_{\max} 3340, 2927, 1704, 1631, 1598, 1515, 1448, 1378, 1261, 1177, 1164, 1140, 1079, 1022, 828 cm⁻¹; ¹H NMR i ¹³C NMR podaci dati u **Tabeli 2.2.11**; HR-ESI-MS m/z : 667,2759 [M+H]⁺ (izračunato za C₃₆H₄₂O₁₂+H: 667,2749).

37: $[\alpha]_D^{22}$ -32,0 (c 1,00, MeOH); CD (H₂O:MeOH/9:1, c $1,43 \times 10^{-4}$ M) $[\theta]_{227}$ +8063,2, $[\theta]_{299}$ +6337,8, $[\theta]_{307}$ +7436,0, $[\theta]_{345}$ 0; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ), 224 (4,58), 286 (4,38), 314 (4,41) nm; IR (MeOH) ν_{\max} 3354, 2923, 1702, 1630, 1604, 1515, 1447, 1372, 1258, 1171, 1078, 831 cm⁻¹; ¹H NMR i ¹³C NMR podaci dati u **Tabeli 2.2.11**; HR-ESI-MS m/z : 621,2383 [M-H]⁻ (izračunato za C₃₄H₃₈O₁₁-H: 621,2341).

38: $[\alpha]_D^{22}$ -2,5 (c 2,00, MeOH); CD (H₂O:MeOH/9:1, c $1,43 \times 10^{-4}$ M) $[\theta]_{220}$ +2417,7, $[\theta]_{235}$ 0, $[\theta]_{291}$ +2317,8, $[\theta]_{316}$ +1910,8, $[\theta]_{368}$ 0; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ), 223 (sh) (4,41), 286 (4,21), 323 (4,19) nm; IR (MeOH) ν_{\max} 3304, 2929, 1702, 1630, 1600, 1515, 1450, 1361, 1261, 1183, 1141, 1079, 814 cm⁻¹; ¹H NMR i ¹³C NMR podaci dati u **Tabeli 2.2.12**; HR-ESI-MS m/z : 681,2594 [M-H]⁻ (izračunato za C₃₆H₄₂O₁₃-H: 681,2553).

39: $[\alpha]_D^{22}$ -10,0 (c 1,00, MeOH); CD (H₂O:MeOH/9:1, c $1,43 \times 10^{-4}$ M) $[\theta]_{220}$ -20295,5, $[\theta]_{230}$ 0, $[\theta]_{244}$ +28807,8, $[\theta]_{288}$ +6564,8, $[\theta]_{300}$ 0, $[\theta]_{329}$ -9636,7; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ), 220 (sh) (4,49), 288 (4,23), 310 (4,36) nm; IR (MeOH) ν_{\max} 3334, 2922, 1700, 1632, 1601, 1512, 1449, 1377, 1258, 1169, 1079, 831 cm⁻¹; ¹H NMR i ¹³C NMR podaci dati u **Tabeli 2.2.12**; HR-ESI-MS m/z : 681,2586 [M-H]⁻ (calcd. for C₃₆H₄₂O₁₃-H: 681,2553).

3.4. Biološke aktivnosti

3.4.1. Citotoksična aktivnost prema NCI-H460 ćelijskoj liniji kancera pluća

3.4.1.1. Ćelije i ćelijske kulture

Ćelijske linije humanog nesitnoćelijskog karcinoma pluća (NCI-H460) su komercijalni proizvod (American Type Culture Collection, Rockville, MD). Ove parentalne ćelijske linije se smatraju senzitivnim s obzirom na to da su dobijene od pacijenata koji nisu podvrgnuti lečenju, a kod kojih je dijagnostifikovan primarni tumor. Odgovarajuće rezistentne ćelijske linije dobijene su selekcijom iz parentalnih ćelijskih linija koje su izlagane lekovima: ćelije NCI-H460/R potiču od NCI-H460 ćelija gajenih u medijumu sa 100 nM doksorubicina⁸¹; HaCaT ćelijske linije (normalni humani keratinociti) su dobijeni od CLS - Cell Lines Service, Eppelheim, Germany - poklon Prof. Andre Jorg (Division of Biophysics, Research Center Borstel, Leibniz-Center for Medicine and Biosciences, Borstel, Germany). Tumorske ćelijske linije kultivisane su u RPMI 1640 medijumu koji je obogaćen dodavanjem 10% rastvora toplotno inaktiviranog fetalnog goveđeg seruma, 2 mM rastvora L-glutamina, 4,4 g/L glukoze i smeše antibiotika i antimikotika (rastvor koji sadrži 5000 U/mL penicilina, 5 mg/mL streptomocina u inkubatoru (Sanyo Instruments, Japan)), na temperaturi 37 °C, u vlažnoj atmosferi sa 5% ugljen-dioksida. Ćelije su presejavane pomoću 0,25% rastvora tripsin/EDTA na svakih 72 h i gajene u svežem medijumu tako da je njihova gustina bila 8000 ćelija/cm² za NCI-H460, 16000 ćelija/cm² NCI-H460/R i 32.000 ćelija/cm² za HaCaT.

