



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



Ana B. Miltojević

**SEKUNDARNI METABOLITI BILJNE VRSTE
CHOISYA TERNATA KUNTH (RUTACEAE):
IZOLOVANJE, SINTEZA, SPEKTRALNA
KARAKTERIZACIJA I BIOLOŠKA AKTIVNOST**

Doktorska disertacija

Niš, 2016.



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



Ana B. Miltojević

**SEKUNDARNI METABOLITI BILJNE VRSTE
CHOISYA TERNATA KUNTH (RUTACEAE):
IZOLOVANJE, SINTEZA, SPEKTRALNA
KARAKTERIZACIJA I BIOLOŠKA AKTIVNOST**

Doktorska disertacija

Tekst ove doktorske disertacije stavlja se na uvid javnosti,
u skladu sa članom 30., stav 8. Zakona o visokom obrazovanju
("Sl. glasnik RS", br. 76/2005, 100/2007 – autentično tumačenje, 97/2008, 44/2010, 93/2012,
89/2013 i 99/2014)

NAPOMENA O AUTORSKIM PRAVIMA:

Ovaj tekst smatra se rukopisom i samo se saopštava javnosti (član 7. Zakona o autorskim i
srodnim pravima, "Sl. glasnik RS", br. 104/2009, 99/2011 i 119/2012).

**Nijedan deo ove doktorske disertacije ne sme se koristiti ni u kakve svrhe,
osim za upoznavanje sa njenim sadržajem pre odbrane disertacije.**

Niš, 2016.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS



Ana B. Miltojević

**SECONDARY METABOLITES OF *CHOISYA*
TERNATA KUNTH (RUTACEAE): ISOLATION,
SYNTHESIS, SPECTRAL CHARACTERIZATION
AND BIOLOGICAL ACTIVITY**

PhD thesis

Niš, 2016.

MENTOR:

dr Niko S. Radulović, vanredni profesor
Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

1. **dr Marina T. Stojanović**, redovni profesor
Univerzitet u Nišu, Fakultet zaštite na radu
2. **dr Stevo J. Najman**, redovni profesor
Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet
3. **dr Polina D. Blagojević**, vanredni profesor
Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet
4. **dr Vidoslav S. Dekić**, docent
Univerzitet u Prištini sa privremenim sedištem u Kosovskoj Mitrovici,
Prirodno-matematički fakultet

DATUM ODBRANE:

	ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ НИШ
	КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:											
Идентификациони број, ИБР:											
Тип документације, ТД:	монографска										
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички										
Врста рада, ВР:	докторска дисертација										
Аутор, АУ:	Ана Б. Милтојевић										
Ментор, МН:	Нико С. Радуловић										
Наслов рада, НР:	СЕКУНДАРНИ МЕТАБОЛИТИ БИЉНЕ ВРСТЕ <i>CHOISYA TERNATA</i> KUNTH (RUTACEAE): ИЗОЛОВАЊЕ, СИНТЕЗА, СПЕКТРАЛНА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И БИОЛОШКА АКТИВНОСТ										
Језик публикације, ЈП:	српски										
Језик извода, ЈИ:	енглески										
Земља публикавања, ЗП:	Србија										
Уже географско подручје, УГП:	Србија										
Година, ГО:	2016.										
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт										
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.										
Физички опис рада, ФО:	12 поглавља; 337 страна; 360 цитата; 34 табеле; 103 слике; 129 прилога										
Научна област, НО:	хемија										
Научна дисциплина, НД:	органска хемија и биохемија										
Предметна одредница/ Кључне речи, ПО:	<i>Choisya ternata</i> Kunth, етарско уље, изопропил- <i>N</i> -метилантранилат, естри- <i>N</i> -метилантранилне киселине, нитрозо-једињења, термолита, спектрална карактеризација, антиноцицепција, антимикробна активност, хепато-/нефро-/гастропротективно дејство, дејство на ЦНС, метаболизам										
УДК	547.944.8 : [54.057+543.42+615.322]										
Чува се, ЧУ:	библиотека										
Важна напомена, ВН:	Докторска дисертација је део истраживања на пројекту ев. бр. 172061 МПНТР РС. Испитивање антимикробне активности извршено је у Микробиолошкој лабораторији ПМФ-а у Нишу, дејства на ЦНС мишева, као и хепато-/нефро-/гастропротективног дејства у Научноистраживачком центру за биомедицину Медицинског факултета у Нишу, а антиноцицептивне активности у <i>Laboratório de Farmacologia da Dor e da Inflamação, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil</i> .										
Извод, ИЗ:	Хемијски састав етарског уља листова биљне врсте <i>Choisya ternata</i> Kunth (Rutaceae) је анализиран методама ГЦ и ГЦ-МС. Идентификовано је 157 састојака, а међу њима и изопропил- <i>N</i> -метилантранилат, нови природни протоалкалоид, који је назван тернантранин. Извршена је његова синтеза редукцијом <i>in situ</i> генерисаног имиња метил-антранилата и формалдехида, при чему је добијен метил- <i>N</i> -метилантранилат (такође детектован у анализираном етарском уљу), који је трансестерификован одговарајућим алкоксидом. С обзиром на етнофармаколошку примену ове биљне врсте, испитане су: антиоксидантна, антимикробна и низ <i>in vivo</i> фармаколошких активности изопропил- и метил- <i>N</i> -метилантранилата. Оба естра су показала значајну антиноцицептивну активност (чак и у дози од 0,3 mg/kg, <i>p.o.</i>) код мишева. Утврђено је да поседују и анксиолитичко и антидепресивно дејство, да немају успављујуће дејство, али да продужавају време дијазепамом-узрокованог сна (50–200 mg/kg, <i>i.p.</i>) мишева. У дозама од 200 mg/kg (<i>i.p.</i>), оба испарљива алкалоида, иако се нису показали као добри антиоксиданси, испољили су хепатопротективни потенцијал у моделу CCl ₄ -узрокованих оштећења јетре, а само метил- <i>N</i> -метилантранилат нефропротективни потенцијал у истом моделу, код пацова. Оба алкалоида показала су значајну антиулцерозну активност, чак и у дози од 50 mg/kg. Утврђена је њихова селективна инхибиторна активност према тестираним гљивицама. Анализом изопропил- и метил- <i>N</i> -метилантранилата, и њихових метаболита у урину и органима пацова третираних овим супстанцама, утврђено је да су у случају изопропил- <i>N</i> -метилантранилата доминантни метаболити настали хидроксилацијом ароматичног језгра, а у случају метил- <i>N</i> -метилантранилата производи хидролизе и амонлизе. Синтетисан је и метил- <i>N</i> -метил- <i>N</i> -нитрозоантранилат и проучавана је његова термичка разградња. Метил-5-метил-6-оксо-5 <i>H</i> -фенантридин-4-карбоксилат је идентификован међу 46 производа термолитизе у кондензованој фази, а у парној фази су идентификовани само диметил-2,2'-(1,2-диметилхидразин-1,2-диил)добензоат и метил- <i>N</i> -метилантранилат.										
Датум прихватања теме, ДП:	24.12.2012.										
Датум одбране, ДО:											
Чланови комисије, КО:	<table border="0"> <tr> <td>Председник:</td> <td>Марина Т. Стојановић</td> </tr> <tr> <td>Члан:</td> <td>Стево Ј. Најман</td> </tr> <tr> <td>Члан:</td> <td>Полина Д. Благојевић</td> </tr> <tr> <td>Члан:</td> <td>Видослав С. Декић</td> </tr> <tr> <td>Члан, ментор:</td> <td>Нико С. Радуловић</td> </tr> </table>	Председник:	Марина Т. Стојановић	Члан:	Стево Ј. Најман	Члан:	Полина Д. Благојевић	Члан:	Видослав С. Декић	Члан, ментор:	Нико С. Радуловић
Председник:	Марина Т. Стојановић										
Члан:	Стево Ј. Најман										
Члан:	Полина Д. Благојевић										
Члан:	Видослав С. Декић										
Члан, ментор:	Нико С. Радуловић										



ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Ana B. Miltojević
Mentor, MN :	Niko S. Radulović
Title, TI :	SECONDARY METABOLITES OF <i>CHOISYA TERNATA</i> KUNTH (RUTACEAE): ISOLATION, SYNTHESIS, SPECTRAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2016
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD :	12 chapters; 337 pages; 360 references; 34 tables; 103 pictures; 129 appendices
Scientific field, SF :	chemistry
Scientific discipline, SD :	organic chemistry and biochemistry
Subject/Key words, S/KW :	<i>Choisya ternata</i> Kunth, essential oil, isopropyl <i>N</i> -methylantranilate, <i>N</i> -methylantranilic acid esters, nitroso-compounds, thermolysis, spectral characterisation, antimicrobial activity, antinociception, hepato-/nephro-/gastroprotective activity, effects on CNS, metabolism
UC	547.944.8 : [54.057+543.42+615.322]
Holding data, HD :	library
Note, N :	This work is a part of the research performed within the Project No. 172061. Antimicrobial activity was tested in the Microbiological Laboratory of the Faculty of Sciences and Mathematics in Niš. Effects on CNS, hepato-/nephro-/gastroprotective activities were evaluated in the Scientific Research Centre for Biomedicine, Faculty of Medicine in Niš, while the antinociceptive activity was tested in the Laboratório de Farmacologia da Dor e da Inflamação, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.
Abstract, AB :	Chemical analyses (GC, GC-MS) of the essential oil of <i>Choisya ternata</i> Kunth (Rutaceae) leaves enabled, among 157 constituents, the identification of isopropyl <i>N</i> -methylantranilate (IMA), a new natural protoalkaloid named ternantranin. IMA was synthesized via the reduction of <i>in situ</i> generated imine of methyl anthranilate and formaldehyde, leading to methyl <i>N</i> -methylantranilate (MMA) (also a constituent of the analyzed oil), which was transesterified with a suitable alkoxide. Based on the ethnopharmacology of <i>C. ternata</i> , antioxidant, antimicrobial and various <i>in vivo</i> pharmacological activities of IMA and MMA were tested. Both esters exhibited significant antinociceptive activity (even at 0.3 mg/kg, <i>p.o.</i>) in mice. They (50-200 mg/kg, <i>i.p.</i>) showed anxiolytic and antidepressant activities, but did not induce sleep, while significantly prolonging the diazepam-induced sleep in mice. Although IMA and MMA had not exhibited significant antioxidant activity, they (200 mg/kg, <i>i.p.</i>) demonstrated a hepatoprotective potential in the CCl ₄ -induced liver damage model, while only MMA demonstrated a nephroprotective potential in the same model in rats. Both alkaloids exhibited significant anti-ulcer activity even at 50 mg/kg. They exhibited selective antifungal activity. An analysis of IMA and MMA and their metabolites in the urine and organs of rats treated with these substances led us to the conclusion that, in the case of IMA, hydroxylation of the aromatic core was the dominant metabolic pathway, while, in the case of MMA, hydrolysis and amonolysis were predominant. The synthesis of methyl <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosantranilate was achieved and its thermal degradation was investigated. Methyl 5-methyl-6-oxo-(5 <i>H</i>)-phenanthridine-4-carboxylate was identified among 46 products of thermolysis in the condensed phase, while in the vapor phase only 2,2'-(1,2-dimethylhydrazine-1,2-diyl)dibenzoate and MMA were identified.
Accepted by the Scientific Board on, ASB :	24.12.2012.
Defended on, DE :	
Defended Board, DB :	President: Marina T. Stojanović
	Member: Stevo J. Naiman
	Member: Polina D. Blagojević
	Member: Vidoslav S. Dekić
	Member, Mentor: Niko S. Radulović

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

*Izolovanje i analiza hemijskog sastava etarskih ulja biljne vrste *Choisya ternata*, sinteza, izolovanje, strukturna karakterizacija i biotransformacija pojedinih sekundarnih metabolita ove biljne vrste, kao i ispitivanje hemijskog ponašanja odabranih derivata na povišenim temperaturama vršeni su u Laboratoriji za organsku analizu i sintezu Departmana za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu. Antimikrobna aktivnost je testirana u Mikrobiološkoj laboratoriji Departmana za biologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu. Ispitivanje dejstva na centralni nervni sistem miševa, kao i hepato-, nefro- i gastroprotektivnog dejstva i biotransformacije odabranih sekundarnih metabolita vrste *C. ternata* kod pacova vršeno je u Naučno-istraživačkom centru za biomedicinu Medicinskog fakulteta u Nišu, a ispitivanje antinociceptivne aktivnosti u Laboratório de Farmacologia da Dor e da Inflamação, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil. Zahvaljujem se zaposlenima u ovim institucijama na pruženoj pomoći.*

Najiskrenije se zahvaljujem svom mentoru, prof. dr Niku Raduloviću, na ukazanom poverenju, nesebičnom zalaganju, pomoći i podršci, kako tokom izrade ove disertacije, tako i tokom osnovnih i doktorskih studija.

Najsrdahnije se zahvaljujem i članovima komisije, prof. dr Stevu Najmanu, prof. dr Marini Stojanović, prof. dr Polini Blagojević i doc. dr Vidoslavu Dekiću, na korisnim sugestijama i savetima u završnoj fazi rada koji su značajno doprineli kvalitetu disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem i doc. dr Zorici Stojanović-Radić na pomoći pri ispitivanju antimikrobne aktivnosti, assis. dr Pavlu Ranđeloviću i Nikoli Stojanović, na saradnji prilikom ispitivanja farmakoloških aktivnosti i dr Patrišiji Dias Fernandes (Patrícia Dias Fernandes) na pomoći pri testiranju antinociceptivne aktivnosti.

Zahvaljujem se i kolegama iz grupe, na predusjetljivosti i saradnji u toku izrade ove doktorske disertacije, kao i svojoj porodici na podršci, razumevanju i ljubavi.

OZNAKE I SKRAĆENICE

- NOMENKLATURA -

Ac ili CH ₃ CO-	Acetil
Ar	Aromatično (aril)
Me ili CH ₃ -	Metil
Et ili C ₂ H ₅ -	Etil
iPr ili (CH ₃) ₂ CH-	Izopropil
Pr ili C ₃ H ₇ -	Propil
ATP	<i>Adenosine-5'-triphosphate</i> (adenozin-5'-trifosfat)
CoA	Coenzyme A (koenzim A)
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
Glu	Glukuronid
NAD	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i> (nikotinamid-adenin-dinukleotid)
NADP	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> (nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat)
NMDA	N-metil-D-aspartat
SAM	S-adenozil-L-homocistein
SAH	S-adenozil-L-metionin
<i>n</i>	normalni niz
<i>o</i>	<i>orto</i>
<i>m</i>	<i>meta</i>
<i>p</i>	<i>para</i>

- REAGENSI I RASTVARAČI -

AcOH	Sirćetna kiselina
DMSO	Dimetilsulfoksid
DMSO-<i>d</i>₆	Perdeuterisani dimetilsulfoksid
Et₃N	Trietilamin
EtOH	Etanol

MCPBA	meta-<i>Chloroperoxybenzoic acid</i> (<i>meta</i> -hlorperoksobenzoeva kiselina)
MeOH	Metanol
NaOEt	Natrijum-etoksid
NaOMe	Natrijum-metoksid
THF	Tetrahidrofur
TMS	Tetrametilsilan
D	Ditrepnoidi
GL	<i>Green leaf</i> isparljivi sastojci
HT	Hemiterpenoidi
HT/E	Hemiterpenoidni estri
M	Monoterpenoidi
MA	Aciklični monoterpenoidi
MM	Mentani i njima srodni monoterpenoidi
MP	Pinanski monoterpenoidi
MT	Tujanski monoterpenoidi
O	Ostalo
S	Seskviterpenoidi
SCAD	<i>Cadinane and Related Sesquiterpenoids</i> (Kadinani i njima srodni seskviterpenoidi)
SCAR	<i>Caryophyllane and Related Sesquiterpenoids</i> (Kariofilani i njima srodni seskviterpenoidi)
SGER	<i>Germacrane and Related Sesquiterpenoids</i> (Germakrani i njima srodni seskviterpenoidi)
AA	<i>Anthranilic acid</i> (antranilna kiselina)
4-ASA	<i>4-Aminosalicylic acid</i> (4-aminosalicilna kiselina)
5-ASA	<i>5-Aminosalicylic acid</i> (5-aminosalicilna kiselina)
3-HAA	<i>3-Hydroxyanthranilic acid</i> (3-hidroksiantranilna kiselina)
5-HAA	<i>5-Hydroxyanthranilic acid</i> (5-hidroksiantranilna kiselina)
3-HIA	Izopropil-3-hidroksiantranilat
5-HIA	Izopropil-5-hidroksiantranilat

3-HMA	Metil-3-hidroksiantranilat
5-HMA	Metil-5-hidroksiantranilat
5-HIMA	Izopropil-5-hidroksi-<i>N</i>-metilantranilat
5-HMMA	Metil-5-hidroksi-<i>N</i>-metilantranilat
IA	Izopropil-antranilat
IMA	Izopropil-<i>N</i>-metilantranilat
MA	Metil-antranilat
MMA	Metil-<i>N</i>-metilantranilat
NO-MMA	Metil-<i>N</i>-metil-<i>N</i>-nitrozoantranilat
PMA	Propil-<i>N</i>-metilantranilat
SA	<i>Salicylic acid</i> (salicilna kiselina)

- HROMATOGRAFIJA I MASENA SPEKTROMETRIJA -

[M]⁺	Molekulski jon
AMDIS	<i>Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System</i> (Automatizovani sistem za identifikaciju i dekonvoluciju masenih spektara)
CoI	<i>Coinjection</i> (ko-injekcija)
EI	<i>Electron Ionization</i> (elektronska jonizacija)
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (elektrosprej jonizacija)
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (plameno-jonizacioni detektor)
GC	<i>Gas Chromatography</i> (gasna hromatografija)
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (gasna hromatografija-masena spektrometrija)
HP	<i>Hewlett-Packard</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i> (tečna hromatografija pri visokim pritiscima)
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i> (masena spektrometrija visoke rezolucije)
IdenMet	<i>Identification Method</i> (Metod identifikacije)

<i>m/z</i>	<i>Mass-to-charge ratio</i> (odnos mase i naelektrisanja)
MPLC	<i>Medium Pressure Liquid Chromatography</i> (tečna hromatografija pri srednjim pritiscima)
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i> (Američki nacionalni institut za standarde i tehnologiju)
rel. int.	Relativni intenzitet
RI	Retention index (retencioni indeks)
R_t	Retention time (retenciono vreme)
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i> (ukupni jonski hromatogram)
TLC	<i>Thin-Layer Chromatography</i> (tankoslojna hromatografija)

- INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA I ULTRALJUBIČASTA SPEKTROSKOPIJA -

ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i>
FT	<i>Fourier Transform</i> (Fourier-ova transformacija)
FTIR	<i>Fourier Transformed Infrared Spectroscopy</i> (Fourier-transformisana infracrvena spektroskopija)
IR	<i>InfraRed</i> (infracrvena)
UV	<i>UltraViolet</i> (ultraljubičasta)
γ	Frekvencija deformacione vibracije
λ^{-1}	Talasni broj trake u IR spektru
λ_{\max}	Talaska dužina maksimuma apsorpcije
ν	Frekvencija valencione vibracije
ν_{asim}	Frekvencija asimetrične valencione vibracije
ν_{sim}	Frekvencija simetrične valencione vibracije

- NUKLEARNA-MAGNETNA REZONANTNA SPEKTROSKOPIJA -

1D	jednodimenzionalni
2D	dvodimenzionalni
¹³C NMR	<i>Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy</i> (nuklearna-magnetna rezonantna spektroskopija ugljenika-13)

$^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY	$^1\text{H} - ^1\text{H}$ Correlation Spectroscopy (Homonuklearna $^1\text{H} - ^1\text{H}$ korelisana dvodimenzionalna nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija)
^1H NMR	Hydrogen-1 Nuclear Magnetic Resonance (protonska nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija)
br d	broad doublet (široki dublet)
br q	broad quartet (široki kvartet)
br s	broad singlet (široki singlet)
d	dublet
dd	dublet dubleta
ddd	dublet dubleta dubleta
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
dq	dublet of quartet (dublet kvarteta)
dt	dublet tripleta
HETCOR	Heteronuclear Correlation (heteronuklearna $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ korelisana 2D NMR spektroskopija)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
<i>J</i>	Konstanta kuplovanja
m	multiplet
mult.	multipletnost
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija)
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
ppm	parts per million ((jedan) deo na milion delova)
pseudo dt	pseudo dublet tripleta
pseudo t	pseudo triplet
qd	quartet of doublet (kvarteta dubleta)
s	singlet
t	triplet

tqt	<i>triplet of quartet of triplet</i> (triplet kvarteta tripleta)
δ	Hemijsko pomeranje u NMR spektru
δ_C	Hemijsko pomeranje u ^{13}C NMR spektru
δ_H	Hemijsko pomeranje u ^1H NMR spektru

- ANTIMIKROBNA I ANTIOKSIDANTNA AKTIVNOST -

ABTS	<i>2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)</i> (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotijazolin-6-sulfonska kiselina))
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHT	B utilovani H idroksi T oluen)
DPPH	<i>1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical</i> (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Etilendiamintetrasirćetna kiselina)
IC₅₀	<i>Half Maximal Inhibitory Concentration</i>
MHA	<i>Müller Hinton Agar</i>
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (minimalna inhibitorna koncentracija)
MRSA	<i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus</i>
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium chloride</i> (nitroplavotetrazolijum-hlorid)
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i> (Američki nacionalni komitet za kliničke laboratorijske standarde)
RKV	R eaktivne k iseonične v rste
SDA	<i>Sabouraud dekstrozni agar</i>
TSA	T ripton soja a gar
TTC	<i>2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride</i> (2,3,5-trifeniltetrazolijum-hlorid)

- FARMAKOLOŠKA AKTIVNOST -

AA	<i>Acetic acid</i> (sirćetna kiselina)
AFL	<i>Area Fraction of Lesions</i> (površina pojedinačnih lezija)

ALT	Alanin transaminaza
ASA	<i>Acetylsalicylic acid</i> (acetilsalicilna kiselina)
AST	Aspartat transaminaza
AUC	<i>Area Under the Curve</i> (površina ispod krive)
B	Perimetar
cGMP	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i> (ciklični gvanozin-monofosfat)
Cho	<i>Cholesterol</i> (holesterol)
Cir	<i>Mean Lesions' Circularity</i> (srednja cirkularnost lezija)
CNS	Centralni nervni sistem
COX	<i>Cyclooxygenase</i> (ciklooksigenaze)
Cyt P-450	<i>Cytochrome P-450</i> (citohrom P-450)
DB	Direktan bilirubin
DC	<i>Diclofenac</i> (diklofenak)
ET	Etanol
GABA	<i>Gamma-aminobutyric acid</i> (Gama-aminobuterna kiselina)
H₂	Histaminski receptor H ₂
HE	Hematoksilin i eozin
5-HT₃	5-Hidroksitriptaminski receptori- serotoniniski receptori
<i>i. p.</i>	<i>Intraperitoneal</i> (intraperitonealna injekcija)
IB	<i>Increase in Baseline</i> (porast osnovne linije)
IFN-γ	Interferon-gama
iGluR	<i>Ionotropic glutamate receptors</i> (jonotropni glutamatni receptori)
mGluR	Metabotropni glutamatni receptori
IL	Interleukin
<i>J</i>	<i>Jones-ovo</i> bojenje
L-NAME	<i>N_o-Nitro-L-arginine methyl ester</i> (Metil estar <i>N_o</i> -nitro-L-arginina)
MLA	<i>Mean Lesions' Area</i> (srednja površina lezija)
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i> (sintaza-azot-monoksida)
NSAIL	Nesteroidni anti-inflamatorni lekovi
<i>p. o.</i>	<i>Per os</i> (oralna primena)

PAS	<i>Periodic acid-Schiff stain</i> (bojenje perjodnom kiselinom i <i>Schiff</i> -ovim reagensom)
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (puferovani fiziološki rastvor)
PCPA	<i>para-Chlorophenylalanine methyl ester</i> (metil estar para-hlor-fenilalanina)
PGE₂	Prostaglandin E₂
PNS	Periferni nervni sistem
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> (standardna greška srednje vrednosti)
SL	Silimarin
TAL	<i>Total Area of Lesions</i> (ukupna površina lezija)
TB	<i>Total bilirubin</i> (ukupni bilirubini)
TCA	Tricikličnih antidepresivi
t.m.	telesna masa
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i> (faktor nekroze tumora-alfa)
TRPV	<i>Transient receptor potential (vanilloid)</i>

- STATISTIČKA ANALIZA -

ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (jednosmerna analiza varijanse)
p	nivo poverenja
S.D.	Standardna Devijacija

- MERNE JEDINICE -

amu	<i>atomic mass unit</i> (jedinica atomske mase)
°C	Celzijusov stepen
cm	centimetar
eV	<i>electron Volt</i> (elektron volt)
g	gram
h	<i>hour</i> (sat)
Hz	<i>Hertz</i> (herc)
K	Kelvinov stepen

l	litar
M	mol/dm ³
m	metar
MHz	<i>MegaHertz</i> (megaherc)
mg	miligram
min	minut
ml	mililitar
mm	milimetar
mmol	milimol
mmu	<i>milli mass unit</i>
nm	nanometar
rpm	<i>revolutions per minute</i> (broj okretaja u minuti)
s	sekunda
W	<i>Wat</i> (vat)
v/v	<i>volume/volume</i> (zapremina/zapremina)
w/v	<i>weight/volume</i> (masa/zapremina)
w/w	<i>weight/weight</i> (masa/masa)
μl	mikrolitar
μm	mikrometar

- OSTALO -

<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (i drugi)
EA	elektron-akceptorska grupa
eq	equivalent (ekvivalent)
L-	<i>leaving group</i> (odlazeća grupa)
<i>p.a.</i>	<i>pro analysi</i> (analitička čistoća)
R²	kvadrat korelacionog koeficijenta
sin.	sinonim
Tk	tačka ključanja
tr	trag

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. CILJEVI RADA	3
3. OPŠTI DEO	6
3.1. CHOISYA TERNATA	6
3.1.1. Botanička klasifikacija	7
3.1.2. Hemijski sastav	7
3.1.3. Medicinski značaj	15
3.2. ANTRANILNA KISELINA	16
3.2.1. Osobine antranilne kiseline	16
3.2.2. Anabolizam i katabolizam antranilne kiseline	16
3.2.3. Sinteza antranilne kiseline	19
3.2.4. Reaktivnost antranilne kiseline	20
3.2.5. (Trans)Esterifikacija antranilne kiseline	23
3.2.6. Alkilovanje antranilne kiseline	26
3.2.7. Dobijanje <i>N</i> -alkilovanih derivata antranilne kiseline	28
3.2.8. Derivati antranilne kiseline	29
3.3. HEMIJSKI I BIOLOŠKI ZNAČAJ <i>N</i>-NITROZO JEDINJENJA	31
3.4. PRIRODNI PROIZVODI KAO POTENCIJALNI TERAPEUTICI ZA TRETMAN RAZLIČITIH DISFUNKCIJA SISTEMA I ORGANA	32
3.4.1. Prirodni proizvodi kao antinociceptivni agensi	32
3.4.2. Prirodni proizvodi kao terapeutici za lečenje poremećaja centralnog nervnog sistema	33
3.4.3. Prirodni proizvodi koji ispoljavaju hepato- i nefroprotektivno dejstvo	34
3.4.4. Prirodni proizvodi kao terapeutici za sprečavanje nastanka i lečenje čira na želucu	35
4. EKSPERIMENTALNI DEO	36
4.1. HEMIKALIJE I RASTVARAČI	36
4.2. METODE ANALIZE I RAZDVAJANJA	36
4.2.1. Nuklearno-magnetna rezonantna (NMR) spektroskopija	36
4.2.2. Ultraljubičasta spektrofotometrija (UV)	37

4.2.3.	Infracrvena spektroskopija (FTIR)	37
4.2.4.	Masena spektrometrija visoke rezolucije (HRMS)	37
4.2.5.	Gasna hromatografija (GC) i gasna hromatografija-masena spektrometrija (GC-MS)	38
4.2.5.1.	<i>Gasna hromatografija (GC) i gasna hromatografija-masena spektrometrija (GC-MS)</i>	38
4.2.5.2.	<i>Identifikacija sastojaka</i>	38
4.2.5.3.	<i>Gasna hromatografija sa plameno-jonizacionom detekcijom (GC-FID)</i>	39
4.2.6.	Elementalna mikroanaliza	39
4.2.7.	Tankoslojna hromatografija (TLC)	40
4.2.8.	<i>Dry flash</i> hromatografija	40
4.2.9.	Hromatografija na koloni	40
4.2.10.	Tečna hromatografija pri srednjim pritiscima (MPLC)	40
4.3.	BILJNI MATERIJAL I PRIPREMA UZORAKA	41
4.3.1.	Biljni materijal	41
4.3.2.	Dobijanje etarskog ulja	41
4.3.3.	Dobijanje etanolnog ekstrakta	41
4.4.	OPIS SINTETIČKIH KORAKA	42
4.4.1.	Optimizacija uslova sinteze izopropil- (IMA), metil- (MMA) i propil- <i>N</i> -metilantranilata (PMA)	42
4.4.1.1.	<i>Optimizacija uslova transesterifikacije metil-antranilata (MA)</i>	42
4.4.1.2.	<i>Optimizacija uslova N-metilovanja metil-antranilata</i>	44
4.4.1.3.	<i>N-metilovanje izopropil-antranilata</i>	47
4.4.1.4.	<i>Transesterifikacija metil-N-metilantranilata izopropoksidom</i>	47
4.4.1.5.	<i>Transesterifikacija metil-N-metilantranilata n-propoksidom</i>	48
4.4.2.	Sinteza metil- <i>N</i> -metil- <i>N</i> -nitroantranilata (NO-MMA)	49
4.4.3.	Piroliza metil- <i>N</i> -metil- <i>N</i> -nitroantranilata	49
4.4.4.	Sinteza metil- <i>N</i> -benzoilantranilata	50
4.5.	SPEKTRALNA KARAKTERIZACIJA	51
	SINTETISANIH/IZOLOVANIH/DETEKTOVANIH JEDINJENJA	
4.5.1.	Spektralna karakterizacija proizvoda <i>N</i> -metilovanja antranilne kiseline	51
4.5.2.	Spektralna karakterizacija proizvoda transesterifikacije metil- <i>N</i> -metilantranilata izopropoksidom	52
4.5.3.	Spektralna karakterizacija proizvoda transesterifikacije metil- <i>N</i> -metilantranilata <i>n</i> -propoksidom	52
4.5.4.	Spektralna karakterizacija metil- <i>N</i> -metil- <i>N</i> -nitroantranilata	53

4.5.5.	Spektralna karakterizacija proizvoda pirolize metil- <i>N</i> -metil- <i>N</i> -nitrozoantranilata	53
4.5.6.	Spektralna karakterizacija metabolita izopropil- <i>N</i> -metilantranilata izolovanih iz urina pacova tretiranih ovim jedinjenjem	55
4.6.	ISPITIVANJE ANTIOKSIDANTNE AKTIVNOSTI IZOPROPIL- I METIL-<i>N</i>-METILANTRANILATA	57
4.6.1.	Sposobnost hvatanja slobodnih radikala	57
4.6.2.	DPPH [•] test	57
4.6.3.	ABTS ^{•+} test	58
4.6.4.	Hvatanje superoksidnog radikala	59
4.7.	ISPITIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI	60
4.7.1.	Korišćeni mikroorganizmi	60
4.7.2.	Testiranje <i>in vitro</i> antimikrobne aktivnosti etarskog ulja <i>C. ternata</i> disk difuzionom metodom	60
4.7.3.	Testiranje <i>in vitro</i> antimikrobne aktivnosti jedinjenja IMA i MMA mikrodilucionom metodom	61
4.8.	ISPITIVANJE FARMAKOLOŠKIH AKTIVNOSTI	63
4.8.1.	Laboratorijske životinje i njihov tretman	63
4.8.1.1.	<i>Ispitivanje antinociceptivne aktivnosti</i>	63
4.8.1.2.	<i>Ispitivanje dejstva na centralni nervni sistem</i>	63
4.8.1.3.	<i>Ispitivanje hepato-, nefro- i gastroprotektivnog dejstva jedinjenja IMA i MMA; Analiza IMA i MMA i njihovih metabolita u urinu pacova i njihova distribucija u organima i serumu pacova</i>	64
4.8.2.	Ispitivanje akutne toksičnosti, uticaja na telesnu temperaturu miševa i uticaja IMA, MMA i PMA na spontanu aktivnost miševa (test otvorenog polja i rotarod test)	64
4.8.2.1.	<i>Ispitivanje akutne toksičnosti IMA, MMA i PMA</i>	64
4.8.2.2.	<i>Ispitivanje uticaja IMA, MMA i PMA na telesnu temperaturu eksperimentalnih životinja</i>	65
4.8.2.3.	<i>Ispitivanje uticaja IMA, MMA i PMA na spontanu aktivnost životinja – Test otvorenog polja i rotarod test</i>	65
4.8.3.	Ispitivanje antinociceptivne aktivnosti IMA, MMA, PMA, etarskog ulja i etanolnog ekstrakta listova biljne vrste <i>C. ternata</i> kod miševa	66
4.8.3.1.	<i>Dizajn eksperimenta</i>	66
4.8.3.2.	<i>Test abdominalnih grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom (engl. writhing test)</i>	66
4.8.3.3.	<i>Test osetljivosti na termalni nadražaj - metoda vruće ploče (engl. hot-plate test)</i>	67

4.8.3.4. <i>Formalinom indukovana nocicepcija (formalinski test)</i>	67
4.8.3.5. <i>Kapsaicinom indukovana nocicepcija</i>	68
4.8.3.6. <i>Glutamatom indukovana nocicepcija</i>	68
4.8.3.7. <i>Refleks naglog pokreta repom (Tail flick reflex)</i>	68
4.8.3.8. <i>Ispitivanje mehanizma dejstva IMA, MMA i PMA na osećaj bola izazvanog toplotnim stimulusom kod miševa (test vruće ploče)</i>	69
4.8.4. Ispitivanje uticaja IMA i MMA na centralni nervni sistem miševa	70
4.8.4.1. <i>Dizajn eksperimenta</i>	70
4.8.4.2. <i>Test otvorenog polja (Open field test)</i>	70
4.8.4.3. <i>Test horizontalne žice (Horizontal wire test)</i>	71
4.8.4.4. <i>Test svetlo/tama (Light/dark test)</i>	71
4.8.4.5. <i>Test prinudnog plivanja (Forced swimming test)</i>	72
4.8.4.6. <i>Test vešanja o rep (Tail suspension test)</i>	72
4.8.4.7. <i>Test sna izazvanog dijazepamom</i>	72
4.8.5. Ispitivanje hepatoprotektivnog dejstva jedinjenja IMA i MMA u modelu oštećenja jetre pacova izazvanog ugljen-tetrahloridom	72
4.8.5.1. <i>Dizajn eksperimenta</i>	72
4.8.6. Ispitivanje nefroprotektivnog dejstva jedinjenja IMA i MMA u modelu oštećenja bubrega pacova izazvanog ugljen-tetrahloridom	73
4.8.6.1. <i>Dizajn eksperimenta</i>	73
4.8.7. Uticaj IMA i MMA na nastanak lezija na sluznici želuca pacova izazvanih diklofenakom i etanolom	74
4.8.7.1. <i>Dizajn eksperimenta</i>	74
4.8.7.2. <i>Uticaj IMA i MMA na sluznicu želuca</i>	75
4.8.7.3. <i>Nastanak lezija želuca pod dejstvom diklofenaka</i>	75
4.8.7.4. <i>Nastanak lezija želuca pod dejstvom etanola</i>	75
4.8.8. Biohemijske analize	76
4.8.9. Histopatološka ispitivanja jetre, bubrega i želuca	76
4.8.10. Morfometrijska analiza tkiva bubrega i želuca	77
4.8.10.1. <i>Morfometrijska analiza tkiva bubrega</i>	77
4.8.10.2. <i>Morfometrijska analiza tkiva želuca</i>	78
4.8.11. Makroskopski pregled sluznice želuca	78
4.8. METABOLIZAM IZOPROPIL- I METIL-N-METILANTRANILATA KOD PACOVA	79
4.8.1. Analiza IMA i MMA i njihovih metabolita u urinu pacova	79
4.8.1.1. <i>Dizajn eksperimenta</i>	79
4.8.1.2. <i>Enzimaska hidroliza glukuronida prisutnih u urinu</i>	79

4.8.1.3.	<i>Kiselo katalizovana hidroliza glukuronida prisutnih u urinu</i>	79
4.8.1.4.	<i>Obrada hidrolizata</i>	79
4.8.1.5.	<i>Obrada nehidrolizovanog uzorka urina</i>	80
4.8.2.	Analiza IMA i MMA i njihovih metabolita u homogenatima organa pacova	80
4.8.2.1.	<i>Dizajn eksperimenta</i>	80
4.8.2.2.	<i>Analiza metil- i izopropil-N-metilantranilata i njihovih metabolita u pojedinim organima pacova</i>	80
4.8.3.	Inkubacija IMA i MMA sa homogenatom svinjske jetre	81
4.8.3.1.	<i>Inkubacija IMA i MMA sa supernatantom dobijenim nakon centrifugiranja homogenata svinjske jetre - Dizajn eksperimenta</i>	81
4.8.3.2.	<i>Inkubacija IMA i MMA sa homogenatom svinjske jetre - Dizajn eksperimenta</i>	81
4.9.	STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA	82
4.9.1.	Statistička analiza podataka dobijenih u eksperimentima u kojima je ispitivana antinociceptivna aktivnost jedinjenja IMA, MMA i PMA, kao i mehanizam dejstva ovih supstanci na osećaj bola izazvanog toplotnim stimulusom kod miševa	82
4.9.2.	Statistička analiza podataka dobijenih u eksperimentima u kojima je ispitivano dejstvo jedinjenja IMA i MMA na CNS, kao i njihovo hepato- i nefroprotektivno dejstvo	82
4.9.3.	Statistička analiza podataka dobijenih ispitivanjem uticaja jedinjenja IMA i MMA na nastanak lezija želuca pacova usled dejstva diklofenaka i etanola	82
5.	REZULTATI I DISKUSIJA	83
5.1.	OPTIMIZACIJA USLOVA SINTEZE IZOPROPIL-, METIL- I PROPIL-N-METILANTRANILATA	83
5.1.1.	Optimizacija uslova transesterifikacije metil-antranilata	84
5.1.2.	Optimizacija uslova N-metilovanja metil-antranilata	86
5.1.3.	N-metilovanje izopropil-antranilata	89
5.1.4.	Transesterifikacija metil-N-metilantranilata izopropoksidom	90
5.1.5.	Transesterifikacija metil-N-metilantranilata n-propoksidom	90
5.2.	ASIGNACIJA SPEKTARA IZOPROPIL-, METIL- I PROPIL-N-METILANTRANILATA	92
5.3.	SASTAV ETARSKOG ULJA BILJNE VRSTE <i>CHOISYA TERNATA</i>	105
5.3.1.	Gasna ko-hromatografija metil-, izopropil- i propil-N-metilantranilata sa etarskim uljem biljne vrste <i>Choisya ternata</i>	110
5.4.	SINTEZA I TERMALNA DEGRADACIJA METIL-N-METIL-N-NITROZOANTRANILATA	112
5.5.	ANTIOKSIDANTNA AKTIVNOST	133
5.6.	ANTIMIKROBNA AKTIVNOST	135

5.7. FARMAKOLOŠKA AKTIVNOST	137
5.7.1. Antinociceptivna aktivnost	138
5.7.1.1. <i>Periferna i centralna antinociceptivna aktivnost IMA, MMA i PMA – Test abdominalnih grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom (writhing test) i test osetljivosti na termalni nadražaj - metoda vruće ploče (hot-plate test)</i>	138
5.7.1.2. <i>Formalinski test</i>	140
5.7.1.3. <i>Model kapsaicinom izazvane nocicepcije</i>	141
5.7.1.4. <i>Model glutamatom izazvane nocicepcije</i>	142
5.7.1.5. <i>Model refleksa naglog pokreta repom (tail flick model)</i>	143
5.7.1.6. <i>Ispitivanje mehanizma dejstva IMA, MMA i PMA u modelu vruće ploče</i>	145
5.7.2. Uticaj IMA i MMA na anksioznost i depresiju kod miševa	150
5.7.2.1. <i>Uticaj i.p. aplikacije IMA i MMA na motornu aktivnost – test otvorenog polja (open field test) i test horizontalne žice (horizontal wire test)</i>	150
5.7.2.2. <i>Anksiolitičko dejstvo MMA i IMA - test svetlo/tama (light/dark test)</i>	151
5.7.2.3. <i>Antidepresivno dejstvo jedinjenja MMA i IMA – test prinudnog plivanja (forced swimming test) i test vešanja o rep (tail suspension test)</i>	152
5.7.2.4. <i>Hipnotičko/sedativno dejstvo jedinjenja IMA i MMA – test spavanja izazvanog dijazepamom</i>	154
5.7.3. Ispitivanje hepatoprotektivnog dejstva IMA i MMA u modelu oštećenja jetre pacova izazvanog ugljen-tetrahloridom	155
5.7.3.1. <i>Određivanje aktivnosti alanin- (ALT) i aspartat-aminotransferaze (AST), koncentracije holesterola (Cho) i totalnog (TB) i direktnog (DB) bilirubina u serumu pacova</i>	155
5.7.3.2. <i>Uticaj IMA i MMA na telesnu masu i masu jetre pacova</i>	156
5.7.3.3. <i>Histopatološka analiza isečaka jetre</i>	157
5.7.4. Ispitivanje nefroprotektivnog dejstva IMA i MMA u modelu oštećenja bubrega pacova izazvanog ugljen-tetrahloridom	159
5.7.4.1. <i>Određivanje nivoa uree i kreatinina u serumu</i>	159
5.7.4.2. <i>Histopatološka analiza isečaka bubrega</i>	160
5.7.4.3. <i>Morfometrijska analiza glomerula bubrega</i>	165
5.7.5. Uticaj IMA i MMA na nastanak lezija na sluznici želuca pacova izazvanih diklofenakom i etanolom	169
5.7.5.1. <i>Uticaj jedinjenja IMA i MMA na sluznicu želuca</i>	169
5.7.5.2. <i>Uticaj jedinjenja IMA i MMA na nastanak lezija na sluznici želuca pacova izazvanih diklofenakom – Makroskopski i mikroskopski pregled lezija</i>	171

5.7.5.3.	<i>Uticaj jedinjenja IMA i MMA na nastanak lezija na sluznici želuca pacova izazvanih diklofenakom – Morfometrijska analiza</i>	175
5.7.5.4.	<i>Uticaj jedinjenja IMA i MMA na nastanak lezija na sluznici želuca pacova izazvanih etanolom – Makroskopski i mikroskopski pregled lezija</i>	176
5.7.5.5.	<i>Uticaj jedinjenja IMA i MMA na nastanak lezija na sluznici želuca pacova izazvanih etanolom – Morfometrijska analiza</i>	177
5.8.	ASIGNACIJA SPEKTARA ANTRANILNE I SALICILNE KISELINE I NJIHOVIH ODABRANIH DERIVATA	180
5.9.	METABOLIZAM IZOPROPIL- I METIL-N-METILANTRANILATA KOD PACOVA	188
5.9.1.	Analiza IMA i MMA i njihovih metabolita u urinu pacova	188
5.9.1.1.	<i>Analiza IMA i njegovih metabolita u urinu pacova</i>	188
5.9.1.2.	<i>Analiza MMA i njegovih metabolita u urinu pacova</i>	198
5.9.2.	Analiza IMA i MMA i njihovih metabolita u homogenatima organa pacova	202
5.9.3.	Inkubacija IMA i MMA sa homogenatom svinjske jetre	207
6.	IZVOD	209
7.	SUMMARY	213
8.	LITERATURA	217
9.	PRILOZI	234
10.	BIOGRAFIJA AUTORA	305
11.	BIBLIOGRAFIJA AUTORA	306
12.	IZJAVE AUTORA	312

1. UVOD

Ljudi od davnina koriste biljne sirovine kao hranu, lekovite droge, u kozmetičke i mnoge druge svrhe. Pored toga što čovek na osnovu instinkta, opažanja i iskustva razlikuje korisne, jestive i lekovite biljne vrste od štetnih i otrovnih, danas je, zahvaljujući primeni savremenih analitičkih tehnika i metoda, moguća detaljna hemijska analiza njihovog sastava, kao i izolovanje i određivanje strukture molekula koji se u biljnim tkivima nalaze čak i u veoma malim količinama. Istraživanja usmerena u tom pravcu su veoma značajna: 75% jedinjenja, koja se danas koriste u medicinske svrhe, biljnog je porekla, a četvrtina se još uvek izoluje iz biljne droge. Poslednjih godina zabeležen je trend rasta upotrebe prirodnih proizvoda za prevenciju i lečenje brojnih oboljenja (Duke, 1990; Newman i Cragg, 2007). Potraga za novim biološki aktivnim prirodnim proizvodima biljnog porekla obuhvata nekoliko koraka:

1. utvrđivanje prisustva nepoznatog jedinjenja u biljnom materijalu,
2. izolovanje,
3. odnosno sintezu nepoznatog jedinjenja u cilju određivanja njegove strukture i
4. testiranje biološke aktivnosti.