3.4.1.2. Određivanje hemosenzitivnosti pomoću sulforodamina B (SRB)

Ćelije gajene u flaskovima površine 25 cm² tretirane su tripsinom i zasejavane u mikrotitar ploče sa 96 bunarića (za NCI-H460 po 4000, za NCI-H460/R po 8000 i za HaCaT 16000 ćelija/bunariću), gde su ostavljane preko noći. Diarilheptanoidi koji su ispitivani u ovom testu su: platifilozid (**1**), acerozid VII (**5**), hirsutanonol (**14**), 5(*S*)-*O*-metilhirsutanonol (**15**), hirsutenon (**16**), oregonin (**17**), rubranol (**20**), rubranozid A (**22**), alnuzid A (**25**), alnuzid B (**26**), poznata jedinjenja **18**, **23**, **24** i nova jedinjenja **29-39**. Standard kurkumina i diarilheptanoidi su rastvoreni u apsolutnom etanolu do koncentracija od 20 mM i štokovi su čuvani na -20 °C. Radni rastvori su pripremani razblaživanjem dejonizovanom vodom do 1 mM. Tretman diarilheptanoidima u koncentracijama 2,5-100 μM trajao je 72 h. Efekti diarilheptanoida, standarda kurkumina i klasičnog hemio-terapeutika doksorubicina proučavani su na MDR ćelijskoj liniji - NCI-H460/R. Test hemosenzitivnosti urađen je posle 72 h. Ćelijski proteini su bojeni sulforodaminom B (SRB) po delimično izmenjenoj proceduri koju je razvio Skehan sa saradnicima.⁹⁵ SRB je negativno naelektrisana supstanca koja sadrži dve sulfonske grupe kojima se elektrostatički vezuje za bazne ostatke aminokiseline bojeći ukupne proteine ćelija ružičasto. Ukratko, na kraju perioda predviđenog za tretman ćelija, u mikrotitar pločama sa 96 bunarića, ćelije su fiksirane dejstvom 50% trihlorsirćetne kiseline (50 μL/bunariću) 1 h na +4 °C, a zatim su četiri puta ispirane vodom i bojene 0,4% (w/v) rastvorom SRB u 1% sirćetnoj kiselini (50 μL/bunariću) 30 min na sobnoj temperaturi. Posle toga, kako bi se uklonio višak boje, ćelije su tri puta ispirane sa po 250 μL 1% sirćetne kiseline i osušene na 45 °C u termostatu. Kompleks proteina vezanog za boju ekstrahovan je sa po 200 μL 10 mM Tris baze (pH 10,5) po bunariću, a njegova optička gustina je merena na 540 nm i korigovana za vrednost optičke gustine SRB boje rastvorene u puferisanoj 10 mM Tris bazi (pH 10,5) očitane na 670 nm (LKB 5060–006 Micro Plate Reader, Vienna, Austria). Inhibicija rasta ćelija (I) određena je primenom sledeće jednačine:

$$I (\%) = 1 - \frac{A_{\text{trestiranih uzoraka}}}{A_{\text{trestiranih kontrola}}} \times 100$$

gde je A – apsorbancija.

Koncentracija testirane supstance koja smanjuje ćelijski rast za 50% u odnosu na ćelijski rast u kontroli, IC_{50} izračunata je metodom linearne regresije pomoću Excel softvera.

3.4.1.3. Određivanje inhibicije aktivnosti P-gp-a testom akumulacije doksorubicina

Uticaj diarilheptanoida 5(*S*)-*O*-metilhirsutanonola (**15**) i alnuzida A (**25**) na funkciju P-gp-a analiziran je metodom protočne citometrije zahvaljujući sposobnosti njegovog supstrata doksorubicina da fluorescira, pri čemu je intenzitet fluorescencije srazmeran njegovoj akumulaciji. Kurkumin je korišćen kao pozitivna kontrola.

Ćelije NCI-H460 i NCI-H460/R su kultivisane u flaskovima površine 75 cm² do postizanja 80% konfluentnosti, kada su tretirane tripsinom i prebacivane u kivete za centrifugiranje zapremine 10 mL, rastvaranjem u medijumu koji je sadržavao 20 μM doksorubicina. Ćelije su tretirane diarilheptanoidima i standardom kurkuminom (50 μM), pa su ostavljane da stoje 30 min na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% ugljen-dioksida. Na kraju perioda predviđenog za akumulaciju, ćelije su odvajane centrifugiranjem, dva puta ispirane fosfatnim puferom i ostavljene da stoje u 0,5 mL hladnog rastvora fosfatnog pufera na ledu na tamnom mestu do analize pomoću FACScalibur protočnog citometra (Becton Dickinson, Oxford, UK.). Fluorescencija doksorubicina merena je na kanalu 2 (FL2-H) na talasnoj dužini od 530 nm. Za svaki uzorak prikupljeno je bar 10000 pojedinačnih događaja. Razlike u obliku krive su kvantifikovane primenom Komogorov–Smirnov neparametarske statistike. CellQuest Pro na Macintosh računaru je upotrebljen za izračunavanje *P* vrednosti.

3.4.1.4. Određivanje tipa ćelijske smrti

Procenti ćelija u apoptozi i nekrozi, kao i vijabilnih ćelija su određeni protočnom citometrijom pomoću Annexin-V-FITC (AV) i propidijum jodid (PI) bojenja. NCI-H460 ćelije su inicijalno zasejane u ploče sa 6 bunarića pri gustini 80000 ćelija po bunariću, i inkubirane su preko noći. Posle 72 h tretmana kurkuminom, platifilozidom (**1**) i jedinjenjem **37** u koncentraciji 50 μM, adherentne i plivajuće ćelije su sakupljene i centrifugirane. Ćelijski talog je resuspendovan u 100 μL vezujućeg pufera koji je sadržavao 10 mM HEPES/NaOH, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ (pH 7,4), zajedno sa 0,2

μg AV i $1 \mu\text{g}$ PI. Posle inkubacionog perioda od 30 min (u mraku, na 37°C) dodato je još $400 \mu\text{L}$ vezujućeg pufera i AV/PI bojenje je analizirano u toku narednog sata protočnom citometrijom. Intenzitet fluorescencije (zelene FL1-H i crvene FL2-H) je meren na protočnom citometru FACSClibur (Becton Dickinson, Oxford, United Kingdom). U svakom uzorku 10000 ćelija je izdvojeno i analizirano bez ćelijskog debrisa, a procenat vijabilnih ćelija (AV-PI-), ćelija u ranoj apoptozi (AV+PI-), u kasnoj apoptozi i nekrozi (AV+PI+) je utvrđen pomoću “CellQuest Pro data analysis” softvera.