Biljna vrsta *Choisya ternata* Kunth (porodica Rutaceae) je zimzeleni žbun, koji potiče iz jugozapadnih oblasti Severne i severa Srednje Amerike. To je ukrasna biljka, belih cvetova koji podsećaju na cvetove narandže, pa je zbog ove sličnosti neki narodi zovu meksička narandža (Creche *et al*, 1993). Poznato je da su, zbog njegovog antispazmodičnog i „stimulativnog“ dejstva, stanovnici Meksika pili čaj pripremljen od listova ove biljne vrste (Standley, 1923). Medicinsku primenu vrste *C. ternata* je još krajem XIX veka proučavao *Boudouresque* (1895). On je, na sebi, izveo i prvi farmakološki test kojim je pokazao da je vodeni ekstrakt listova ove biljne vrste osvežavajućeg ukusa i da podstiče varenje. Bez obzira na to, hemijski sastav vrste *C. ternata* još uvek nije detaljno ispitan. Proučavani su alkaloidi (Johns *et al*, 1967; Grundon *et al*, 1974a,b; Boyd *et al*, 2007; Wahab *et al*, 2012), kumarini (Bohlmann *et al*, 1972; Wahabet *al*, 2012), triterpeni (Dreyer *et al*, 1972; Wahabet *al*, 2012), flavonoidi (Tea *et al*, 1975; Tea, 1977), steroli (Gras, 1983; Creche *et al*, 1987; Wahabet *al*, 2012), dok su isparljivi sekundarni

metaboliti ispitivani samo jednom (Respaud *et al*, 1997), pri čemu je okarakterisano svega 18 isparljivih sastojaka.

Isparljivi sekundarni metaboliti biljaka čine strukturno nehomogenu grupu jedinjenja poznatu pod nazivom *etarska ulja* (Knudsen *et al*, 1993). Ova jedinjenja (po strukturi su to najčešće benzenoidi, izoprenoidi i derivati masnih kiselina), pored svoje funkcije u okviru organizma biljke, igraju i značajnu ulogu u interakcijama biljaka sa spoljnom sredinom (drugim biljkama, insektima, životinjama), obično u vrlo malim količinama. Na primer, biljke ih emituju kako bi privukle oprašivače ili odbile biljojede, što je naročito važno uveče, kada vizuelni efekti nisu dovoljni.

Preliminarnim istraživanjima je utvrđeno da etarsko ulje vrste *C. ternata* sadrži derivate aminobenzoevih kiselina i da poseduje izraženo analgetsko dejstvo. Iako su isparljiva jedinjenja koja sadrže azot važni nosioci mirisnih, bioloških i farmakoloških karakteristika biljaka, ona često ostaju neidentifikovana prilikom analize njihovog hemijskog sastava (Jabalpurwala *et al*, 2009). S obzirom da molekuli koji sadrže azot (čak i oni veoma jednostavne strukture) pokazuju izraženo farmakološko dejstvo, pomenuti derivati aminobenzoevih kiselina, kao potencijalni nosioci aktivnosti etarskog ulja vrste *C. ternata*, zavređuju da budu detaljnije ispitani. Kada nedostaju podaci o mehanizmima delovanja, biotransformaciji i toksičnosti farmakološki aktivnih biljnih sastojaka, ostaje otvoreno pitanje da li ti sastojci, ili neki njihovi metaboliti, pored lekovitog imaju i neki neželjeni toksičan efekat. Sintezom farmakološki aktivnih biljnih sastojaka i njihovom modifikacijom moguće je dobiti set jedinjenja veće aktivnosti, tj. manje toksičnosti. Uporednom analizom rezultata ovih istraživanja moguće je utvrditi (kvantitativnu) vezu između strukture molekula i njegove aktivnosti (*(quantitative) activity structure relationship*).

2. CILJEVI RADA

Biljni materijal predstavlja nepresušni izvor sekundarnih metabolita koji poseduju biološku aktivnost, a razvoj nauke i tehnike omogućava otkrivanje novih biološki aktivnih sastojaka, čak i ako su oni prisutni u vrlo malim količinama. Izolovanje ovih sastojaka iz biljnog materijala je otežano kako zbog malih količina, tako i zbog složenog matriksa u kome se nalaze, pa se potvrđivanje pretpostavljenih struktura može izvršiti sintezom, koja pruža i dovoljne količine supstance za razne biološke testove.

Imajući u vidu napred navedeno, postavljeni su sledeći ciljevi doktorske disertacije pod nazivom: “Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae): izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost”:

1. Izolovanje i detaljna analiza hemijskog sastava etarskog ulja biljne vrste *C. ternata*;
2. Sinteza i identifikacija odabranih sastojaka etarskog ulja biljne vrste *C. ternata* i njihovih derivata;
3. Spektroskopska i strukturna karakterizacija sintetisanih jedinjenja;
4. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti izolovanih i/ili sintetisanih jedinjenja;
5. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti izolovanih i/ili sintetisanih jedinjenja;
6. Ispitivanje farmakološke aktivnosti i toksičnosti (ispitivanje analgetskog dejstva, uticaja na funkcije centralnog nervnog sistema, histoloških promena na jetri, bubregu i želucu, kao i biohemijskih parametara krvi);
7. Ispitivanje metabolisanja i distribucije u organizmu pacova odabranih sintetisanih jedinjenja;
8. Povezivanje farmakološke aktivnosti sintetisanih jedinjenja sa etnofarmakološkom primenom biljne vrste *C. ternata*.

Predviđena ispitivanja su izvršena korišćenjem sledećih metoda:

1. *Dobijanje etarskih ulja* - hidroddestilacija po *Clevenger-u*;
2. *Dobijanje ekstrakata* - maceracija etanolom;
3. *Analiza* - gasna hromatografija (GC) i gasna hromatografija sa masenom detekcijom (GC-MS);
4. *Sinteza* odabranih sekundarnih metabolita biljne vrste *C. ternata* i njihovih derivata;
5. *Izolovanje* - *dry-flash* hromatografija i tečna hromatografija pod srednjim pritiscima (MPLC);
6. *Spektroskopska i strukturna karakterizacija*:
 - nuklearna magnetna spektroskopija vodonika i ugljenika (^1H - i ^{13}C -NMR, jedno- i dvodimenzionalna),
 - infracrvena spektroskopija (IR),
 - ultraljubičasta spektroskopija (UV),
 - masena spektrometrija (MS);
7. Ispitivanje hemijskog ponašanja odabranog derivata na povišenim temperaturama;
8. *Ispitivanje biotransformacije*:

analiza metabolita iz urina i organa pacova koji su tretirani odabranim sekundarnim metabolitima biljne vrste *C. ternata*

 - hromatografija na stubu *Sephadex-a* LH-20,
 - gasna hromatografija sa masenom detekcijom (GC-MS),
 - nuklearna magnetna spektroskopija vodonika i ugljenika (^1H - i ^{13}C -NMR, jedno- i dvodimenzionalna);
9. *Ispitivanje dejstva na centralni nervni sistem miševa*:
 - testovi anksioznosti (test svetlo/tama (*light/dark*) u kombinaciji sa testom otvorenog polja (*open field*)),
 - testovi depresije (test prinudnog plivanja (*forced swimming*) i test vešanja o rep (*tail suspension*)),
 - test spavanja izazvanog dijazepamom;

10. *Ispitivanje analgetske aktivnosti i mehanizma analgetske aktivnosti:*
 - Test abdominalnih grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom (*writhing test*),
 - Test osetljivosti na termalni nadražaj - metoda vruće ploče (*hot-plate test*),
 - Formalinom-izazvana nocicepcija (formalinski test),
 - Kapsaicinom-izazvana nocicepcija,
 - Glutamatom-izazvana nocicepcija,
 - Refleks naglog pokreta repom (*tail flick reflex*);
11. *Histopaloška analiza jetre, bubrega i želuca pacova:*
 - ispitivanje hepato- i nefroprotektivnog dejstva u modelu oštećenja jetre i bubrega pacova izazvanog ugljen-tetrahloridom,
 - ispitivanje uticaja na nastanak lezija na sluznici želuca pacova izazvanih diklofenakom i etanolom;
12. *Određivanje biohemijskih parametara krvi:*
 - aktivnost alanin- i aspartat-aminotransferaze,
 - koncentracija holesterola,
 - koncentracija totalnog i direktnog bilirubina;
 - koncentracija uree i kreatinina;
13. *Određivanje antioksidantne aktivnosti:*
 - DPPH i ABTS test,
 - hvatanje superoksidnog radikala;
14. *Određivanje antimikrobne aktivnosti* mikrodilucionom metodom po preporukama NCCLS-a.

3. OPŠTI DEO

3.1. CHOISYA TERNATA

Biljna vrsta *Choisya ternata* Kunth (porodica Rutaceae – tabela 3.1) je zimzeleni žbun, koji može da poraste do 2 m visine (Bayer *et al.*, 2009; Creche *et al.*, 1993). To je ukrasna biljka, belih cvetova, koji podsećaju na cvetove narandže (slika 3.1.1), pa je zbog ove sličnosti u Francuskoj poznata kao *Oranger du Mexique*, a u Engleskoj kao *Mexican orange* ili *mock orange* (lažna narandža).

Tabela 3.1. Filogenetsko stablo biljne vrste *C. ternata* Kunth
(<http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=CHOIS&display=31>)

Taksonomske kategorije	Taksoni
Carstvo (regnum)	Plantae
Podcarstvo (subregnum)	Tracheobionita
Superodeljak (superphylum)	Spermatophyta
Odeljak (phylum)	Magnoliophyta
Klasa (classis)	Magnoliopsida
Potklasa (subclassis)	Rosidae
Red (ordo)	Sapindales
Familija (familia)	Rutaceae
Rod (genus)	<i>Choisya</i>
Vrsta (species)	<i>ternata</i> Kunth

Vrsta je dobila naziv po ženevskom prirodnjaku, *Choisy*-u (1799-1859). *Choisya grandiflora* Regel (Gartenflora (1876) 257; in Act. Hort. Petrop. iv. (1876) 336.) i *Juliania caryophyllata* La Llave i Lex. su sinonimi za biljnu vrstu *C. ternata* (Nov. Veg. Descr. [La Llave i Lexarza] 2: 4. 1825) (www.theplantlist.org).



Slika 3.1.1. *Choisya ternata* izgled a) žbuna (<http://www.mooseycountrygarden.com/shrubs/choisya-shrub-white-flower.html>), b) racema (<https://en.wikipedia.org/wiki/Choisya>) i c) cveta (https://commons.wikimedia.org/wiki/Choisya_ternata#/media/File:Choisya_ternata_7.jpg)

3.1.1. Botanička klasifikacija

Rod *Choisya* proučavali su *Gray* (1888), *Standley* (1923) i *Muller* (1940) i on broji sedam vrsta (www.theplantlist.org):

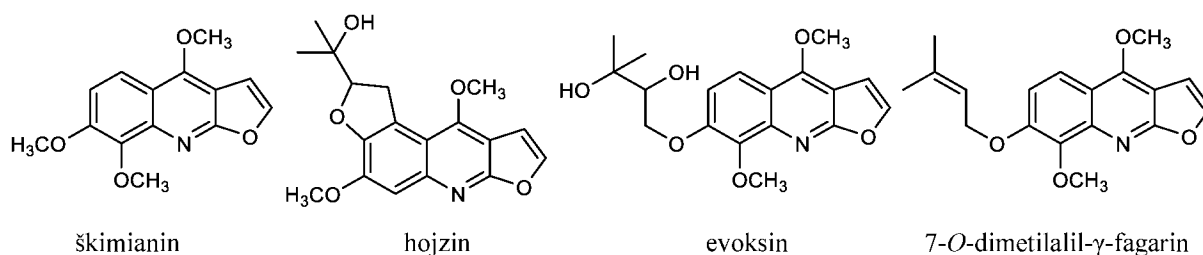
1. *C. dumosa* (Torr. i A.Gray) A.Gray,
2. *C. dumosa* var. *arizonica* (Standl.) L.D.Benson = *C. arizonica* Standl,
3. *C. dumosa* var. *mollis* (Standl.) L.D.Benson = *C. mollis* Standl,
4. *C. ternata* Kunth = *C. grandiflora* Regel,
5. *C. katherinae* C.H.Müll,
6. *C. neglecta* C.H.Müll,
7. *C. palmeri* Standl.

Nemački botaničar *Kunth* je prvi opisao biljnu vrstu *C. ternata* 1823. godine, prilikom klasifikacije biljaka koje su na području Severne Amerike sakupili *Humboldt* i *Bonpland*. *Choisya ternata* potiče iz jugozapadnih država Severne Amerike i planina centralnog i južnog dela Meksika. Retko raste u divljini, a stanovnici Meksika su je uzgajali još početkom 19. veka. Kultivisani primerci biljne vrste *C. ternata* su vrlo slični nekultivisanim (*Muller*, 1940).

3.1.2. Hemijski sastav

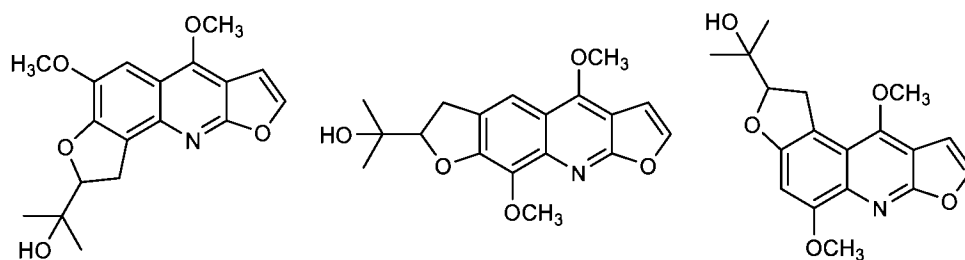
Hemijski sastav biljne vrste *C. ternata* još uvek nije detaljno ispitan. Proučavani su alkaloidi, kumarini, triterpeni, flavonoidi, steroli i isparljivi sekundarni metaboliti.

Alkaloidi. Iz biljne vrste *C. ternata* izolovani su tercijarni alkaloidi furohinolinskog tipa, koji se smatraju odlikom (*Waterman*, 1975) vrsta porodice Rutaceae (*Frolova et al*, 1958; 1963; *Johns et al*, 1967; *Dreyer et al*, 1972; *Grundon et al*, 1974a,b). Sve četiri grupe gore pomenutih istraživača pronašle su škimianin, hojzin i evoksin (slika 3.1.2), koji su u razvijenoj biljci (žbunu) zastupljeni u relativnom odnosu 100 : 46 : 37 (*Grundon et al*, 1974a).



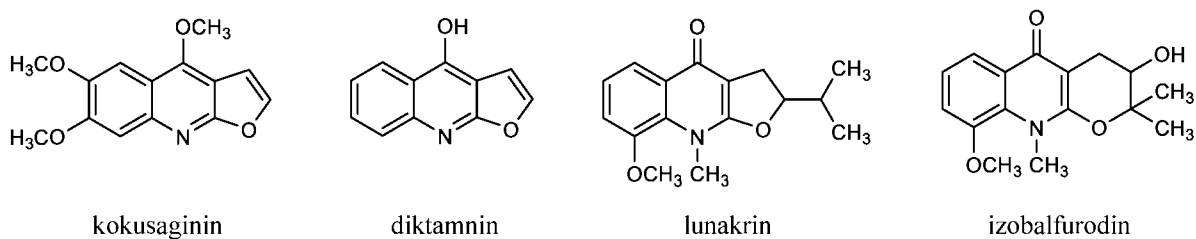
Slika 3.1.2. Strukture nekih tercijarnih furohinolinskih alkaloida izolovanih iz biljne vrste *C. ternata*

O'Donnell sa sardnicima (2006) je proučavo kiseli ekstrakt listova i stabla biljne vrste *C. ternata* metodom tečne hromatografije kuplovane sa masenom spektrometrijom (HPLC-ESI-MS). Između ostalog, u hromatogramima su detektovali hojzin, evoksin, njihove izomere, kao i izomer 7-*O*-dimetilalil- γ -fagarina. Primeri mogućih izomernih struktura hojzina date su na slici 3.1.3.



Slika 3.1.3. Strukture mogućih izomera hojzina detektovanih u biljnoj vrsti *C. ternata*

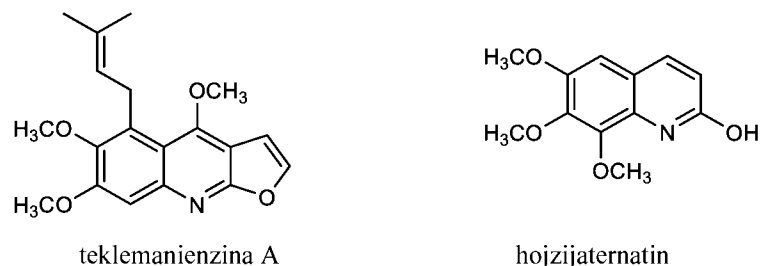
Boyd i saradnici (2007) su iz listova *C. ternata* izolovali i identifikovali sedamnaest hinolinskih alkaloida, uključujući i nekoliko oksigenovanih hinolinskih derivata. Među njima je bilo devet poznatih i osam novootkrivenih alkaloida (uključujući i dva nova hidroperoksida), koji nastaju uglavnom prenilovanjem na C(5). *Montagu* sa saradnicima (1985) je pomoću HPLC-a ispitivao furo- i dihidrofurohinolinske alkaloidne iz metanolnog ekstrakta biljnih vrsta porodice Rutaceae, a fizičko-hemijske osobine ovih jedinjenja su ispitane metodom tankoslojne hromatografije (TLC) na tri različite stacionarne faze. Otkriveni su i neki drugi alkaloidi, kao na primer: kokusaginin (*Dreyer et al*, 1972), diktamnin, lunakrin i izobalfurodin (*Tea*, 1977) (slika 3.1.4).



Slika 3.1.4. Strukture drugih hinolinskih alkaloida izolovanih iz biljne vrste *C. ternata*

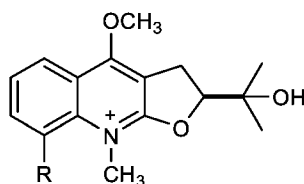
Nedavno su ispitivani neisparljivi sastojci etanolnog ekstrakta listova biljne vrste *C. ternata* dobijenog ekstrakcijom po *Soxhlet*-u (*Wahab et al*, 2012). Pored škimianina i hojzina, po prvi put u ovoj biljnoj vrsti utvrđeno je prisustvo teklemanienzina A (slika 3.1.5), kao i nekih kumarina, sterola i steroidnih heterozida. Pored toga, izolovan je i do sada nepoznati hinolinski

alkaloid, hojzijaternatin (slika 3.1.5), koji je potpuno spektralno okarakterisan, a njegova struktura je dodatno potvrđena kristalografskom analizom.



Slika 3.1.5. Strukture drugih hinolinskih alkaloida izolovanih iz biljne vrste *C. ternata*

Iz listova biljne vrste *C. ternata* su izolovane dve kvaternarne dihidrofuro[2,3-*b*]hinolinijum soli, koje inhibiraju rast biljaka, a to su (-)-*S*-balfurodinijum i (-)-*S*-platidezminijum so (slika 3.1.6) (Garestier i Rideau, 1972; Rideau, 1972; Rideau *et al*, 1979). U vrstama porodice Rutaceae su do sada pronađeni samo njihovi optički antipodi (Waterman, 1975). Ove soli su u stabljici i korenu prisutne u približno jednakim količinama, dok je sadržaj balfurodinijum soli u listovima veći (Garestier i Rideau, 1972). Koncentracija kvaternarnih dihidrofuro[2,3-*b*]hinolinijum soli je viša u mladim stabljikama, nego u kulturama tkiva mladih stabljika (Creche *et al*, 1993). Relativni sadržaj soli platidezminijuma u nekim kulturama tkiva može biti veći nego u celoj biljci, dok je so balfurodinijuma uvek prisutna u znatno manjim koncentracijama (Tremouillaux-Guiller *et al*, 1988), čak i kod kultura onih tkiva koja akumuliraju najviše alkaloida (Tremouillaux-Guiller *et al*, 1987).



R = H – soli platidezminijuma, R = OCH₃ – soli balfurodinijuma

Slika 3.1.6. Strukture kvaternarnih furohinolinskih alkaloida izolovanih iz biljne vrste *C. ternata*

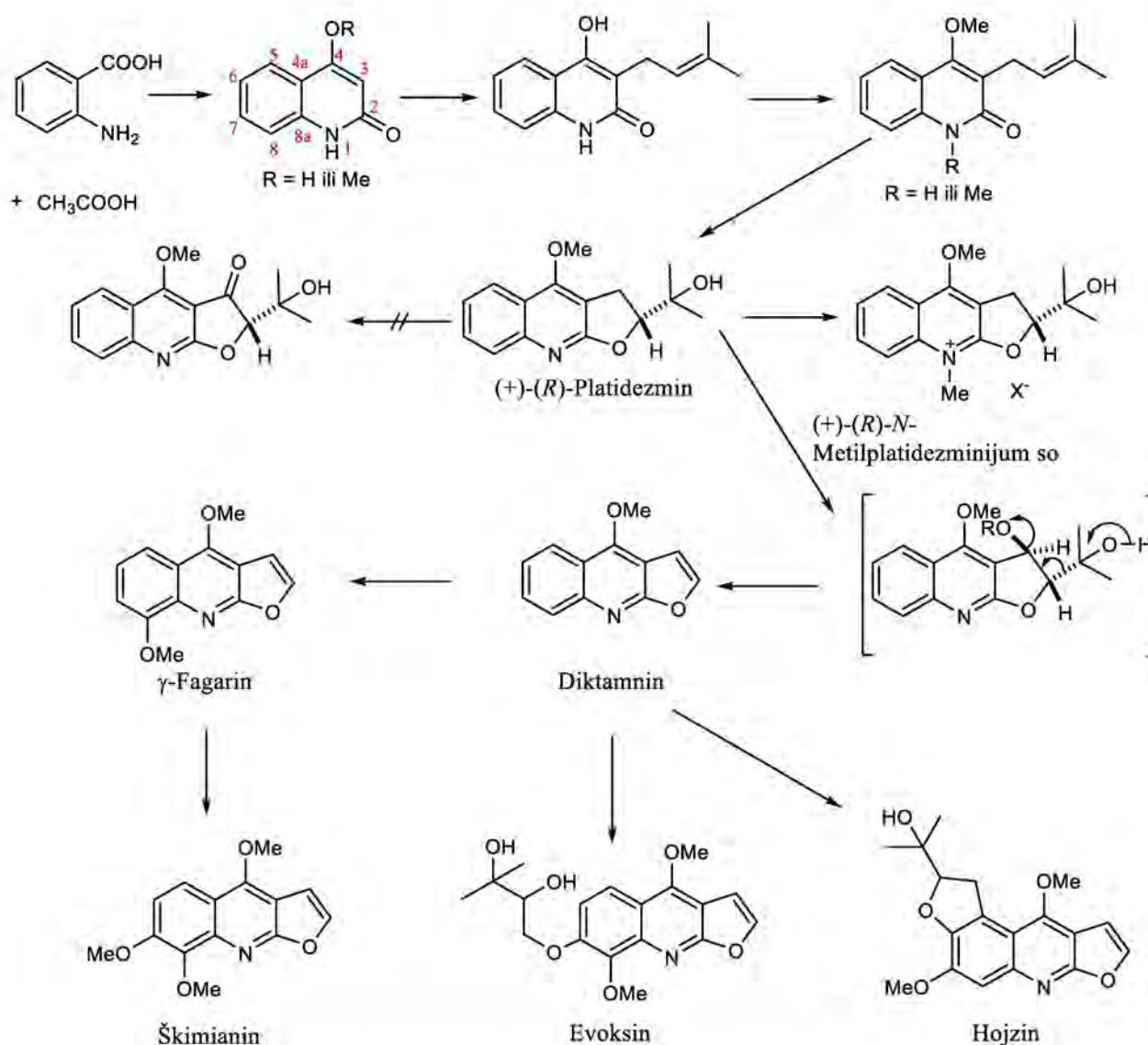
Kulture ćelija biljne vrste *C. ternata* sadrže furohinolinske alkaloida, so platidezminijuma i kokusaginin, kao i tragove soli balfurodinijuma i škimianina. Ova jedinjenja su u kulturama ćelija prisutna u manjoj relativnoj količini u odnosu na količinu koja se nalazi u listovima biljne

vrste *C. ternata*, što ukazuje na smanjenje koncentracije specifičnih enzima, koji katalizuju reakcije hidroksilacije i metilovanja (Sejourne *et al*, 1981).

Sadržaj tercijarnih alkaloida u listovima, peteljka, čašičnim listićima, laticama, prašnicima i tučkovima biljne vrste *C. ternata* je 0,60, 0,14, 0,62, 0,065, 0,03 i 0,19% u odnosu na masu suvog biljnog materijala (Rideau i Chenieux, 1978). U prašnicima se nalazi samo škimianin, dok su u ostalim biljnim organima prisutni najzastupljeniji alkaloidi iz listova (Grundon *et al*, 1974a). Od kvaternarnih alkaloida nivo soli balfurodinijuma u gore pomenutim biljnim organima je 0,49, 0,26, 0,63, 0,055, 0,08 i 0,31%, dok je nivo soli platidezminijuma 0,045, 0,03, 0,10, 0,015, 0,04 i 0,055%. Sadržaj alkaloida u čašičnim listićima raste tokom ranih stadijuma cvetanja, a zatim opada sa starenjem biljke. Smanjenje nivoa kvaternarnih alkaloida sa starenjem je izraženije u odnosu na smanjenje nivoa tercijarnih. Koncentracija alkaloida, kao i sadržaj soli balfurodinijuma u odnosu na so platidesminijuma, viši je u biljnim organima, koji poseduju hlorofil, npr. listovi, mlade stabljike, čašični listići, ovarijumi (Chenieux *et al*, 1978). Rezultati proučavanja *in vitro* kultura tkiva pokazuju da ne postoji veza između sadržaja hlorofila i alkaloida.

Svi ovi alkaloidi nastaju biosintezom iz antranilne kiseline. Grundon i saradnici (1974a) proučavali su biosintezu furohinolina različitih vrsta porodice Rutaceae, uključujući i vrstu *C. ternata*. Opšta šema biosinteze ovih alkaloida, koju su dali Petit-Paly *et al*. (1989; 1993), u saglasnosti je sa biosintetskim putevima kod vrste *C. ternata*. Još uvek nije poznato u kom se biljnom organu vrši sinteza dihidrofurohinolinskih alkaloida (Chenieux *et al*, 1978).

Biosinteza hinolinskih alkaloida biljne vrste *C. ternata*. Hinolinski alkaloidi biljne vrste *C. ternata* nastaju biosintezom iz antranilne i sirćetne kiseline (C(2) i C(3) atomi hinolinske strukture (slika 3.1.7) potiču od acetata) (Grundon *et al*, 1974 a). Izotopskim markiranjem hinolona koji je prekursor (+)-(R)-platidezmina (R=H), opovrgnuta je pretpostavka da je keton, derivat platidezmina, intermedijer u biosintezi furanskog prstena. Do formiranja furanskog prstena diktamnina iz platidezmina najverovatnije dolazi stereospecifičnom fragmentacijom(+)-(R)-N-metilplatidezminijum soli, ili direktnom apstrakcijom vodonikovog atoma, nakon čega, u oba slučaja, sledi gubitak izopropil-grupe. Diktamnin je prekursor evoksina i hojzina, kao i γ -fagarina, iz kog nastaje škimianin, glavni furohinolinski alkaloid biljne vrste *C. ternata*. Pretpostavlja se da furohinolinski alkaloidi oksigenovani na aromatičnom jezgru, između ostalih i škimianin, nastaju hidroksilacijom diktamnina, međutim na osnovu rezultata se ne mogu isključiti ni drugi biohemijski putevi, npr. formiranje škimianina iz 7,8-dimetoksi-2-hinolona.



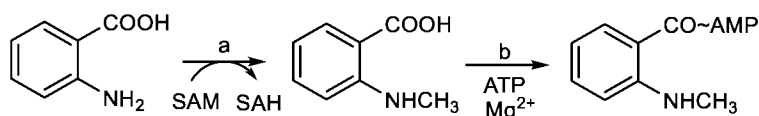
Slika 3.1.7. Šema biosinteze furohinolinskih alkaloida

Enzimi koji katalizuju biosintezu furo- i dihidrofuro-hinolinskih alkaloida. Još uvek se ne zna da li pri biosintezi kvaternarnih, dihidrofuro- i dihidropirano-hinolinskih alkaloida do *N*-metilovanja dolazi pre ili nakon formiranja piridinskog prstena hinolina. Ukoliko se *N*-metilovanje vrši nakon formiranja prstena mogući supstrati koji podležu *N*-metilovanju su 2,4-dihidroksihinolin ili platidezmin.

Baumer i saradnici (1990) su ispitali prisustvo enzima *S*-adenozil-L-metionin: antranilna kiselina-*N*-metiltransferaze u kulturama tkiva biljne vrste *C. ternata*, stare dve ili tri nedelje, a koje su sadržavale različite količine kvaternarnih alkaloida. Prisustvo gore pomenutog enzima zabeleženo je u nekim kulturama tkiva, ali ne i u onim, koje su sadržale soli balfurodinijuma i platidezminijuma u tragovima.

Prilikom biosinteze hinolina sa malonil-koenzimom A mogu da reaguju aktivirana antranilna kiselina ili aktivirana *N*-metilantranilna kiselina. Ekstrakti kulture tkiva biljne vrste *C. ternata* bez ostataka ćelija, koje akumuliraju dihidrofuro- i dihidropirano-hinolinske alkaloide, katalizuju ATP-zavisnu aktivaciju *N*-metil-antranilne kiseline, preko hidroksamata, dok aktivaciju antranilne kiseline katalizuju u znatno manjoj meri. Najveću specifičnu enzimsku aktivnost pokazuju kulture tkiva koje akumuliraju prilično velike količine kvaternarnih alkaloida.

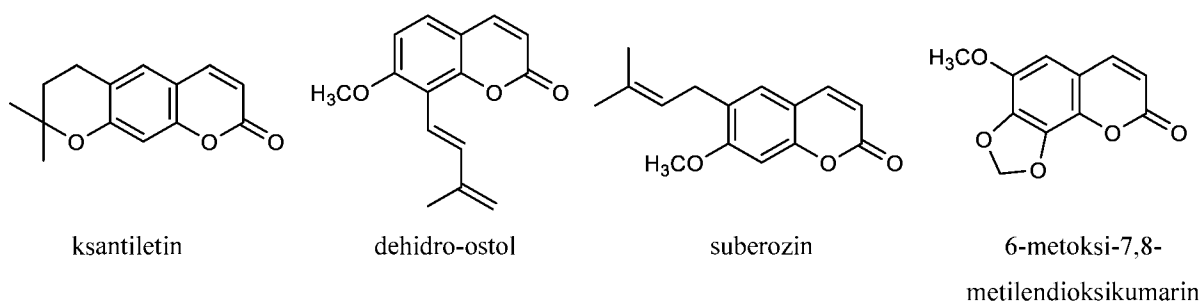
Od ranije je poznato da kulture tkiva biljne vrste *Ruta graveolens* akumuliraju alkaloide akridonskog tipa. Prilikom biosinteze akridonskih alkaloida prvi korak je *N*-metilovanje antranilne kiseline, a drugi aktivacija *N*-metilantranilne kiseline (Baumert *et al*, 1983, 1985). Oba enzima učestvuju u prvim koracima biosinteze furohinolinskih alkaloida (slika 3.1.8). Na osnovu ovoga se može zaključiti da se *N*-metilovanje odvija pre zatvaranja prstena, tj. da dolazi do *N*-metilovanja antranilne kiseline.



Slika 3.1.8. Prve specifične reakcije pri biosintezi furohinolina

- (a) Reakcija koju katalizuje enzim antranilna kiselina-*N*-metil-transferaza
- (b) Reakcija koju katalizuje *N*-metilantranilna kiselina aktivirajući enzim

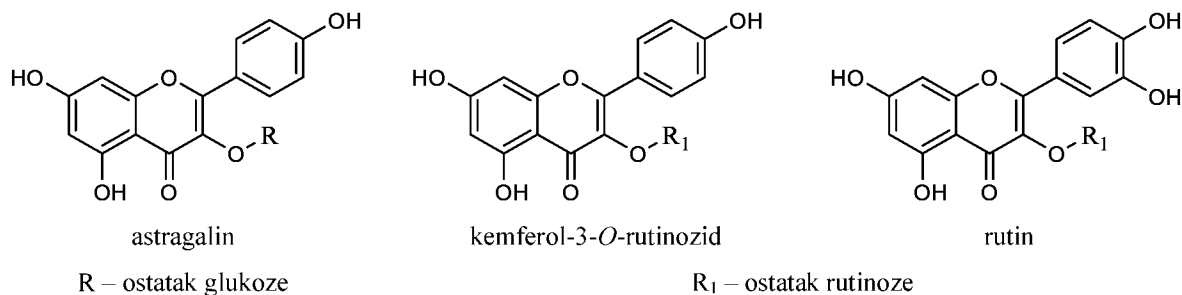
Kumarini. Ksantiletin, dehidro-ostol i suberozin izolovani su iz korena biljne vrste *C. ternata* (slika 3.1.9) (Bohlmann *et al*, 1972). Iz dihlormetanske frakcije etanolnog ekstrakta listova izolovan je 6-metoksi-7,8-metilendioksikumarin (slika 3.1.9) (Wahab *et al*, 2012).