3.4.1.5. Statistička analiza ispitivanja odnosa struktura-citotoksična aktivnost

Podaci su statistički obrađeni analizom varijanse (jednparametarskim ANOVA testom). Kada je normalna raspodela podataka uočena Kolmogorov-Smirnov testom, primenjen je Tukey HSD test u softveru STATISTICA 6.0. i njime je utvrđena značajnost razilke. Statistički značajnom je prihvaćena razlika ako je $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) (Tabela 2.4.2 u poglavlju 2.4).

3.4.2. Protektivni efekat na DNK humanih limfocita

Uzorci venske krvi (dva alikvota po 5 mL) dobijeni su od 6 zdravih muških volontera koji nisu bili izloženi hemikalijama, lekovima ili drugim supstancama. Volonteri su dali pristanak da se njihova krv koristi za eksperiment. Uzorci krvi su uzeti u zdravstvenoj ustanovi u skladu sa tekućim zdravstvenim i etičkim propisima u Srbiji.⁹⁶

Za pripremu mikronuleusa (MN) korišćena je metoda blokirane citokineze⁸³ sa izvesnim modifikacijama. Kulture limfocita su tretirane rastvorima izolovanih jedinjenja u koncentracijama od $0,5$, $1,0$ i $2,0 \mu\text{g/mL}$ u DMSO. Jedinjenja iz kore zelene jove koja su ispitana u ovom testu su platifilozid (**1**), platifilenon (**4**), acerozid VII (**5**), acerozid VIII (**6**), (+)-katehin (**12**), jedinjenja **2** i **10**, i nova jedinjenja **3**, **8**, **11** i **13**. Jedinjenja izolovana iz kore crne jove koja su ispitana u ovom testu su: platifilozid (**1**), acerozid VII (**5**), hirsutanonol (**14**), hirsutenon (**16**), oregonin (**17**), **18**, rubranozid B (**21**), rubranozid A (**22**), jedinjenje **23**, alnuzid A (**25**), alnuzid B (**26**) i nova jedinjenja **27** i **29**. Amifostin (S-2[3-aminopropilamino]-etilfosfotionska kiselina (98%); Marligen-Biosciences, USA), u koncentraciji od $1 \mu\text{g/mL}$ dodat je u jednu od kultura i to je bila

pozitivna kontrola. Mitomicin C (u fosfatnom puferu) u koncentraciji od 0,1 µg/mL je kao negativna kontrola. Približno 2×10^6 limfocita iz krvi je prebačeno u 5 mL RPMI-1640 medijuma sa 15% telećeg seruma i 2,4 µg/mL fitohemaglutinina (Invitrogen-Gibco-BRL, USA). Jedan sat posle inicijacije ćelijske stimulacije, ispitivana jedinjenja (u tri koncentracije) su dodavana uzorcima.

Posle inkubacije u termostatu na 37 °C u toku 19 h sve ćelijske kulture su isprane čistim medijumom, prebačene u 5 mL svežeg RPMI 1640 medijuma (RPMI 1640 Medium + GlutaMAX + 25 mM HEPES; Invitrogen-Gibco-BRL, Vienna, Austria) i inkubirane dodatnih 48 h. Citohalasin B (Invitrogen-Gibco-BRL, Vienna, Austria) finalne koncentracije 6 µg/mL dodat je u uzorke i kulture su inkubirane još 24 h. Ćelije su potom isprane sa 0,9% rastvorom NaCl (Merck Sharp&Dohme G.M.B.H, Vienna, Austria), sakupljene centrifugiranjem i tretirane hipotoničnim rastvorom (0,56% KCl + 0,9% NaCl, pomešani u istim zapreminama) na 37 °C. Ćelijske suspenzije su fiksirane smešom metanol/sirćetna kiselina 3:1, ispirane tri puta fiksatorom i nanošene na čist slajd.⁸³ Slajdovi su sušeni na vazduhu i bojeni alkalnim Giemsa (Sigma-Aldrich, Vienna, Austria) (2%). Najmanje 1000 binuklearnih ćelija (BN) po uzorku je pregledano i pojava mikronukleusa je beležena po kriterijumama Kantrimena i Hedla⁸², i Feneka i Morlija.⁹⁷

U analizu mikronukleusa uračunate su samo binuklearne ćelije sa dobro očuvanom citoplazmom (posmatrane pod svetlosnim mikroskopom sa 40×10 uvećanjem). Kriterijumi za selekciju binuklearnih ćelija i identifikaciju mikronukleusa uzeti su sa veb sajta "HUMN project website" (<http://www.humn.org>).⁹⁸ Beležen je broj binuklearnih ćelija sa jednim, dva, tri ili više mikronukleusa. Podaci za svaki uzorak su izraženi kao učestalost mikronukleusa na 1000 ćelija.

Sva određivanja su rađena u triplikatu. Čistoća svih jedinjenja, proverena tačnom hromatografijom (HPLC-DAD) i NMR spektroskopijom, bila je veća od 98%.

Statistička analiza je urađena pomoću softverskog paketa Origin verzije 7.0. Statistički značaj razlike između parova podataka je određen analizom varijanse (One-way ANOVA) za kojom je sledio Tukey test. Statističke razlike su smatrane značajnim pri $p < 0.01$ i $p < 0.05$.

3.4.3. Antimikrobna aktivnost

Za određivanje antimikrobnog dejstva ispitivanih jedinjenja na Gram-pozitivne, Gram-negativne bakterije i gljivice korišćen je mikrodilucioni metod dvostrukog razblaženja.⁹⁴ Gram-negativne bakterije su bile: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) i *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031). Gram-pozitivne bile su: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Clostridium sporogenes* (ATCC 19404), *Streptosporangium longisporum* (ATCC 25212), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240), *Sarcina lutea* (ATCC 9341), *Micrococcus luteus* (ATCC 15307) i *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Gljivice korišćene u testu su bile: *Candida albicans* (ATCC 10231), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), *Penicillium species*, *Trichoderma viride*, *Fusarium proliferatum* (izolovane iz cveta nevena), *Fusarium semitectum* (izolovan iz kukuruzne svile), *Fusarium tricinctum* (izolovan iz lista nane), *Fusarium equiseti* (izolovan iz rastavića). Jedinjenja koja su ispitivana u antibakterijskom i i antimikrobnom testu bila su diarilheptanoidi izolovani u većoj količini (> 15 mg). Iz zelene jove to su bila jedinjenja: platifilozid (**1**), jedinjenje **2**, platifilenon (**4**), acerozid VII (**5**), acerozid VIII (**6**) i novo jedinjenje **10**. Iz crne jove su ispitivana sledeća jedinjenja: platifilozid (**1**), acerozid VII (**5**), hirsutanonol (**14**), 5(S)-O-metilhirsutanonol (**15**), hirsutenon (**16**), oregonin (**17**), rubranozid A (**22**), jedinjenje **23**, jedinjenje **24**, alnuzid A (**25**) i alnuzid B (**26**). Ispitivani diarilheptanoidi su rastvarani u DMSO.

U svaki bunarić sterilne polistirenske mikrotitar ploče (sa 96 bunarića) zapremine 300 µL dodato je po 100 µL svežeg Miler Hinton (Mueller Hinton) bujona. Zapremina od 100 µL štok rastvora ispitivanog jedinjenja je dodata u svaki bunarić prvog reda. Zatim je 100 µL uklonjeno iz prve kolone i pomešano pažljivo sa bujonom u bunarićima druge kolone. Sve je isto ponovljeno još 10 puta tako da je dobijeno dvanaest duplih razblaženja na celoj ploči. Tri reda u svakoj ploči su korišćena kao kontrole. Dva reda su korišćena kao pozitivne kontrole i u njemu su se nalazili antibiotici širokog spektra delovanja amikacin i hloramfenikol (za određivanje osetljivosti prema bakterijama) tj. antimikotici nistatin i flukonazol (za određivanje osetljivosti ka gljivama). U drugom redu, u oba testa, nalazio se rastvarač DMSO kao negativna kontrola. U svaki bunarić ploče bilo je dodato 10 µL bakterijske kulture (10^6 ćelija po mL) za ispitivanje antibakterijske i 10 µL kultura gljivica (10^5 spora po mL) za

ispitivanje antifungalne aktivnosti. Mikrotitar ploče su inkubirane 24 h na 37 °C za bakterije ili 48 h na 28 °C za gljive. Posle toga meren je rast bakterija i gljivica. MIC (“minimal inhibitory concentration”) vrednosti su određivane kao najniže koncentracije koje su rezultovale inhibicijom rasta bakterija i gljivica.

LITERATURA

1. USDA, ARS, National Genetic Resources Program, Germplasm Resources Information Network (GRIN) Beltsville, Maryland, USA: National Germplasm Resources Laboratory; [Last accessed on 2003]. GRIN Database. Available from: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?2448>
2. Jovanović B. Genus *Alnus* Hill. In: Josifović VM, editor. Flora of Serbia II. Belgrade: Serbian Academy of Sciences and Arts; 1970: 102-105
3. wiki. <http://en.wikipedia.org/wiki/Alder>
4. http://rbg-web2.rbge.org.uk/cgi-bin/nph-readbtrees.pl/feout?FAMILY_XREF=Betulaceae&GENUS_XREF=Alnus&SPECIES_XREF=viridis&TAXON_NAME_XREF=&RANK=
5. Mitchell A., Wilkinson J. (1997) *Parey's Buch der Baume (The Trees of Britain and Northern Europe, 1982, 3rd ed. Berlin Germany: Blackwell Wissenschafts-Verlag.*
6. http://en.wikipedia.org/wiki/Alnus_glutinosa
7. Grieve M. (2004) *A Modern Herbal Alder.* Available from: <http://www.botanical.com/botanical/mgmh/a/alder019.html>
8. <http://herbalriot.tumblr.com/post/63255960443/herb-of-the-day-alder>
9. Holton J., Hylton W. *Complete Guide to Herbs. Vol. 46.* Emmaus, PA: Rodale Press; 1979. p. 269. ISBN 0-87857-262-7.
10. Launert E. *Edible and Medicinal Plants. Vol. 21.* Hamlyn UK: 1981. p. 254. ISBN 0-600-37216-2.