Slika 3.1.9. Strukture kumarina izolovanih iz biljne vrste *C. ternata*

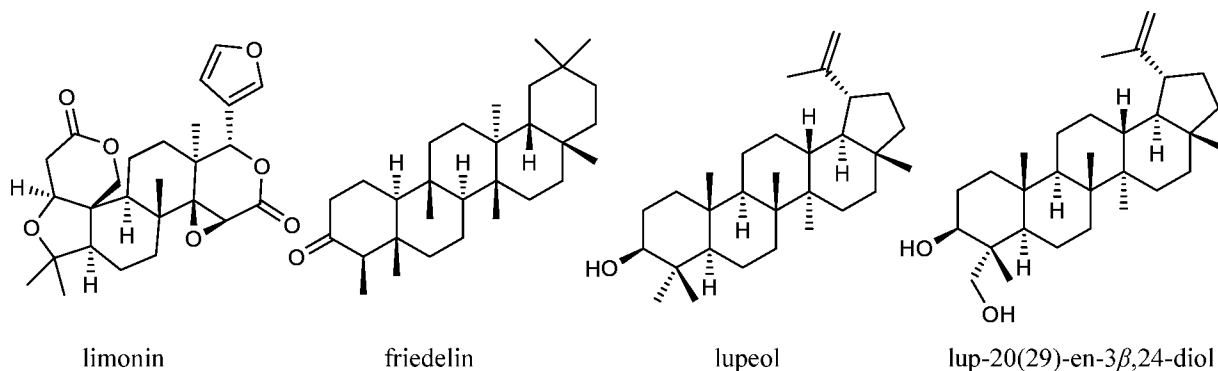
Flavonoidi. Vruć etanolni ekstrakt latica (Tea *et al*, 1975) i listova (Tea, 1977) biljne vrste *C. ternata* analiziran je metodom tankoslojne hromatografije. Detektovano je pet

flavonoidnih heterozida, među kojima su astragalin (kemferol-3-*O*-glukozid), kemferol-3-*O*-rutinozid i rutin (kvercitol-3-*O*-rutinozid) (slika 3.1.10).



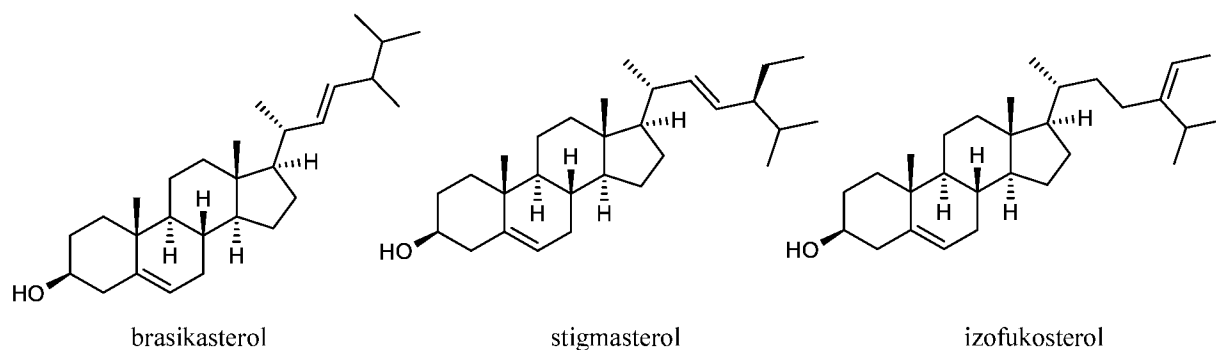
Slika 3.1.10. Strukture izolovanih flavonoidnih heterozida iz biljne vrste *C. ternata*

Triterpeni. Iz listova biljne vrste *C. ternata* izolovani su limonin (Dreyer *et al*, 1972) i friedelin (slika 3.1.11). Limonin je detektovan i u listovima biljnih vrsta *C. arizonica* i *C. mollis*. Wahabi saradnici (2012) su nedavno iz heksanskog ekstrakta listova izolovali lupeol i lup-20(29)-en-3 β ,24-diol (slika 3.1.11).

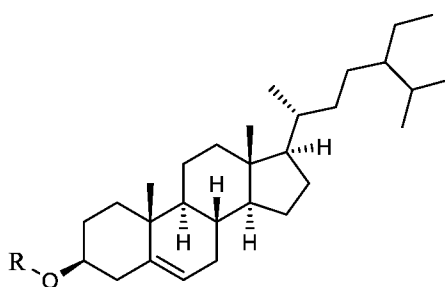


Slika 3.1.11. Strukture triterpena izolovanih iz biljne vrste *C. ternata*

Steroli. Količina slobodnih sterola u kulturama tkiva je veća u odnosu na stabljike koje sadrže hlorofil (Gras, 1983; Creche *et al*, 1987). Brasikasterol, stigmasterol i izofukosterol (slika 3.1.12) su detektovani u fotoautotrofnoj, dok se ne javljaju u ostalim kulturama tkiva, kao ni u stablu. Wahab i saradnici (2012) su iz heksanskog ekstrakta listova biljne vrste *C. ternata* izolovali β -sitosterol glukozid (slika 3.1.13).



Slika 3.1.12. Strukture sterola izolovanih iz biljne vrste *C. ternata*



Slika 3.1.13. Struktura β -sitosterol glukozida (R – ostatak glukoze)

Isparljivi sekundarni metaboliti. Etarsko ulje listova biljne vrste *C. ternata* analizirano je metodom GC-MS (Respaud *et al*, 1997). Okarakterisano je osamnaest sastojaka, među kojima su bili najzastupljeniji α -felandren (64-71%) i mircen (11,5%) (slika 3.1.14). Sastav etarskog ulja listova sakupljenih na proleće i jesen se razlikovao.



Slika 3.1.14. Strukture isparljivih sekundarnih metabolita detektovanih u biljnoj vrsti *C. ternata*

Biološka aktivnost nekih jedinjenja izolovanih iz biljne vrste *C. ternata*. Evoksin deluje kao spazmolitik, sedativ, ima hipnotično dejstvo (kod pacova i miševa u dozama do 200 mg/kg), a poznato je i da snižava telesnu temperaturu (Berezhinskaya i Trutneva, 1959; Berezhinskaya, 1979). Škimianin, najzastupljeniji tercijarni alkaloid u biljnoj vrsti *C. ternata*, je

antidiuretik i hipotermik (Polietshev *et al*, 1972). Kokusaginin ima ganglioplegičan efekat (Kovalenko, 1946). Balfurodinijum-hlorid pokazuje antimitotičnu aktivnost u vrlo malim koncentracijama (Chenieux *et al*, 1976), dok su ostali furohinolinijum-hloridi manje aktivni. Ksantiletin ima blago citotoksično dejstvo. Piranokumarini, kao i mnogi furokumarini, mogu da stupe u fotohemijske reakcije sa DNK (Rodiguiero i Dall'acqua, 1976).

3.1.3. Medicinski značaj

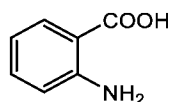
Medicinsku primenu biljne vrste *C. ternata* proučavao je *Boudoresque* (1895). On je izveo i prvi farmakološki test, kojim je na sebi ispitivao dejstvo vodenog ekstrakta listova ove biljne vrste, pri čemu je utvrdio da je osvežavajućeg ukusa i da podstiče varenje. S druge strane, masno ulje ove biljke je vrlo odbojno. Poznato je da su stanovnici Meksika pili čaj, pripremljen od listova ove biljne vrste, zbog njegovog antispazmodičnog i „stimulativnog“ dejstva (Standley, 1923). Antispazmodične osobine listova najverovatnije potiču od prisustva evoksina, koji deluje sedativno i spazmolitično. Takođe je utvrđeno da soli balfuordinijuma pokazuju spazmolitični efekat na izolovani duodenum pacova (Creche *et al*, 1993).

Choisya ternata je oficinalna po 4. i 5. tomu Meksičke farmakopeje. Koliko je poznato, *C. ternata* danas nema široku primenu. Međutim, neke vrste porodice Rutaceae, *Ruta graveolens* i *Ptelea trifoliata*, sličnog hemijskog sastava kao *C. ternata*, se i dalje koriste u terapeutske svrhe (Petit-Paly *et al*, 1989; 1993).

3.2. ANTRANILNA KISELINA

3.2.1. Osobine antranilne kiseline

Antranilna kiselina (2-aminobenzojeva kiselina) (slika 3.2.1) je čvrsto jedinjenje slatkog ukusa, bele do bledo žute boje. Tačka topljenja antranilne kiseline je 144-146 °C i može da se prekrystalise iz tople vode. Rastvor ove kiseline u alkoholu ili etru fluorescira poput ametista (The Merck Index, 1996).



Slika 3.2.1. Struktura antranilne kiseline

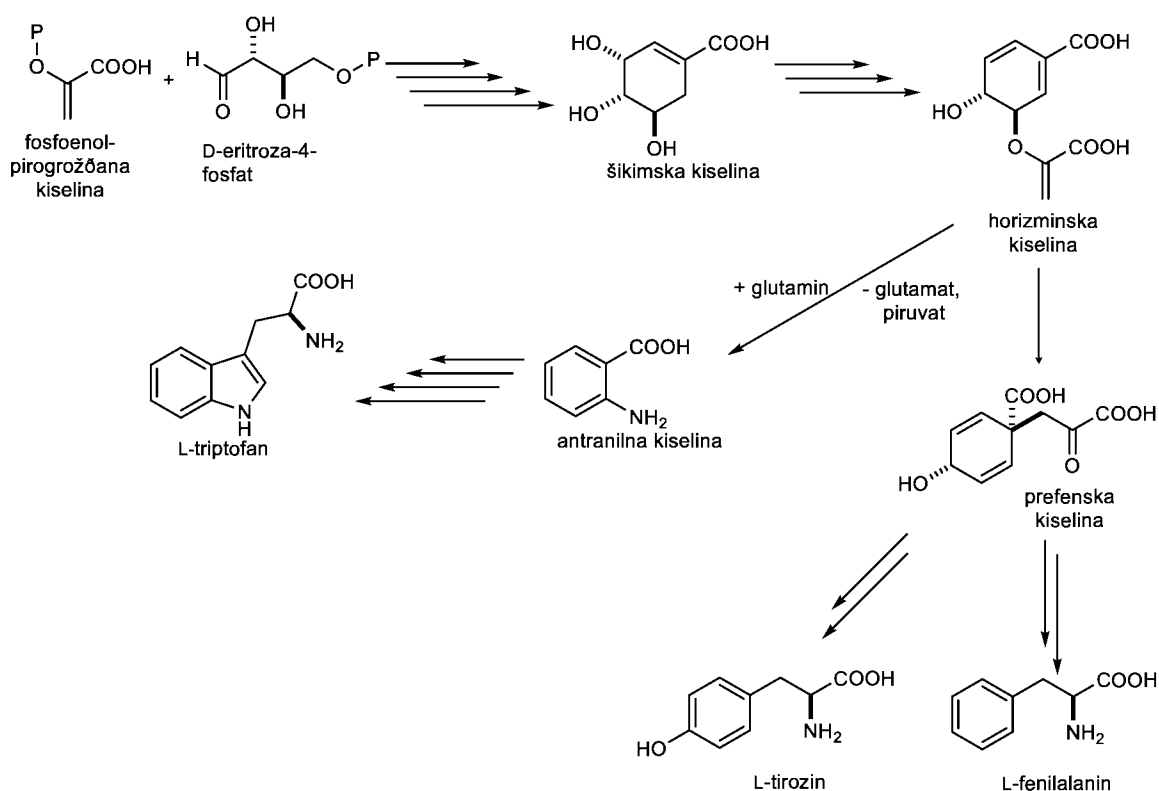
Kao i ostale aminokiseline, antranilna kiselina je amfoterna (Wiklund i Bergam, 2004). Usled elektron-donorskog efekta amino grupe, antranilna kiselina je slabija od benzojeve ($pK_a=4,20$). Antranilna kiselina je znatno slabija baza od anilina ($pK_a=4,61$) zbog jakog elektron-akceptorskog efekta karboksilne grupe.

Postoje mnoge soli antranilne kiseline, kao i kompleksna jedinjenja sa antranilnom kiselinom ili njenom konjugovanom bazom, kao ligandom. Struktura litijumove, natrijumove, kalijumove (Wiesbrock i Schmidbaur, 2002), magnezijumove (Wiesbrock *et al*, 2002), rubidijumove i cezijumove (Wiesbrock i Schmidbaur, 2003a) soli antranilne kiseline, odnosno kompleksa antranilne kiseline i galijuma, aluminijuma (Branch *et al*, 2001) i talijuma (Wiesbrock i Schmidbaur, 2003b) određena je kristalografskom analizom. Takođe je utvrđena i stabilnost kompleksa sa bakrom i kadmijumom (Harris i Sweet, 1956).

3.2.2. Anabolizam i katabolizam antranilne kiseline

Antranilna kiselina je jedan od intermedijera anabolizma i katabolizma triptofana. Ovi anabolički procesi uključuju i biosintezu fenilalanina i tirozina, kao i sintezu hinolinske kiseline, koja je prekursor nikotinamid-adenin-dinukleotida (NAD^+). Biosinteza sve tri aromatične aminokiseline počinje reakcijom fosfoenol-pirogroždane kiseline i eritroza-4-fosfata (Nelson i

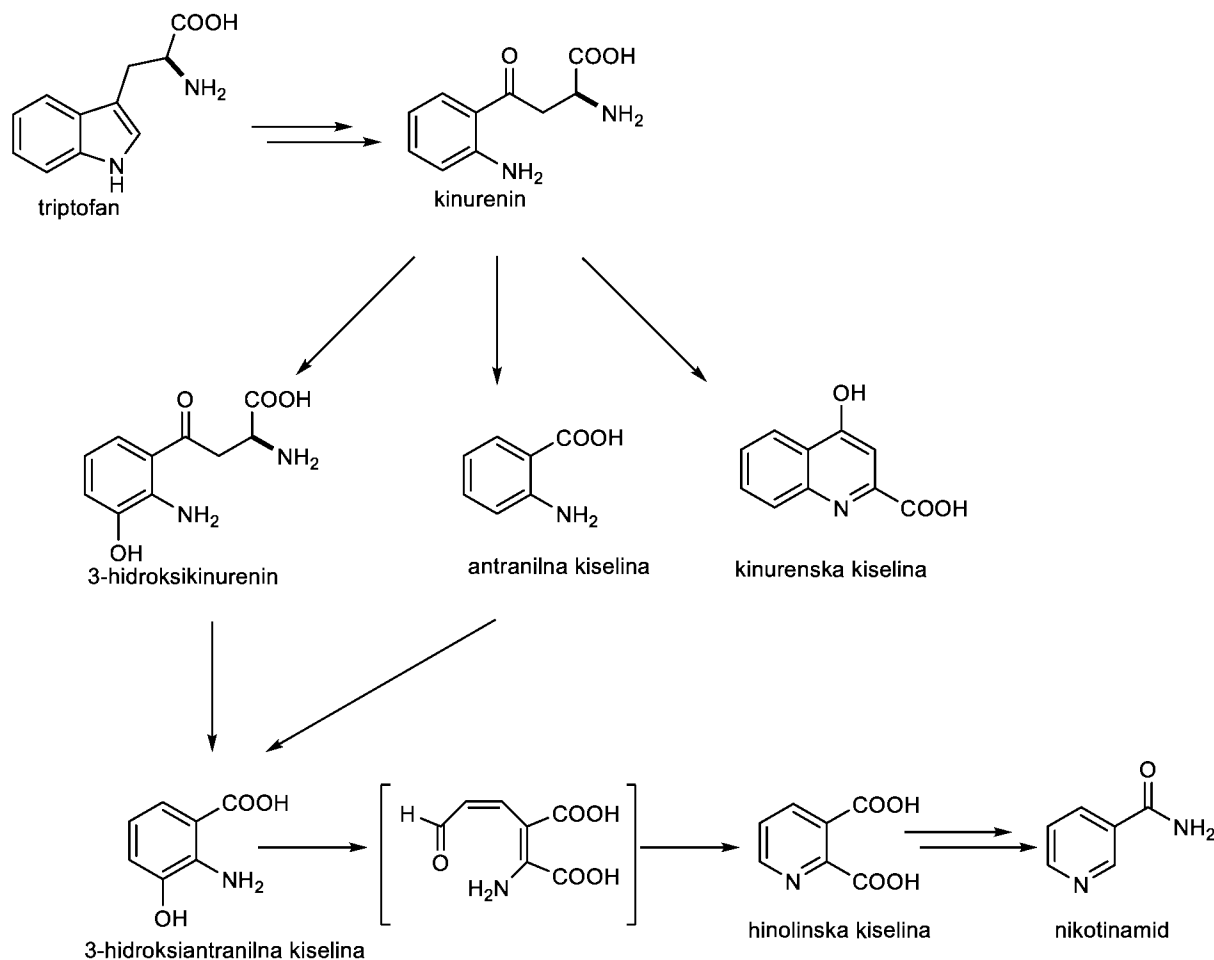
Cox, 2000) i preko šikimske (Knaggs, 2001), vodi ka građenju horizmiske kiseline. U koraku transformacije horizmiske kiseline, anabolički put aromatičnih aminokiselina se grana, pri čemu, u jednom slučaju nastaje prefenska kiselina, koja je intermedijer pri sintezi fenilalanina i tirozina, a u drugom, antranilna kiselina, koja je intermedijer pri sintezi triptofana. Antranilna kiselina nastaje transaminacijom između glutamina i horizmata, uz eliminaciju piruvata, dejstvom enzima *antranilat sintaze* (slika 3.2.2).



Slika 3.2.2. Biosintetska šema aromatičnih aminokiselina

Razgradnjom triptofana kod životinja dolazi do oksidativnog otvaranja pirolovog prstena, pri čemu nastaje kinurenin, koji se dalje transformiše u nekoliko važnih, biološki aktivnih molekula (Botting, 1995). Hidroksilovanjem kinurenina, a zatim eliminacijom alanina, nastaje 3-hidroksiantranilna kiselina. Direktnom eliminacijom alanina (dejstvom enzima *kinureninaze*) gradi se antranilna kiselina. Dezaminacijom bočnog niza uz formiranje prstena nastaje kinureat. Oksidacijom (hidroksilacijom) antranilne kiseline dobija se 3-hidroksiantranilna kiselina (Moroni, 1999). Enzimskim otvaranjem aromatičnog prstena 3-hidroksiantranilne kiseline, dejstvom *oksidaze 3-hidroksiantranilne kiseline* (Botting, 1995), a zatim neenzimskim zatvaranjem prstena, nastaje hinolinska kiselina, koja može da reaguje sa podgrupom NMDA (*N*-

metil-D-aspartat) receptora i pri velikim koncentracijama deluje kao neurotoksin (Stone, 1993). Ona je, takođe, prekursor nikotinamida (i NAD-a) (slika 3.2.3).

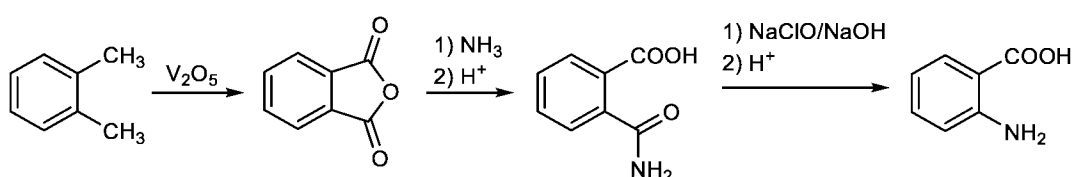


Slika 3.2.3. Katabolizam triptofana

Antranilna kiselina učestvuje u važnim biohemijskim putevima bakterija, biljaka i životinja, kao startni materijal za nekoliko različitih vrsta jedinjenja. Među njima su alkaloidi (Groger, 1984), signalni molekuli biljaka, kao što je 2,4-dihidroksi-7-metoksi-(2*H*)-1,4-benzoksazin-3(4*H*)-on (Kumar i Chilton, 1994) i indol-3-sirćetna kiselina (Knaggs, 2001; Radwanski i Last, 1995). Antranilna kiselina je feromon insekta *Holotrichia Loochooana Loochooana* (Arakaki *et al*, 2003). Poznato je i da antranilna, 4-aminobenzoeva i benzoeva kiselina stimulišu formiranje plodnog tela nekih vrsta pečuraka (Murao, 1986).

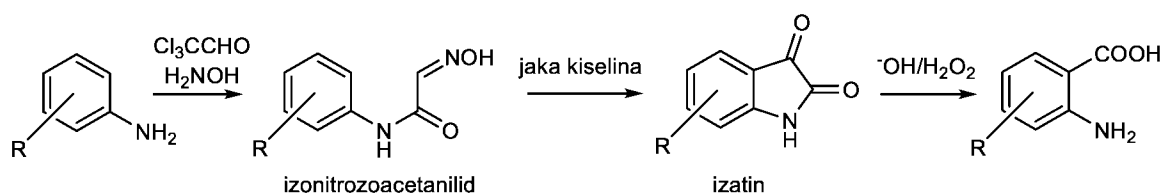
3.2.3. Sinteza antranilne kiseline

Prvi korak industrijske sinteze antranilne kiseline je oksidacija *o*-ksilena, pri čemu nastaje ftalanhidrid. Tretiranjem ovog anhidrida amonijakom, nastaje ftalamid, koji dejstvom natrijum-hipohlorita, u prisustvu baze, podleže *Hofmann*-ovom premeštanju (slika 3.2.4) (Kutyaniin *et al.*, 2002; BASF, 1890; Chapman i Stephen, 1925). Umesto natrijum-hipohlorita moguće je koristiti natrijum-hipobromit (Blach, 1953). Ftalimid reaguje na isti način kao i ftalamid.



Slika 3.2.4. Industrijska sinteza antranilne kiseline iz *o*-ksilena

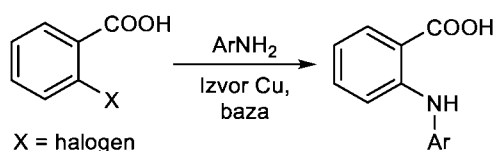
Antranilna kiselina sa supstituisanim prstenom se može dobiti oksidacijom odgovarajućih izatina vodonik-peroksidom u baznoj sredini (slika 3.2.5). Ovaj postupak je primenjen na alkil-, halogen-, alkoksi-, trifluormetil-, nitro- i na *N*-supstituisanim izatinima (Popp, 1975). Izatini nastaju *Sandmeyer*-ovom sintezom izatina, tretiranjem anilina hloralhidratom i hidroksilaminom. *Baeyer-Villiger*-ovom oksidacijom izatina (sa npr. MCPBA ili H_2O_2 u AcOH) nastaje odgovarajući anhidrid izatoiniske kiseline (Reissenweber i Mangold, 1980).



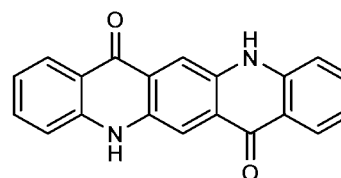
Slika 3.2.5. Sinteza antranilne kiseline sa supstituentima vezanim za prsten, oksidacijom odgovarajućih izatina

N-Arilantranilna kiselina se može dobiti i *Ullman-Goldberg*-ovom reakcijom. Originalna reakcija podrazumeva kuplovanje antranilne kiseline sa brombenzenom, u prisustvu bakra kao katalizatora (slika 3.2.6). Reakcija se izvodi na visokim temperaturama, pri čemu nastaje *N*-fenilantranilna kiselina (Goldberg, 1906). *Irma Goldberg*, a odmah nakon nje *Fritz Ullmann* (Meyer, 1940) i *Maag*, publikovali su rad o sintezi hinakridona (slika 3.2.7), koji se koristi kao boja (Jaffe, 2002; Lincke, 1999), koji je zasnovan na istom postupku, iz antranilne kiseline i *p*-

fenilendiamina (Ullmann i Maag, 1906). Naredne godine *Ullmann* i *Dieterle* su objavili detalje o bakrom katalizovanom kuplovanju anilina i 2-hlorbenzoeve kiseline (Ullmann i Dieterle, 1907). Modifikacija ove reakcije podrazumeva upotrebu 2-halogenbenzoeve kiseline i anilina, ili nekog drugog aril-amina u prisustvu baze i izvora bakra. Reakcija se može ubrzati dejstvom ultrazvuka (Pique *et al*, 2002), a u ovom slučaju moguće ju je uspešno izvesti i u prisustvu vode (Palacios i Comdom, 2003). *Kunz* sa saradnicima je 2003. publikovao rad o primeni ove reakcije na veći broj supstrata, uz upotrebu kompleksa bakra. Slični reakcioni uslovi, uz visoke prinose, se mogu koristiti pri *N*-arilovanju amida (Renger, 1985). Postoji i veliki broj, mada zastarelih, literaturnih pregleda o nukleofilnim supstitucijama aril-halogenida katalizovanih bakrom (Lindley, 1984).



Slika 3.2.6. Sinteza *N*-arilantranilne kiseline



Slika 3.2.7. Struktura hinakridona

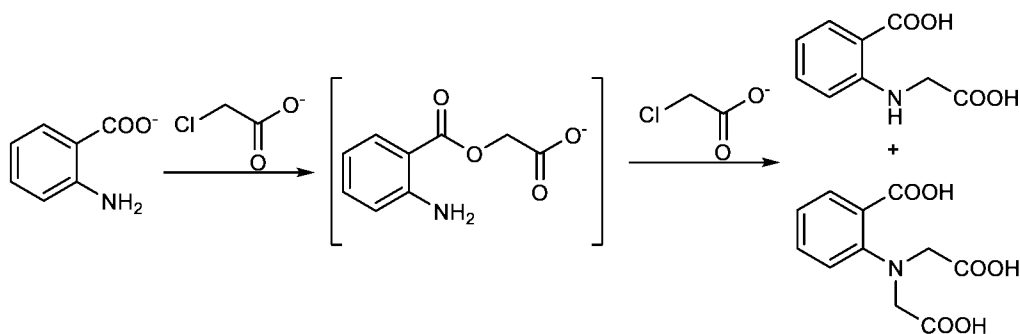
Antranilna kiselina i neki njeni derivati, takođe, mogu nastati i reakcijom disproporcije 2-nitrotoluena (Bakke *et al*, 1972).

3.2.4. Reaktivnost antranilne kiseline

Acilovanje/alkilovanje. U neutralnoj sredini, naročito u reakcijama sa acil-halogenidima, amino grupa je reaktivnija (nukleofilnija) od karboksilne grupe, a proizvodi reakcije, amidi, su termodinamički stabilniji, u odnosu na anhidride, koji bi nastali acilovanjem karboksilata. Reakcijom antranilne kiseline i acil-halogenida nastaje halogen-vodonik, koji antranilna kiselina neutrališe, pa zato samo polovina startnog materijala može da nagradi proizvod, dok se druga polovina prevodi u so. Pošto je karboksilna grupa znatno kiselija od anilinske amino grupe, dodatkom baze gradi se karboksilat. U baznoj sredini karboksilat napada elektrofil (Wiklund i Bergam, 2004).

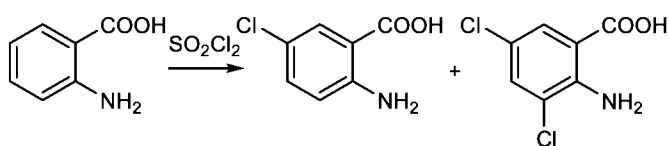
Primer za ovakvu reaktivnost je sinteza *N*-karboksimetilantranilne kiseline, koja se u starijoj literaturi često naziva i fenilglicin-*o*-karbonska kiselina (karboksilna kiselina), startnog materijala u sintezi indiga. U literaturi se mogu pronaći brojni načini za sintezu *N*-karboksi-

metilantranilne kiseline, među kojima je najviše radova, koji se bave sintezom iz antranilne kiseline i hlorsirćetne kiseline u vodenom rastvoru $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaOH}$ (slika 3.2.8). Primenom ovog postupka je *Heumann* prvi dobio *N*-karboksimetilantranilnu kiselinu (*Heumann*, 1890). Metod je 1901. godine patentirao *BASF* (*BASF*, 1900). U ovoj reakciji, kao sporedan proizvod, neizbežno nastaje *N,N*-dikarboksimetilantranilna kiselina, koja pod oksidativnim uslovima može da se dealkiluje do *N*-karboksimetilantranilne kiseline.

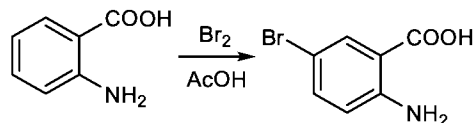


Slika 3.2.8. Sinteza *N*-karboksimetilantranilne kiseline

Halogenovanje. Reakcijom antranilne kiseline i sulfuril-hlorida (SO_2Cl_2), u etru, dobija se smeša 5-hlorantranilne kiseline i 3,5-dihlorantranilne kiseline (slika 3.2.9), koje se mogu lako razdvojiti (*Endicott et al*, 1946; *Eller i Klemm*, 1922). Tretiranjem antranilne kiseline bromom, u sirćetnoj kiselini, dobija se 5-bromovani proizvod (slika 3.2.10), u visokom prinosu (*Wheeler i Oates*, 1910; *Wheeler*, 1909).



Slika 3.2.9. Hlorovanje antranilne kiseline



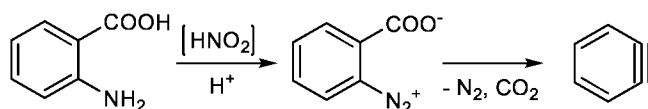
Slika 3.2.10. Bromovanje antranilne kiseline

Diazotovanje. Kao i ostali anilini, antranilna kiselina podleže reakciji diazotovanja, pri čemu se, u nevodenoj sredini, može formirati i unutrašnja so (*Dyke et al*, 1966). Na ovaj način nastao benzendiazonijum-karboksilat, sintetisan upotrebom izoamil-nitrita, u etanolu, može da se izoluje i stabilan je na temperaturama ispod $-70\text{ }^\circ\text{C}$ (*Stiles et al*, 1963). Zagrevanjem se so raspada na nestabilni intermedijer benzin, uz izdvajanje azota i ugljen-dioksida (slika 3.2.11).

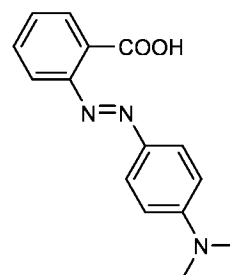
Pri uobičajenim uslovima za diazotovanje, npr. NaNO_2 , u hladnom, vodenom rastvoru HCl , ne dolazi do formiranja *zwitter*-jona. Zagrevanjem ovakve reakcione smeše nastaje salicilna kiselina (*Stiles et al*, 1963), uz izdvajanje azota. Dodatkom odgovarajućeg nukleofila

diazotovanoj antranilnoj kiselini može se dobiti 2-supstituisana benzoeva kiselina. Na ovaj način mogu da se sintetišu 2-hlor- (Doyle *et al*, 1977), 2-fluor- (Yoneda i Fukuhara, 1996), 2-brom- (Meisenheimer *et al*, 1926) i 2-jodbenzoeva kiselina (Kundu i Khan, 2000), kao i 2-azidobenzoeva kiselina (Okawa *et al*, 1996).

Kada se diazotovanoj antranilnoj kiselini dodaju anilin ili fenol, dolazi do diazokuplovanja. Primer za ovo je dobijanje diazo boje, metil-crveno (slika 3.2.12), iz diazotovane antranilne kiseline i *N,N*-dimetilanilina.



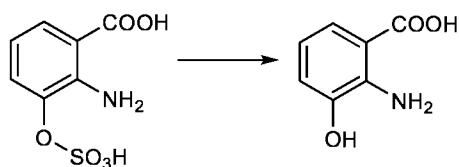
Slika 3.2.11. Diazotovanje antranilne kiseline



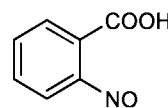
Slika 3.2.12. Struktura metil-crvenog

Oksidacija. 3-Hidroksiantranilna kiselina, koja je veoma važan biohemijski intermedijer, lako se dobija oksidacijom antranilne kiseline natrijum- ili kalijum-perokso-sulfatom, pri čemu nastaje sulfatni estar proizvoda, koji odmah hidrolizuje do slobodne hidrosikiseline (slika 3.2.13) (Boylard i Sims, 1954).

Postoji mnogo primera *N*-oksidacije antranilne kiseline do odgovarajuće 2-nitrobenzo-eve kiseline, mada one nisu od većeg praktičnog značaja, s obzirom na to da je nitro jedinjenja lakše dobiti nitrovanjem. Jedan od načina na koji se antranilna kiselina može kvantitativno oksidovati do 2-nitrobenzo-eve kiseline je upotrebom superoksidnih radikala, koji nastaju iz vodonik-peroksida na čvrstom titanijumovom katalizatoru (Dewkar *et al*, 2001). Sintetički značajnija oksidacija do 2-nitrozobenzo-eve kiseline (slika 3.2.14) izvodi se perokso-sirćetnom kiselinom (D'Ans i Kneip, 1915) ili perokso-monosumpornom (*Caro*-ovom) kiselinom (Bamberger i Elger, 1903). Oksidacijom antranilne kiseline natrijum-perboratom nastaje *N*-hidroksiantranilna kiselina (Bamberger i Pyman, 1909), koja se dalje, takođe, može oksidovati do 2-nitrozobenzo-eve kiseline (Karunakaran i Kamalam, 2002).



Slika 3.2.13. Sinteza 3-hidroksiantranilne kiseline

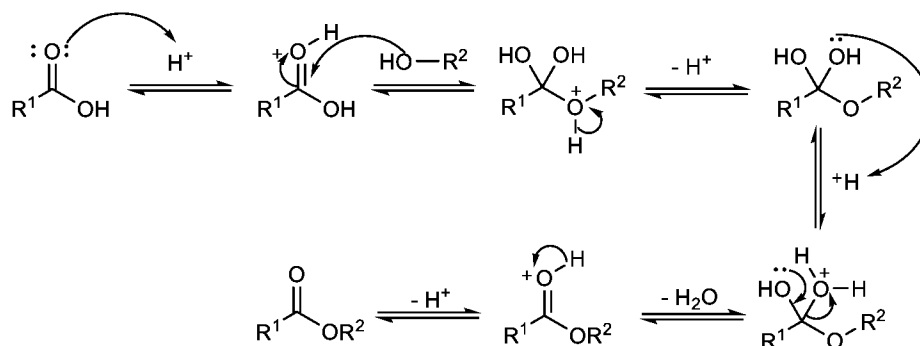


Slika 3.2.14. Struktura 2-nitrozobenzo-eve kiseline

Redukcija. Antranilna kiselina se može redukovati natrijum-amalgamom (Langguth, 1905) ili LiAlH_4 (Ardakani *et al*, 1983) do 2-aminofenilmetanola. Na sobnoj temperaturi, redukciju je moguće uspešno izvesti upotrebom samarijumovih soli (Kamochi i Kudo, 1993; Kamochi i Kudo, 1994a,b). Antranilatni estri se NaBH_4 (Asakawa *et al*, 1979) ili $\text{NaBH}_4/\text{ZnCl}_2$ (Yamakawa *et al*, 1991) mogu redukovati do odgovarajućih alkohola. Schultz i saradnici (1985) su izveli Birch-ovu redukciju derivata antranilne kiseline.

3.2.5. (Trans)Esterifikacija antranilne kiseline

Esterifikacija karboksilnih kiselina je ravnotežni proces koji se odvija u prisustvu kiselog katalizatora prema šemi predstavljenoj na slici 3.2.15. Ravnotežu je moguće pomeriti ka proizvodu reakcije, estru, viškom alkohola ili karboksilne kiseline ili odvođenjem vode iz reakcione smeše (npr. destilacijom ili izvođenjem reakcije u prisustvu dehidracionog sredstva (koncentrovane H_2SO_4 ili silika-gela).

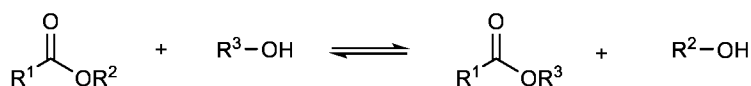


Slika 3.2.15. Jednačina reakcije kiselo-katalizovane esterifikacije

Alkil estri antranilne kiseline mogu se dobiti esterifikacijom ove kiseline odgovarajućim alkoholom, u prisustvu katalitičkih količina hlorovodonične ili sumporne kiseline (Anonymous, US Patent No 4135050, 1979). Međutim, upotreba i jednog i drugog kiselog katalizatora ima svoje nedostatke. U oba slučaja mora se upotrebiti najmanje jedan mol kiseline, pošto amino grupa antranilne kiseline sa hlorovodoničnom kiselinom daje hidrohlorid, a pri upotrebi sumporne kiseline gradi se alkil-sulfat odgovarajućeg estera. Estri se iz ovih amonijumovih soli mogu osloboditi dodatkom baze. Drugi nedostatak upotrebe kiselih katalizatora je to što obe

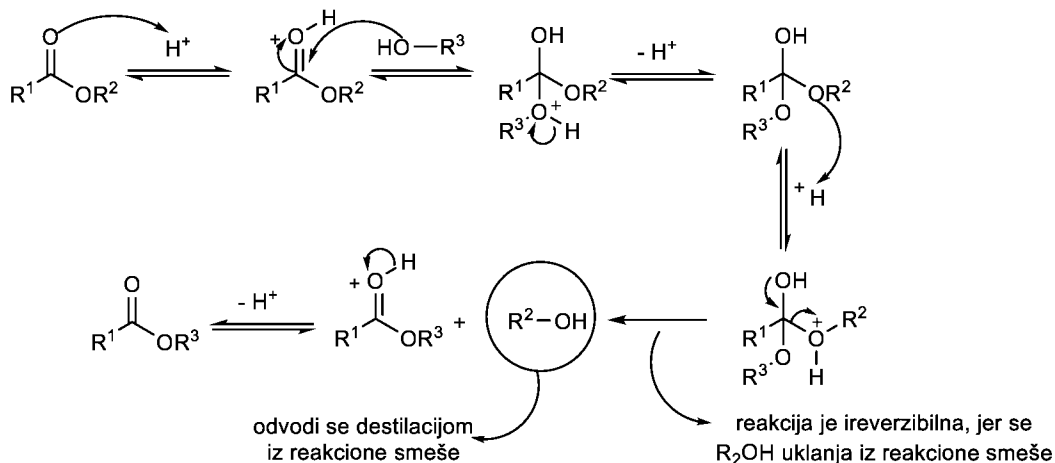
kiseline učestvuju u sporednoj reakciji sa alkoholom. Reakcijom hlorovodonične kiseline i alkohola nastaju alkil-hloridi, dok upotreba sumporne kiseline, vodi građenju dialkil-etara.

Drugi način za sintezu alkil-estara je kiselo- ili bazno-katalizovana reakcija nekog drugog estra sa odgovarajućim alkoholom - transesterifikacija (slika 3.2.16) i ona omogućava direktnu transformaciju jednog estra u drugi, bez nastajanja slobodne kiseline. Transesterifikacija je, kao i esterifikacija, ravnotežna reakcija, a ravnoteža se ka proizvodima može pomeriti na sličan način kao i kod esterifikacije, velikim viškom reaktanta ili odvođenjem produkta reakcije iz reakcione smeše (npr. destilacijom). Zato je reakcija od većeg praktičnog značaja samo ako se tačke ključanja estara i (ili) alkohola, reaktanta i proizvoda, dovoljno razlikuju. Međutim, prinosi transesterifikacije (u odnosu na polazni estar) gotovo nikada nisu kvantitativni.



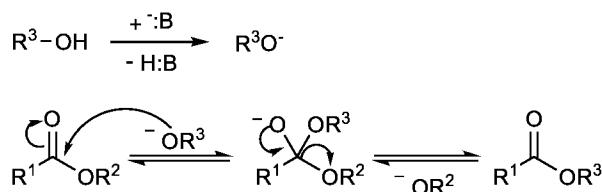
Slika 3.2.16. Jednačina reakcije transesterifikacije

Kiselo-katalizovana transesterifikacija započinje protonovanjem karbonilnog kiseonika, nakon čega sledi nukleofilni napad alkohola na karbonilni ugljenik (slika 3.2.17). Nedostaci kiselo-katalizovane transesterifikacije su isti, kao i nedostaci kiselo-katalizovane esterifikacije, o čemu je već bilo reči.