11. Lust J. The Herb Book. New York: Bantam books; 1983. ISBN 0-553-23827-2.
12. Pande P.C., Tiwari L., Pande H.C. (2006) Bishen Singh, Mahendra Pal Singh publishers, 23-A. New Connaught Place, Dehradun, India: Folk-Medicine and Aromatic Plants of Uttaranchal; p.29.
13. Changkija S. (1999): Folk medicinal plants of the Nagas in India, *Asian Folklore Studies* **58**, 205-230.
14. Gerald B.H., Fernandez I.D., Villegas L.F., Vaisberg A.J. (1998) A survey of traditional medicinal plants from the Callejon de Huaylas, Department of Ancash, Peru. *J Ethnopharmacol* **61**, 17-30.
15. <http://www.nr-herbalist.com/alnus-glutinosa-alder/>
16. Kim S.T., Kim J.D., Ahn S.H., Ahn G.S., Lee Y.I., Jeong Y.S. (2005) Hepatoprotective and antioxidant effects of *Alnus japonica* extracts on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother Res* **18**, 971-975.
17. Jin W.Y., Cai X.F., Na M.K., Lee J.J., Bae K.H. (2007) Triterpenoids and Diarylheptanoids from *Alnus hirsuta* inhibit HIF-1 in AGS cells. *Arch Pharm Res* **30**, 412-418.
18. Lee S.J. (1996) Korea folk Medicine. Seoul, Korea: Seoul National University Publishing Center
19. Holistic Online Database. Herb Information. (2004) Available from: <http://www.holistic-online.com/Herbal0Med/Herbs/h90.htm>.
20. Middleton P., Stewart F., Al-Qahtani S., Egan P., Rourke C., Abdulrahman A., Byres M., Middleton M., Kumarasamy Y., Shoeb M., Nahar L., Delazar A. Sarker S.D.

(2005) Antioxidant, antibacterial activities and general toxicity of *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior* and *Papaver rhoeas*. *Iran J Pharm Res* **2**, 81-86.

21. Turner J.J., Hebda R. (1990) Contemporary use of bark for medicine by two salishan native elders of Southeast Vancouver Island, Canada. *J Ethnopharmacol* **29**, 59-72.

22. Forlines, D.R., Tavenner, T., Malan, J.C.S., Karchesy, J.J. (1992) In R.W. Hemingway, & P.E. Laks, *Plant Polyphenols* (p.767). New York: Plenum Press.

23. Kumarasamy Y., Cox P.J., Jaspars M., Nahar L., Sarker S.D. (2006) Bioactivity of hirsutanolol, oregonin and genkwanin, isolated from the seeds of *Alnus glutinosa* (Betulaceae). *Nat Prod Commun* **1**, 641-644.

24. O'Rourke C., Byres M., Delazar A., Kumarasamy Y., Nahar L., Stewart F., Sarker S.D. (2005) Hirsutanolol, oregonin and genkwanin from the seeds of *Alnus glutinosa* (Betulaceae) *Biochem Syst Ecol* **33**, 749-752.

25. Meurer, B., Wray, V., Wiermann, R., Strack, D. (1988) Hydroxycinnamic acid-spermidine amides from pollen of *Alnus glutinosa*, *Betula verrucosa* and *Pterocarya fraxinifolia*. *Phytochemistry* **27**(3), 839-843.

26. Wollenweber E., Jay M., Favre-Bonvin J. (1974) Flavonoid compounds from *Alnus viridis*. *Phytochemistry* **13**, 2618-2619.

27. Favre-Bonvin J., Jay M., Wollenweber E. (1978) A novel stilbene from bud excretion of *Alnus viridis*. *Phytochemistry* **17**, 821-822.

28. Sati S.C., Sati N., Sati O.P. (2011) Bioactive constituents and medicinal importance of genus *Alnus*. *Pharmacogn Rev* **5**, 174-183.

29. Gupta S.C., Patchva S., Koh W., Aggarwal B.B. (2012) Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **39**, 283-299.
30. Aggarwal B.B., Harikumar K.B. (2009) Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 40-59.
31. Tung N.H., Kwon H.-J., Kim J.-H., Ra J.C., Ding Y., Kim J.A., Kim Y.H. (2010) Anti-influenza diarylheptanoids from the bark of *Alnus japonica*. *Bioorg Chem Lett* **20**, 1000-1003.
32. De Albuquerque I.L., Galeffi C., Casinovi C.G., Marini-Bettolo G.B. A tetrahydropyran derivative isolated from *Centrolobium* wood (1964) *Gazz Chim Ital* **94**, 287-295.
33. Kiuchi F., Goto Y., Sugimoto N., Akao N., Kondo K., Tsuda Y. (1993) Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids. *Chem Pharm Bull* **41**(9), 1640-1643.
34. Araujo C.A.C., Alegrio L.V., Leon L.L. (1998) Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. *Phytochemistry* **49**(3), 751-754.
35. Nagumo S., Kaji N., Inoue T., Nagai M. (1993) Studies on the constituents of Aceraceae plants. XI. Two types of cyclic diarylheptanoid from *Acer nikoense*. *Chem Pharm Bull* **41**(7), 1255-1257.
36. Fuchino H., Konishi T., Satoh T., Akiko Y., Saitsu K., Tatsumi T., Tanaka N. (1996) Chemical evaluation of *Betula* species in Japan. II. Constituents of *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Chem Pharm Bull* **44**(5), 1033-1038.

37. Nagumo S., Ishizawa S., Nagai M., Noue T. (1996) Studies on the constituents of Aceraceae plants. XIII. Diarylheptanoids and other phenolics from *Acer nikoense*. *Chem Pharm Bull* **44**, 1086-1089.
38. Ishida J., Kozuka M., Tokuda H., Nishino H., Nagumo S., Lee K.-H., Nagai M. (2002) Chemopreventive potential of cyclic diarylheptanoids. *Bioorg Med Chem* **10**, 3361-3365.
39. Akihisa T., Taguchi Y., Yasukawa K., Tokuda H., Akazawa H., Suzuki T., Kimura Y. (2006) Acerogenin M, a cyclic diarylheptanoid, and other phenolic compounds from *Acer nikoense* and their anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects. *Chem Pharm Bull* **54**, 735-739.
40. Tanaka T., Jiang Z.H., Kouno I. (1998) Distribution of ellagic acid derivatives and a diarylheptanoid in wood of *Platycarya strobilacea*. *Phytochemistry* **47**(5), 851-854.
41. Brand S., Hölscher D., Schierhorn A., Svatoš A., Schröder J., Schneider B. (2006) A type III polyketide synthase from *Wachendorfia thyrsiflora* and its role in diarylheptanoid and phenylphenalenone biosynthesis. *Planta* **224**, 413-428.
42. Munde, T., Brand, S., Hidalgo, W., Maddula, R.K., Svatoš, A., Schneider, B. (2013) Biosynthesis of tetraoxygenated phenylphenalenones in *Wachendorfia thyrsiflora*. *Phytochemistry* **91**, 165-176.
43. Choi S.E., Kim K.H., Kwon J.H., Kim S.B., Kim H.W., Lee M.W. (2008) Cytotoxic activities of diarylheptanoids from *Alnus japonica*. *Arch Pharm Res* **31**, 1287-1289.
44. Mshvildadze V., Legault J., Lavoie S., Gauthier C., Pichette A. (2007) Anticancer diarylheptanoid glycosides from the inner bark of *Betula papyrifera*. *Phytochemistry* **68**, 2531-2536.
45. Wolmuth H., Deseo M.A., Brushett D.J., Thompson D.R., MacFarlane G., Stevenson L.M., Leach D.N. (2010) Diarylheptanoids from *Pleuranthodium*

racemigerum with *in vitro* prostaglandin E₂ inhibitory and cytotoxic activity. *J Nat Prod* **73**, 743-746.

46. Matsuda H., Ishikado A., Nishida N., Ninomiya, N., Fujiwara H., Kobayasi Y., Yoshikawa M., (1998) Hepatoprotective, superoxide scavenging, and antioxidative activities of aromatic constituents from the bark of *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Bioorg Chem Lett* **8**, 2939-2944.

47. Telysheva G., Krasilnikova J., Bikovens O., Dizhbite T. Effect of plant diarylheptanoid oregonin on the antioxidants and lipid peroxidation blood markers in experiments *in vitro* and *in vivo* MipTec 2009 - The Leading European Event for Drug Discovery, 13.10.2009 - 15.10.2009, Basel, Switzerland

48. Park D., Kim H.J., Jung S.Y., Yook C.-S., Yin C., Lee Y.S., (2010) A new diarylheotanoid glycoside from the stem bark of *Alnus hirsuta* and protective effects of diarylheptanoid derivatives in human HepG2 cells. *Chem Pharm Bull* **58**(2), 238-241.

49. Farrand L., Kim J.Y., Byun S., Im-aram A., Lee J., Suh J.Y., Lee K.W., Lee H.J., Tsang B.K. (2014) The diarylheptanoid hirsutenone sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin via modulation of apoptosis-inducing factor and X-linked inhibitor of apoptosis. *J Biol Chem* **289**(3), 1723-1731.

50. Kuroyanagi M., Shimomae M., Nagashima Y., Muto N., Okuda T., Kawahara N., Nakane T., Sano T. (2005) New diarylheptanoids from *Alnus japonica*. *Chem Pharm Bull* **53**, 1519-1523.

51. Han J.M., Lee W.S., Kim J.R., Son J., Kwon O.H., Lee H.J., Lee J.J., Jeong T.S. (2008) Effect of 5-O-Methylhirsutanonol on nuclear factor-kappaB-dependent production of NO and expression of iNOS in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells. *J Agric Food Chem* **56**(1), 92-98.

52. Telysheva G., Dizhbite T., Bikovens O., Ponomarenko J., Janceva S., Krasilnikova J. (2011) Structure and antioxidant activity of diarylheptanoids extracted from bark of grey alder (*Alnus incana*) and potential of biorefinery-based bark processing of European trees. *Holzforschung* **65**(4), 623-629.
53. Ponomarenko J., Trouillas P., Martin N., Dizhbite T., Krasilnikova J., Telysheva G. (2014) Elucidation of antioxidant properties of wood bark derived saturated diarylheptanoids: A comprehensive (DFT-supported) understanding. *Phytochemistry U* štampi. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.03.010
54. Lee K.Y., Jeong E.J., Huh J., Cho N., Kim T.B., Jeon B.J., Kim S.H., Kim H.P., Sung S.H. (2012) Cognition-enhancing and neuroprotective activities of the standardized extract of *Betula platyphylla* bark and its major diarylheptanoids. *Phytomedicine* **19**(14), 1315-1320.
55. Lee H.-B., Lee H.-K., Kim J.-R., Ahn Y.-J. (2009) Anti-*Helicobacter pylori* diarylheptanoid identified in the rhizome of *Alpinia officinarum*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **52**, 367-370.
56. Yadav D., Singh S.C., Verma R.K., Saxena K., Verma R., Murthy P.K., Gupta M.M. (2013) Antifilarial diarylheptanoids from *Alnus nepalensis* leaves growing in high altitude areas of Uttarakhand, India. *Phytomedicine* **20**(2), 124-132.
57. Lai Y.-C., Chen C.-K., Lin W.-W., Lee S.-S. (2012) A comprehensive investigation of anti-inflammatory diarylheptanoids from the leaves of *Alnus formosana*. *Phytochemistry* **73**, 84-94.
58. Lee S.-L., Huang W.-J., Lin W.W., Lee S.-S., Chen C.-H. (2005) Preparation and anti-inflammatory activities of diarylheptanoids and diarylheptylamine analogs. *Bioorg Med Chem* **13**, 6175-6181.