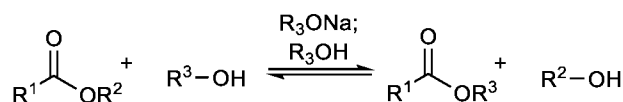
Slika 3.2.17. Šematski prikaz mehanizma reakcije kiselo-katalizovane transesterifikacije

Kod bazno-katalizovane transesterifikacije prvo se deprotonuje alkohol, a zatim dobijeni alkoksid nukleofilno napada ugljenikov atom estarske grupe (slika 3.2.18).



Slika 3.2.18. Koraci mehanizma bazno-katalizovane transesterifikacije

Transesterifikacija se može vršiti alkoholnim rastvorom natrijum- ili kalijum-alkoksida (slika 3.2.19). Mehanizam ove reakcije potpuno je analogan mehanizmu bazne hidrolize estara, a to je nukleofilna, bimolekulska, karbonilna supstitucija, kod koje dolazi do raskidanja *O*-acil veze. Jedina razlika u odnosu na uvek povoljniju saponifikaciju, koja vodi ka termodinamički stabilnijim solima, je u tome što transesterifikacija može da ima praktičan značaj (u molskim odnosima 1:1) jedino kada se R^2OH i R^3OH znatno razlikuju po kiselosti, npr. fenoli i alifatični alkoholi.



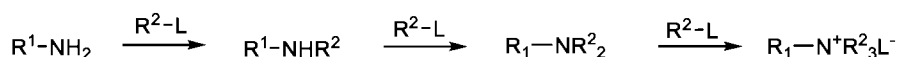
Slika 3.2.19. Jednačina reakcije transesterifikacije pomoću alkoholnog rastvora alkoksida

Alkil-antranilati se najčešće dobijaju transesterifikacijom estara antranilne kiseline (po pravilu metil-antranilata), odgovarajućim alkoholom, koji mora da ima višu tačku ključanja od alkohola, koji gradi polazni estar (od metanola u slučaju metil-antranilata) (Anonymous, US Patent No 4135050, 1979). Prilikom transesterifikacije metil-estara antranilne kiseline višim alkoholima (C_2 do C_5) uz natrijum-metoksid (MeONa) kao katalizator dolazi do građenja diantranilida i, u manjoj meri, viših kondenzacionih proizvoda, nastalih intramolekulskom kondenzacijom antranilatnih estara. Alkil estri antranilne kiseline se dobijaju u prinosu od oko 73 do 82%. Ukoliko startni materijal sadrži vodu, makar i u tragovima, prinos se znatno smanjuje. Alkohol koji učestvuje u reakciji transesterifikacije treba upotrebiti u velikom višku (4 do 7 molova po molu estra).

Nedostaci transesterifikacije katalizovane alkoksidom se u nekim slučajevima mogu izbeći upotrebom K_2CO_3 , kao baznog katalizatora (do sada je potvrđeno samo na *n*-alkoholima). Upotrebom ovog katalizatora, transesterifikaciju je moguće vršiti i mnogo manjom količinom alkohola, bez bojazni da će doći do građenja kondenzacionih proizvoda. Viši alkil estri antranilne kiseline se dobijaju u dobrom prinosu. K_2CO_3 pokazuje iznenađujuće dobru katalitičku aktivnost, dok ni Li_2CO_3 , ni Na_2CO_3 nisu dovoljno aktivni u ovom smislu. Estri antranilne kiseline i sekundarnih ili tercijarnih alkohola do sada nisu dobijani na ovaj način.

3.2.6. Alkilovanje antranilne kiseline

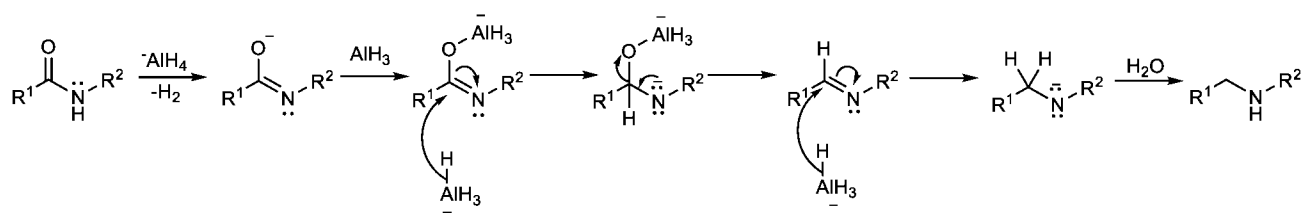
Direktnim alkilovanjem antranilne kiseline, nukleofilnom supstitucijom alkil-L supstrata (gde je L neka dobra odlazeća grupa – engl. *leaving group*), kao što je i slučaj sa direktnim alkilovanjem većine amina, dobija se smeša mono- i disupstituisane antranilne kiseline i kvaternarne amonijum soli (slika 3.2.20), jer je proizvod svakog sledećeg stupnja alkilovanja nukleofilniji od startnog materijala.



Slika 3.2.20. Direktno alkilovanje amina nukleofilnom supstitucijom alkil-L

Problem hemoselektivnosti alkilovanja amina, a time i antranilne kiseline, može se rešiti primenom indirektno strategije, kod koje se umesto alkil-L, koriste elektrofilni, koji daju manje nukleofilan proizvod od startnog materijala, npr. acil-halogenidi, aldehidi ili ketoni. Proizvodi koji bi nastali, amidi u slučaju acil-halogenida, odnosno imini, kada bi se kao elektrofilni koristili aldehidi i ketoni, mogli bi da se redukuju u amine. Ovakav, indirektno, postupak alkilovanja amina, naziva se reduktivno alkilovanje. Pri tom se amid pre redukcije izoluje, dok se redukcija imina može vršiti nakon njegovog izolovanja ili *in situ*.

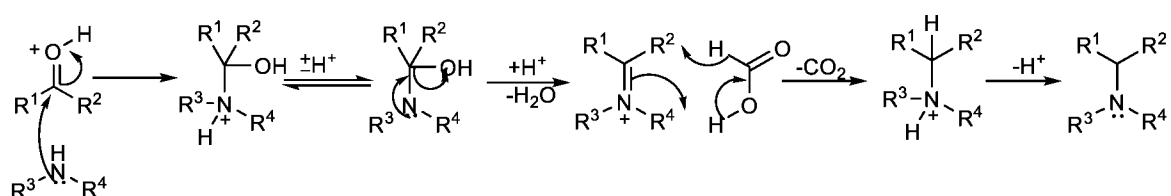
Amidi karboksilnih kiselina, koji nastaju u reakciji acil-halogenida sa aminima, se mogu redukovati u alkil-amine pomoću $LiAlH_4$, borana (npr. BH_3 u THF) ili katalitičkom hidrogenizacijom (slika 3.2.21).



Slika 3.2.21. Redukcija amida pomoću LiAlH₄

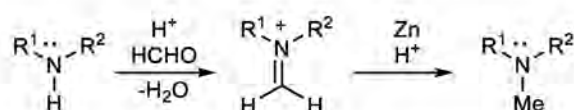
Ako se kao elektrofilni koriste aldehidi ili ketoni, prvi korak reduktivnog alkolovanja je kondenzacija amina sa karbonilnim jedinjenjem u imin, koji može da se izoluje, a zatim redukuje hidridnim reagensima ili hidrogenizacijom. Kako je većinu imina teško izolovati, zbog njihove nestabilnosti, reduktivno alkilovanje se češće vrši *in situ*, npr. mravljom kiselinom, NaBH₃CN u kiseloj sredini, pomoću reaktivnih metala ili katalitičkom hidrogenizacijom.

Reduktivno alkilovanje amina pomoću aldehida ili ketona i mravlje kiseline, odnosno amonijum-formijata, kao redukcionog sredstva, naziva se *Leuckart-Wallache-a* reakcijom. Pretpostavlja se da se redukcija imina mravljom kiselinom odvija se preko cikličnog prelaznog stanja, uz izdvajanje ugljen-dioksida (slika 3.2.22). Specijalan slučaj *Leuckart-Wallache-ove* reakcije je *Eschweiler-Clarke-ova* reakcija, koja podrazumeva isključivo reduktivno metilovanje amina pomoću formaldehida i mravlje kiseline (Li i Corey, 2007).



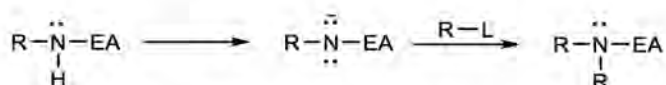
Slika 3.2.22. *Leuckart-Wallach-ova* reakcija

Kao redukciono sredstvo mogu se, umesto skupih i toksičnih borhidridnih reagenasa, koristiti i reaktivni metali, npr. cink u vodenom rastvoru kiseline (da Silva *et al*, 2007) (slika 3.2.23). Vodeni rastvor kiseline, pored toga što rastvara sve učesnike reakcije i katalizuje reverzibilno građenje iminijum jona, izvor je protona. Najbolji rezultati se postižu upotrebom vodenog rastvora sirćetne kiseline, kojim se, sa jedne strane, omogućava dovoljna reaktivnost pri transferu elektrona, a sa druge, izbegava nepotrebno trošenje metala usled izdvajanja vodonika. Građenjem iminijum jona se, kao i u prethodnom slučaju, omogućuje selektivna redukcija. U prisustvu viška reagenasa, u kiseloj sredini, monoalkil proizvodi podležu dialkilovanju. Što je amino grupa startnog materijala sterno zaklonjenija, vreme odigravanja reakcije je duže.



Slika 3.2.23. Redukcija *in situ* generisanog iminijum katjona cinkom

Jedno od mogućih rešenja problema hemoselektivnosti je blokiranje amina, supstitucijom jednog ili dva vodonikova atoma nekom elektron-akceptorskom grupom (EA), nakon čega sledi alkilovanje konjugovane baze pomoću alkil-L (slika 3.2.24). Konjugovana baza amina, za koju je vezana elektron-akceptorska grupa, nukleofilnija je od proizvoda reakcije.

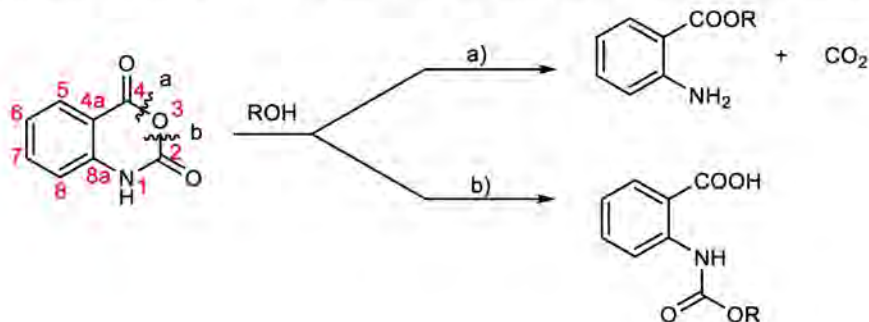


Slika 3.2.24. Alkilovanje blokiranog amina

3.2.7. Dobijanje *N*-alkilovanih derivata antranilne kiseline

U slučaju amino grupe antranilne kiseline, veoma pogodan reagens za konsekutivno *N*-alkilovanje i esterifikaciju je anhidrid izatoinske kiseline (Staiger i Miller, 1959), koji se, na primer, može dobiti *Hofmann*-ovim premeštanjem ftalimida, ili kondenzacijom antranilne kiseline i fozgena. Anhidrid izatoinske kiseline je blokirani derivat antranilne kiseline i on se najpre *N*-alkiluje u prisustvu nenukleofilne baze. Nakon toga, dodatkom alkohola dolazi do otvaranja prstena anhidrida izatoinske kiseline, pri čemu se gradi *N*-alkilovani estar antranilne kiseline i odgovarajućeg alkohola i izdvaja se ugljen-dioksid.

Postoje dva načina za raskidanje anhidridnog prstena izatoinske kiseline (slika 3.2.25).



Slika 3.2.25. Dva moguća načina za reakciju anhidrida izatoinske kiseline sa ROH:

a) nukleofilni napad alkohola na C(4), b) nukleofilni napad alkohola na C(2)

Regioselektivnost raskidanja anhidridnog prstena zavisi od prirode, voluminoznosti i koncentracije alkohola. Većina reakcija primarnih alkohola vodi ka građenju estara antranilne kiseline (Heindel *et al*, 1968) (slika 3.2.25 – a), voluminozni tercijarni alkoholi daju karbamat (Teeter, 1966) (slika 3.2.25 – b), dok sekundarni alifatični alkoholi, kakav je izopropanol, reaguju otežano i daju oba proizvoda, izopropil-antranilat i izopropil-*N*-*o*-karboksifenilkarbamat (Heindel *et al*, 1968). Kompetitivnom reakcijom anhidrida izatoinske kiseline sa samim sobom, u prisustvu čak i tragova vode, nastaje antraniloil-antranilna kiselina, kao sporedan proizvod (Teeter, 1966). Zato je pri izvođenju ove reakcije neophodno koristiti anhidrovani alkohol. Reakcija esterifikacije se odvija zagrevanjem alkohola i anhidrida izatoinske kiseline. Dodatkom katalitičkih količina NaOH, NaOEt, KOH, (CH₃)₃N ili Na₂CO₃, reakciju je moguće izvesti na znatno nižoj temperaturi, uz visoke prinose.

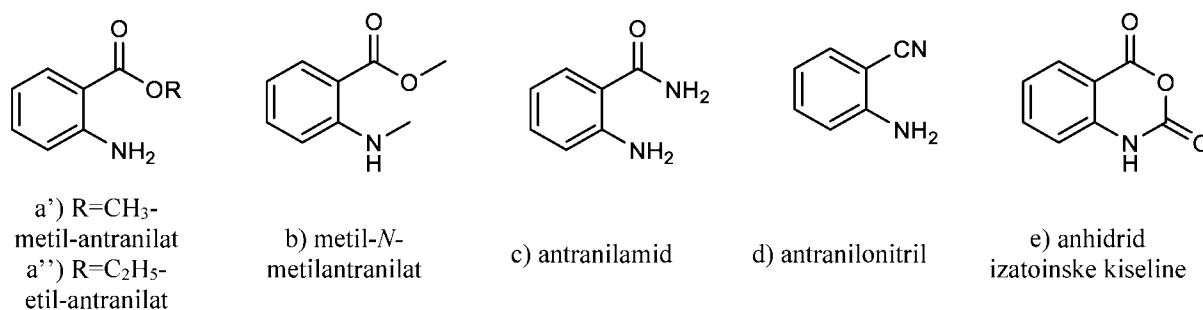
Anhidrid *N*-metilizatoinske kiseline sa alkoholima daje estre, međutim reakcija je otežana. Reakcija se odvija isključivo nukleofilnim napadom alkohola na C(4) anhidridne funkcije (slika 3.2.25 – b), čak i u slučaju izopropanola, tako da prisustvo karbamata u reakcionoj smeši nije zabeleženo. Ovo se objašnjava time da u slučaju anhidrida izatoinske kiseline, voluminozniji alkoholi (sekundarni i tercijarni) napadaju C(2) anhidridnog prstena, jer je on sterno manje zaklonjen. Međutim, ako je N-atom anhidrida izatoinske kiseline alkilovan, sterne smetnje su veće na C(2), pa je favorizovan nukleofilni napad na C(4).

3.2.8. Derivati antranilne kiseline

Metil-antranilat (slika 3.2.26 – a'), estar antranilne kiseline, veoma je važan sastojak parfema, a takođe se koristi i kao aroma za bezalkoholna pića. Metil- i etil-antranilati (slika 3.2.26 – a'') su jedni od nosilaca karakterističnog mirisa vina, kao što je *Pinot noir* iz Burgundije (Moio i Etievant, 1995). Količina metil-antranilata u grožđu raste sa sazrevanjem (Shure i Acree', 1994). Njegova godišnja proizvodnja se procenjuje na preko 1000 tona (Yadav i Krishnan, 1998). Metil-antranilat je jedan od karakterističnih sastojaka citrusnih ulja (Jabalpurwala *et al*, 2009). Kako ovo jedinjenje kod ptica prouzrokuje hemosenzornu iritaciju, našao je primenu kao repelent za ptice i koristi se ne samo u zaštiti useva (Curtis *et al*, 1994; Avery *et al*, 2001), već i u sprečavanju nesreća prouzrokovanih udarom aviona u ptice (Engeman *et al*, 2002).

Metil-*N*-metilantranilat (slika 3.2.26 – b) je hemotaksonomski marker etarskog ulja mandarine (*Citrus recutita*), a izotopski ^{14}N – ^{15}N odnosi se koriste pri kontroli autentičnosti ovog etarskog ulja i njegovog porekla (Faulhaber *et al*, 1997). Utvrđeno je da je on nosilac arome ulja kore mandarine i ukusa soka od mandarine (Wilson i Shaw, 1981; Fanciullino *et al*, 2006). Deluje privlačno na meksičku voćnu mušicu (*Anastrepha ludens*) (Massa *et al*, 2008) i tripse (*Thrips coloratus*) (Imai *et al*, 2001), a odbojno na neke vrste ptica, npr. na vrstu obični čvorak (*Sturnus vulgaris*) (Clark *et al*, 1991) i neke druge vrste (Schafer *et al*, 1983).

Primarni amid antranilne kiseline, antranilamid (slika 3.2.26 – c), komercijalno je dostupan i koristi se kao startni materijal u brojnim sintezama farmaceutskih i prirodnih proizvoda. Odgovarajući nitril, antranilonitril (2-aminobenzonitril) (slika 3.2.26 – d), industrijski se može dobiti reakcijom 2-nitrotoluena i amonijaka, u gasnoj fazi, uz silika gel kao katalizator (Bakke *et al*, 1972). Postoje različiti postupci za sintezu anhidrida izatoinske kiseline (2*H*-3,1-benzoksazin-2,4(1*H*)-dion) (slika 3.2.26 – e), npr. kondenzacijom antranilne kiseline i fozgena, ili Hofmann-ovim premeštanjem ftalimida. Ovaj anhidrid je koristan startni materijal u različitim sintezama, u kojima su potrebni derivati antranilne kiseline. Postoji više revijalnih radova o sintetskoj upotrebi anhidrida izatoinske kiseline (Coppola, 1980; Kappe i Stadlbauer, 1981; Shvekhgeimer, 2001).



Slika 3.2.26. Strukture nekih derivata antranilne kiseline

3.3. HEMIJSKI I BIOLOŠKI ZNAČAJ *N*-NITROZO JEDINJENJA

Iako prvi rad o nitrozaminima, ili preciznije *N*-nitrozo jedinjenjima, datira još iz 1863. godine (Geuther, 1863), ova klasa jedinjenja nije privlačila pažnju hemičara gotovo čitav vek. Otkriće da su *N*-nitrozo jedinjenja toksična (pre svega kancerogena), dovelo ih je u žižu naučne javnosti i krenulo se sa ispitivanjem njihove sinteze, hemijskih, fizičkih i bioloških osobina (Scanlan i Tannenbaum, 1981; Mirvish, 1995; Eichholzer i Gutzwiller, 1998; Loh et al, 2011; WHO, 1978; Lijinsky, 1992). Samo se mali broj *N*-nitrozo jedinjenja javlja u prirodi (Lijinsky, 1992), dok najveći broj njih nastaje nitrozovanjem sekundarnih amina (Ridd, 1961). Ona mogu da nastanu *in vitro*, u hrani, duvanskom dimu, životnoj sredini, ili *in vivo* (npr. u stomaku), simultanim unošenjem u organizam nitrozujućih agenasa i supstanci koje podležu nitrozovanju (WHO, 1978; Lijinsky, 1992; Mirvish, 1975).

N-nitrozo jedinjenja male molekulske mase (koja sadrže tri ili manje ugljenikovih atoma) su rastvorna u vodi, dok je većina njih rastvorna u organskim rastvaračima. I sama *N*-nitrozo jedinjenja su u prošlosti korišćena kao rastvarači (Lijinsky, 1992). Ona imaju visok particioni koeficijent u sistemu organski rastvarač – voda, pa se njihova liposolubilnost često povezuje sa njihovom kancerogenom aktivnošću u određenim organima (Singer *et al*, 1977).

Što se tiče hemijskih osobina *N*-nitrozo jedinjenja, ona su dobri alkilujućí agensi; podležu raskidanju N-N veze pri čemu nastaje odgovarajućí amin i NO; njihovom redukcijom nastaju disupstituisani hidrazini, a oksidacijom nitramini (Lijinsky, 1992; Patai, 1996; Loeppky i Michejda, 1994). Izlaganjem rastvora nitrozamina vidljivoj svetlosti, nitrozamin se razlaže do amina i nitrita. *N*-nitrozo jedinjenja su stabilna na sobnoj temperaturi, dok se na temperaturama iznad 200 °C razlažu uz oslobađanje NO (Lijinsky, 1992).

3.4. PRIRODNI PROIZVODI KAO POTENCIJALNI TERAPEUTICI ZA TRETMAN RAZLIČITIH DISFUNKCIJA SISTEMA I ORGANA

3.4.1. Prirodni proizvodi kao antinociceptivni agensi

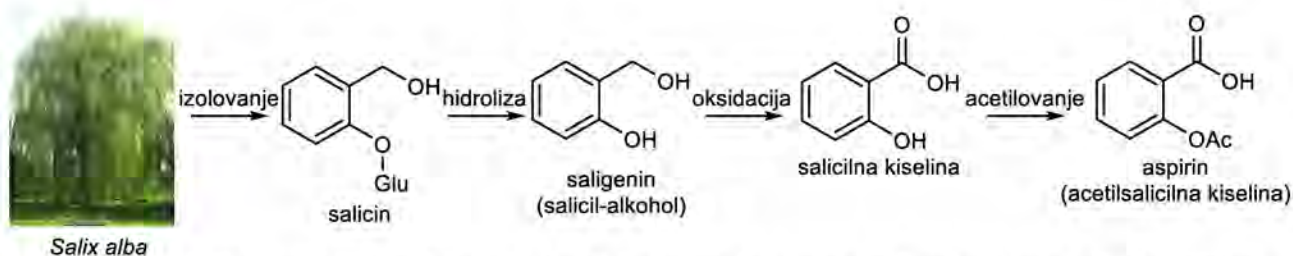
Prema Međunarodnoj asocijaciji za proučavanje bola (*International Association for the Study of Pain*), bol se definiše kao neprijatno čulno i emocionalno iskustvo povezano sa pravom ili potencijalnom povredom tkiva, ili uzrokovano tim oštećenjem ili povredom (Merskey i Bogduk, 1994). S druge strane, nocicepcija se definiše kao nervni proces registrovanja i procesuiranja bolnog stimulusa (Loeser i Treede, 2008), kojim se prenose somatske informacije o upali, povredi ili potencijalnoj povredi tkiva, prema kičmenoj moždini i mozgu bez prisustva svesti, dok je bol percepcija čulne informacije. Bol istovremeno može biti dopuna nocicepciji, ali se može javiti i bez nocicepcije (Radulović *et al*, 2013a).

Prema mehanizmu nastanka razlikuju se tri različita tipa bola: nociceptivni (fiziološki), inflamatorni i neuropatski bol (Radulović *et al*, 2013a). Nociceptivni bol je posledica aktivacije receptora za bol (nociceptora) i nastaje usled oštećenja kože i mekih tkiva (somatski) ili unutrašnjih organa (visceralni). Nastaje kao odgovor na termički, mehanički ili hemijski bolni stimulus (engl. *noxiousstimuli*) i smatra se delom normalnog funkcionisanja nociceptivnog sistema (nociceptori, tipovi vlakana, putevi u kičmenoj moždini i projekcije površine) (Giordano, 2005). Inflamatorni bol je posledica oštećenja tkiva ili inflamacije, izlaganja različitim hemikalijama ili autoimunih procesa (Marchand *et al*, 2005). U modelima inflamatorne boli kod životinja, ovaj bol se obično izaziva injektiranjem formalina, karagenana ili zimozana u zadnju šapu miša ili pacova (Radulović *et al*, 2013a). Neuropatski bol je posledica lezija ili disfunkcije perifernog (PNS) ili centralnog nervnog sistema (CNS), obično nastaje kao rezultat povrede perifernih nerava, ili kao posledica dijabetesa, infektivnih bolesti i izlaganja neurotoksičnim jedinjenjima (Jensen *et al*, 2011; Attal *et al*, 2008).

Uprkos značaju bola kao zaštitnog mehanizma organizma, čija je funkcija da organizam postane svestan opasnosti i reaguje kako bi uklonio bolni nadražaj, bol je glavni simptom mnogih bolesti (Niv i Kreitler, 2001) i predstavlja ozbiljan zdravstveni i ekonomski problem (Radulović *et al*, 2013a). Postoji nekoliko pristupa u terapiji bola, pri čemu se pacijentima najčešće prepisuju nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL), opiodi i drugi sintetski lekovi koji deluju na različite komponente perifernog i/ili centralnog nervnog sistema. Međutim, svi ovi

lekovi imaju i sporedne, neželjene efekte koji ograničavaju njihovu upotrebu, npr. NSAID dovode do oštećenja sluznice želuca, dok prilikom upotrebe opioida može doći do pojave zavisnosti od i tolerancije na opioide (Woodcock *et al*, 2007).

Danas grupe naučnika širom sveta rade na otkrivanju novih jedinjenja sa antinociceptivnim osobinama. Jedan od načina za dobijanje ovih jedinjenja je izolovanje aktivnih principa biljnih vrsta koje se u tradicionalnoj medicini mnogih naroda od davnina koriste kao analgetici (Cragg *et al*, 1997). Prirodne supstance izolovane iz biljaka odigrale su veoma značajnu ulogu u razvoju analgetika, kao i razumevanju složenih mehanizama prenosa i terapije bola (Yunes *et al*, 2005). Dobar primer za ovo je salicin, glikozid izolovan iz kore vrsta roda *Salix*. Veza između njegove aktivnosti i strukturnih osobina je bila ideja vodilja prilikom sinteze aspirina (slika 3.3.1). Utvrđeno je da veliki broj prirodnih proizvoda (alkaloida (npr. morfin izolovan iz maka (*Papaver somniferum* L.)), terpenoid-acetogenina (npr. tetrahidrokanabinol, izolovan iz biljnih vrsta roda *Cannabis*) i flavonoida (npr. rutin, izolovan iz biljnih vrsta porodice Rutaceae) (Calixto *et al*, 2000)) ispoljava antinociceptivne osobine što predstavlja osnovu za otkrivanje novih potencijalnih analgetika.



Slika 3.3.1. Veza sekundarnih metabolita vrste *Salix alba* sa komercijalnim analgetikom aspirinom (slika vrste *Salix alba* je preuzeta sa: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Salix_alba_%27Tristis%27_02_by_Line1.jpg)

3.4.2. Prirodni proizvodi kao terapeutici za lečenje poremećaja centralnog nervnog sistema

Anksioznost predstavlja psihološko i fiziološko stanje koje se karakteriše somatskim, emocionalnim, kognitivnim i bihevioralnim aspektima, a povezana je sa neprijatnim emocijama, strahom, brigom, nesigurnošću i nelagodnošću (Dobetsberger i Buchbauer, 2011). Napadi panike su uobičajeni simptomi anksioznosti, a bojazan od nastanka takvih napada može dovesti do razvoja raznih fobija (Carlson *et al*, 2009). Takođe, generalizovani anksiozni poremećaj može biti uzrok poremećaja spavanja (teškoće pri uspavlivanju ili spavanju, ili nemiran i

nezadovoljavajući san) (Bourne, 2010). Kod individua koje pate od ovog poremećaja povećan je rizik pojave somatskih, kardiovaskularnih, autoimunih i neurodegenerativnih oboljenja, kao i stopa mortaliteta, međutim veza između anksioznosti i somatskih oboljenja nije dovoljno istražena (Niles *et al*, 2015). Tokom proteklih dvadeset godina anksioznost je dostigla epidemijske razmere i veruje se da skoro četvrtina odrasle populacije pati od anksioznog poremećaja u nekom trenutku svog života (Matzo i Sherman, 2010; Bourne, 2010).

Kako veliki broj lekova koji se koriste za lečenje anksioznosti, depresije i insomnije, pokazuje niz neželjenih, sporednih efekata, kao što su tolerancija, zavisnost i mogućnost zloupotrebe (Schneider-Helmert, 1988; Carlini, 2003; Landaverde *et al*, 2009), u poslednje vreme se pribegava alternativnim metodama lečenja zasnovanim, između ostalog, na korišćenju prirodnih proizvoda (npr. medicinskog bilja). U više navrata je dokazano da pojedina etarska ulja ispoljavaju niz specifičnih dejstava na centralni nervni sistem (Bagetta *et al*, 2010): smanjuju anksioznost, ispoljavaju antidepresivno dejstvo i oslobađaju od stresa, pomažu pri relaksaciji, deluju smirujuće, pomažu osobama koje imaju probleme sa spavanjem, utiču na raspoloženje, ponašanje i percepciju (Dobetsberger i Buchbauer, 2011).

3.4.3. Prirodni proizvodi koji ispoljavaju hepato- i nefroprotektivno dejstvo

Ugljen-tetrahlorid (CCl₄) je sintetska industrijska hemikalija koja ispoljava izraženo hepato- i nefrotoksično dejstvo (Abraham *et al*, 1999). Pored oštećenja jetre i bubrega, CCl₄ može da dovede i do oštećenja pluća, testisa, mozga i krvi (Ahamad *et al*, 1987; Ozturk *et al*, 2003), pa se može iskoristiti za izazivanje oksidativnog stresa u različitim organima laboratorijskih životinja. Udisanje, ingestija, apsorpcija putem kože ili intraperitonealna (*i.p.*) injekcija ugljen-tetrahlorida mogu da izazovu nekrotična oštećenja ćelija i tkiva, usled čega dolazi do oslobađanja enzima u krvotok (Obi *et al*, 2001). Mehanizam dejstva ugljen-tetrahlorida se zasniva na propagaciji trihlormetil radikala ([•]CCl₃) koji nastaje biotransformacijom CCl₄ u jetri pod dejstvom mikrozomalnog citohroma P450 (Brent i Rumack, 1993). Trihlormetil radikali mogu da grade kovalentne veze sa makromolekulima i da ih oksiduju, nakon čega ovi mogu da grade adukte sa lipidima, proteinima ili nukleinskim kiselinama, pa dovode do oštećenja DNK u ćelijama različitih organa, predominantno jetre i bubrega, lipidne peroksidacije bioloških membrana i smanjenja antioksidantne sposobnosti tkiva (Rechnagel i Glende, 1973; Lee *et al*, 1982; Khan *et al*, 2010).

Kako bi se izborili sa slobodnim radikalima koji nastaju kao posledica oksidativnog stresa, organizmi su razvili enzimske i neenzimske antioksidantne sisteme za sprečavanje nastanka i „hvatanje“ reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV) (Chaudiere i Ferrari-Iliou, 1999). Reaktivne kiseonične vrste zauzimaju vrlo važno mesto u patogenezi hepato- i nefrotoksičnosti, što je potvrđeno brojnim eksperimentalnim modelima (Liu *et al*, 2013). Antioksidansi su veoma značajne supstance koje učestvuju u zaštiti tela od oštećenja uzrokovanih slobodnim radikalima, a antioksidantna sposobnost supstanci može poslužiti za razvoj lekova koji bi se koristili u sprečavanju ili lečenju bolesti koje su uzrokovane oksidativnim stresom. Danas se sve više radi na pronalaženju jakih, netoksičnih antioksidanasa prirodnog porekla (Gulcin *et al*, 2003; Oktay *et al*, 2003). Utvrđeno je da neki prirodni antioksidansi smanjuju oksidativni stres u bubrezima (Chavez-Morales *et al*, 2011; Fadhel *et al*, 2002).

3.4.4. Prirodni proizvodi kao terapeutici za sprečavanje nastanka i lečenje čira na želucu

Čir na želucu (ulcer, ulkus) je bolest gastrointestinalnog trakta od koje boluju milioni ljudi širom sveta (Klein-Junior *et al*, 2010) i predstavlja poremećaj strukture sluznice želuca i/ili duodenuma koji dovodi do pojave lokalnih defekata i ekskavacija usled inflamacije (Syam *et al*, 2009). Proces nastanka i razvoja čira na želudcu je veoma složen (Lemos *et al*, 2011), a najčešći uzročnici su nesteroidni antiinflamatorni lekovi, infekcije bakterijom *Helicobacter pylori*, stres (Syam *et al*, 2009) i prekomerno korišćenje alkohola. Tretman čira podrazumeva korišćenje različitih sintetskih lekova koji smanjuju količinu želudačne kiseline, štite tkivo sluznice koja oblaže želudac i gornjih delova tankog creva ili deluju protiv bakterije *H. pylori* (Awaad *et al*, 2013). Naučnici neprestano tragaju za efikasnijim, biljnim i/ili sintetskim, antiulceroznim lekovima koji bi simultano sprečili patogenezu ulcera i stimulisali gastroprotektivne faktore (Beserra *et al*, 2011; Singh *et al*, 2012). Iako se u tradicionalnoj medicini mnogih naroda od davnina koriste biljne vrste koje ispoljavaju antiulcer osobine (*Aloe vera*, *Ginkgo biloba*, zeleni čaj), biljni svet predstavlja bogat, ali nedovoljno istraženi, izvor antiulceroznih agenasa (Maity i Chattopadhyay, 2008; Awaad *et al*, 2013).

4. EKSPERIMENTALNI DEO

4.1. HEMIKALIJE I RASTVARAČI

Sve hemikalije korišćene u radu su bile *p.a.* čistoće i nabavljene su od kompanija *Acros Organics* (Nju Džerzi, SAD), *CarlRoth* (Karlzrue, Nemačka), *J.T. Baker* (Deventer, Holandija), *Merck* (Darmštat, Nemačka), *Richter Pharma AG* (Vels, Austrija), *Sigma-Aldrich* (Sent Luis, Mizuri, SAD), *Supelco* (Belfonte, SAD), *Centrohem* (Stara Pazova, Srbija), *Galenika* (Beograd, Srbija), *Hemofarm* (Vršac, Srbija), *Zorka* (Šabac, Srbija) i *Zdravlje* (Leskovac, Srbija). Rastvarači su predestilovani neposredno pre korišćenja, dok su ostale hemikalije upotrebljene bez prethodnog prečišćavanja.

4.2. METODE ANALIZE I RAZDVAJANJA

4.2.1. Nuklearno-magnetna rezonantna (NMR) spektroskopija

^1H - i ^{13}C - jedno-(1D) i dvodimenzionalni (2D) NMR spektri snimani su na 25 °C na *Varian Gemini 200 MHz NMR* (200 MHz za ^1H , a 50 MHz za ^{13}C NMR) i *Bruker Avance III 400 MHz NMR* (400 MHz za ^1H , a 100 MHz za ^{13}C NMR) spektrometrima. Kao rastvarači su korišćeni deuterisani hloroform (CDCl_3) i deuterisani dimetil-sulfoksid ($\text{DMSO-}d_6$), dok je tetrametilsilan (TMS, Me_4Si) korišćen kao unutrašnji standard. Hemijska pomeranja su data u δ (ppm) vrednostima u odnosu na TMS ($\delta_{\text{H}} = 0,00$ ppm) za ^1H NMR spektre ili u odnosu na CDCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7,26$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 77,16$ ppm) ili $\text{DMSO-}d_6$ ($\delta_{\text{H}} = 2,50$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 39,52$ ppm) za ^{13}C NMR i heteronuklearne 2D NMR spektre. Skalarna sprežanja (konstante kuplovanja - J) izražena su u Hz. 2D NMR spektri (^1H - ^1H COSY, NOESY, TOCSY, HSQC, HMBC i HETCOR), kao i DEPT90/135 spektri snimani su uz primenu uobičajenih pulsnih sekvenci. Dobijeni podaci su obrađeni u programu *MestReNova* (ver. 6.0.2-5475, *Mestrelab Research S.L.*, *Santiago de Compostela*, Španija). Predviđanja hemijskih pomeranja u ^1H - i ^{13}C - NMR spektrima izvršena su u programu *ChemBioDraw Ultra 13.0*, *CambridgeSoft*.

4.2.2. Ultraljubičasta spektrofotometrija (UV)

UV spektri (u acetonitrilu) snimani su na *UV-1800 Shimadzu* spektrofotometru (Tokio, Japan).

4.2.3. Infracrvena spektroskopija (FTIR)

FT infracrveni spektri (FT = *Fourier*-ova transformacija), *neat* (dijamantska igla), ATR - *Attenuated Total Reflectance*, snimani su na instrumentu *Thermo Nicolet 6700 FTIR* spektrometru (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Masačusec, SAD*).

4.2.4. Masena spektrometrija visoke rezolucije (HRMS)

Masena spektrometrija visoke rezolucije (HRMS – engl. *High-Resolution Mass Spectrometry*) sintetisanih jedinjenja je izvršena na *JEOL MStation JMS-700* masenom spektrometru (*JEOL Ltd., Tokio, Japan*) pri jonizacionoj energiji od 70 eV, jonskoj zamci od 300 μ A i temperaturi jonskog izvora od 230 °C. Perfluorkerozin je korišćen kao interni standard za tačno određivanje mase, a kalibracija je vršena automatski pomoću *MStation* softvera. Opseg masa je bio izabran tako da se pik koji potiče od nepoznatog jedinjenja nalazi između dva pika koji potiču od internog standarda. Analiza je vršena pri rezoluciji od 30,000 (10% tzv. „doline”) i brzini skeniranja od 60 s/dekada¹. Tačna masa je izračunata kao srednja vrednost 5 do 10 skeniranja, a svaka pojedinačna vrednost je određena kao centroida M^+ jona i ostalih jona. Greška dobijenog elementarnog sastava je data u mmu jedinicama i izračunata je od strane *MStation* softvera.

¹ Ova merna jedinica predstavlja broj sekundi koje su uređaju potrebne da skenira opseg masa koje se međusobno razlikuju za faktor 10 (na engleskom *decade of mass*) npr. od m/z 50 do m/z 500.

4.2.5. Gasna hromatografija (GC) i gasna hromatografija-masena spektrometrija (GC-MS)

4.2.5.1. Gasna hromatografija (GC) i gasna hromatografija-masena spektrometrija (GC-MS)

Gasno-hromatografska analiza etarskih ulja, ekstrakata, reakcionih smeša i sintetisanih jedinjenja izvršena je za svaki uzorak u triplikatu na *HP 6890N* gasnom hromatografu (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, Kalifornija, SAD), koji je bio direktno kuplovan sa *HP 5975B* masenim detektorom iste kompanije. Gasni hromatograf je bio opremljen kapilarnom kolonom *HP-5MS* ili *DB-5MS* (5% fenilmetilsiloksana, 30 m × 0,25 mm, debljina filma 0,25 µm; *Agilent Technologies*, Santa Klara, Kalifornija, SAD). Režim rada GC-MS bio je sledeći: temperature injektora i detektora su održavane na 250 °C i 320 °C; temperatura peći programirana je linearno od 70 do 315 °C brzinom od 5 °C/min, nakon toga je temperatura održavana 10 min na 315 °C; kao noseći gas korišćen je helijum, čiji je konstantni protok održavan na 1,0 ml/min; pulsno je injektirana zapremina od 1 µl rastvora uzorka u dietil-eteru ili drugom pogodnom rastvaraču (protok je bio 1,5 ml/min u prvih 30 sekundi, a onda je podešen na 1,0 ml/min), razblaženja 1/100 ili 10 mg na 1 ml rastvora; splitovana u odnosu 40:1). Jonizacija je vršena elektronima energije 70 eV. Pun sken masenog detektora beležen je u intervalu *m/z* 35-750 (brzina skeniranja 5 skenova u sekundi), a vreme skeniranja bilo je 0,32 sekunde. Obrada TIC (engl. *total ion current* –totalna jonska struja) hromatograma vršena je u programu *MestReNova* (ver. 6.0.2-5475, *Mestrelab Research S.L.*, *Santiago de Compostela*, Španija).