59. Jin W.Y., Cai X.F., Na M.K., Lee J.J., Bae K.H. (2007) Diarylheptanoids from *Alnus hirsuta* inhibit the NF- κ B activation and NO and TNF- α production. *Biol Pharm Bull* **30**, 810-813.
60. Lee M.W., Kim N.Y., Park M.S., Ahn K.H., Toh S.H., Hahn D.R., Kim Y. C., Chung H. T. (2000) Diarylheptanoids with *in vitro* inducible nitric oxide synthesis inhibitory activity from *Alnus hirsuta*. *Planta Med* **66**, 551-553.
61. Lee M.W., Kim J.H., Jeong D.W., Ahn K.H., Toh S.H., Surth Y.J. (2000) Inhibition of cyclooxygenase-2 expression by diarylheptanoids from the bark of *Alnus hirsuta* var. *sibirica*. *Biol Pharm Bull* **23**, 517-518.
62. Kang H.M., Son K.H., Yang D.C., Han D.C., Kim J.H., Baek N.I., Kwon B.M. (2004) Inhibitory activity of diarylheptanoids on farnesyl protein transferase. *Nat Prod Res* **18**, 295-299.
63. Chung M.Y., Rho M., Lee S.W., Park H.R., Kim K., Lee I.A., Kim D.H., Jeune K.H., Lee H.S., Kim Y.K. (2006) Inhibition of diacylglycerol acyltransferase by betulinic acid from *Alnus hirsuta*. *Planta Med* **72**, 267-269.
64. Lee C.S., Jang E.-R., Kim Z.J., Myung S.C., Kim W., Lee M.W. (2012) Diarylheptanoid hirsutenone enhances apoptotic effect of trail on epithelial ovarian carcinoma cell lines via activation of death receptor and mitochondrial pathway. *Invest New Drugs* **30**, 548-557.
65. Joo S.S., Kim H.J., Kwon H.S., Lee D.I. (2002) Augmentation of macrophage antitumor activities and nitric oxide production by oregonin. *Arch Pharm Res* **25**(4), 457-462.
66. Choi S.E., Jeong M.S., Kang M.J., Lee do I., Joo S.S., Lee C.S., Bang H., Lee M.K., Myung S.C., Choi Y.W., Lee K.S., Seo S.J., Lee M.W. (2010) Effect of topical

application and intraperitoneal injection of oregonin on atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Exp Dermatol* **9**(8), 37-43.

67. Seo S., Tomita Y., Tori K., Yoshimura Y. (1978) Determination of the absolute configuration of a secondary hydroxy group in a chiral secondary alcohol using glycosidation shifts in carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Am Chem Soc* **100**, 3331-3339.

68. Suga T., Ohta S., Hivata T., Aoki T. (1982) Absolute configuration of diarylheptanoid xyloside, oregonine, isolated from the female flowers of *Alnus serrulatoides*. *Chem Lett* 895-898.

69. Chen J., Gonzalez-Laredo R.F., Karchesy J.J. (2000) Minor diarylheptanoid glycosides of *Alnus rubra* bark. *Phytochemistry* **53**, 971-973.

70. Smite E., Lundgren L.N., Andersson R. (1993) Arylbutanoid and diarylheptanoid glycosides from inner bark of *Betula pendula*. *Phytochemistry* **32**, 365-369.

71. Wada H., Tachibana H., Fuchino H., Tanaka N. (1998) Three new diarylheptanoid glycosides from *Alnus japonica*. *Chem Pharm Bull* **46**, 1054-1055.

72. Nomura M., Tokoroyama T., Kubota T. (1981) Biarylheptanoids and other constituents from wood of *Alnus japonica*. *Phytochemistry* **20**(5), 1097-1104.

73. Kwon J.H., Kim J.H., Choi S.E., Park K.H., Lee M.W. (2010) Inhibitory Effects of Phenolic Compounds from Needles of *Pinus densiflora* on Nitric Oxide and PGE2 Production. *Arch Pharm Res* **33**, 2011-2016.

74. Gonzalez-Laredo R.F., Helm R.F., Chen J., Karchesy J.J. (1998) Two acylated diarylheptanoid glycosides from red alder bark. *Nat Prod Lett* **61**, 1292-1294.

75. Martin-Cordero C., Lopez-Lazaro M., Angeles Agudo M.A., Navarro E., Trujillo J., Ayuso M.J. (2001) A cytotoxic diarylheptanoid from *Viscum cruciatum*. *Phytochemistry* **58**, 567-569.
76. Lee K.K., Bahle B.D., Hofmann G.A., Mattern M.R., Johnson R.K., Kingston D.G.I. (1998) Isolation and Structure Elucidation of New PKC α Inhibitors from *Pinus flexilis*. *J Nat Prod*, **61**(11), 1407-1409.
77. Gonzalez-Laredo R.F., Chen J., Karchesy Y.M., Karchesy J.J. (1999) Four new diarylheptanoid glycosides from *Alnus rubra* bark. *Nat Prod Lett* **13**, 75-80.
78. Li J., Liao C.-R., Wei J.-Q., Chen L.-X., Zhao F., Qiu F. (2011) Diarylheptanoids from *Curcuma kwangsiensis* and their inhibitory activity on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Bioorg Med Chem Lett* **21**, 5363-5369.
79. He J.-B., Yan Y.-M., Ma X.-J., Lu Q., Li X.-S., Su J., Li Y., Liu G.-M., Cheng Y.-X. (2011) Sesquiterpenoids and diarylheptanoids from *Nidus vespae* and their inhibitory effects on nitric oxide production. *Chem Biodivers* **8**, 2270-2276.
80. Anđelković T., Pešić M., Banković J., Tanić N., Marković I.D., Ruždijić S. (2008) Synergistic effects of the purine analog sulfinosine and curcumin on the multidrug resistant human non-small cell lung carcinoma cell line (NCI-H460/R). *Cancer Biol Ther* **7**, 1024-1032.
81. Pešić M., Marković J., Janković D., Marković I., Rakić Lj., Kanazir S., Ruždijić S. (2006) Induced resistance in the human non small cell lung carcinoma (NCI-H460) cell line *in vitro* by anticancer drugs. *J Chemotherapy* **18**, 66-73.
82. Countryman P.I., Heddle J.A. (1976) The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res* **41**, 321-332.