4.2.5.2. Identifikacija sastojaka

Podaci su obrađeni pomoću *MSD ChemStation* softvera (ver. D.03.00.611, *Agilent Technologies*, Santa Klara, Kalifornija, SAD) u kombinaciji sa programskim paketima *AMDIS Version 2.68* (engl. *Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*) i *NIST MS Search Version 2.0d* (engl. *National Institute of Standards and Technology* - Nacionalni institut za standarde i tehnologiju, Gejtersburg, Merilend, SAD). *AMDIS* je korišćen za dekonvoluciju masenog skena, tj. ekstrakciju masenih spektara iz skenova preklapljenih pikova, dok je *NIST MS Search* obezbedio algoritam za pretragu biblioteka masenih spektara.

Kvalitativna analiza etarskih ulja, etanolnog ekstrakta, reakcionih smeša i prečišćenih sintetisanih jedinjenja zasnovana je na:

1. poređenju linearnih retencionih indeksa pojedinih sastojaka, izračunatih u odnosu na retencionna vremena ko-injektiranih homologa serije *n*-alkana C₇-C₃₆ (Van den Dool i Kratz, 1963) sa literaturnim vrednostima (Adams, 2007; Eom *et al*, 2006; Vernon, 1973);
2. poređenju masenih spektara sa masenim spektrima standarda, kao i masenim spektrima iz biblioteka *Wiley Registry: Mass Spectral Library, 10th Edition / NIST 2014, MassFinder 2.3, Adams* (Adams, 2007) i MS biblioteke "OSA" (engl. *Organic Synthesis and Analysis*) istraživačke grupe Departmana za hemiju, PMF-a u Nišu;
3. analizi fragmentacionih šablona u masenim spektrima;
4. na korelaciji izračunatih tački ključanja za pretpostavljene strukture sa eksperimentalnim RI vrednostima;
5. ko-injektiranjem standarda, gde god je to bilo moguće.

Procentualni sastav ulja i reakcionih smeša je procenjivan integraljenjem površine pikova u hromatogramima bez korišćenja korekcionih faktora.

4.2.5.3. Gasna hromatografija sa plameno-jonizacionom detekcijom (GC-FID)

Gasna hromatografija sa plameno-jonizacionom detekcijom (GC-FID – engl. *Gas Chromatography with Flame Ionization Detector*) izvršena je na aparatu *Agilent 7890A*, koji je bio opremljen sa jednim injektorom, plameno-jonizujućim detektorom i HP-5MS (5% fenilmetilsiloksan, 30 m × 0,32 mm, debljina filma 0,25 mm, *Agilent Technologies*, Santa Klara, SAD). Radna temperatura injektora je bila 250 °C, dok je temperatura peći menjana linearno od 150 do 300 °C brzinom od 15 °C/min, nakon toga je održavana 5 min na 300 °C. Kao noseći gas korišćen je azot sa konstantnim protokom od 3 ml/min. Injektiran je 1 µl odgovarajućeg rastvora uzorka u *splitless* modu. Korišćeni su sledeći parametri FID detektora: temperatura grejača, 300 °C; protok H₂, 30 ml/min; protok vazduha, 400 ml/min; protok azota (tzv. *make up gas*), 23,5 ml/min; signal, 20 Hz.

4.2.6. Elementalna mikroanaliza

Elementalna mikroanaliza ugljenika, vodonika i azota je izvršena na *Carlo Erba 1106 microanalyzer* instrumentu i vrednosti sadržaja pomenutih elemenata za analizirana jedinjenja su se dobro slagale sa izračunatim vrednostima.

4.2.7. Tankoslojna hromatografija (TLC)

Tankoslojna hromatografija (TLC – engl. *Thin-Layer Chromatography*) vršena je na aluminijumskim pločama sa prethodno nanešenim slojem silika-gela 60 (Kieselgel 60 F254, debljina sloja 0,2 mm; *Merck*, Darmštat, Nemačka). Mrlje na TLC-u su vizualizovane pomoću UV svetlosti (254 nm) i izazivane su 30% (v/v) vodenim rastvorom H₂SO₄ ili 10% (w/v) etanolnim rastvorom fosfomolibdenske kiseline, nakon čega su pločice zagrevane.

4.2.8. *Dry flash* hromatografija

Za preparativno razdvajanje pomoću *dry flash* hromatografije korišćena je jednostavna aparatura koja se sastojala od kolone silika gela 20-45 µm (*Carl Roth GmbH + Co.KG*, Karlzrue, Nemačka) napakovane na sinterovanom staklenom levku srednje poroznosti i veličine, i standardne boce za vakuum filtraciju.

4.2.9. Hromatografija na koloni

Preparativno razdvajanje sastojaka urina izvršeno je pomoću gravitacione hromatografije na stubu (dužina 50 cm, prečnik 1,5 cm) *Sephadex*-a LH-20 (*Sigma-Aldrich*, Sent Luis, Mizuri, SAD). Kao eluent je korišćena smeša metanola i hloroforma u odnosu 1 : 1 (v/v).

4.2.10. Tečna hromatografija pri srednjim pritiscima (MPLC)

Preparativno razdvajanje pomoću MPLC-a (MPLC – engl. *Medium Pressure Liquid Chromatography*) je ostvareno na *Büchi*-jevom instrumentu, na prethodno napakovanoj koloni silika-gela 60 (>230 *mesh*-a, proizvođač *Büchi*, Flavil, Švajcarska), sa radnom pumpom istog proizvođača (*Module C-601*, *pump controler C-610*) pri protoku od 2,5 ml/min.

4.3. BILJNI MATERIJAL I PRIPREMA UZORAKA

4.3.1. Biljni materijal

Listovi biljne vrste *Choisya ternata* sakupljeni su 20. oktobra 2008. godine u botaničkoj bašti *Trinity* koledža (*Trinity College Botanical Gardens, Dartry, Dublin, Irska*) (broj pod kojim je jedinka zavedena u Botaničkoj bašti: 19850023). Uzorci su pohranjeni u herbarijumu *Trinity* koledža pod brojem SW 10-52.

4.3.2. Dobijanje etarskog ulja

Biljni materijal je podeljen na dva dela. Deo svežih listova je odmah nakon ubiranja hidrodestilovan po *Clevenger*-u tokom 2,5 h (etarsko ulje 1). Drugi deo je sušen nedelju dana na vazduhu, u tamnoj prostoriji, nakon čega je dobijeno etarsko ulje 2. Etarska ulja 1 i 2 su ekstrahovana dietil-etrom iz izoljenog vodenog sloja, a etarski ekstrakti su sušeni preko anhidrovanog MgSO₄. Posle odvajanja sredstva za sušenje filtracijom, etar je uklonjen destilacijom na rotacionom-vakuuum uparivaču (*Büchi Rotavapor, Büchi, Flavil, Švajcarska*), na sobnoj temperaturi, a etarska ulja 1 i 2 su analizirana odmah po izolovanju. Prinosi mirisnih ulja 1 i 2, su iznosili 0,08 i 0,1% (w/w, masa ulja/masa svežeg/suvog biljnog materijala).

4.3.3. Dobijanje etanolnog ekstrakta

Etanolni ekstrakt listova vrste *C. ternata* dobiven je maceracijom biljnog materijala sušenog na vazduhu etanolom (100 ml etanola po 1 g biljnog materijala) tokom tri dana na mračnom mestu. Dobijeni ekstrakt je uparen do suva pri sniženom pritisku, na sobnoj temperaturi.

4.4. OPIS SINTETIČKIH KORAKA

4.4.1. Optimizacija uslova sinteze izopropil- (IMA), metil- (MMA) i propil-*N*-metilantranilata (PMA)

4.4.1.1. Optimizacija uslova transesterifikacije metil-antranilata (MA)

Pod rednim brojevima od 1 do 7 navedeni su eksperimenti vršeni u cilju optimizacije reakcionih uslova transesterifikacije metil-antranilata (MA).

1. Smeša 1,51 g (10 mmol) metil-antranilata, izopropanola u velikom višku (40 ml) i 0,6 ml koncentrovane H₂SO₄ refluktovana je 10 sati. Nakon toga, smeša je neutralisana čvrstim NaHCO₃ i ekstrahovana etrom. Izopropanol je uklonjen destilacijom na rotacionom vakuum uparivaču (temperatura vodenog kupatila je iznosila 50 °C). U rezultujućoj reakcionoj smeši nisu detektovani, metodom GC-MS, čak ni tragovi željenog proizvoda. Utvrđeno je da se ona sastoji isključivo iz neizreagovanog metil-antranilata.

2. Napravljen je rastvor natrijum-izopropoksida rastvaranjem 2,30 g (100 mmol) fino usitnjenog natrijuma u 40 ml izopropanola. Natrijum je dodavan u malim porcijama, uz mešanje, a zatim je reakciona smeša zagrevana na 50 – 70 °C, dok se celokupna količina natrijuma nije rastvorila. Nakon toga, dodat je rastvor 1,51 g (10 mmol) metil-antranilata u 10 ml izopropanola. Reakciona smeša je refluktovana jedan sat, uz mešanje, a onda izlivena u malo vode i ekstrahovana etrom. Etarski ekstrakt sušen je anhidrovanim MgSO₄. Posle odvajanja sredstva za sušenje filtracijom, etar i izopropanol su uklonjeni destilacijom na rotacionom vakuum uparivaču, na sobnoj temperaturi, odnosno na 50 °C vodenog kupatila. Dobijeno je 54 mg proizvoda, koji je sadržao 60,0% izopropil-antranilata, dok su ostatak činili polikondenzacioni proizvodi metil-antranilata (GC-MS).

3. U rastvor natrijum-izopropoksida, koji je dobijen rastvaranjem 0,5 g (21,75 mmol) natrijuma u 40 ml izopropanola, na način opisan u postupku 4.4.1.1 - 2, dodat je rastvor 1,51 g (10 mmol) metil-antranilata u 10 ml izopropanola. Reakciona smeša je mešana 3 sata, na sobnoj

temperaturi, a onda je obrađena na način opisan u postupku 4.4.1.1 - 2. Dobijenih 1,36 g proizvoda se sastojalo iz 40,0% izopropil-antranilata i 60,0% metil-antranilata (GC-MS).

4. U reakcionu smešu dobijenu postupkom 4.4.1.1 – 3 dodata je nova porcija natrijum-izopropoksida (0,5 g natrijuma u 40 ml izopropanola) i ona je mešana 3 sata, na sobnoj temperaturi. Pri tom je na balon stavljena CaCl_2 cev, kako bi se izbegao kontakt sa vlagom iz vazduha. Reakciona smeša je zatim obrađena na način opisan u postupku 4.4.1.1 – 2. Dobijen je polučvrst proizvod mase 0,77 g, koji se sastojao iz 76,0% izopropil-antranilata i 24,0% metil-antranilata (GC-MS).

5. Postupak 4.4.1.1 – 3 (1 mol-ekvivalent metil-antranilata i 2,17 mol-ekvivalenta natrijum-izopropoksida) je ponovljen, s jedinom razlikom što je mešanje reakcione smeše na sobnoj temperaturi vršeno 6 sati. Dobijeno je 0,80 g proizvoda, koji se sastojao iz 71,0% izopropil-antranilata i 29,0% metil-antranilata (GC-MS).

6. Suv izopropanol pripremljen je refluktovanjem 250 ml komercijalnog izopropanola preko CaO , oko pola sata (Furnis, 1989). Zatim je izopropanol predestilovan u još topao balon, izvađen iz sušnice (na 200 °C). Destilatu je dodato 2 g natrijuma i refluktovan je dok se celokupna količina natrijuma nije rastvorila, nakon čega je izopropanol ponovo predestilovan, a prvih 10 ml destilata je odbačeno. Dobijeno je oko 100 ml suvog izopropanola.

U rastvor natrijum-izopropoksida, dobijen rastvaranjem natrijuma, u višku (oko 2 g), u 40 ml suvog izopropanola, na način opisan u postupku 4.4.1.1 - 2, dodat je rastvor 1,51 g (10 mmol) metil-antranilata u 10 ml suvog izopropanola. Reakciona smeša je refluktovana 30 minuta, a onda je izlivena na ustinjeni led. Nakon topljenja leda, ekstrahovana je etrom, a etarski ekstrakt je obrađen na način opisan u postupku 4.4.1.1 - 2. Dobijeno je 0,57 g proizvoda koji se sastojao iz oko 96,5% izopropil-antranilata, oko 3,5% metil-antranilata i antranilne kiseline u tragovima (GC-MS).

7. Uslovi su bili analogni onima u postupku 4.4.1.1 - 6, s razlikom što reakciona smeša nije refluktovana, već je mešana 2 sata, na sobnoj temperaturi. Uljasti proizvod (0,85 g) se sastojao iz 98,0% izopropil-antranilata i 2,0% metil-antranilata.

4.4.1.2. Optimizacija uslova N-metilovanja metil-antranilata

Pod rednim brojevima od 1 do 10 navedeni su eksperimenti vršeni u cilju optimizacije reakcionih uslova metilovanja metil-antranilata.

Nukleofilna supstitucija – reakcija metil-jodida i metil-antranilata

1. U smešu rastvora 0,84 g (10 mmol) NaHCO_3 u vodi i 1,51 g (10 mmol) metil-antranilata polako je dodavano 0,65 ml (10 mmol) metil-jodida, uz mešanje, na sobnoj temperaturi. Pošto je dodata celokupna količina metil-jodida, reakciona smeša je refluktovana, uz mešanje, 2 sata i 30 minuta. Nakon toga, reakciona smeša je razblažena vodom, a zatim ekstrahovana etrom. Etarski ekstrakt je sušen anhidrovanim MgSO_4 . Posle odvajanja sredstva za sušenje filtracijom, etar je uklonjen destilacijom na rotacionom vakuum uparivaču, na sobnoj temperaturi. Dobijen je 1,00 g blede-žute tečnosti koja je sadržala 32,0% smeše metil-*N*-metilantranilata (MMA) i metil-*N,N*-dimetantranilata, približno u odnosu 5:1. Preostalih 68,0% sastojalo se iz neizreagovanog metil-antranilata (GC-MS).

2. Uslovi su analogni onima u postupku 4.4.1.2 – 1, s tim što je korišćeno tri puta više NaHCO_3 (2,52 g) i metil-jodida (1,95 g). Dobijen je blede-žut tečni proizvod (1,12 g) koji se sastojao iz 41,0% metil-*N*-metilan-tranilata, 31,0% metil-*N,N*-dimetantranilata i 28,0% metil-antranilata (GC-MS).

Redukcija *in situ* generisanog imina pomoću NaBH_4

3. U balonu od 100 ml pomešano je 1,51 g (10 mmol) metil-antranilata i 0,86 g 35% rastvora formalina (15 mmol formaldehida), pri čemu se izdvojio beo talog, koji je mešan još pola sata. Nakon toga dodavan je NaBH_4 u velikom višku, postepeno, uz mešanje, na sobnoj temperaturi. Reakciona smeša je izlivena u malo vode i ekstrahovana etrom (5 puta). Etarski ekstrakt je obrađen na način opisan u postupku 4.4.1.2 - 1. Dobijeni su blede-žuti kristali mase 0,47 g. GC-MS analizom je utvrđeno da se reakciona smeša sastojala pretežno iz imina i amina metil-antranilata i formaldehida (metil-*N*-metilenantranilat i metil-*N*-(hidroksimetil)antranilat).

4. U rastvor 0,3 g paraformaldehida u 10 ml vode dodato je 1,51 g (10 mmol) metil-antranilata i jedna kap HCl (1:1, v/v), a zatim je reakciona smeša mešana 30 min na sobnoj temperaturi. Izdvojio se beli proizvod, koji je ceđenjem odvojen od viška rastvora paraformaldehida, a zatim je redukovan NaBH₄. Redukcija i obrada reakcione smeše su vršene na način opisan u postupku 4.4.1.2 - 3. Dobijeno je 0,79 g proizvoda. GC-MS analizom je utvrđeno da se reakciona smeša sastojala pretežno od imina i amina metil-antranilata i formaldehida.

5. Smeša 0,42 g proizvoda dobijenog reakcijom 4.4.1.2 – 4, koji je sadržao oko 2,32 mol metil-*N*-(hidroksimetil)antranilata (GC-MS), viška MgSO₄ (oko 1 g) i viška NaBH₄, u hloroformu, mešana je 4 sata, na sobnoj temperaturi. Nakon uništavanja NaBH₄ vodom i odvajanja hloroformskog sloja, vodeni sloj je ekstrahovan etrom, a spojeni organski slojevi su obrađeni na način opisan u postupku 4.4.1.2 – 1. Dobijeno je 0,38 g proizvoda koji je sadržao 39,0% metil-antranilata, 9,6% metil-*N*-metilantranilata, dok su ostatak činili amina metil-antranilata i formaldehida (metil-*N*-(hidroksimetil)antranilata) i polikondenzacioni proizvodi (GC-MS).

6. Smeša proizvoda dobijenog reakcijom 4.4.1.2 – 5 mase 0,38 g, 2 g silika-gela 60 i NaBH₄ u višku u etru mešana je 5 sati, na sobnoj temperaturi. Nakon uništavanja NaBH₄ vodom i odvajanja etarskog sloja, vodeni sloj je ekstrahovan etrom. Spojeni etarski slojevi su obrađeni na način opisan u postupku 4.4.1.2 – 1. GC-MS analizom je utvrđen sastav dobijenog proizvoda (0,19 g): 37,0% metil-*N*-metilantranilata, 29,0% metil-antranilata, a ostatak su činili amina metil-antranilata i formaldehida (metil-*N*-(hidroksimetil)antranilat) i polikondenzacioni proizvodi.

Građenje imina metil-antranilata i formaldehida

7. Smeša 9,00 g (0,06 mol) metil-antranilata i formalina u višku (20 ml) mešana je izvesno vreme, pri čemu se izdvojio beli talog. Talog je ekstrahovan etrom. Etarski ekstrakt je obrađen na način opisan u postupku 3.3.2 – 1. Belim kristalima, koji su zaostali nakon uparavanja etra, dodat je toluen i tri kapi koncentrovane H₂SO₄, nakon čega je vršena destilacija azeotropne smeše toluena i vode uz upotrebu nastavka po *Dean-Stark*-u. Dobijen je crvenkast, želatinozan proizvod mase 8,24 g, koji je preko noći iskristalisao (roze-narandžasti kristali). GC-

MS analizom utvrđeno je da se proizvod sastoji isključivo od amina metil-antranilata i formaldehida (metil-*N*-(hidroksimetil)antranilata).

Pokušaj blokiranja amino grupe metil-antranilata

8. Smeša 1,51 g (10 mmol) metil-antranilata, 1,06 g (10 mmol) benzaldehida i 3 kapi sirćetne kiseline, zagrevana je 9 sati na 100 °C. Reakciona smeša je izlivena u malo vode, a zatim ekstrahovana etrom. Etarski ekstrakt je obrađen na način opisan u postupku 4.4.1.2 – 1. Masa rezultujuće reakcione smeše bila je 1,36 g, međutim GC-MS analiza je pokazala da do reakcije nije došlo.

Redukcija *in situ* generisanog imina cinkom

9. Smeša 1,51 g (10 mmol) metil-antranilata, 2,40 g (40 mmol) sirćetne kiseline, 1,25 g 35% rastvora formalina (15 mmol formaldehida) i 1,31 g (20 mmol) cinka u prahu, u oko 20 ml dioksana, mešana je 5 sati na sobnoj temperaturi (da Silva *et al.*, 2007). Nakon toga, reakciona smeša je neutralisana amonijakom, izlivena u malo vode i ekstrahovana hloroformom. Hloroformski ekstrakt je sušen anhidrovanim MgSO₄. Posle odvajanja sredstva za sušenje filtracijom, hloroform je uklonjen destilacijom na rotacionom vakuum uparivaču. Dobijen je tečni proizvod (1,44 g) koji se sastojao iz 74,0% metil-*N*-metilantranilata, 15,0% metil-*N,N*-dimetantranilata i 7,0% metil-antranilata (GC-MS).

10. Uslovi su bili analogni uslovima u postupku 4.4.1.2 – 9, s razlikom što je korišćeno 0,92 g 35% rastvora formalina (11 mmol formaldehida), a reakciona smeša je mešana 4 sata, uz zagrevanje na 50 – 60 °C. Dobijeno je 1,55 g proizvoda, žućkaste, viskozne tečnosti, sledećeg sastava: 74,0% metil-*N*-metilantranilata, 9,0% metil-*N,N*-dimetantranilata i 10,0% metil-antranilata (GC-MS).

U cilju izolovanja čistog metil-*N*-metilantranilata, 0,77 g dobijene supstance rastvoreno je u heksanu i podvrgnuto je hromatografiji pod srednjim pritiskom (MPLC) na prethodno napakovanoj koloni silika-gela 60 (80 g) koja je uravnotežena u heksanu. Kolona je eluirana gradijentski sa po 100 ml rastvarača rastuće polarnosti, od čistog heksana do čistog etra. Eluiranje je započeto sa 100 ml heksana, a nastavljeno je sa po 100 ml rastvarača koji je sadržao

1, 5, 10, 20, 40 i 60% (v/v) etra u heksanu i na kraju sa 300 ml čistog etra. Protok u toku hromatografije je bio podešen na 2,5 ml u minuti. Sakupljano je po 100 ml eluata, za prve tri frakcije i po 30 do 40 ml eluata za ostalih 15. Spajanje frakcija je vršeno na osnovu izgleda TLC hromatograma, primenom mobilne faze dobijene mešanjem heksana i etra u odnosu 3:1 (v/v). Posle spajanja dobijeno je sedam frakcija.

Pool-ovana frakcija 1 (40 mg) bila je vrlo složena smeša. Frakcija 2 (0,33 g) je sadržala 99,0% metil-*N*-metilantranilata (GC-MS). Frakcija 3 (80 mg) je sadržala 88,0% metil-antranilata i 3,0% metil-*N,N*-dimetilan-tranilata (GC-MS). Frakcija 4 (70 mg) je sadržala 79,0% metil-antranilata, 8,0% metil-*N,N*-dimetilantranilata i 0,5% metil-*N*-formilantranilata (GC-MS). Frakcija 5 (30 mg) je sadržala 87,0% metil-*N,N*-dimetil antranilata i 9,0% metil-antranilata (GC-MS). Frakcija 6 (0,11g) je sadržala 51,0% metil-*N*-formilantranilata, 33,0% neidentifikovanog polikondenzacionog proizvoda (Rt 25,418 min) i 8,0% metil-antranilata (GC-MS). Frakcija 7 (40 mg) je sadržala 38,0% metil-*N*-formilantranilata, 31,0% metil-antranilata i 17,0% metil-*N*-karboksimetilantranilata (GC-MS). Ukupna masa *pool*-ovanih frakcija bila je 0,70 g. S obzirom na to da je hromatografisano 0,77 g smeše dobijene *N*-metilovanjem metil-antranilata (postupak 4.4.1.2 - 10), *recovery* je bio veoma dobar (90,9%).

4.4.1.3. *N*-metilovanje izopropil-antranilata

Reakciona smeša je sadržavala 0,34 g (1,9 mmol) izopropil-antranilata dobijenog u postupku 4.4.1.1 – 5, 0,46 g (7,6 mmol) sirćetne kiseline, 0,17 g 36% rastvora formalina (2,09 mmol formaldehida) i 0,25 g (3,8 mmol) cinka u prahu, u oko 20 ml dioksana, a uslovi reakcije su bili analogni uslovima opisanim u postupku 4.4.1.2 – 9. Dobijeno je 0,19 g žućkaste tečnosti. Sastav reakcione smeše bio je: 51,0% izopropil-*N*-metilantranilata (IMA), 0,5% izopropil-*N,N*-dimetilantranilata i 34,5% izopropil-antranilata (GC-MS).

4.4.1.4. Transesterifikacija metil-*N*-metilantranilata izopropoksidom

Rastvoru natrijum-izopropoksida, koji je dobijen rastvaranjem viška natrijuma (oko 2 g) u 40 ml suvog izopropanola, na način opisan u postupku 4.4.1.1 – 2 dodat je rastvor 1,44 g proizvoda reakcije 4.4.1.2 – 9 (oko 6,5 mmol metil-*N*-metilantranilata) u 10 ml suvog izopropanola. Reakciona smeša je mešana 20 minuta, uz zagrevanje do refluksa. Zatim je izlivena na usitnjeni led. Kada se led otopio, ekstrahovana je etrom, a etarski ekstrakt je obrađen

na način opisan u postupku 4.4.1.2 – 1. Dobijeni proizvod (1,00 g), bledo-žuta tečnost, sadržao je 63,0% izopropil-*N*-metilantranilata, 12,0% izopropil-antranilata, 6,0% metil-*N,N*-dimetantranilata, 5,0% izopropil-*N,N*-dimetantranilata i 2,5% metil-*N*-metilantranilata (GC-MS).

Rastvor 1,00 g dobijenog proizvoda u heksanu podvrgnut je hromatografiji na način opisan u postupku 4.4.1.2 - 10. Sakupljano je po 100 ml eluata, za prve tri frakcije, zatim po 50 ml za 4. i 5, 20 ml za 6. Pošto je frakcija 6 opalescirala, naredne frakcije su hvatane u 30 epruveta (po 10 ml), a zatim je poslednjih 6 frakcija skupljano po 50 do 100 ml. Spajanje frakcija je vršeno na osnovu izgleda TLC hromatograma. Posle spajanja dobijeno je 5 frakcija. *Pool*-ovana frakcija 1 (90 mg) je odbačena. Frakcija 2 (0,47 g) je analizirana pomoću GC-MS-a, pri čemu je utvrđeno da sadrži 97,0% izopropil-*N*-metilantranilata i 3,0% metil-*N*-metilantranilata. Snimljeni su i IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, HETCOR, ¹H-¹H COSY i NOESY spektri frakcije 2. Frakcija 3 (30 mg) je sadržala 82,0% izopropil-antranilata (GC-MS). Frakcija 4 (40 mg) je sadržala 35,0% izopropil-antranilata, 31,0% metil-*N*-metil-antranilata, 22,0% izopropil-*N,N*-dimetantranilata i 7,0% metil-antranilata. Frakcija 5 (30 mg) je sadržala 8,0% izopropil-antranilata, 6,0% metil-*N,N*-dimetantranilata, 3,0% izopropil-*N*-metilantranilata, 1,0% metil-antranilata i po 0,1% metil-*N*-metilantranilata i izopropil-*N,N*-dimetantranilata. Najveći deo frakcije 5 činili su polikondenzacioni proizvodi (GC-MS). Ukupna masa *pool*-ovanih frakcija je 0,66 g, a *recovery* 66,0%.

4.4.1.5. *Transesterifikacija metil-N-metilantranilata n-propoksidom*

Rastvoru natrijum-propoksida, koji je dobijen rastvaranjem viška natrijuma (oko 2 g) u 40 ml suvog propanola (propanol je sušen na način na koji je sušen izopropanol, postupak 4.4.1.1 – 6), dodat je rastvor 0,78 g proizvoda reakcije 4.4.1.2 – 10 u 10 ml suvog propanola (oko 3,5 mmol metil-*N*-metilantranilata). Reakciona smeša je mešana 10 minuta, uz zagrevanje do refluksa. Zatim je izlivena na usitnjeni led. Kada se led otopio, ekstrahovana je etrom, a etarski ekstrakt je obrađen na način opisan u postupku 4.4.1.2 – 1. Dobijeno je 0,55 g žućkastonaranđastog čvrstog proizvoda, sledećeg sastava: 73,0% propil-*N*-metilantranilata (PMA), 15,0% propil-antranilata, 9,0% propil-*N,N*-dimetantranilata i 0,4% metil-*N*-metilantranilata (GC-MS).

Dobijena supstanca (0,55 g) je rastvorena u heksanu podvrgnuta hromatografiji na način opisan u postupku 4.4.1.2 - 10. Posle spajanja, koje je vršeno na osnovu izgleda TLC

hromatograma, dobijeno je 5 frakcija. *Pool*-ovana frakcija 1 (80 mg) je odbačena. Frakcija 2 (0,29 g) je sadržala 99,0% propil-*N*-metilantranilata (GC-MS). Frakcija 3 (0,1 g) je sadržala 43,0% propil-antranilata, 35,0% propil-*N,N*-dimetilantranilata i 2,0% propil-*N*-metilantranilata (GC-MS). Frakcija 4 (20 mg) je sadržala 99,0% propil-antranilata (GC-MS). Frakcija 5 (20 mg) je sadržala 60,0% neidentifikovanog jedinjenja (Rt 19,355 min) i 16,0% propil-antranilata. Ukupna masa *pool*-ovanih frakcija je 0,51 g, a *recovery* 92,7%.

4.4.2. Sinteza metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata (NO-MMA)

Sinteza metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata (NO-MMA) je izvršena prema proceduri *Sakai*-ja sa saradnicima (1978). U rastvor 2,77 g (40 mmol) natrijum-nitrita u 10 ml vode je dodata smeša 3,31 g (20 mmol) metil-*N*-metilantranilata (MMA) i 3,32 ml 37% hlorovodonične kiseline (40 mmol) u 10 ml vode, polako, u kapima, uz mešanje na sobnoj temperaturi, nakon čega je reakciona smeša mešana još dodatnih 30 min. Kraj reakcije je određen na osnovu TLC analize. Reakciona smeša je ekstrahovana dietil-etrom, organski sloj je ispran rastvorom hlorovodonične kiseline (1%, w/w), vodom, rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata (2%, w/w), a zatim ponovo vodom. Organski sloj je nakon odvajanja osušen preko anhidrovanog magnezijum-sulfata, a rastvarač je uparen. Sirovi proizvod (2,67 g) je prečišćen izokraskom *dry flash* hromatografijom (kao eluent je korišćena smeša heksana i dietil-etra u zapreminskom odnosu heksan : dietil-etar = 2 : 1) nakon čega je dobijeno 2,00 g čistog metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata (52%).

4.4.3. Piroliza metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata

Metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilat (0,12 g, 0,62 mmol) je zatopljen u stakleni sud iz koga je uklonjen vazduh. Sud je zagrevan u uljanom kupatilu na 220 °C tokom 15 minuta. Sadržaj reakcionog suda je ekstrahovan hloroformom. Pirolizat (0,10 g), dobijen nakon uklanjanja rastvarača, podvrgnut je *dry flash* hromatografiji na silika gelu (20-45 μm) pri čemu je kao eluent korišćena smeša *n*-heksana i dietil-etra (v/v) rastuće polarnosti, nakon čega je dobijeno 7 frakcija (*pool*-ovanje frakcija je izvršeno na osnovu izgleda TLC hromatograma). Frakcije su analizirane metodama GC-MS i NMR.

4.4.4. Sinteza metil-*N*-benzoilantranilata

Metil-*N*-benzoilantranilat je sintetisan prema proceduri *Schneider*-a sa saradnicima (2013). Metil-antranilat (0,51 g, 3,38 mmol), benzoil hlorid (0,50 g, 3,56 mmol) i Et₃N (0,38 g, 3,71 mmol) su rastvoreni u oko 40 ml CH₂Cl₂. Reakciona smeša je mešana 4 sata, nakon čega je isprana 10% (v/v) HCl i NaHCO₃, osušena preko anhidrovanog MgSO₄, a rastvarač je uparen. Dobijeno je 0,77 g belog, čvrstog proizvoda (89%).

4.5. SPEKTRALNA KARAKTERIZACIJA

SINTETISANIH/IZOLOVANIH/DETEKTOVANIH JEDINJENJA

4.5.1. Spektralna karakterizacija proizvoda *N*-metilovanja antranilne kiseline

Metil-*N*-metilantranilat (metil-2-(metilamino)benzoat, MMA): $C_9H_{11}NO_2$; žućkasta tečnost; Rt, RI, IR, 1H - i ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, $DMSO-d_6$) su navedeni u tabelama 5.1 – 5.6; UV (CH_3CN) λ_{max} ($\log \epsilon$) 354 (3,73), 256 (3,89), 219 (4,32) nm; MS m/z (rel.int.): 165 $[M]^+$ (100%), 133 $[M-CH_3OH]^+$ (29,7%), 132 $[M-CH_3-H_2O]^+$ (54,4%), 105 $[M-CH_3OH-CO]^+$ (85,8%), 104 $[M-CH_3-H_2O-CO]^+$ (84,4%), 91 $[M-C_3H_6O_2]^+$ (10,0%), 77 $[M-C_3H_6O_2N]^+$ (47,9%); Izračunato za $C_9H_{11}NO_2$: C 65,44, H 6,71, N 8,48, O 19,37%; nađeno C 65,52, H 6,69, N 8,47, O 19,32%.

Metil-*N,N*-dimetantranilat (metil-2-(dimetilamino)benzoat): $C_{10}H_{13}NO_2$; Rt 14,445 min, RI (HP-5MS) 1406; MS m/z (rel.int.): 179 $[M]^+$ (64,0%), 164 $[M-CH_3]^+$ (100%), 148 $[M-CH_3O]^+$ (88,1%), 132 $[M-CH_3OH-CH_3]^+$ (97,1%), 91 $[M-C_4H_8O_2]^+$ (56,4%), 77 $[M-C_4H_8O_2N]^+$ (57,6%).

Metil-*N*-formilantranilat – Videti 4.5.5. Spektralna karakterizacija proizvoda pirolize metil-*N*-metil-*N*-nitrozantranilata.

Metil-*N*-metilenantranilat (metil-2-(metilenamino)benzoat): $C_9H_9NO_2$; Rt 13,372 min, RI (HP-5MS) 1363; MS m/z (rel.int.): 163 $[M]^+$ (30,3%), 148 $[M-CH_3]^+$ (100%), 132 $[M-CH_3O]^+$ (33,8%), 105 $[M-C_2H_2O_2]^+$ (40,9%), 77 $[M-C_3H_4O_2N]^+$ (57,1%).

Metil-*N*-(hidroksimetil)antranilat (metil-2-((hidroksimetil)amino)benzoat): $C_9H_{11}NO_3$; Rt ~ 15,15 min, RI (HP-5MS) 1435; MS m/z (rel.int.): 163 (22,9%), 151 (60,0%), 148 (75,6%), 132 (24,8%), 120 (34,3%), 119 (100%), 105 (33,0%), 92 (62,0%), 77 (45,6%), 65 (28,2%).

4.5.2. Spektralna karakterizacija proizvoda transesterifikacije metil-*N*-metilantranilata izopropoksidom

Izopropil-*N*-metilantranilat (izopropil-2-(metilamino)benzoat, IMA): C₁₁H₁₅NO₂; žućkasta tečnost; Rt, RI, IR, ¹H- i ¹³C-NMR (CDCl₃, DMSO-*d*₆) su navedeni u tabelama 5.1 – 5.6; MS *m/z* (rel.int.): 193 [M]⁺(53,8%), 151 [M – H₂C=CH-CH₃]⁺ (62,3%), 134 [M – (CH₃)₂CHO]⁺ (25,5%), 133 [M – H₂C=CH-CH₃ – H₂O]⁺ (37,3%), 132 [M – H₂C=CH-CH₃ – H₂O – H]⁺ (22,2%), 106 [M – COOCH(CH₃)₂]⁺ (17,4%), 105 [M – H₂C=CH-CH₃ – H₂O – CO]⁺ (100%), 104 [M – H₂C=CH-CH₃ – H₂O – CO – H]⁺ (57,6%), 77 [M – (CH₃)₂CHO – CH₂=NH – CO]⁺ (34,7%). Izračunato za C₁₁H₁₅NO₂: C 68,37, H 7,82, N 7,25, O 16,56%; nađeno C 68,30, H 7,85, N 7,19, O 16,66%.

Izopropil-*N,N*-dimetantranilat (izopropil-2-(dimetilamino)benzoat): C₁₂H₁₇NO₂; Rt 16,731 min, RI (HP-5MS) 1500; MS *m/z* (rel.int.): 207 [M]⁺(38,0%), 164 [M – (CH₃)₂CH]⁺ (100%), 148 [M – (CH₃)₂CHO]⁺ (56,1%), 133 [M – H₂C=CH-CH₃ – CH₃OH]⁺ (20,9%), 132 [M – H₂C=CH-CH₃ – CH₃OH – H]⁺ (58,0%), 118 [M – H₂C=CH-CH₃ – H₂O – CO – H]⁺ (42,7%), 105 [M – H₂C=CH-CH₃ – CH₃OH – CO]⁺ (18,9%), 104 [M – H₂C=CH-CH₃ – CH₃OH – CO – H]⁺ (21,4%), 77 [M – (CH₃)₂CHCOO – C₂H₅N]⁺ (28,9%).

Izopropil-antranilat (izopropil-2-aminobenzoat): C₁₀H₁₃NO₂; Rt 15,532 min, RI (HP-5MS) 1451; MS *m/z* (rel.int.): 179 [M]⁺ (30,2%), 137 [M – H₂C=CH-CH₃]⁺ (32,9%), 120 [M – (CH₃)₂CHO]⁺ (25,5%), 119 [M – (CH₃)₂CHOH]⁺ (100%), 92 [M – COOCH(CH₃)₂]⁺ (29,9%), 91 [M – (CH₃)₂CHOH – CO]⁺ (5,2%).

4.5.3. Spektralna karakterizacija proizvoda transesterifikacije metil-*N*-metilantranilata *n*-propoksidom

Propil-*N*-metilantranilat (propil-2-(metilamino)benzoat, PMA): C₁₁H₁₅NO₂; žućkasta tečnost; Rt, RI, IR, ¹H- i ¹³C-NMR (CDCl₃, DMSO-*d*₆) su navedeni u tabelama 5.1 – 5.6; MS *m/z* (rel.int.): 193 [M]⁺(83,3%), 151 [M – H₂C=CH-CH₃]⁺ (20,0%), 134 [M – C₃H₇O]⁺ (30,6%), 133 [M – H₂C=CH-CH₃ – H₂O]⁺ (39,0%), 132 [M – H₂C=CH-CH₃ – H₂O – H]⁺ (43,2%), 106

$[M - COOC_3H_7]^+$ (20,4%), 105 $[M - H_2C=CH-CH_3 - H_2O - CO]^+$ (100%), 104 $[M - H_2C=CH-CH_3 - H_2O - CO - H]^+$ (61,6%), 77 $[M - C_3H_7O - CH_2=NH - CO]^+$ (39,1%); Izračunato za $C_{11}H_{15}NO_2$: C 68,37, H 7,82, N 7,25, O 16,56%; nađeno: C 68,39, H 7,81, N 7,21, O 16,59%.

Propil-*N,N*-dimetilantranilat (propil-2-(dimetilamino)benzoat): $C_{12}H_{17}NO_2$; Rt 18,224 min, RI (HP-5MS) 1565; MS m/z (rel.int.): 207 $[M]^+$ (51,4%), 164 $[M - C_3H_7]^+$ (97,6%), 148 $[M - C_3H_7O]^+$ (100%), 133 $[M - H_2C=CH-CH_3 - CH_3OH]^+$ (21,3%), 132 $[M - H_2C=CH-CH_3 - CH_3OH - H]^+$ (70,4%), 118 $[M - H_2C=CH-CH_3 - H_2O - CO - H]^+$ (54,7%), 105 $[M - H_2C=CH-CH_3 - CH_3OH - CO]^+$ (29,1%), 104 $[M - H_2C=CH-CH_3 - CH_3OH - CO - H]^+$ (31,6%), 91 $[M - C_6H_{12}O_2]^+$ (51,3%), 77 $[M - C_3H_7COO - C_2H_5N]^+$ (41,5%).