83. Fenech M., Morley A.A. (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* **285**, 35-44.
84. Stanković M., Tešević V., Vajs V., Todorović N., Milosavljević S., Gođevac D. (2008) Antioxidant properties of grape seed extract on human lymphocyte oxidative defence. *Planta Med* **74**, 730-735.
85. Grochová D., Šmardová J. (2007) The antimutagenic and cytoprotective effects of amifostine: the role of p53, *J Appl Biomed* **5**, 171-178.
86. Ortiz R., Cortes L., Gonzalez C., Lopez L., Perez P., Cortes E., Betancourt M. (1997) Analysis of mitomycin c- induced micronuclei in lymphocytes from malnourished infected children. *Environ Mol Mutagen* **30**, 363-370.
87. Roncada T., Vicentini V.E.P., Mantovani M.S. (2004) Possible modulating actions of plant extracts on the chromosome breaking activity of MMC and Ara-C in human lymphocytes *in vitro*. *Toxicol in Vitro* **18**, 617-622.
88. Surralles J., Xamena N., Creus A., Catalan J., Norppa H., Marcos R. (1995) Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* **341**, 169-184.
89. Pfuhler S., Wolf H.U. (1996) Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. *Environ Mol Mutagen* **27**, 196-201.
90. Mozdarani H., Taheri A., Haeri S.,A. (2007) Assessment of radioprotective effects of amifostine on human lymphocytes irradiated *in vitro* by gamma-rays using cytokinesis-blocked micronucleus assay. *Iran J Radiat Res*; **5**(1), 9-16.
91. Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nut Biochem* **13**, 572-584.

92. Vučković I., Vajs V., Stanković M., Tesević V., Milosavljević S. (2010) A new prenylated flavanonol from *Seseli annuum* roots showing protective effect on human lymphocytes DNA. *Chem Biodivers* **7**, 698-704.
93. Saxena G., Farmer S., Hancock R.E., Towers G.H. (1995) Antimicrobial compounds from *Alnus rubra*. *Int J Pharmacogn* **33**, 33-36.
94. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (2000) Approval standard document M7-A5, Villanova, Pa, USA.
95. Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMaho J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M.R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* **82**, 1107-1112.
96. Law on Health Care. (2005) Official Gazette of the Republic of Serbia, Parliament of the Republic of Serbia **107**, 112-161.
97. Fenech M. (2000) Mathematical model of the *in vitro* micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not scored specifically in binucleated cells or cells that have completed one nuclear division. *Mutagenesis* **15**(4), 329-336.
98. Fenech M., Chang W.P., Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S., Zeiger E. (2003) HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* **534**(1-2), 65-75.

BIOGRAFIJA

Miroslav M. Novaković je rođen 14. septembra 1976. godine u Kikindi. Osnovnu školu i Gimnaziju je završio u Kikindi, Gimnaziju kao đak generacije. Školske 1994/95. upisao se na Hemijski fakultet u Beogradu, a diplomirao je 18. februara 2002. sa prosečnom ocenom 9,53 tokom studija i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Magistarske studije upisao je školske 2002/03. godine na Hemijskom fakultetu u Beogradu, na Odeljenju za instrumentalnu analizu pri Katedri za organsku hemiju kod mentora prof. dr Veleta Teševića i završio ih je školske 2008./09. sa prosečnom ocenom 9,67. Magistarsku tezu pod naslovom „Sekundarni metaboliti biljne vrste *Cotinus coggygria* Scop.“ odbranio je 23. decembra 2008. godine. Od 2. novembra 2002. zaposlen je u Centru za hemiju IHTM.

U okviru svog naučno-istraživačkog rada bavi se hemijom sekundarnih metabolita biljaka, proučavanjem antioksidativne aktivnosti biljnih ekstrakata i uzoraka pića i hrane kao i hromatografskim i spektroskopskim tehnikama analize strukture organskih jedinjenja. Autor je 24 rada sa SCI liste.

Oženjen je Irenom Novaković i ima sina Dimitrija.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани: Мирослав Новаковић

Број индекса: /

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

“Изоловање и идентификација диарилхептаноида из биљних врста црна јова (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) и зелена јова (*Alnus viridis* (Chaix) DC. subsp. *viridis*) и њихова биолошка активност”

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Мирослав Новаковић

Број индекса: /

Студијски програм: /

Наслов рада: “Изоловање и идентификација диарилхептаноида из биљних врста црна јова (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) и зелена јова (*Alnus viridis* (Chaix) DC. subsp. *viridis*) и њихова биолошка активност”

Ментори: проф. др. Веле Тешевић, др. Снежана Трифуновић

Потписани: Мирослав Новаковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

“Изоловање и идентификација диарилхептаноида из биљних врста црна јова (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) и зелена јова (*Alnus viridis* (Chaix) DC. subsp. *viridis*) и њихова биолошка активност”

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.