Propil-antranilat (propil-2-aminobenzoat): $C_{10}H_{13}NO_2$; Rt 18,734 min, RI (HP-5MS) 1568; MS m/z (rel.int.): 179 $[M]^+$ (39,8%), 137 $[M - H_2C=CH-CH_3]^+$ (13,4%), 120 $[M - OC_3H_7]^+$ (29,4%), 119 $[M - C_3H_7OH]^+$ (100%), 92 $[M - COOC_3H_7]^+$ (29,9%), 91 $[M - C_3H_7OH - CO]^+$ (4,9%).

4.5.4. Spektralna karakterizacija metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata

Metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilat (metil-2-(metil(nitrozo)amino)benzoat, NO-MMA): $C_9H_{10}N_2O_3$; žuta tečnost; UV (CH_3CN) λ_{max} ($\log \epsilon$) 283 sh (4,59), 218 (5,20) nm; FTIR (čisto) ν_{max} 2952,4, 1720,7, 1601,0, 1495,6, 1432,9, 1395,4, 1293,3, 1264,1, 1192,1, 1116,7, 1066,9, 1040,9, 952,6, 762,1, 711,5, 702,7 cm^{-1} ; EIMS m/z (rel.int.): 194 $[M]^+$ (1,4%), 164 $[M - NO]^+$ (25,7%), 133 $[M - CH_3O - NO]^+$ (14,6%), 132 $[M - CH_3OH - NO]^+$ (100%), 105 $[M - COOCH_3 - NO]^+$ (19,5%), 104 $[M - CH_3OH - NO - CO]^+$ (18,5%), 77 $[M - C_3H_5N_2O_3]^+$ (38,8%); Izračunato za $C_9H_{10}N_2O_3$: C 55,67, H 5,19, N 14,43, O 24,72%; nađeno: C 55,70, H 5,22, N 14,39, O 24,69%; 1H - i ^{13}C -NMR podaci su navedeni u tabeli 5.8.

4.5.5. Spektralna karakterizacija proizvoda pirolize

metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata

Dimetil-2,2'-(1,2-dimetilhidrazin-1,2-diil)dibenzoat: $C_{18}H_{20}N_2O_4$; EIMS m/z (rel.int.): 328 $[M]^+$ (10,0), 165 $[M-C_9H_9NO_2]^+$ (63,9), 164 $[M-C_6H_4(NCH_3)COOCH_3]^+$ (18,2), 163 $[M-C_9H_{11}NO_2]^+$ (22,4), 148 $[M-C_9H_{11}NO_2-CH_3]^+$ (24,4), 133 $[M-C_9H_9NO_2-CH_3OH]^+$ (27,6), 132 $[M-C_9H_{10}NO_2-CH_3OH]^+$ (100,0), 118 $[M-C_{11}H_{16}NO_3]^+$ (10,3), 105 $[M-C_9H_9NO_2-CH_3OH-CO]^+$ (69,0), 104 $[M-C_9H_9NO_2-CH_3-H_2O-CO]^+$ (58,8), 91 $[M-C_{11}H_{13}N_2O_4]^+$ (12,55), 77 $[M-C_{12}H_{15}N_2O_4]^+$ (62,4).

Metil-5-metil-6-okso-(5*H*)-fenantridin-4-karboksilat: $C_{16}H_{13}NO_3$; žućkasta amorfna čvrsta supstanca; UV (CH_3CN) λ_{max} ($\log \epsilon$) 328 (4,58), 242 (5,19), 224 (5,18) nm; FTIR (čisto) ν_{max} 2920,8, 2849,9, 1722,5, 1651,8, 1608,0, 1584,9, 1513,6, 1431,0, 1325,6, 1293,1, 1254,3, 1144,1, 1104,8, 1060,6, 753,3, 722,7, 691,4 cm^{-1} ; Rt 36,941 min, RI (DB-5MS) 2570; EIMS m/z (rel.int.): 267 $[M]^+$ (100%), 252 $[M-CH_3]^+$ (25,1%), 236 $[M-OCH_3]^+$ (78,7%), 222 (94,0%), 208 $[M-COOCH_3]^+$ (40,6%), 206 (44,4%), 180 (20,7%), 179 (31,2%), 178 (48,0%), 164 (10,2%), 152 (37,8%), 151 (31,2%), 139 (11,8%), 117 (10,0%), 103 (12,6%), 90 (10,6%), 89 (11,6%), 76 (16,3%), 63 (5,9%), 51 (2,3%); Izračunato za $C_{16}H_{13}NO_3$: C 71,90, H 4,90, N 5,24, O 17,96%; nađeno: C 71,86, H 4,88, N 5,27, O 17,99%; 1H - i ^{13}C -NMR podaci su navedeni u tabeli 5.9. IR, 1H i ^{13}C NMR spektralni podaci se slažu sa literaturnim vrednostima (Han *et al*, 2014).

Metil-*N*-benzoilantranilat (metil-2-benzamidobenzoat): $C_9H_{10}N_2O_3$; bela amorfna čvrsta supstanca; UV (CH_3CN) λ_{max} ($\log \epsilon$) 314 (4,22), 267 (4,37), 234 (4,64), 212 (4,72) nm; FTIR (čisto) ν_{max} 3263,9, 2949,4, 1692,5, 1666,9, 1608,4, 1589,1, 1531,3, 1494,1, 1453,7, 1432,9, 1323,3, 1295,8, 1268,0, 1251,3, 1189,7, 1178,4, 1079,9, 965,8, 896,1, 766,7, 696,4, 664,6 cm^{-1} ; Rt 31,951 min, RI (DB-5MS) 2249; EIMS m/z (rel.int.): 255 $[M]^+$ (34,0), 224 $[M-CH_3O]^+$ (2,2), 196 $[M-COOCH_3]^+$ (6,1), 105 $[M-C_6H_4(NH)COOCH_3]^+$ (100,0), 90 (3,5), 77 $[M-C_9H_8NO_3]^+$ (38,8); Izračunato za $C_9H_{10}N_2O_3$: C 70,58, H 5,13, N 5,49, O 18,80%; nađeno: C 70,56, H 5,12, N 5,52, O 18,80%; 1H - i ^{13}C -NMR podaci su navedeni u tabeli 5.10. 1H i ^{13}C NMR spektralni podaci se slažu sa literaturnim vrednostima (Hinsberger *et al*, 2013).

Metil-*N*-formilantranilat (metil-2-(formamido)benzoat): $C_9H_9NO_3$; bela amorfna čvrsta supstanca; UV (CH_3CN) λ_{max} (log ϵ) 311 (4,34), 251 (4,77), 244 (4,78), 221 (5,01) nm; FTIR (čisto) ν_{max} 3320,1, 2950,0, 1685,4, 1586,1, 1516,2, 1435,0, 1292,0, 1259,5, 1193,3, 1127,3, 1082,4, 963,4, 755,5, 700,7 cm^{-1} ; Rt 18,307 min, RI (DB-5MS) 1568; EIMS m/z (rel.int.): 179 $[M]^+$ (25,9%), 151 $[M-CO]^+$ (58,9%), 148 $[M-CH_3O]^+$ (8,2%), 146 (10,8%), 120 $[M-COOCH_3]^+$ (21,2%), 119 $[M-CH_3O-CHO]^+$ (100%), 92 $[M-COOCH_3-CO]^+$ (39,8%), 90 (10,4%), 77 $[M-C_3H_4NO_3]^+$ (4,0%), 65 (16,2%); Izračunato za $C_9H_9NO_3$: C 60,33, H 5,06, N 7,82, O 26,79%; nađeno: C 60,37, H 5,04, N 7,84, O 26,75%; 1H - i ^{13}C -NMR podaci su navedeni u tabeli 5.10. 1H i ^{13}C NMR spektralni podaci se slažu sa literaturnim vrednostima (Chen *et al*, 2014). Iako je u NMR spektrima uočeno prisustvo dva rotamera, kao što su prethodno primetili Chen i saradnici (2014), ovde su navedeni podaci samo za jedan rotamer.

4.5.6. Spektralna karakterizacija metabolita izopropil-*N*-metilantranilata izolovanih iz urina pacova tretiranih ovim jedinjenjem

Izopropil-3-hidroksiantranilat (izopropil-2-amino-3-hidroksibenzoat, 3-HIA): $C_{10}H_{13}NO_3$; žućkasta tečnost; UV (CH_3CN) λ_{max} (log ϵ) 340 (4,47), 218 (5,18) nm; FTIR (čisto) ν_{max} 3371,6, 2918,5, 2849,7, 1682,6, 1550,2, 1489,5, 1464,1, 1372,7, 1283,5, 1235,2, 1097,3, 949,2, 746,3 cm^{-1} ; Rt 21,811 min, RI (HP-5MS) 1726; EIMS m/z (rel.int.): 195 $[M]^+$ (53,9%), 153 $[M-H_2C=CH-CH_3]^+$ (53,2%), 136 $[M-(CH_3)_2CHO]^+$ (34,7%), 135 $[H_2C=CH-CH_3-H_2O]^+$ (100%), 134 $[M-H_2C=CH-CH_3-H_2O-H]^+$ (9,8%), 108 $[M-COOCH(CH_3)_2]^+$ (12,4%), 107 $[M-H_2C=CH-CH_3-H_2O-CO]^+$ (79,2%), 106 (9,2%), 80 (11,6%); 52 (8,8%); Izračunato za $C_{10}H_{13}NO_3$: C 61,53, H 6,71, N 7,18, O 24,59%; nađeno: C 61,52, H 6,68, N 7,16, O 24,64%; 1H - i ^{13}C -NMR podaci su navedeni u tabeli 5.25.

Izopropil-5-hidroksiantranilat (izopropil-2-amino-5-hidroksibenzoat, 5-HIA): $C_{10}H_{13}NO_3$; žućkasta tečnost; UV (CH_3CN) λ_{max} (log ϵ) 340 (4,62), 218 (5,28) nm; FTIR (čisto) ν_{max} 3178,7, 2978,0, 1679,1, 1550,0, 1489,9, 1465,7, 1355,1, 1232,6, 1096,9, 1019,7, 948,0, 794,9, 746,1 cm^{-1} ; Rt 22,521 min, RI (HP-5MS) 1760; EIMS m/z (rel.int.): 195 $[M]^+$ (31,2%), 153 $[M-H_2C=CH-CH_3]^+$ (50,5%), 136 $[M-(CH_3)_2CHO]^+$ (23,4%), 135 $[H_2C=CH-CH_3-H_2O]^+$ (100%), 134 $[M-H_2C=CH-CH_3-H_2O-H]^+$ (3,5%), 108 $[M-COOCH(CH_3)_2]^+$ (12,8%), 107 $[M-H_2C=CH-CH_3-H_2O-CO]^+$ (30,7%), 80 (6,5%), 68 (5,3%), 52 (7,9%); Izračunato za

$C_{10}H_{13}NO_3$: C 61,53, H 6,71, N 7,18, O 24,59%; nađeno: C 61,50, H 6,76, N 7,23, O 24,51%;
 1H - i ^{13}C -NMR podaci podaci su navedeni u tabeli 5.25.

Izopropil-5-hidroksi-N-metilantranilat (izopropil-5-hidroksi-2-(metilamino)benzoat, 5-HIMA): $C_{11}H_{15}NO_3$; žućkasta tečnost; UV (CH_3CN) λ_{max} (log ϵ) 376 (4,06), 257 (4,38), 220 (4,84) nm; FTIR (čisto) ν_{max} 3382,5, 2978,7, 2931,7, 1674,6, 1582,4, 1515,0, 1455,4, 1358,8, 1205,8, 1166,1, 1103,7, 1080,7, 1051,5, 955,4, 907,8, 811,8, 752,9 cm^{-1} ; Rt 23,694 min, RI (HP-5MS) 1814; EIMS m/z (rel.int.): 209 $[M]^+$ (55,4%), 167 $[M-H_2C=CH-CH_3]^+$ (90,5%), 150 $[M-(CH_3)_2CHO]^+$ (24,0%), 149 $[M-H_2C=CH-CH_3-H_2O]^+$ (42,2%), 148 $[M-H_2C=CH-CH_3-H_2O-H]^+$ (21,8%), 122 $[M-COOCH(CH_3)_2]^+$ (17,9%), 121 $[M-H_2C=CH-CH_3-H_2O-CO]^+$ (100%), 120 $[M-H_2C=CH-CH_3-H_2O-CO-H]^+$ (58,4%), 94 (13,4%), 80 (4,4%), 65 (14,7%); Izračunato za $C_{11}H_{15}NO_3$: C 63,14, H 7,23, N 6,69, O 22,94; nađeno: C 63,17, H 7,20, N 6,61, O 23,02; 1H - i ^{13}C -NMR podaci podaci su navedeni u tabeli 5.25.

Amid N-metilantranilne kiseline (2-(metilamino)benzamid): $C_8H_{10}N_2O$; UV (CH_3CN) λ_{max} (log ϵ) 340 (4,76), 257 (5,11), 217 (5,63) nm; FTIR (čisto) ν_{max} 3354,8, 3167,3, 2918,5, 2850,3, 2811,1, 1652,9, 1614,6, 1578,0, 1508,9, 1434,4, 1404,3, 1238,5, 1155,2, 1115,8, 1027,9, 829,1, 746,6 cm^{-1} ; Rt 19,139 min, RI (DB-5MS) 1604; EIMS m/z (rel.int.): 150 $[M]^+$ (100,0%), 133 $[M-NH_2-H]$ (59,6%), 132 (24,6%), 105 $[M-NHCH_3-NH]$ (81,1%), 104 $[M-NHCH_3-NH_2]$ (96,6%), 92 $[M-NHCH_3-CO]$ (7,8%), 91 (6,0%), 78 (27,4%), 77 (37,9%), 63 (6,1%), 51 (9,5%); Izračunato za $C_8H_{10}N_2O$: C 63,98, H 6,71, N 18,65, O 10,65%; nađeno: C 63,90, H 6,68, N 18,78, O 10,64%; 1H - i ^{13}C -NMR podaci podaci su navedeni u tabeli 5.25. IR, 1H NMR i MS spektralni podaci se slažu sa literaturnim vrednostima (Bertini *et al*, 2005). MS spektralni podaci se slažu sa literaturnim vrednostima (Selva *et al*, 2005).

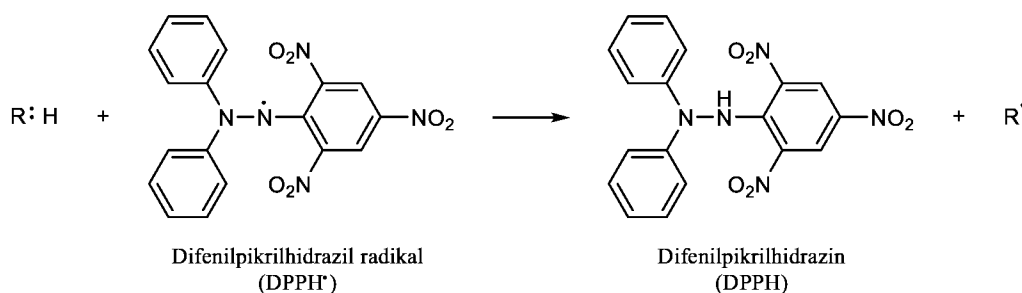
4.6. ISPITIVANJE ANTIOKSIDANTNE AKTIVNOSTI IZOPROPIL- I METIL-*N*-METILANTRANILATA

4.6.1. Sposobnost hvatanja slobodnih radikala

Za određivanje antioksidantne aktivnosti jedinjenja IMA i MMA korišćena su tri standardna modela zasnovana na merenju sposobnosti hvatanja slobodnih radikala (engl. *radical scavenging activity*) i to: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH[•]), radikal-katjona 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS^{•+}) i superoksidnog radikala (Radulović *et al*, 2013b). Sposobnost hvatanja slobodnih radikala izražena je kao procenat smanjenja količine slobodnih radikala u određenom testu. Za testiranje antioksidantne aktivnosti jedinjenja IMA i MMA pripremljeni su rastvori koncentracije 0,25 mg/ml, dok rastvore većih koncentracija nije bilo moguće pripremiti usled nedovoljne mešljivosti IMA i MMA sa vodom. Butilovani hidroksitoluen (BHT) i kvercetin su korišćeni kao pozitivne kontrole.

4.6.2. DPPH[•] test

Antioksidantna aktivnost ispitivanih uzoraka je određivana DPPH metodom (slika 4.6.1) koju je opisao *Brand-Williams* sa saradnicima (1995). Metanolni rastvor ovih radikala je ljubičaste boje i sa maksimumom apsorpcije na 515 nm. Reakcijom DPPH[•] radikala i antioksidansa, dolazi do redukcije pomenutog radikala (formalno se prenosi H[•]) i građenja žuto obojenog difenilpikrilhidrazina, usled čega dolazi do smanjenja apsorbanca na 515 nm (Foti *et al*, 2008).



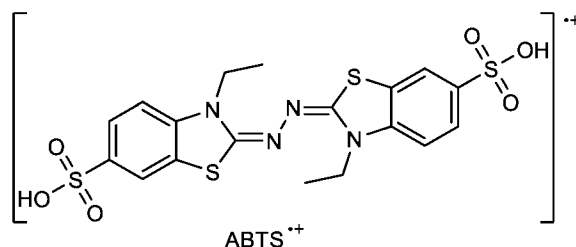
Slika 4.6.1. Mehanizam reakcije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH[•]) sa antioksidansom (R:H)

Rastvor koji je sadržavao 0,25 mg/ml eksperimentalne supstance i 100 $\mu\text{mol/l}$ 1,1-difenil-2-pikrilhidrazina (DPPH) u metanolu mešan je na *vortex*-u i nakon stajanja na tamnom mestu 30 minuta, merena je apsorbanca na talasnoj dužini od 515 nm. Takođe je izmerena i apsorbanca slepe probe koja je sadržala istu količinu metanola i rastvora DPPH.

4.6.3. ABTS⁺⁺ test

Antioksidantna sposobnost jedinjenja IMA i MMA određena je ABTS⁺⁺ metodom koju su opisali *Ozgen* i saradnici (2006). 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS) oksidacijom sa kalijum-persulfatom ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) daje ABTS⁺⁺ radikal-katjon (slika 4.6.2) modroplave boje sa maksimumom apsorpcije na 734 nm. Prilikom reakcije ABTS⁺⁺ sa antioksidansima dolazi do smanjenja inteziteta boje, i u krajnjem slučaju do obezbojenja rastvora.

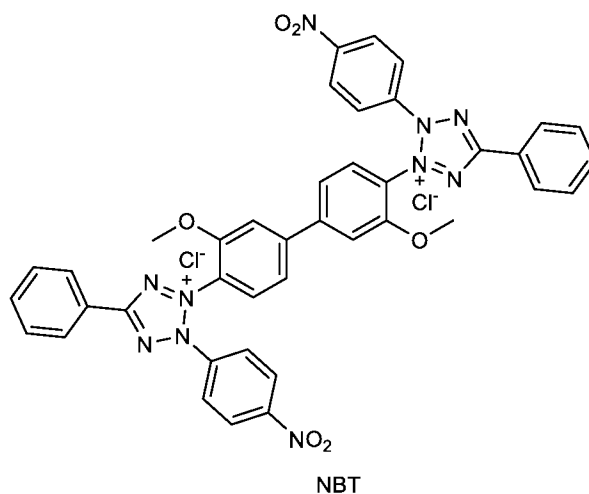
U cilju dobijanja rastvora ABTS⁺⁺ radikal-katjona pomešani su 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (7 mmol/l) i kalijum-persulfat (2,45 mmol/l), nakon čega je vršena inkubacija na 23 °C na tamnom mestu tokom 12 h. Zatim je rastvor ABTS⁺⁺ razblažen etanolom (80%, v/v) kako bi se dobio rastvor apsorbanca 0,700 \pm 0,020 na talasnoj dužini od 734 nm. Deo ovog rastvora (3,9 ml) je dodat u 0,1 ml rastvora MMA ili IMA (tako da je konačna koncentracija 0,25 mg/ml) i rastvor je dobro promešan. Reakciona smeša je zatim ostavljena na 23 °C 6 minuta, nakon čega je apsorbanca ponovo izmerena. Uzorci su razblaženi etanolom (80%, v/v) kako bi se dobili rastvori čija je apsorbanca 20–80% manja od apsorbanca slepe probe.



Slika 4.6.2. Struktura ABTS⁺⁺ radikal-katjona

4.6.4. Hvatanje superoksidnog radikala

Superoksidni radikal je dobijen u sistemu riboflavin/svetlost/nitroplavotetrazolijum-hlorid (NBT). Reakciona smeša (3 ml) je sadržavala EDTA (6,6 mmol/l), riboflavin (2 μ mol/l), NBT (engl. – *nitroblue tetrazolium chloride*, slika 4.6.3) (50 μ mol/l), testiranu supstancu (čija je konačna koncentracija u rastvoru bila 0,25 mg/ml) i fosfatni pufer (50 mmol/l) na pH 7,63. Reakcija je započeta ozračivanjem reakcione smeše UV lampom tokom 15 minuta, nakon čega je merena apsorbanca na 590 nm.



Slika 4.6.3. Struktura NBT

4.7. ISPITIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI

4.7.1. Korišćeni mikroorganizmi

Za određivanje antimikrobne aktivnosti etarskog ulja biljne vrste *C. ternata* korišćeni su klinički izolati: Gram-pozitivna bakterija - *Staphylococcus aureus* MRSA, Gram-negativna bakterija - *Escherichia coli* i dva kvasca: *Candida albicans* i *Cryptococcus neoformans* t444.

Za određivanje antimikrobne aktivnosti jedinjenja MMA i IMA korišćeni su standardni ATCC sojevi: Gram-pozitivna bakterija - *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), tri Gram-negativne bakterije: *Proteus mirabilis* (ATCC 12453), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) i dve gljivice: kvasac - *Candida albicans* (ATCC 10231) i buđ - *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404).

Pre testiranja kulture bakterija su gajene na hranljivom agru (engl. *nutrient agar*), a gljivica na saburo dekstroznom agru (engl. *Sabouraud dextrose agar*) na odgovarajućim optimalnim temperaturama (37 i 30 °C).

4.7.2. Testiranje *in vitro* antimikrobne aktivnosti etarskog ulja *C. ternata* disk difuzionom metodom

Za određivanje antimikrobne aktivnosti etarskog ulja biljne vrste *C. ternata* primenjen je disk difuzioni metod na osnovu preporuka Nacionalnog (Američkog) komiteta za kliničke laboratorijske standarde (NCCLS - engl. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 1997). Sledeće hranljive podloge su korišćene za čuvanje, kao i za ispitivanje aktivnosti protiv mikroorganizama: *Antibiotic Medium 1* (*Difco Laboratories*, Detroit, Mičigen, SAD) ili B1 (Torlak, Beograd) za rast Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, a Tripton soja agar (TSA, Torlak, Beograd) za *Candida albicans* i *Aspergillus brasiliensis*. Podloge su pripremane prema uputstvima proizvođača: pomešana suva podloga sa odgovarajućom količinom destilovane vode (1,50 g B1 ili *Antibiotic Medium 1* u 50 ml destilovane vode, 0,80 g TSA/20 ml) je zagrevana do ključanja da bi se podloga potpuno rastvorila, a zatim je sterilisana u autoklavu (120 °C, 3 atm) u toku 15 min. U 10 ml rashlađene hranljive podloge dodat je 0,1 ml suspenzije mikroorganizama i ona je razlivena u *Petri*-jeve šolje (prečnika 90 mm) čineći sloj

debljine 2 mm. Sterilni diskovi *Antibiotica test blattchen* (*Schleicher and Schuell*, Dassel, Nemačka) prečnika 6 mm, na koje je naneto 50 µl rastvora jedinjenja u DMSO-u (1 mg na 1 ml DMSO, svi rastvori su sterilisani propuštanjem kroz membranske filtere veličine pora 0,45 µm), stavljeni su na zasejanu očvrснуtu podlogu. Ovako pripremljene *Petri*-jeve šolje, nakon 2 h na 4 °C, termostahirane (inkubirane) su u toku 24 h na 37 °C (bakterije) i 48 h na 30 °C (gljivice). Standardni diskovi antibiotika (gentamicin, tetraciklin, ampicilin), kao i nistatina, 30 µg aktivne supstance po disku, upotrebljene su kao pozitivne kontrole sojeva, dok su diskovi impregnirani sa po 50 µl DMSO-a korišćeni kao negativne kontrole. Po isteku vremena inkubiranja, prečnici inhibicionih zona (statskih i/ili cidnih) očitavani su pomoću aparata *Fisher-Lilly antibiotic zone reader* (*Fisher Scientific Co.*, Hempton, Nju Hempšir, SAD). Svaki test rađen je u triplikatu i rezultati su obrađeni statistički.

4.7.3. Testiranje *in vitro* antimikrobne aktivnosti jedinjenja IMA i MMA mikrodilucionom metodom

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskog ulja, jedinjenja IMA i MMA korišćena je mikrodilucionna metoda koju su prethodno opisali Radulović i saradnici (2015). Bakterije su kultivisane na *Müller-Hinton* agaru (MHA) (37 °C), a gljivice na *Sabouraud* dekstroznom agaru (SDA) (30 °C). Posle 18 časova kultivisanja, napravljena je bakterijska suspenzija u *Müller-Hinton* bujonu, pri čemu je broj mikroorganizama standardizovan turbidimetrijskom metodom na 0,5 jedinica *McFarland*-ove skale (DEN-1 *McFarland Densitometer*, *Biosan*, Riga, Letonija). Konačna veličina bakterijskog inokuluma iznosila je 5×10^5 . Suspenzije gljivica su napravljene u *Sabouraud* dekstroznom agaru i njihov turbiditet je potvrđen prebrojavanjem živih ćelija u *Toma* komori. Konačna veličina fungalnog inokuluma iznosila je 1×10^4 . Uzorci za testiranje su pripremljeni rastvaranjem jedinjenja IMA i MMA u dimetil-sulfoksidu (DMSO, 100%) i onda su serijski razblaženi (faktor razblaženja je 2) pri čemu je konačna koncentracija bila u opsegu 0,0025–5,00 mg/ml. Najveća koncentracija rastvarača (DMSO) u bunarićima je bila 10% (v/v), a ranije je dokazano da ova koncentracija ne utiče na rast testiranih ćelija. Nakon razblaživanja testiranih jedinjenja, inokulum je dodat u bunariće i mikrotitarske ploče su inkubirane na 37 °C u toku 24 časa (bakterije) ili 30 °C u toku 48 časa (gljivice). Hloramfenikol i nistatin su korišćeni kao pozitivna, a rastvarač (10% DMSO) kao negativna kontrola. Jedan neinokulisani bunarić, bez antimikrobnog agensa, služio je kao kontrola sterilnosti.

Bakterijski rast je vizualizovan dodavanjem 20 μ l 0,5%-tnog vodenog rastvora 2,3,5-trifeniltetrazolijum-hlorida (TTC). Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC – engl. *minimum inhibitory concentration*) je definisana kao najniža koncentracija ispitivanog uzorka koja sprečava vidljiv rast mikroorganizama (crveno obojenje na dnu bunarića nakon dodavanja TTC-a). Svi eksperimenti su rađeni u triplikatu.

4.8. ISPITIVANJE FARMAKOLOŠKIH AKTIVNOSTI

4.8.1. Laboratorijske životinje i njihov tretman

4.8.1.1. Ispitivanje antinociceptivne aktivnosti

Eksperimenti su izvedeni na mužjacima miševa *Swiss* soja, težine od 18 do 25 g, starosti 2 meseca, uzgajanim u *Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Óxido Nítrico*, Rio de Janeiro, Brazil. Životinje su čuvane pod standardnim laboratorijskim uslovima (temperatura 22 ± 2 °C, vlažnost vazduha 60%, prirodni ciklus dana i noći (12/12 h)). Hrana i voda bile su dostupne 24 h dnevno. Dvanaest sati pre početka eksperimenta životinje su imale slobodan pristup vodi, ali ne i hrani. Životinje su aklimatizovane na laboratorijske uslove najmanje 1 h pre početka eksperimenta i korišćene su samo jednom tokom eksperimenata. Eksperimentalne procedure su sprovedene u skladu sa principima zaštite i upotrebe laboratorijskih životinja za potrebe istraživanja koji su usvojeni od strane *Brazilian College of Animal Experimentation* (COBEA) i odobreni od strane *Biomedical Science Institute/UFRJ, Ethical Committee for Animal Research*, pod brojem DFBCICB-015.

4.8.1.2. Ispitivanje dejstva na centralni nervni sistem

Za eksperiment su korišćeni miševi BALB/c soja, muškog pola, težine 20 ± 5 g, starosti 2 meseca, uzgajani u Vivarijumu Instituta za biomedicinska istraživanja Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Nišu, Niš, Srbija. Životinje su čuvane pod standardnim laboratorijskim uslovima (temperatura 22 ± 2 °C, vlažnost vazduha 60%, prirodni ciklus dana i noći (12/12 h)), a hrana (specijalni briketi za ishranu eksperimentalnih životinja, Vetzavod, Subotica) i voda su im bile dostupne *ad libitum*. Dvanaest sati pre početka eksperimenta životinje su imale slobodan pristup vodi, ali ne i hrani. Eksperimentalne procedure su sprovedene u skladu sa principima zaštite i upotrebe laboratorijskih životinja u istraživanju i odobrene su od strane lokalnog Etičkog komiteta (saglasnost odbora broj 01-2857-5). Svi naponi su bili uloženi da se smanji patnja i broj životinja koje su korišćene u eksperimentima.

4.8.1.3. Ispitivanje hepato-, nefro- i gastroprotektivnog dejstva jedinjenja IMA i MMA; *Analiza IMA i MMA i njihovih metabolita u urinu pacova i njihova distribucija u organima i serumu pacova*

U eksperimentima su korišćeni odrasli pacovi *Wistar* soja oba pola, težine 200-250 g, uzgajani u Vivarijumu Instituta za biomedicinska istraživanja Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Nišu, Niš, Srbija. Životinje su čuvane u prostranim kavezima pod standardnim laboratorijskim uslovima, na temperaturi od 22 ± 2 °C, pri vlažnosti vazduha 60% i sa prirodnim ciklusom dana i noći (12/12 h). Hrana (specijalni briketi za ishranu eksperimentalnih životinja, Vetzavod, Subotica) i voda su bile dostupne *ad libitum*. Svi ekperimenti nad životinjama izvedeni su u saglasnosti *The European Council Directive* koja je usvojena 22. septembra 2010. godine (2010/63/EU), a eksperimentalne procedure su sprovedene u skladu sa principima zaštite i upotrebe laboratorijskih životinja u istraživanju i odobrene su od strane lokalnog Etičkog komiteta (saglasnosti odbora broj 01-7289-11 i 01-7289-13).

4.8.2. Ispitivanje akutne toksičnosti, uticaja na telesnu temperaturu miševa i uticaja IMA, MMA i PMA na spontanu aktivnost miševa (test otvorenog polja i *rotarod* test)

4.8.2.1. Ispitivanje akutne toksičnosti IMA, MMA i PMA

Akutna toksičnost je određena pomoću eksperimentalnog modela koji je prvi put opisao *Lorke* (1983). Po jedna doza testiranih jedinjenja (100 mg/kg t.m.) data je grupi miševa oba pola. Praćeni su bihevioralni parametri kao što su konvulzije, hiperaktivnost, sedativni efekat, lizanje krzna (engl. – *grooming*), gubitak posturalnog refleksa (engl. - *righting reflex*), povećana ili smanjena respiracija, unos hrane i vode 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24 h i svaka 24 h u toku 5 dana nakon aplikacije testiranih supstanci. Nakon ovog perioda životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom, izvađeni su im želuci, napravljen je rez duž velike krivine i zabeležen je broj ulceracija (jednostrukih ili višestrukih erozija, ulcera ili perforacija) i hiperemija.

4.8.2.2. Ispitivanje uticaja IMA, MMA i PMA na telesnu temperaturu eksperimentalnih životinja

Rektalna temperatura svake jedinice merena je neposredno pre eksperimenta i 1, 4, 12 i 24 h nakon davanja svake doze (50, 100 i 200 mg/kg t.m, *i.p.*) pomoću termistor termometra povezanog sa termoelektričnom probom premazanom lubrikantom (*Panlab* 0331, Barselona, Španija). Merenje je izvedeno na sobnoj temperaturi bez prethodnog davanja anestezije životinjama. Za eksperiment su korišćeni miševi muškog pola čija je rektalna temperatura neposredno pre eksperimenata iznosila između 35 i 37 °C.

4.8.2.3. Ispitivanje uticaja IMA, MMA i PMA na spontanu aktivnost životinja –

Test otvorenog polja i rotarod test

Jedan od testova koji pruža uvid u opšti motorni status jedinice je test aktivnosti u otvorenom polju (engl. *open field test*). Ovaj test se koristi za procenu motorne aktivnosti, dok se na osnovu obrasca kretanja životinje u areni za testiranje mogu dobiti i informacije o anksioznom ponašanju. Test je izveden na način koji je opisao *Barros* sa saradnicima (1991), a modifikovao *Figueiredo* sa saradnicima (2013). Odmah nakon što su miševima oralno data testirana jedinjenja (100 mg/kg t.m.), miševi su ponaosob stavljeni u komoru za posmatranje, čiji je pod bio izdeljen na 50 jednakih kvadrata (dimenzija 5 cm × 5 cm). Beležen je broj kvadrata koji je miš prešao u toku 5 minuta.

Efekat jedinjenja na motornu koordinaciju miševa ispitivan *rotarod* testom, kako su prethodno opisali *Godoy* i saradnici (2004), a modifikovao *Figueiredo* sa saradnicima (2013). Dvadesetčetiri časa pre eksperimenta sve životinje su trenirane na *rotarod*-u (prečnika 3,7 cm, 8 r.p.m) dok nisu uspevale da se zadrže na rotoru 60 s, a da ne padnu. Na dan eksperimenta miševi su tretirani jedinjenjima IMA, MMA i PMA (100 mg/kg t.m.) i testirani na *rotarod*-u od pola sata do 3,5 sata nakon tretmana pomenutim jedinjenjima. Zabeleženo je koliko je puta u toku 240 s životinja pala sa aparature.

4.8.3. Ispitivanje antinociceptivne aktivnosti IMA, MMA, PMA, etarskog ulja i etanolnog ekstrakta listova biljne vrste *C. ternata* kod miševa

4.8.3.1. Dizajn eksperimenta

Za testiranje antinociceptivne aktivnosti korišćeni su miševi *Swiss* soja. Sve eksperimentalne grupe su brojale od 6 do 10 miševa. Prilikom izvođenja testa abdominalnih grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom (engl. *writhing test*) i testa vruće ploče (engl. *hot-plate test*), sintetisana jedinjenja, MMA, IMA i PMA (u dozama 0,3, 1 i 3 mg/kg t.m.), etarsko ulje i etanolni ekstrakt listova (u dozama 10, 30 i 100 mg/kg t.m.), suspendovani su u sterilnom kukuruznom ulju i miševima su data oralno (*per os, p.o.*).

Prilikom izvođenja testova formalinom, kapsaicinom i glutamatom izazvane nocicepcije i testa refleksa naglog pokreta repom (*tail flick test*) napravljeni su osnovni rastvori IMA, MMA i PMA koncentracije 100 mg/ml, rastvaranjem pomenutih supstanci u dimetil-sulfoksidu (DMSO). Na dan eksperimenta ovi rastvori su rablaženi fosfatnim puferom (PBS – engl. *phosphate-buffered saline*). Testirana jedinjenja (IMA, MMA i PMA) su životinjama data oralno, u dozama 0,3, 1 i 3 mg/kg t.m, pri čemu je maksimalna zapremina rastvora koja je data životinji bila 0,1 ml. Formalin i L-glutaminska kiselina su rastvoreni u fosfatnom puferu (PBS), a kapsaicin u rastvoru fosfatnog pufera u etanolu (20% v/v).

Životinjama su dati i poznati analgetici, acetilsalicilna kiselina (ASA) i morfin, kao i rastvarač, kukuruzno ulje ili PBS sa količinom DMSO-a koju je sadržavala najviša doza (konačna količina DMSO-a sama po sebi nije imala uticaja na životinje).

4.8.3.2. Test abdominalnih grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom (engl. *writhing test*)

Miševi su tretirani na način koji je prvi put opisao *Whittle* (1964), a modifikovao *Matheus* sa saradnicima (2005). Beležen je ukupan broj abdominalnih grčeva (ekstenzija zadnjih ekstremiteta i abdomena, engl. - *writhing*) izazvanih intraperitonealnom injekcijom (*i.p.*) sirćetne kiseline (AA, 2% v/v) u vremenskom periodu od petog do dvadesetog minuta od momenta davanja AA. Petnaest minuta pre nego što je miševima data AA, injektirane su im testirane supstance ili acetilsalicilna kiselina (ASA, u dozi 200 mg/kg t.m.) ili rastvarač (kukuruzno ulje). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm S.D.

4.8.3.3. Test osetljivosti na termalni nadražaj - metoda vruće ploče (engl. hot-plate test)

Miševi su testirani po metodi koju su prvi put opisali *Sahley* i *Berntson* (1979), a koju je modifikovao *Matheus* sa saradnicima (2005). Trideset minuta nakon davanja testiranih supstanci, rastvarača ili morfina (5 mg/kg t.m.), u pravilnim intervalima, miševi su stavljani na toplu ploču (*Insight equipments*, Brazil) čija je temperatura iznosila 55 ± 1 °C. Beleženo je vreme potrebno da životinja odreaguje (zadržka/latencija u sekundama). Lizanje prednjih ili zadnjih šapa i skakanje, smatralo se pozitivnom reakcijom na termalni stimulus. Osnovna linija je određena kao srednja vrednost vremena latencije, merena 60 i 30 min pre davanja supstanci, rastvarača ili morfina i definisana je kao normalana reakcija životinje na dati temperaturni stimulus. Životinje nisu držane na toploj ploči duže od perioda tri puta većeg od osnovne linije kako bi se izbeglo eventualno oštećenje šapa. Antinocicepcija je kvantifikovana bilo kao porast osnovne linije (u %) (IB – engl. *increase in baseline*) ili kao površina ispod krive (AUC - engl. *area under the curve*). Porast osnovne linije (u %) računat je po formuli:

$$((\text{vreme potrebno za prvu reakciju} \times 100) / \text{osnovna linija}) - 100.$$

Za izračunavanje površine ispod krive korišćena je sledeća formula zasnovana na trapeznom pravilu vremena reakcija životinja od 30-og minuta nakon aplikacije supstanci do kraja eksperimenta (180 min nakon aplikacije supstanci) (*Matthews et al*, 1990).

$$\text{AUC} = 30 \times \text{IB}[(\text{min } 30)/2 + (\text{min } 60) + \dots + (\text{150 min}) + (\text{min } 180)/2]$$

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm S.D. Površina ispod krive (AUC) je izračunata pomoću programa *Prism Software 5.0* (*GraphPad Prism Software, GraphPad Software, Inc., La Jolla, Kalifornija, SAD*).

4.8.3.4. Formalinom indukovana nocicepcija (formalinski test)

Formalinski test je izveden prema proceduri sličnoj onoj koju su opisali *Hunskaar* i *Hole* (1987) i *Gomes* sa saradnicima (2007). Životinjama je injektirano 20 μ l formalina (2,5% v/v) u dorzalni deo leve zadnje šape, nakon čega je beleženo vreme koje je životinja provela ližući pomenutu šapu. Nociceptivni odgovor se sastoji iz dve faze: prva - neurogena – 5 minuta nakon injekcije formalina i druga - zapaljenska – 15–30 min nakon injekcije formalina. Testirane supstance, IMA, MMA i PMA (0,3–3 mg/kg t.m.), morfin (5 mg/kg t.m.), ASA (100 mg/kg t.m.) ili rastvarač su životinjama date oralno 60 min pre aplikacije formalina.

4.8.3.5. Kapsaicinom indukovana nocicepcija

Test kapsaicinom indukovane nocicepcije izveden je na način koji je opisao *Sakurada* sa saradnicima (1998) uz manje modifikacije. Miševima je dat rastvor kapsaicina (20 µl) intraplantarnom injekcijom u desnu zadnju šapu (1,6 µg po šapi). Odmah nakon injekcije kapsaicina životinje su stavljane u providnu kutiju i tokom 5 minuta beleženo je vreme tokom koga je životinja lizala ili grizla šapu u koju je injektiran kapsaicin, što je smatrano nociceptivnom reakcijom. Sat vremena pre intraplantarne injekcije kapsaicina životinjama su oralno dati IMA, MMA i PMA (0,3–3 mg/kg t.m.) ili rastvarač. Kod nekih eksperimenata životinje su 30 min pre injekcije kapsaicina primile intraplantarnu injekciju 10 µl kapsazepina (antagonista kapsaicinskih receptora, 3,8 pg po šapi).

4.8.3.6. Glutamatom indukovana nocicepcija

Korišćena procedura je slična onoj koju je prethodno opisao *Beirith* sa saradnicima (2002). Sat vremena pre nego što je miševima dat rastvor glutamata (3,7 ng po šapi) intraplantarnom injekcijom ispod površine desne zadnje šape, životinjama su oralno dati IMA, MMA ili PMA (0,3–3 mg/kg t.m.) ili rastvarač. Odmah nakon toga životinje su smeštene u providnu kutiju i tokom 15 minuta mereno je vreme tokom koga su životinje lizale ili grizle šapu u koju je injektiran glutamat.

4.8.3.7. Refleks naglog pokreta repom (Tail flick reflex)

Ovaj test je izveden na način koji je opisao *Bem-Bassat* sa saradnicima (1959), a modifikovala *Pinheiro* sa saradnicima (2010). Ukratko, miševi su stavljani u fiksacioni kavez (engl. *container tube*), a jedna trećina repa je uranjana u vodeno kupatilo temperature 50 ± 1 °C. Mereno je vreme potrebno da životinja izvuče rep iz tople vode u nekoliko navrata u toku 20 minuta nakon davanja IMA, MMA, PMA (0,3–3 mg/kg t.m.), morfina (5 mg/kg t.m.) ili rastvarača. Osnovna linija je određena kao prosečno vreme potrebno da životinja odreaguje zabeleženo 40 i 20 min pre davanja jedinjenja, morfina ili rastvarača i definiše se kao normalna reakcija životinje na termalni stimulus. Ukoliko životinja nije izvukla rep iz tople vode u periodu tri puta većem od osnovne linije, eksperimentatori su vadili repove miševa iz vode kako ne bi došlo do povrede. Antinocicepcija je kvantifikovana kao porast osnovne linije (%) ili kao

površina ispod krive izračunata po formuli zasnovanoj na trapeznom pravilu vremena reakcija životinja od 20-og minuta nakon aplikacije supstanci do kraja eksperimenta (120 min nakon aplikacije supstanci) (Matthews *et al*, 1990): $AUC = 20 \times IB[(\min 20)/2 + (\min 20 + \min 40)/2 + (\min 40 + \min 60)/2 \dots + (\min 120)/2]$. Vrednosti osnovne linije su iznosile 4 do 7 s.

4.8.3.8. Ispitivanje mehanizma dejstva IMA, MMA i PMA na osećaj bola izazvanog toplotnim stimulusom kod miševa (test vruće ploče)

U cilju ispitivanja mehanizma antinociceptivnog dejstva IMA, MMA i PMA (tj. učešća opioidnog, acetilholinskog, noradrenergičkog, nitrenergičkog, serotoniniskog i kanabinoidnog sistema i ATP zavisnih kalijumovih kanala (K^+_{ATP})), 30 minuta pre nego što su primili pomenuta jedinjenja u dozi 3 mg/kg t.m, *p.o.*, miševima su dati sledeći antagonisti receptora: nalokson (opioidni antagonist, 5 mg/kg t.m, *i.p.*), mekamilamin (nikotinski antagonist, 2 mg/kg t.m, *i.p.*), atropin (muskarinski antagonist, 1 mg/kg t.m, *i.p.*), johimbin (antagonist α -adrenergičkih receptora, 2 mg/kg t.m, *i.p.*), ondansetron (5-HT₃ serotoniniski antagonist, 0,5 mg/kg t.m, *i.p.*), AM-251 (antagonist kanabinoidnog CB₁ receptora, 1 mg/kg t.m, *i.p.*), glibenklamid (blokator ATP zavisnih kalijumovih kanala, 2 mg/kg t.m, *i.p.*) ili metil ester L-nitro arginina (L-NAME, inhibitor sintaze-azot-monoksida, 3 mg/kg t.m, *i.p.*). Doze antagonista date ekperimentalnim životinjama su određene na osnovu literaturnih podataka (Otuki *et al*, 2005; Tabarelli *et al*, 2004) i prethodnih eksperimenata izvedenih u *Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Óxido Nítrico*, Rio de Janeiro, Brazil, a antagonisti su rastvoreni u fosfatnom puferu (PBS) neposredno pre eksperimenta. Za svaki antagonist konstruisane su krive zavisnosti doza-odgovor. U eksperimentu je korišćena ona doza antagonista koja je smanjila 50% odgovora (Pinheiro *et al*, 2010).

Mogući doprinos endogenog serotonina na antinociceptivno dejstvo IMA, MMA i PMA ispitan je prema postupku koji su opisali Koe i Weissman (1966) uz modifikacije. Životinje su tretirane metil estrom 4-hlor-fenilalanina-hidrohlorida (PCPA – engl. *p*-chlorophenylalanine methyl ester, 100 mg/kg t.m, *i.p.*) ili rastvaračem, jednom dnevno tokom 4 dana uzastopno, a 30 minuta nakon poslednje injekcije, životinjama su oralno dati IMA, MMA, PMA ili rastvarač. Antinociceptivni efekat je ispitan testom vruće ploče kako je opisano u 4.8.3.3.

4.8.4. Ispitivanje uticaja IMA i MMA na centralni nervni sistem miševa

4.8.4.1. Dizajn eksperimenta

Za svaki eksperiment oformljeno je 6 eksperimentalnih i 2 kontrolne (pozitivna i negativna) grupe sa 6 životinja po grupi (Tabela 4.1). Životinjama iz eksperimentalnih grupa su IMA i MMA dati u dozama 50, 100 i 200 mg/kg t.m, intraperitonealno, 1 h pre eksperimenta. Kontrolne grupe primile su dijazepam (2 mg/kg t.m.) ili imipramin-hidrochlorid (15 mg/kg t.m.), koji je korišćen kao pozitivna kontrola u testovima za ispitivanje antidepresivnog dejstva, i rastvarač (maslinovo ulje, 10 ml/kg t.m.).

Tabela 4.1. Ispitivanje uticaja IMA i MMA na centralni nervni sistem miševa – dizajn eksperimenta
(6 eksperimentalnih + 2 kontrolne grupe; 6 životinja po grupi)

Supstanca	Doza	Tretman	Naziv testa
Maslinovo ulje	10 ml/kg	1 doza, 1 h pre eksperimenta, <i>i.p.</i> (12 h pre početka eksperimenta životinje su imale slobadan pristup vodi, ali ne i hrani)	Test otvorenog polja Test svetlo/tama Test dijazepamom izazvanog spavanja Test prinudnog plivanja Test vešanja o rep
IMA	50/100/200 mg/kg		Test otvorenog polja Test svetlo/tama Test dijazepamom izazvanog spavanja
MMA	50/100/200 mg/kg		Test prinudnog plivanja Test vešanja o rep
Dijazepam	2 mg/kg		Test otvorenog polja Test svetlo/tama Test dijazepamom izazvanog spavanja
Imipramin- hidrochlorid	15 mg/kg		Test prinudnog plivanja Test vešanja o rep

4.8.4.2. Test otvorenog polja (Open field test)

Kvadratna kutija napravljena od čistog pleksiglasa (*Plexiglas*[®], *Evonik Industries AG*, Esen, Nemačka), dimenzija 50 × 50 × 35 cm, sa linijama iscrtanim po dnu tako da je dele na 25 jednakih kvadrata (dimenzija 10 × 10 cm), korišćena je za izvođenje testa otvorenog polja. Životinje su pojedinačno uzimane i smeštane u centar kutije, nakon čega je praćena njihova motorna aktivnost tokom 5 min. Eksperimentatori su beležili sledeće parametre aktivnosti životinje - broj kvadrata pređenih sa sve četiri šape i broj vertikalnih pokreta istraživanja (engl. *rearings*, koliko se puta životinja propela na zadnje noge) koje je miš načinio tokom trajanja eksperimenta (Archer, 1973). Nakon perioda od 5 minuta testirana životinja je vraćena u svoj

kavez, a kutija za izvođenje testa otvorenog polja je očišćenjena 10% (v/v) etanolom kako bi se uklonili tragovi životinje koja je boravila u kutiji.

4.8.4.3. *Test horizontalne žice* (Horizontal wire test)

Test horizontalne žice je korišćen kako bi se ispitaio uticaj IMA i MMA na tonus mišića miševa. Aparaturu, koja je primenjena u ovom testu, opisao je *Bonetti* sa saradnicima (1982). Životinja je uhvaćena za rep tako da joj je omogućeno da se prednjim šapama uhvati za horizontalnu žicu (visine 25 cm, prečnika 2 mm i dužine 30 cm), a onda je puštena. Zabeležen je broj životinja koje nisu uspele da se uhvate za horizontalnu žicu bilo prednjim šapama ili makar jednom zadnjom šapom i da se drže za žicu tokom barem 10 s. Životinje koje su tri puta za redom pale sa žice za manje od 5 s ili tri puta za redom nisu uspele da uhvate žicu makar zadnjom šapom, nisu prošle test i smatrano je da je kod njih došlo do mišićne relaksacije (Vogel i Vogel, 1997).

4.8.4.4. *Test svetlo/tama* (Light/dark test)

Light/dark test se zasniva na urođenoj averziji glodara da borave na jako osvetljenim mestima i na spontanom istraživačkom ponašanju glodara, kao odgovoru na blagi stres, tj. na novo okruženje i svetlost (Crawley i Goodwin, 1980). Ovaj test je izveden na način koji je opisao *Costall* sa saradnicima (1989) uz manje modifikacije. U testu je korišćena drvena kutija dimenzija 40 cm × 60 cm × 20 cm (dužina, širina, visina), podeljena na dva dela (komore) barijerom koja poseduje jedan prolaz (okrugli otvor prečnika 7 cm) kroz koji miševi mogu da prelaze iz jednog dela u drugi. Veća komora (40 cm × 40 cm) bele boje bila je osvetljena svetlosnim izvorom od 60 W, dok je manja komora (40 cm × 20 cm) crne boje i nije bila osvetljena. Nakon što su životinjama date testirane supstance, miš je postavljan u osvetljeni deo kutije, okrenut od prolaza. Mereno je ukupno vreme provedeno u svetlom ili u tamnom delu kutije i zabeležen broj prelaza između ova dva dela kutije, u periodu od 5 min. Posle svakog testa, aparat je pažljivo očišćen 10% (v/v) etanolom.

4.8.4.5. Test prinudnog plivanja (Forced swimming test)

Test prinudnog plivanja (*Forced swimming test*) je izveden na način koji je opisao Porsolt sa saradnicima (1977) uz manje modifikacije. Korišćeni su stakleni cilindri (visine 20 cm, prečnika 14 cm) ispunjeni vodom do 10 cm temperature 22-23 °C. Miševi su u vodi boravili 6 minuta, a tokom poslednja 4 minuta mereno je vreme tokom koga su miševi bili nepokretni (tj. plutali bez ikakvih pokreta ili pravili samo pokrete neophodne da održe glavu iznad vode), tzv. vreme nepokretnosti (imobilnosti).

4.8.4.6. Test vešanja o rep (Tail suspension test)

Ovaj test je izveden na način koji je opisao Steru sa saradnicima (1985) uz manje izmene. Ukratko, miš se pomoću lepljive trake, koja se lepi 1 cm od vrha repa, postavlja da visi tako da mu je glava udaljena 5 cm od podloge. Test traje 6 minuta, a meri se imobilnost jedinke tokom poslednja 4 minuta. Pod imobinošću se smatra stanje u kome jedinka visi pasivno, ne pokušavajući da se istragne, ne uvrće telo, niti se trza.

4.8.4.7. Test sna izazvanog dijazepamom

Test sna koji je izazvan dijazepamom izveden je na način koji je opisao Rakotonirina sa saradnicima (2001). Životinjama je dat dijazepam (20 mg/kg t.m, *i.p.*) sat vremena nakon što su im date testirane supstance. Mereno je vreme potrebno da se životinja uspava, kao i dužina sna. Trenutak u kome dolazi do gubitka posturalnog refleksa (engl. - *righting*) smatra se trenutkom uspavljivanja, dok se povratak ovog refleksa smatra trenutkom buđenja.

4.8.5. Ispitivanje hepatoprotektivnog dejstva jedinjenja IMA i MMA u modelu oštećenja jetre pacova izazvanog ugljen-tetrahloridom

4.8.5.1. Dizajn eksperimenta

Životinje su podeljene u četiri eksperimentalne grupe, a svaka je brojala šest jedinki (Tabela 4.2). Grupe 1 i 2 su jednom dnevno tokom 7 dana tretirane jedinjenjima MMA i IMA (u

dozi 200 mg/kg t.m.), a sedmog dana su 2 h nakon aplikacije poslednje doze jedinjenja MMA i IMA, primile CCl₄ (u dozi 1 ml/kg t.m.) rastvoren u maslinovom ulju (1:1, v/v). Kontrolna grupa je tokom sedam dana primala samo maslinovo ulje (1 ml/kg t.m.). Kod životinja četvrte grupe (CCl₄ grupa) akutno oštećenje organa je izazvano injekcijom CCl₄ (1 ml/kg t.m.) rastvorenom u maslinovom ulju (1:1, v/v). Sve supstance su davane intraperitonealnom injekcijom (*i.p.*), a ne oralnim putem (*p.o.*), u cilju preciznog doziranja. Dvadesetčetiri časa nakon injekcije CCl₄ pacovi su žrtvovani prekomernom dozom ketamina. Masa životinja i njihovih jetri je izmerena nakon žrtvovanja i uzorci tkiva su pripremljeni za histološku analizu. Krv je uzorkovana punkcijom srca u cilju određivanja biohemijskih parametara i čuvana je na -80 °C do analize.

Tabela 4.2. Ispitivanje hepatoprotektivnog dejstva antranilata - dizajn eksperimenta (4 eksperimentalne grupe; 6 životinja po grupi)

Supstanca	Doza	Tretman	Uzorkovan materijal	Analize
Maslinovo ulje	1 ml/kg	7 dana, svakodnevno, <i>i.p.</i>	Krv (serum), Tkivo jetre	Masa životinje; Masa jetre; Biohemijska analiza seruma (nivoi AST, ALT, Cho, TB, DB); histopatološka analiza tkiva jetre (HE i PAS bojenje)
CCl ₄	1 ml/kg	1 doza, <i>i.p.</i>		
IMA + CCl ₄	IMA (200 mg/kg, <i>i.p.</i>) 7 dana, svakodnevno + sedmog dana CCl ₄ (1 ml/kg, <i>i.p.</i>)			
MMA + CCl ₄	MMA (200 mg/kg, <i>i.p.</i>) 7 dana, svakodnevno + sedmog dana CCl ₄ (1 ml/kg, <i>i.p.</i>)			

4.8.6. Ispitivanje nefroprotektivnog dejstva jedinjenja IMA i MMA u modelu oštećenja bubrega pacova izazvanog ugljen-tetrahloridom

4.8.6.1. Dizajn eksperimenta

Životinje su nasumice podeljene u sedam eksperimentalnih grupa od kojih je svaka brojala 6 jedinki (Tabela 4.3). Tokom eksperimenta životinje iste grupe su čuvane u istom kavezu. Grupe od 1 do 4 su dnevno tretirane MMA i IMA (u dozi 200 mg/kg t.m, dve grupe po supstanci) tokom sedam dana. Sedmog dana po jedna grupa koja je primila IMA i MMA primila je CCl₄ u maslinovom ulju u dozi 1 ml/kg t.m. (1:1, v/v), 2 h nakon aplikacije poslednje doze antranilata. Pozitivnu kontrolnu grupu činile su životinje koje su primile Silimarin (SL; 100 mg/kg t.m.), a tretirane su na isti način kao i životinje eksperimentalnih grupa (Crocenzi *et al*, 2003). Negativna kontrolna grupa je primala maslinovo ulje (u dozi 1 ml/kg t.m.) tokom sedam

dana. Kod životinja preostale grupe (CCl₄ grupa), akutno oštećenje organa izazvano je ugljen-tetrahloridom (1 ml/kg t.m.) koji je bio rastvoren u maslinovom ulju (1:1, v/v). Sve supstance su davane intraperitonealnom injekcijom (*i.p.*), a ne oralnim putem (*p.o.*), u cilju preciznog doziranja. Dvadesetčetiri časa nakon što su primile CCl₄ pacovi su žrtvovani prekomernom dozom ketamina. Uzorci krvi, dobijeni punkcijom srca, korišćeni su za određivanje biohemijskih parametara i čuvani su na temperaturi od –80 °C do analiza. Bubrežno tkivo je uzorkovano za histopatološku analizu.

Tabela 4.3. Ispitivanje nefroprotektivnog dejstva antranilata - dizajn eksperimenta (7 eksperimentalnih grupa; 6 životinja po grupi)

Supstanca	Doza	Tretman	Uzorkovan materijal	Analize
Maslinovo ulje	1 ml/kg	7 dana, svakodnevna aplikacija	Krv (serum), Tkivo bubrega	Biohemijska analiza seruma (nivoi uree i kreatinina); histopatološke (HE, PAS i J bojenje) i morfološke analize tkiva bubrega
IMA	200 mg/kg			
MMA	200 mg/kg			
CCl ₄	1 ml/kg	1 doza		
IMA + CCl ₄	IMA (200 mg/kg, <i>i.p.</i>) 7 dana, svakodnevno + sedmog dana CCl ₄ (1 ml/kg, <i>i.p.</i>)			
MMA + CCl ₄	MMA (200 mg/kg, <i>i.p.</i>) 7 dana, svakodnevno + sedmog dana CCl ₄ (1 ml/kg, <i>i.p.</i>)			
Silimarin (SL) + CCl ₄	SL (100 mg/kg, <i>i.p.</i>) 7 dana, svakodnevno + sedmog dana CCl ₄ (1 ml/kg, <i>i.p.</i>)			

4.8.7. Uticaj IMA i MMA na nastanak lezija na sluznici želuca pacova izazvanih diklofenakom i etanolom

4.8.7.1. Dizajn eksperimenta

Dvadesetčetiri časa pre eksperimenta životinjama je bio zabranjen pristup hrani, ali ne i vodi. Životinje su podeljene u eksperimentalne grupe od kojih je svaka brojala po 5 jedinki.

4.8.7.2. Uticaj IMA i MMA na sluznicu zeluca

Pre eksperimenta u kojima je proučavano antiulcerozno dejstvo izopropil- i metil-*N*-metilantranilata, ispitan je njihov uticaj na sluznicu zeluca kada se životinjama daju samo ova dva jedinjenja (Tabela 4.4). Dvema grupama životinja su jedinjenja IMA i MMA data oralno (*p.o.*) u dozi 200 mg/kg t.m. Pet sati nakon aplikacije, životinje su žrtvovane injekcijom ketamina. Abdomen je otvoren srednjim rezom, gastro-hepatični ligamenti su isečeni, i izvađen je želudac, koji je zatim opran u ledeno hladnom rastvoru natrijum-hlorida i otvoren duž velike krivine. Nakon toga je želudac raširen, špenadloma pričvršćen za paraplastom ispunjenu *Petri*-jevu šolju i takav preparat je potopljen u 5% (w/w) rastvor formaldehida tokom 30 minuta. Za fotografisanje preparata, pored kojih je stavljen lenjir u cilju prostorne kalibracije, korišćen je *Nikon D3100* digitalni fotoaparatus.

4.8.7.3. Nastanak lezija zeluca pod dejstvom diklofenaka

Za potrebe eksperimenta oformljeno je osam grupa životinja. Prva je primila diklofenak (DC) u dozi 80 mg/kg t.m, *p.o.* (Seo *et al*, 2012), dok je druga 1 h pre diklofenaka primila ranitidin (100 mg/kg t.m.). Jedinjenja IMA i MMA su data pacovima preostalih 6 grupa u dozama 50, 100 i 200 mg/kg t.m, *p.o.*, 1 h pre diklofenaka. Četiri sata nakon davanja diklofenaka, životinje su žrtvovane i želuci su im izvađeni, isprani, fotografisani digitalnim fotoaparatom i fiksirani formalinom kako je opisano u prethodnom odeljku (4.8.7.2) (Tabela 4.4).

4.8.7.4. Nastanak lezija zeluca pod dejstvom etanola

Eksperiment je izvršen na način koji je opisan u 4.8.7.3, samo što je životinjama umesto diklofenaka oralno dat 1 ml apsolutnog etanola (ET) kao erozivnog sredstva (Sagradas *et al*, 2015) (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Ispitivanje uticaja IMA i MMA na nastanak lezija na sluznici želuca pacova izazvanih diklofenakom i etanolom

Supstanca	Doza	Tretman	Uzorkovan materijal	Analize
IMA	200 mg/kg	doza, <i>p.o.</i>	Tkivo želuca	Bodovanje stepena oštećenja želuca, morfometrijska i histopatološka (HE bojenje) analiza tkiva želuca
MMA	200 mg/kg			
Diklofenak (DC)	80 mg/kg			
Etanol (ET)	1 ml			
Ranitidin + diklofenak/etanol	Ranitidin (100 mg/kg, <i>p.o.</i>), a nakon 1 h DC (80 mg/kg, <i>p.o.</i>) ili ET (1 ml, <i>p.o.</i>)			
IMA + diklofenak/etanol	IMA (50/100/200 mg/kg, <i>p.o.</i>), a nakon 1 h DC (80 mg/kg, <i>p.o.</i>) ili ET (1 ml, <i>p.o.</i>)			
MMA + diklofenak/etanol	MMA (50/100/200 mg/kg, <i>p.o.</i>), a nakon 1 h DC (80 mg/kg, <i>p.o.</i>) ili ET (1 ml, <i>p.o.</i>)			

4.8.8. Biohemijske analize

Krv je centrifugirana tokom 15 minuta na 1500 rpm na 4 °C kako bi se dobio serum iz koga su određivani aspartattransaminaza (AST), alanintransaminaza (ALT), holesterol (Cho), ukupan (TB) i direktan bilirubin (DB), nivo uree i kreatinina. Ove analize urađene su pomoću *Olympus AU680 Chemistry-Immuno Analyzer (Olympus America Inc., Centerville, Pensilvanija, SAD)*.

4.8.9. Histopatološka ispitivanja jetre, bubrega i želuca

Za mikromorfološka ispitivanja isečci jetre, bubrega i želuca su neposredno nakon žrtvovanja životinja fiksirani puferovanim rastvorom formaldehida (10%, w/v). Nakon fiksacije, uzorci tkiva su dehidratirani rastvorom etanola različitih koncentracija (50-100%, v/v), ukalupljeni u parafin i sečeni pomoću rotacionog mikrotoma na isečke debljine od 4-5 μm. Dobijeni preseci su bojeni sledećim metodama:

a) Preseci jetre, bubrega i želuca bojeni su hematoksilinom i eozinom (HE) - vizualizacija morfoloških promena;

b) Preseci jetre i bubrega su bojeni perjodnom kiselinom/*Schiff*-ovim reagensom (fuksinska boja) (PAS bojenje) - histohemijska metoda bojenja za verifikaciju sadržaja glikogena;

c) Preseci bubrega podvrgnuti su *Jones*-ovom bojenju (J) (urotropin/srebro-nitrat/perjodna kiselina/*Schiff*-ov reagens) – metoda bojenja bazalnih membrana tubula i kapilara glomerula bubrega.

Svi preparati su posmatrani pod *Olympus BH2* svetlosnim mikroskopom (*Olympus America Inc., Centerville, Pensilvanija, SAD*).

Procena stepena oštećenja jetre i bubrega izazvanog ugljen-tetrahloridom izvršena je na osnovu morfoloških promena isečaka bojenih HE pri čemu je korišćen sledeći skor sistem stepena oštećenja: (-) za odsutnu leziju, (-/+) za minimalna oštećenja, (+) za blage promene, (++) za umerena oštećenja i (+++) za izražena oštećenja. Bodovani su infiltracija mononuklearnih ćelija, vakuolarna degeneracija, kongestija i nekroza u slučaju jetre, odnosno degeneracija tubula, nekroza tubula, infiltracija mononuklearnih ćelija i hijalini cilindri u slučaju bubrega.

4.8.10. Morfometrijska analiza tkiva bubrega i želuca

4.8.10.1. Morfometrijska analiza tkiva bubrega

Za kvantifikaciju promena utvrđenih histološkom analizom bubrežnog tkiva korišćena je morfometrijska analiza ispitivanih struktura bubrega (glomeruli, proksimalni i distalni tubuli i jedra ćelija intersticijuma bubrega). Posmatranje je vršeno pod svetlosnim mikroskopom *Leica DMR* (*Leica Microsystems AG, Veclar, Nemačka*), a analiza korišćenjem kompjuterskog programa *ImageJ* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Analizirani su uzorci tkiva bubrega nasumice odabranih životinja svake eksperimentalne grupe.

Isečki tkiva bubrega su bojeni hematoksilinom i eozinom i fotografisani digitalnim fotoaparatom čemu je uvećanje objektiva bilo 10. Analizirani su vidljivi glomeruli 10 nasumice odabranih vidnih polja korteksa bubrega jedne životinje. Pre svake analize vršena je prostorna kalibracija pomoću mikrometarskog lenjira i kalibracija optičke gustine. Na uočenim glomerulima određivani su sledeći morfometrijski parametri: glomerularna zona, velika i mala osa, perimetar, *Feret*-ov dijametar, cirkularnost i srednja optička gustina.

4.8.10.2. Morfometrijska analiza tkiva želuca

Morfometrijska analiza fotografisanih tkiva želuca je izvršena je pomoću *ImageJ* softvera (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Kalibracija rastojanja na svakoj fotografiji vršeno je lenjirom koji je fotografisan zajedno sa želucem. Mereni su sledeći morfometrijski parametri sluznice želuca: ukupna površina želuca, ukupna površina lezija (TAL – engl. *total area of lesions*), površina pojedinačnih lezija (AFL – engl. *area fraction of lesions*), srednja površina lezija (MLA – engl. *mean lesions' area*), perimetar (B – engl. *mean lesions' perimeter*), srednja cirkularnost lezija (Cir – engl. *mean lesions' circularity*) i srednji *Feret*-ov prečnik lezija.

4.8.11. Makroskopski pregled sluznice želuca

Kako bi se odredio procenat inhibicije nastanka ulcera izvršeno je bodovanje promena na sluzokoži na sledeći način (Mani *et al*, 2013): 0 – želudac uobičajene boje; 0,5 – hiperemija (crvenilo sluzokože); 1 – tačkaste ulceracije; 1,5 – hemoragijske trake; 2 – ulceracija; 3 – perforacija. Srednja vrednost „ulcer skora“ za svaku grupu je predstavljala indeks ulcera za datu eksperimentalnu grupu. Procenat inhibicije je izražen sledećom formulom:

Inhibicija ulcera (%) = $100 \times (\text{indeks ulcera za kontrolnu grupu} - \text{indeks ulcera za test grupu}) / \text{indeks ulcera za kontrolnu grupu}$

4.8. METABOLIZAM IZOPROPIL- I METIL-*N*-METILANTRANILATA KOD PACOVA

4.8.1. Analiza IMA i MMA i njihovih metabolita u urinu pacova

4.8.1.1. Dizajn eksperimenta

Životinje (pacovi *Wistar* soja) su nakon jednonedeljnog perioda adaptacije nasumice podeljenje u tri grupe, od kojih su dve bile eksperimentalne, a jedna kontrolna. Svaka grupa je brojala po 6 životinja. Životinje su individualno stavljane u metaboličke kaveze i imale su slobodan pristup hrani i vodi (*ad libitum*). Grupe 1 i 2 su tretirane jedinjenjima MMA i IMA (200 mg/kg t.m.), rastvorenim u maslinovom ulju, dok je kontrolna grupa tretirana maslinovim uljem 1 ml/kg t.m. Testirane supstance su životinjama date intraperitonealnom injekcijom (*i.p.*) jednom dnevno tokom 7 uzastopnih dana. Urin životinja sakupljan je dnevno, najmanje 4 sata nakon aplikacije supstanci, a uzorci urina su spajani u okviru grupe. Sedmog dana je ukupna zapremina urina iz grupe koja je tretirana jedinjenjem MMA iznosila 230 ml, a iz grupe tretirane jedinjenjem IMA 250 ml. Uzorci urina su čuvani na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize.

4.8.1.2. Enzimaska hidroliza glukuronida prisutnih u urinu

Enzimaska hidroliza urina izvršena je na način koji je opisao *Naito* sa saradnicima (1984). Uzorak urina (70 ml), čiji je pH podešen 0,1 M acetatnim puferom na pH 4,9, inkubiran je sa β -glukuronidazom na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ tokom 2 h.

4.8.1.3. Kiselo katalizovana hidroliza glukuronida prisutnih u urinu

U uzorak urina (70 ml) dodato je 15 ml koncentrovane HCl, reakciona smeša zagrevana 2 h na $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ uz mešanje, a zatim je uzorak neutralisan 10 M KOH (*Feng et al*, 2001)

4.8.1.4. Obrada hidrolizata

Jedan mililitar 40% fosfatnog pufera (pH 9) je dodat hidrolizovanom uzorku urina, nakon čega je uzorak ekstrahovan hloroformom. Gornji, vodeni, sloj je odbačen, a organski sloj je

ispran vodom. Organski sloj je prenesen u balon i uparen pod strujom azota, nakon čega je analiziran metodom GC-MS.

4.8.1.5. Obrada nehidrolizovanog uzorka urina

Nehidrolizovan uzorak urina je ekstrahovan dietil-etrom. Etarski ekstrakt je osušen preko anhidrovanog MgSO₄, sušilo je uklonjeno filtracijom, nakon čega je rastvarač uparen na sobnoj temperaturi.

Preparativno razdvajanje sastojaka urina izvršeno je pomoću gravitacione hromatografije na stubu (dužina 50 cm, prečnik 1,5 cm) *Sephadex*-a LH-20 (*Sigma-Aldrich*, Sent Luis, Mizuri, SAD). Kao eluent je korišćena smeša metanola i hloroforma u odnosu 1 : 1 (v/v).

4.8.2. Analiza IMA i MMA i njihovih metabolita u homogenatima organa pacova

4.8.2.1. Dizajn eksperimenta

Izopropil- i metil-*N*-metilantranilat, rastvoreni u maslinovom ulju, aplicirani su životinjama (pacovima *Wistar* soja) u dozi 2 g/kg t.m. (*i.p.*). Nakon 1 h životinje su žrtvovane injekcijom ketamina. Organi su izvađeni, isprani ledeno hladnim fiziološkom rastvorom, osušeni i čuvani na -80 °C do analize.

4.8.2.2. Analiza metil- i izopropil-*N*-metilantranilata i njihovih metabolita u pojedinim organima pacova

Organ (bubreg, jetra, mišićno tkivo butine, mozak, pluća, srce, slezina), prethodno izmerene mase, prenet je u tarionik i usitnjen skalpelom. Dodato je 3 ml zasićenog rastvora NaCl i kašičica kvarenog peska (*ca.* 5 g), nakon čega je ova smeša homogenizovana u tarioniku pistilom. Zatim je u tarionik dodato 10 ml dietil-etra, smeša homogenata i etra je promešana pistilom, a etarski sloj proceđen kroz sloj NaCl. Etarski ekstrakti su sakupljeni i osušeni preko anhidrovanog MgSO₄. Posle odvajanja sredstva za sušenje filtracijom, etar je uklonjen destilacijom na rotacionom-vakuuum uparivaču, na sobnoj temperaturi. U uzorak je dodat 1 ml rastvora internog standarda (naftalen u slučaju IMA i antracen u slučaju MMA) u etil-acetatu,

uzorak prenet u GC vijalu i analiziran metodom GC-MS. U cilju GC-MS kvantifikacije IMA, MMA i njihovih metabolita u ekstraktima homogenata organa pacova napravljena je serija standardnih rastvora IMA i MMA u etil-acetatu koncentracija 0,5, 0,1, 0,05, 0,01 i 0,005 mg/ml. U slučaju IMA kao interni standard korišćen je naftalen, a u slučaju MMA antracen, a koncentracije internih standarda odgovarale su koncentracijama IMA, odnosno MMA. Konstruisana je kalibraciona kriva zavisnosti površine ispod pikova i koncentracije IMA, MMA i internih standarda.

4.8.3. Inkubacija IMA i MMA sa homogenatom svinjske jetre

4.8.3.1. Inkubacija IMA i MMA sa supernatantom dobijenim nakon centrifugiranja homogenata svinjske jetre - Dizajn eksperimenta

Homogenat svinjske jetre (50%) dobijen je homogenizacijom 2,5 g jetre i 2,5 g fiziološkog rastvora. Homogenat je centrifugiran (*Velocity 18R: Bench-top Centrifuge, Dynamica, Salzburg, Austrija*) 20 min pri brzini 4000 rpm, a supernatantu, koji je prenet u epruvetu, dodato je 20 µl MMA ili IMA, smeša je promešana na *Vortex-u* i vršena je inkubacija 1,5 h na 37 °C. Nakon toga je smeša ekstrahovana dietil-etrom. Etarski ekstrakt je osušen preko anhidrovanog MgSO₄. Sredstvo za sušenje je odvojeno filtracijom, a etar je uklonjen destilacijom na rotacionom-vakuuum uparivaču, na sobnoj temperaturi.

4.8.3.2. Inkubacija IMA i MMA sa homogenatom svinjske jetre - Dizajn eksperimenta

U 50% homogenat svinjske jetre, pripremljen kao što je gore opisano, dodato je 20 µl IMA ili MMA, smeša je promešana na *Vortex-u* i vršena je inkubacija 1,5 h na 37 °C. Nakon toga je smeša centrifugirana 20 min na 4000 rpm. Supernatant je odvojen, a talogu je dodato još 2,5 ml fiziološkog rastvora, smeša je promešana i ponovo centrifugirana. Spojeni supernatanti su ekstrahovani dietil-etrom. Etarski ekstrakt je osušen preko anhidrovanog MgSO₄. Sredstvo za sušenje je odvojeno filtracijom, a etar je uklonjen destilacijom na rotacionom-vakuuum uparivaču, na sobnoj temperaturi.

4.9. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA

4.9.1. Statistička analiza podataka dobijenih u eksperimentima u kojima je ispitivana antinociceptivna aktivnost jedinjenja IMA, MMA i PMA, kao i mehanizam dejstva ovih supstanci na osećaj bola izazvanog toplotnim stimulusom kod miševa

Za statističku obradu podataka korišćen je kompjuterski program *GraphPad Prism* (ver. 5.03, *GraphPad Software Inc.*, San Diego, Kalifornija, SAD). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm SD. Statistička značajnost je utvrđena jednosmernom analizom varijanse (ANOVA – engl. *Analysis of Variance*) i *Bonferroni*-jevim testom. Kao statistički značajne uzimane su vrednosti verovatnoće (p) manje od 0,05.

4.9.2. Statistička analiza podataka dobijenih u eksperimentima u kojima je ispitivano dejstvo jedinjenja IMA i MMA na CNS, kao i njihovo hepato- i nefroprotektivno dejstvo

Za statističku obradu podataka korišćen je isti program, pri čemu je statistička značajnost utvrđena jednosmernom analizom varijanse (ANOVA) i *Tukey*-evim *post hoc* testom za višestruka poređenja. Kao statistički značajne uzimane su vrednosti verovatnoće (p) manje od 0,05.

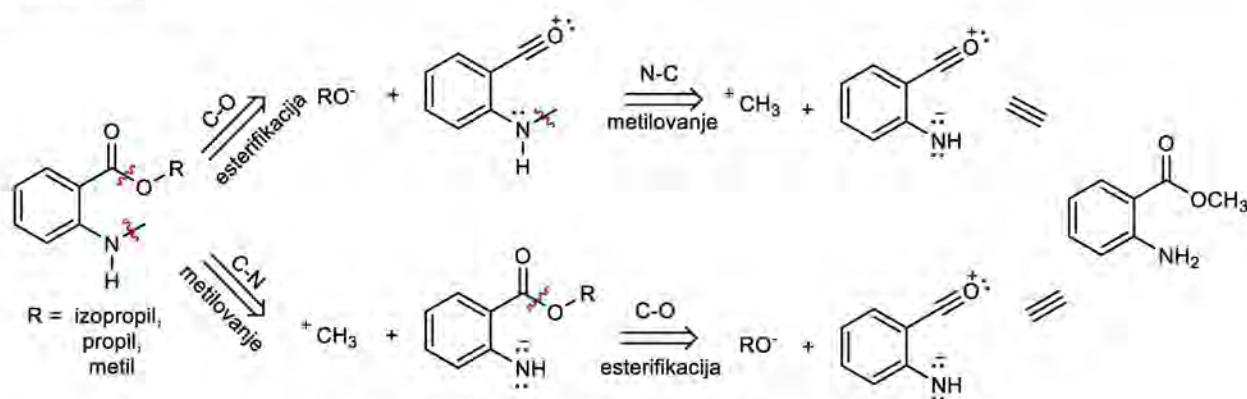
4.9.3. Statistička analiza podataka dobijenih ispitivanjem uticaja jedinjenja IMA i MMA na nastanak lezija želuca pacova usled dejstva diklofenaka i etanola

Statistički značajne razlike morfoloških parametara analiziranih grupa u eksperimentu u kome je ulcer želuca izazvan diklofenakom određene su jednosmernom analizom varijanse (ANOVA) i *Student-Newman-Keuls post hoc* testom u cilju procene dodatnih razlika između eksperimentalnih grupa. U eksperimentu u kome su lezije izazvane etanolom, korišćen je *Student*-ov *t*-test za nezavisne uzorke zbog malog broja grupa kod kojih je došlo do pojave lezija koje bi se mogle kvantifikovati i uporediti.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. OPTIMIZACIJA USLOVA SINTEZE IZOPROPIL-, METIL- I PROPIL-*N*-METILANTRANILATA

Mogućnost sinteze alkil-*N*-metilantranilata razmatrana je prema sledećoj retrosintetskoj šemi (slika 5.1.1).



Slika 5.1.1. Retrosintetska šema dobijanja alkil-*N*-metilantranilata

Prateći gore predloženu strategiju izvedena je sinteza izopropil- (IMA), propil- (PMA) i metil-*N*-metilantranilata (MMA). Metil-antranilat (MA), koji je komercijalno dostupan, korišćen je kao sintetski ekvivalent i elektrofilnog sintona u reakciji esterifikacije i nukleofilnog u reakciji metilovanja. Sinteza izopropil-*N*-metilantranilata iz metil-antranilata je pokušana primenom dve sekvence, transesterifikacija – metilovanje, odnosno metilovanje – transesterifikacija, pri čemu su optimizovani uslovi i jedne i druge reakcije. Transesterifikacija je vršena propanolom i izopropanolom, odnosno odgovarajućim alkoxidima. Kao sintetski ekvivalenti u reakciji metilovanja upotrebljeni su metil-jodid i formaldehid. Metilovanjem pomoću metil-jodida nisu postignuti zadovoljavajući rezultati, dok je upotrebom formaldehida uspešno izvršena sinteza *N*-metil estara antranilne kiseline. Metilovanjem metil-antranilata dobijen je metil-*N*-metilantranilat, dok je propil-*N*-metilantranilat sintetisan analogno izopropil-*N*-metilantranilatu.

5.1.1. Optimizacija uslova transesterifikacije metil-antranilata

Pokušana je transesterifikacija metil-antranilata izopropanolom u prisustvu H_2SO_4 , koja je dodata malo više u odnosu na jedan mol-ekvivalent metil-antranilata. Imajući u vidu reverzibilnost svih koraka ove reakcije, u cilju pomeranja ravnoteže ka proizvodu, alkohol je korišćen u velikom višku, kao rastvarač. Bez obzira na to, metodom GC-MS u rezultujućoj reakcionoj smeši nisu detektovani čak ni tragovi izopropil-antranilata. Utvrđeno je da se ona sastoji isključivo iz neizreagovanog reaktanta (celokupna količina metil-antranilata izolovana je iz reakcione smeše). Struktura metil-estra antranilne kiseline je potvrđena poređenjem njegovog masenog spektra sa spektrom iz WILEY10NIST2014baze. Pik u gasnom hromatogramu na retencionom vremenu (R_t) 12,914 min sa retencionim indeksom (RI) 1345 odgovarao je metil-antranilatu sa molekulskim jonom u masenom spektru $[M]^{+}$ na m/z (rel.int.) 151 (63,6%) i osnovnim jonom $[M - CH_3OH]^+$ na m/z 119 (100%). Jon $[M - COOCH_3]^+$ na m/z 92 (58,3%) bio je značajnijeg ineziteta. Pretpostavlja se da do transesterifikacije metil-antranilata izopropanolom nije došlo zato što je korišćeni alkohol veoma loš nukleofil. Na ovo ukazuje i nedostatak literaturnih podataka o transesterifikaciji estara antranilne kiseline sekundarnim ili tercijskim alkoholima (videti poglavlje 3.2.5).

Zatim je pokušana transesterifikacija metil-antranilata refluktovanjem (1 h) sa rastvorom natrijum-izopropoksida (10 mol-ekvivalenta), za koji se očekivalo da bude značajno nukleofilniji od prvobitno korišćenog alkohola. Prinos izopropil-antranilata bio je 2,0%, dok su ostatak činili proizvodi polikondenzacije metil-antranilata (GC-MS). Struktura izopropil-antranilata potvrđena je poređenjem njegovog masenog spektra sa spektrom iz pomenute baze. Pik na R_t 15,532 min (RI 1451) u gasnom hromatogramu odgovarao je izopropil-estru antranilne kiseline, sa molekulskim jonom $[M]^{+}$ na m/z 179 (30,2%) i osnovnim jonom $[M - (CH_3)_2CHOH]^+$ na m/z 119 (100%). Intenzivni joni u masenom spektru bili su i $[M - H_2C=CH-CH_3]^+$ na m/z 137 (32,9%), nastao *McLafferty*-jevom fragmentacijom i $[M - COOCH(CH_3)_2]^+$ na m/z 92 (29,9%). Prinos željenog proizvoda bio je vrlo nizak, bez obzira na to što je esterifikacija izvedena izopropoksidom, boljim nukleofilom od prvobitno korišćenog izopropanola. Kasnijim ponavljanjem ovog eksperimenta sa suvim izopropanolom, zaključeno je da je nizak prinos reakcije posledica saponifikacije izopropil-estra antranilne kiseline. Reakcijom vode, prisutne u izopropanolu, sa natrijumom, koji se dodaje u cilju generisanja natrijum-izopropoksida, nastaje natrijum-hidroksid, koji hidrolizuje estar do antranilne kiseline. Antranilna kiselina, u prisustvu

natrijum-izopropoksida i/ili natrijum-hidroksida se simultano prevodi u natrijum-antranilat, koji ostaje u vodenom sloju.

U cilju smanjenja hidrolize izopropil-antranilata, kao i sprečavanja sporednih polikondenzacionih reakcija, transesterifikacija metil-antranilata izopropoksidom vršena je mešanjem reakcione smeše na sobnoj temperaturi, a ne refluktovanjem, kao u prethodnom slučaju. Vreme odigravanja reakcije je optimizovano. Nakon 3 sata mešanja, utvrđeno je da se rezultujuća reakciona smeša sastojala iz 40,0% željenog proizvoda i 60,0% reaktanta (GC-MS). Rezultujućoj reakcionoj smeši je dodata nova porcija (2,17 mol-ekvivalenata) natrijum-izopropoksida i nastavljeno je sa mešanjem još 3 sata, radi prevođenja neizreagovanog metil-antranilata u željeni proizvod. Metodom GC-MS detektovano je 76,0% izopropil-antranilata i 24,0% metil-antranilata. Ista procedura (1 mol-ekvivalenta metil-antranilata i 2,17 mol-ekvivalenata natrijum-izopropoksida) je ponovljena, s tim što je mešanje na sobnoj temperaturi vršeno 6 sati. Dobijeni su vrlo slični rezultati.

Izolovana masa reakcione smeše (metil- i izopropil-antranilata) je bivala manja, što je vreme odigravanja reakcije bilo duže. Pretpostavlja se da do gubitka u masi dolazi usled paralelne saponifikacije ovih estara natrijum-hidroksidom iz reagensa. Kako bi se hidroliza željenog proizvoda sprečila, transesterifikacija metil-antranilata je vršena refluktovanjem 30 min sa natrijum-izopropoksidom, koji je dobijen rastvaranjem natrijuma u suvom izopropanolu (Furnis, 1989). S obzirom na egzotermnost reakcije (višak alkoksida + H₂O), reakciona smeša nije izlivena u vodu, već na usitnjeni led, da bi se sprečila hidroliza proizvoda, usled zagrevanja reakcione smeše, a u prisustvu vode. Prinos željenog proizvoda bio je 31,0%, a rezultujuća reakciona smeša se sastojala (GC-MS) iz oko 96,5% izopropil-antranilata i 3,5% metil-antranilata. Utvrđeno je i prisustvo antranilne kiseline u tragovima (< 0,05%) (GC-MS), što je značajno primetiti. Identitet antranilne kiseline je potvrđen ko-injekcijom standarda. U gasnom hromatogramu pik antranilne kiseline se javlja na 14,287 min (RI 1400). Molekulski jon [M]⁺ je u masenom spektru uočen na *m/z* 137 (58,5%), dok je *m/z* vrednost osnovnog jona [M – H₂O]⁺ 119 (100%). Jon značajnog inteziteta je [M – COOH]⁺ na *m/z* 92 (61,5%). Prisustvo izopropil-antranilata i metil-antranilata je potvrđeno na već opisan način.

Postupak transesterifikacije metil-antranilata suvim izopropanolom je ponovljen uz mešanje na sobnoj temperaturi, tokom 2 sata, bez refluktovanja, takođe u cilju sprečavanja hidrolize proizvoda. Rezultujuća reakciona smeša sadržala je 2,0% metil-antranilata, dok je ostatak činio izopropil-antranilat (GC-MS), koji je dobijen u prinosu 47,0%. Prinos reakcije transesterifikacije suvim natrijum-izopropoksidom je manji kada se reakciona smeša refluktuje,

nego kad se meša, jer je proces hidrolize estra izraženiji pri refluktovanju (pored transesterifikacije ubrzava se i saponifikacija).

5.1.2. Optimizacija uslova *N*-metilovanja metil-antranilata

Nukleofilna supstitucija: reakcija metil-jodida i metil-antranilata

Poznato je da se direktno alkilovanje amina, nukleofilnom supstitucijom alkil-L (gde je L neka dobra odlazeća grupa – engl. *leaving group*), retko zaustavlja na monoalkilovanju, pošto je proizvod svakog sledećeg stepena alkilovanja nukleofilniji od startnog materijala. Međutim, ova strategija je ipak pokušana prilikom *N*-metilovanja metil-antranilata, jer je uzeta u obzir voluminoznost metil-*N*-metilantranilata, prvog proizvoda metilovanja. Primenjena je standardna metoda alkilovanja aromatičnih amina. Natrijum-hidrogenkarbonat(1,00 mol-eq) neutrališe nastalu jodovodoničnu kiselinu. Dobijeni proizvod analiziran je metodom GC-MS, pri čemu je utvrđeno da se sastoji iz 32,0% smeše, u kojoj su metil-*N*-metil- i metil-*N,N*-dimetilantranilat zastupljeni približno u odnosu 5 : 1, dok je ostatak činio neizreagovani metil-antranilat. Zbog velike širine pikova i njihove blizine eluiranja (14,584 min (RI 1412) i 14,445 (RI 1406 min)), integracija gasnog hromatograma bila je otežana, pa je moguće samo proceniti zastupljenosti mono- i dimetilovanog metil-antranilata u reakcionoj smeši. Struktura metil-*N*-metilantranilata i metil-*N,N*-dimetilantranilata potvrđena je poređenjem njihovih masenih spektara sa spektrima iz WILEY10NIST2014 baze. Pik na Rt 14,584 min u gasnom hromatogramu odgovara metil-*N*-metilantranilatu, sa molekulskim jonom $[M]^{+}$ na m/z 165, koji je ujedno i osnovni jon (100%). Veoma intenzivni bili su i joni $[M - CH_3OH - CO]^{+}$ na m/z 105 (85,8%) i na $[M - CH_3 - H_2O - CO]^{+}$ m/z 104 (84,4%), a značajan je i intezitet jona $[M - CH_3 - H_2O]^{+}$ na m/z 132 (54,4%) i $[M - C_3H_6O_2N]^{+}$ na m/z 77 (47,9%). U gasnom hromatogramu pik koji odgovara metil-*N,N*-dimetilantranilatu se javlja na Rt 14,445 min, a molekulski jon $[M]^{+}$ u masenom spektru na m/z 179 (64,0%). Tri najintenzivnija jona u MS, veoma sličnog inteziteta, bila su: $[M - CH_3]^{+}$ na m/z 164 (100%), $[M - CH_3O]^{+}$ na m/z 148 (88,1%) i $[M - CH_3OH - CH_3]^{+}$ na m/z 132 (97,1%).

Pošto je u rezultujućoj reakcionoj smeši detektovano približno 5 puta više *N*-monometilovanog- nego *N,N*-dimetilovanog-metilantranilata, ali i 68,0% neizreagovanog reaktanta pokušano je metilovanje sa 3 puta više metil-jodida. Sastav dobijenog proizvoda i strukture jedinjenja (41,0% metil-*N*-metilantranilata, 31,0% metil-*N,N*-dimetilantranilata i 28,0%

metil-antranilata) određeni su na gore opisan način. Prinos metil-*N*-metilantranilata bio je 26,0%. Ni u ovom slučaju nije izvršena potpuna konverzija metil-antranilata u alkilovani proizvod.

Polazna pretpostavka, da se nukleofilna supstitucija metil-jodida metil-antranilatom zaustavlja na stepenu monometilovanja, jer je monometil-proizvod zbog voluminoznosti manje nukleofilan od startnog materijala, nije opravdana. U rezultujućoj reakcionoj smeši se pored metil-*N*-metilantranilata i neizreagovanog reaktanta, nalaze i znatne količine metil-*N,N*-dimetilantranilata.

Redukcija *in situ* generisanog imina pomoću NaBH₄

Drugi pokušaj metilovanja metil-antranilata bila je redukcija *in situ* generisanog imina metil-antranilata i formaldehida, pomoću NaBH₄. Kao izvor formaldehida korišćen je 35% rastvor formaldehida. Metodom GC-MS određeno je da se dobijeni proizvod sastojao iz imina i amina nastalih iz metil-antranilata i formaldehida (metil-*N*-metilenantranilat i metil-*N*-(hidroksimetil)antranilat). Zbog velike širine pikova, integracija gasnog hromatograma nije bila moguća, a utvrđeno je da je amina bio prisutan u velikom višku. Pik metil-*N*-metilenantranilata u TIC-u je uočen na 13,372 min (RI 1363). Struktura ovog jedinjenja je potvrđena na osnovu analize MS fragmentacije, s obzirom na to da u WILEY10NIST2014bazi nije postojao MS ovog jedinjenja. Molekulski jon [M]⁺ u MS se javlja na *m/z* 163 (30,3%), a osnovni jon [M – CH₃]⁺ na *m/z* 148 (100%). Značajnijeg inteziteta bili su i joni [M – CH₃O]⁺ na *m/z* 132 (33,8%), [M – C₂H₂O₂]⁺ na *m/z* 105 (40,9%) i [M – C₂H₄O₂N]⁺ na *m/z* 77 (57,1%). Pretpostavljeno je da veoma širok pik u gasnom hromatogramu (14,00 do 17,00 min) sa maksimumom na Rt ~ 15,15 min (RI 1435) potiče od amina. Do redukcije imina nije došlo zbog moguće nereaktivnosti imina (sterne smetnje), nepovoljne ravnoteže amina – imina, povoljnije (brže) hidrolize NaBH₄ i/ili redukcije formaldehida.

Isti postupak je ponovljen i sa paraformaldehydom da bi se obezbedio višak formaldehida u odnosu na stehiometrijsku količinu, a izbeglo dodavanje velike količine vode iz formalina. Kap HCl dodata je zbog ubrzavanja hidrolize paraformaldehyda do formaldehida. Proizvod, koji se istaložio tokom mešanja, od viška rastvora paraformaldehyda je odvojen ceđenjem, da se NaBH₄ ne bi nepotrebno trošio na redukciju formaldehida, koji bi se generisao iz viška paraformaldehyda. Dobijen je proizvod koji se sastojao iz imina i amina (GC-MS).

S obzirom na to da se redukuje imin, a da se reakciona smesa uglavnom sastojala iz amina, pokušana je dehidratacija amina do imina, zagrevanjem tokom 4 sata sa anhidrovanim

MgSO₄, uz redukciju pomoću NaBH₄, koji je dodat u smešu u velikom višku. Rezultujuća reakciona smeša se sastojala iz 39,0% metil-antranilata, 10,0% metil-*N*-metilantranilata, dok su ostatak činili aminor metil-antranilata i formaldehida (metil-*N*-(hidroksimetil)antranilat) i polikondenzacioni proizvodi (GC-MS). Pošto je dominantni sastojak reakcione smeše i dalje aminor, pokušana je simultana dehidracija i reakcija sa NaBH₄ zagrevanjem u toku 4 sata sa velikim viškom silika-gela 60. Metodom GC-MS je utvrđen sastav dobijenog proizvoda: 37,0% metil-*N*-metilantranilata, 29,0% metil-antranilata, a ostatak su činili aminor metil-antranilata i formaldehida (metil-*N*-(hidroksimetil)antranilat) i polikondenzacioni proizvodi.

Građenje imina metil-antranilata i formaldehida

U reakciji metil-antranilata i bilo kog izvora formaldehida neizbežno dolazi do građenja aminala. Pokušana je dehidracija proizvoda reakcije metil-antranilata i formalina, zagrevanjem, uz par kapi H₂SO₄, kao katalizatora. Reakcionoj smeši je dodat toluen i vršena je destilacija azeotropne smeše toluena i vode uz upotrebu nastavka po *Dean-Stark*-u. Utvrđeno je da se proizvod sastojao isključivo iz aminala (GC-MS). Dakle, dehidracija je bila neuspešna.

Blokiranje amino grupe metil-antranilata

Pokušano je i da se problem hemoselektivnosti metilovanja metil-antranilata reši metilovanjem njegovog blokiranog derivata. Smeša metil-antranilata i benzaldehida uz par kapi CH₃COOH, refluktovana je 9 sati. Međutim, do građenja imina nije došlo (metil-antranilat je voluminozan (loš) nukleofil).

Redukcija *in situ* generisanog imina cinkom

Izvršene su dve sinteze metil-*N*-metilantranilata redukcijom *in situ* generisanog imina cinkom, na osnovu rada koji je objavio *da Silva* sa saradnicima (2007). U prvoj je odnos metil-antranilata i formaldehida bio 1:1,5, a reakciona smeša je mešana 5 sati na sobnoj temperaturi. Prinos željenog proizvoda je bio 65,0%. Sastav rezultujuće reakcione smeše: 74,0% metil-*N*-metilantranilata, 15,0% metil-*N,N*-dimetilantranilata i 7,0% neizreagovanog metil-antranilata, određen je metodom GC-MS. U drugoj sintezi smeša metil-antranilata i formaldehida u odnosu 1:1,1 zagrevana je 4 sata na 50 – 60 °C. Prinos neizolovanog metil-*N*-metil antranilata bio je

70,0%. Pored njega u dobijenoj smeši nalazilo se 9,0% metil-*N,N*-dimetilantranilata i 10,0% metil-antranilata (GC-MS).

5.1.3. *N*-metilovanje izopropil-antranilata

Pokušano je metilovanje izopropil-antranilata redukcijom *in situ* generisanog imina izopropil-antranilata (1 mol-eq) i formaldehida (1,1 mol-eq) pomoću cinka. Uslovi reakcije su bili analogni uslovima opisanim u postupku 4.4.1.2 – 9. Sastav rezultujuće reakcione smeše bio je: 51,0% izopropil-*N*-metilantranilata, 0,5% izopropil-*N,N*-dimetilantranilata i 34,5% izopropil-antranilata (GC-MS).

Maseni spektar izopropil-*N*-metilantranilata slagao se sa spektrom iz WILEY10NIST2014baze. Pik na retencionom vremenu (Rt) 17,057 min (RI 1515) u gasnom hromatogramu odgovarao je izopropil-*N*-metilantranilatu, sa molekulskim jonom $[M]^{+}$ na m/z 193 (53,8%) i osnovnim jonom $[M - H_2C=CH-CH_3 - H_2O - CO]^+$ na m/z 105 (100%). Još tri jona u masenom spektru su bila značajnog intenziteta: jon $[M - H_2C=CH-CH_3]^+$ na m/z 151 (62,3%), nastao *McLafferty*-jevom fragmentacijom, $[M - H_2C=CH-CH_3 - H_2O]^+$ na m/z 133 (37,3%) i $[M - H_2C=CH-CH_3 - H_2O - CO - H]^+$ na m/z 104 (57,6%). Identifikacija izopropil-antranilata izvršena je na već opisan način, dok u bazi nije postojao maseni spektar za jedinjenje sa retencionim vremenom (Rt) 16,731 min (RI 1500). Pretpostavljeno je da je reč o izopropil-*N,N*-dimetilantranilatu pošto se pik na najvećoj vrednosti m/z u masenom spektru ovog jedinjenja $[M]^{+}$ nalazi na m/z 207 (38,0%), što odgovara molekulskoj masi izopropil-*N,N*-dimetilantranilata ($C_{12}H_{17}O_2N$). Identitet je potvrđen pikovima u masenom spektru na određenim vrednostima m/z , koje su odgovarale molekulskim masama jona, za koje je pretpostavljeno da nastaju fragmentacijom ovog jedinjenja. Osnovni jon $[M - (CH_3)_2CH]^+$ javlja se na m/z 164 (100%). Sledeći joni u MS-u su bili značajnog inteziteta: $[M - (CH_3)_2CHO]^+$ na m/z 148 (56,1%), $[M - H_2C=CH-CH_3 - CH_3OH - H]^+$ na m/z 132 (58,0%), $[M - H_2C=CH-CH_3 - H_2O - CO - H]^+$ na m/z 118 (42,7%), $[M - H_2C=CH-CH_3 - CH_3OH - CO]^+$ na m/z 105 (18,9%), $[M - (CH_3)_2CHCOO - C_2H_5]^+$ na m/z 91 (31,7%) i $[M - (CH_3)_2CHCOO - C_2H_5N]^+$ na m/z 77 (28,9%).

Nizak prinos *N*-metilovanja izopropil-antranilata najverovatnije je posledica voluminoznosti supstrata. Voluminozna $-COO^iPr$ grupa čini amino grupu izopropil-antranilata manje nukleofilnom u reakciji metilovanja. Pretpostavljeno je da bi se bolji rezultati mogli

postići zamenom redosleda izvođenja reakcija, tj. transesterifikacijom metil-*N*-metilantranilata izopropoksidom.

5.1.4. Transesterifikacija metil-*N*-metilantranilata izopropoksidom

Transesterifikacija metil-*N*-metilantranilata izopropoksidom je izvršena uz zagrevanje do refluksa u toku 20 minuta. Prinos neizolovanog izopropil-*N*-metilantranilata bio je 51,0%. Njegova struktura je potvrđena na gore opisan način. U rezultujućoj reakcionoj smeši nalazilo se i 12,0% izopropil-antranilata, 5,0% izopropil-*N,N*-dimetilantranilata, 6,0% metil-*N,N*-dimetilantranilata i 2,5% metil-*N*-metilantranilata.

Pretpostavka da se bolji rezultati mogu postići transesterifikacijom metil-*N*-metilantranilata izopropoksidom, u odnosu na metilovanje izopropil-antranilata, bila je opravdana.

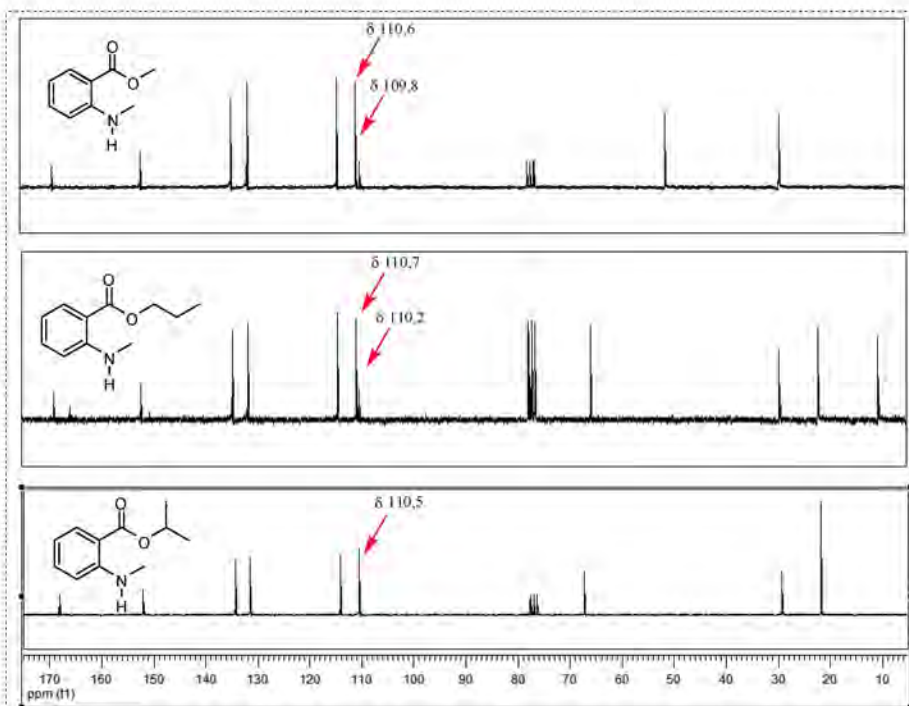
5.1.5. Transesterifikacija metil-*N*-metilantranilata *n*-propoksidom

Transesterifikacija metil-*N*-metilantranilata *n*-propoksidom je vršena uz zagrevanje do refluksa u toku 10 minuta. Vreme odigravanja reakcije kraće je nego u prethodnom slučaju, jer je primarni *n*-propoksid nukleofilniji od sekundarnog izopropoksida. Prinos neizolovanog propil-*N*-metilantranilata bio je 59,0%. Pik na retencionom vremenu (R_t) 18,734 min (RI 1586) u gasnom hromatogramu odgovara propil-*N*-metilantranilatu, što je potvrđeno poređenjem masenog spektra ovog jedinjenja sa spektrom iz WILEY10NIST2014baze. Maseni spektri propil- i izopropil- estra *N*-metilantranilne kiseline su veoma slični, s obzirom da je reč o izomerima, jedino se razlikuju po intezitetima pojedinih pikova. Ova dva jedinjenja imaju različita retencionna vremena (R_t propil-*N*-metilantranilata je 18,734 min, a izopropil-*N*-metilantranilata 17,057 min), odnosno retencione indekse (RI propil-*N*-metilantranilata je 1586, a izopropil-*N*-metilantranilata 1515), na osnovu čega ih je moguće razlikovati. U rezultujućoj reakcionoj smeši nalazilo se i 15,0% propil-antranilata, 9,0% propil-*N,N*-dimetilantranilata i 0,4% metil-*N*-metilantranilata. Maseni spektri propil- i izopropil-antranilata su gotovo identični, ali se njihova retencionna vremena (17,140 i 15,532 min, redom) i retencioni indeksi (1518 i 1451), znatno razlikuju, na osnovu čega je i utvrđen identitet propil estra antranilne kiseline. Takođe je i propil-

N,N-dimetilantranilat identifikovan na osnovu masenog spektra, vrlo sličnog masenom spektru izopropil-*N,N*-dimetilantranilata, a različitog retencionog vremena. Retenciono vreme propil-*N,N*-dimetilantranilata je 18,224 min (RI 1565), a izopropil-*N,N*-dimetilantranilata 16,731 min (RI 1500).

5.2. ASIGNACIJA SPEKTARA IZOPROPIL-, METIL- I PROPIL-*N*-METILANTRANILATA

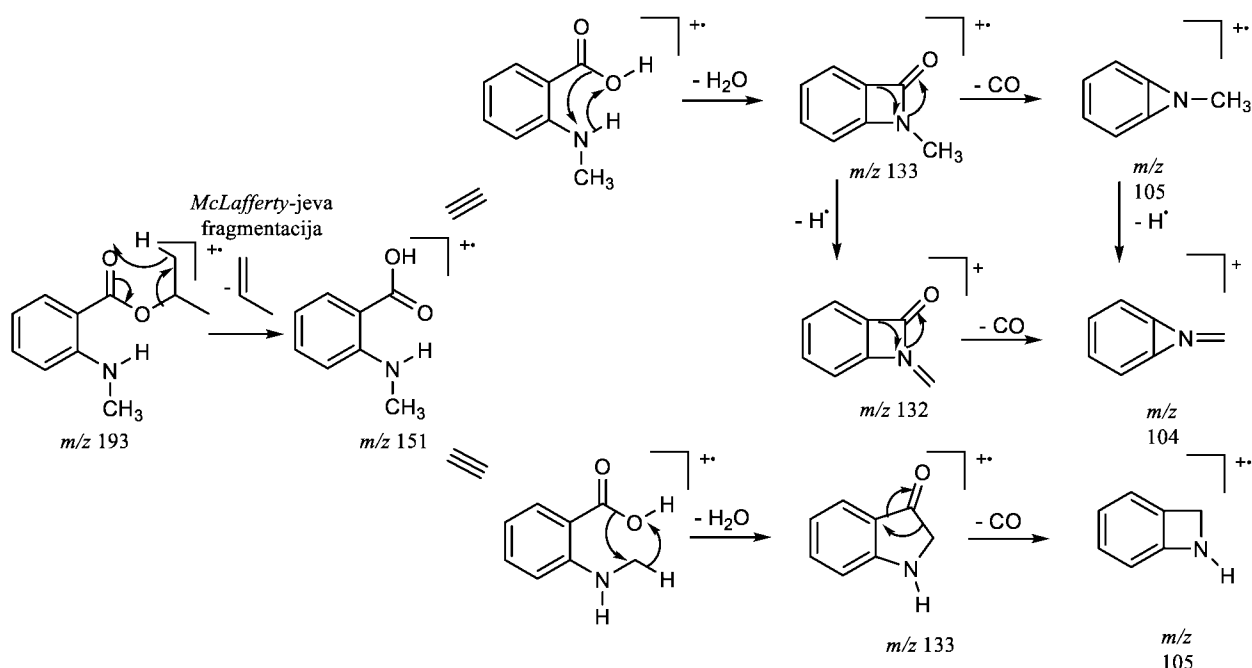
Jedinjenje (žućkasta, tečna supstanca), za koje je pretpostavljeno da je izopropil-*N*-metilantranilat, eluira sa GC kolone na retencionom vremenu 17,057 min. Preliminarna potvrda strukture izvršena je poređenjem njegovog masenog spektra sa spektrom iz WILEY10NIST2014baze. Molekulski jon $[M]^{+}$ se nalazio na m/z 193 u masenom spektru, što odgovara molekulskoj masi izopropil-*N*-metilantranilata ($C_{11}H_{15}O_2N$). Neparna m/z vrednost molekulskog jona potvrđuje da je u analiziranom jedinjenju prisutan neparan broj azotovih atoma. ^{13}C NMR spektar sadržao je signale za 9 neekvivalentnih ugljenikovih atoma. Dva signala na δ 21,8 i 29,3 se nalaze u oblasti zasićenih ugljenikovih atoma, jedan (δ 67,2) odgovara zasićenom ugljenikovom atomu koji je direktno vezan za kiseonik, pet signala, u oblasti δ od 110,5 do 152,0, odgovaraju sp^2 hibridizovanim ugljenikovim atomima, a jedan (δ 168,2) karbonilnom ugljeniku. Kako se u ^{13}C NMR spektru izopropil-*N*-metilantranilata očekuje deset signala (dve metil grupe u izopropil grupi su ekvivalentne), sledi da su signali dva C-atoma slučajno izohroni. Poređenjem ovog spektra sa spektrima metil- i propil- estara *N*-metilantranilne kiseline lako se uočava (razlika, koja se ne tiče alkoholnog dela molekula) da signal na δ 110,5 zapravo potiče od dva ugljenika (slika 5.2.1).



Slika 5.2.1. Poređenje ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) spektara izopropil-, propil- i metil-*N*-metilantranilata.

Signali na $\delta \sim 110,5$ su označeni strelicama

Kao što je već rečeno, preliminarna potvrda strukture izopropil-*N*-metilantranilata izvršena je poređenjem njegovog masenog spektra se spektrom iz baze. Osnovni jon se nalazio na m/z 105, dok su još tri jona, na m/z 151, 133 i 104, bila značajnijeg intenziteta. Pik na m/z 151 mogao bi da se pripiše jonu *N*-metilantranilne kiseline, koja nastaje iz osnovnog jona *McLafferty*-jevom fragmentacijom $[M - H_2C=CH-CH_3]^+$ (slika 5.2.2). Razlika u masi između jona na m/z 151 i 133, je 18 i odgovara eliminaciji vode iz *N*-metilantranilne kiseline. Gubitkom radikala H^\bullet iz jona na m/z 133 nastaje jon na m/z 132, iz kojeg se eliminacijom CO, formira jon na m/z 104. Pik osnovnog jona se nalazi na vrednosti m/z za 28 manjoj od jona na m/z 133, što bi odgovaralo gubitku CO. Još jedna mogućnost za nastanak jona na m/z 104 je eliminacijom H^\bullet iz osnovnog jona. Predložena fragmentacija (slika 5.2.2) potvrđuje da je u analiziranom jedinjenju prisutna $-COOC_3H_7$ grupa i slaže se sa fragmentacijom koju je za *n*-butil-*N*-metilantranilat dao *Teeter* (1966).

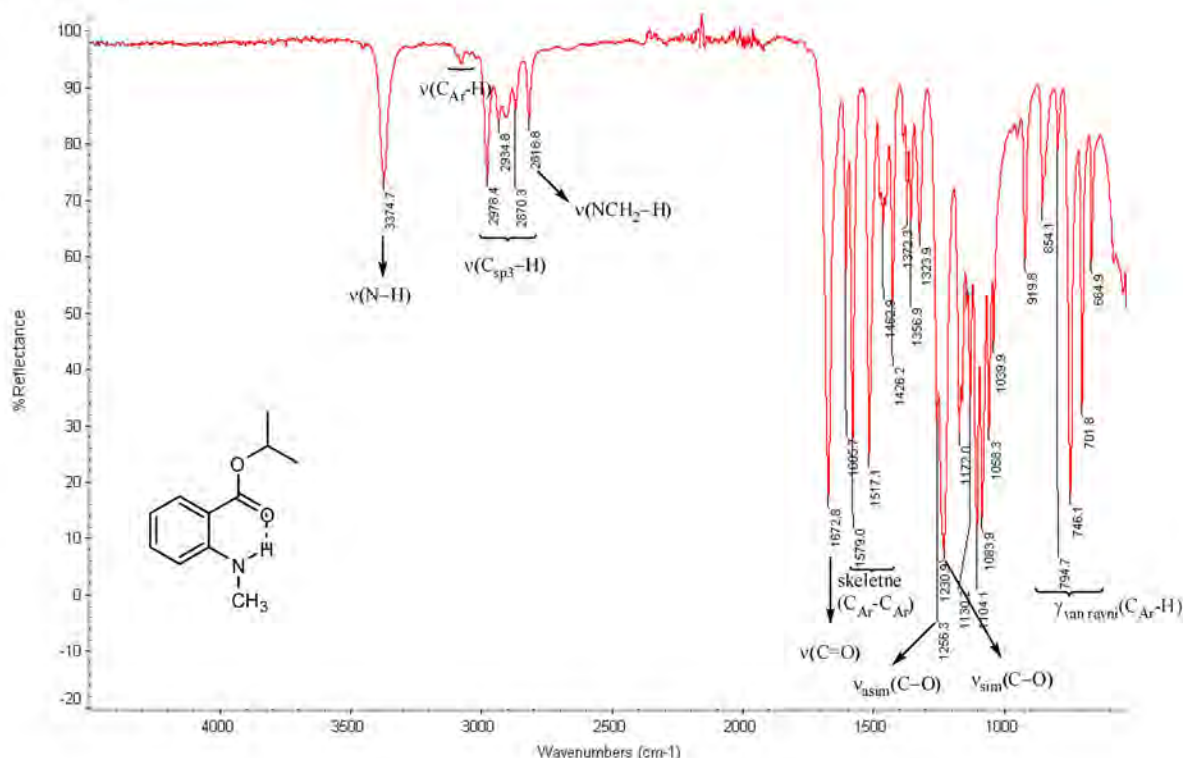


Slika 5.2.2. Predložena MS fragmentacija izopropil-*N*-metilantranilata
(osnovni jon na m/z 105 i joni značajnijeg inteziteta na m/z 151, 133 i 104)

Prisustvo karbonilne grupe u analiziranom jedinjenju potvrđuje i signal u ^{13}C NMR spektru na δ 168,2. U IR spektru (slika 5.2.3), u oblasti karakterističnoj za apsorpciju karbonilne grupe, uočena je intenzivna traka na $1672,8\text{ cm}^{-1}$, koja je poređenjem sa tabličnim vrednostima (Clerc i Simon, 1982), pripisana valencionoj $C=O$ vibraciji estra sa intramolekulskom vodoničnom vezom. Još dve trake, jača na $1256,3$ i slabija na $1230,9\text{ cm}^{-1}$, koje potiču od asimetrične i simetrične valencione $C-O$ vibracije, odlika su estrske funkcionalne grupe. Oštra

traka, srednjeg inteziteta, na $3374,7\text{ cm}^{-1}$, pripisana je valencionim N-H vibracijama sekundarnih amina, koji nisu intermolekulski vodonično vezani (u ovoj oblasti javljaju se i valencione trake asocirane O-H grupe, ali su one široke).

Kod antranilne kiseline asimetrična NH_2 valencionna vibracija se javlja u oblasti $3518\text{--}3525\text{ cm}^{-1}$, a simetrična u oblasti $3382\text{--}3395\text{ cm}^{-1}$ (Nyquist, 2001). Razlika talasnih brojeva asimetrične i simetrične vibracije od 123 cm^{-1} sugeriše da jedan N-H proton učestvuje u građenju intramolekulske vodonične veze sa karbonilom. Valencione N-H \cdots O=C vibracije *N*-metilantranilne i *N*-fenilantranilne kiseline se javljaju na 3392 , odnosno 3348 cm^{-1} . Posledica građenja vodonične veze je slabljenje kovalentnih veza u akceptoru i donoru, što smanjuje konstantu sile, odnosno talasni broj valencionih vibracija (Milosavljević, 1994), pa se sa jačinom vodonične veze, talasni broj valencionih vibracija smanjuje. Zbog elektron-akceptorskog efekta fenil grupe, intramolekulska vodonična veza N-H \cdots O=C *N*-fenilantranilne kiseline je jača, pa pokazuje apsorpcionu traku na nižim talasnim brojevima, u poređenju sa *N*-metilantranilnom kiselinom.



Slika 5.2.3. Asignacija IR (*neat*, ATR) spektra izopropil-*N*-metilantranilata

Vrednost talasnog broja valencione N-H vibracije izopropil-*N*-metilantranilata je između vrednosti valencionih vibracija *N*-metilantranilne i *N*-fenilantranilne kiseline, što ukazuje da je

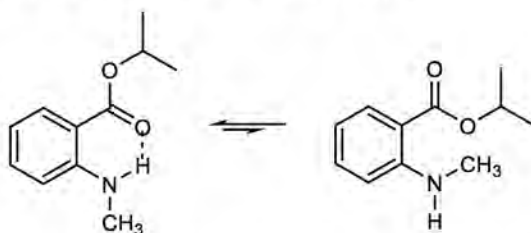
intramolekulska vodonična veza analiziranog jedinjenja jača od intramolekulske vodonične veze *N*-metilantranilne kiseline, a slabija od *N*-fenilantranilne kiseline.

Uticao vodonične veze i +R efekta *N*-metilamino grupe, na apsorpciju karbonilne grupe izopropil-*N*-metilantranilata, uočava se poređenjem vrednosti talasnog broja valencione C=O vibracije izopropil-*N*-metilantranilata ($1672,8\text{ cm}^{-1}$) sa vrednošću za izopropil-benzoat (1719 cm^{-1} , CCl_4 rastvor) (http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi). Pomenuti uticaji, kojih nema kod izopropil-benzoata, smanjuju elektronsku gustinu C=O veze izopropil-*N*-metilantranilata i pomeraju talasni broj karbonilne vibracije ovog jedinjenja ka manjim vrednostima.

Apsorpciona traka ν (C=O) se u IR spektru etil-4-aminobenzoata (benzokain) javlja na talasnim brojevima 1678 cm^{-1} (KBr pilula) i 1734 cm^{-1} (gasna faza) (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>). S obzirom na to da je +R uticaj amino grupe, koja je u *p*-položaju u odnosu na estarsku funkcionalnu grupu, isti, bez obzira na agregatno stanje uzorka, ova razlika u talasnim brojevima se pripisuje intermolekulskim vodoničnim vezama, koje se javljaju kada se uzorak snima u čvrstom stanju (kao KBr pilula), a nema ih u parnoj fazi. Talasni broj valencionih C=O vibracija izopropil-*N*-metilantranilata ($1672,8\text{ cm}^{-1}$) javlja se na nešto manjoj vrednosti u poređenju sa etil-4-aminobenzoatom, kod koga postoje intermolekulske vodonične veze. Niži talasni broj se može pripisati jačoj intramolekulske vodoničnoj vezi izopropil-*N*-metilantranilata, kod kog vodonično vezani oblik formira šestočlani prsten u kome postoji konjugovani sistem (slika 5.2.3). Inkrement u talasnom broju za intramolekulske vodonične veze jednak je razlici talasnih brojeva etil-4-aminobenzoata (u gasnoj fazi) i izopropil-*N*-metilantranilata i iznosi oko 61 cm^{-1} .

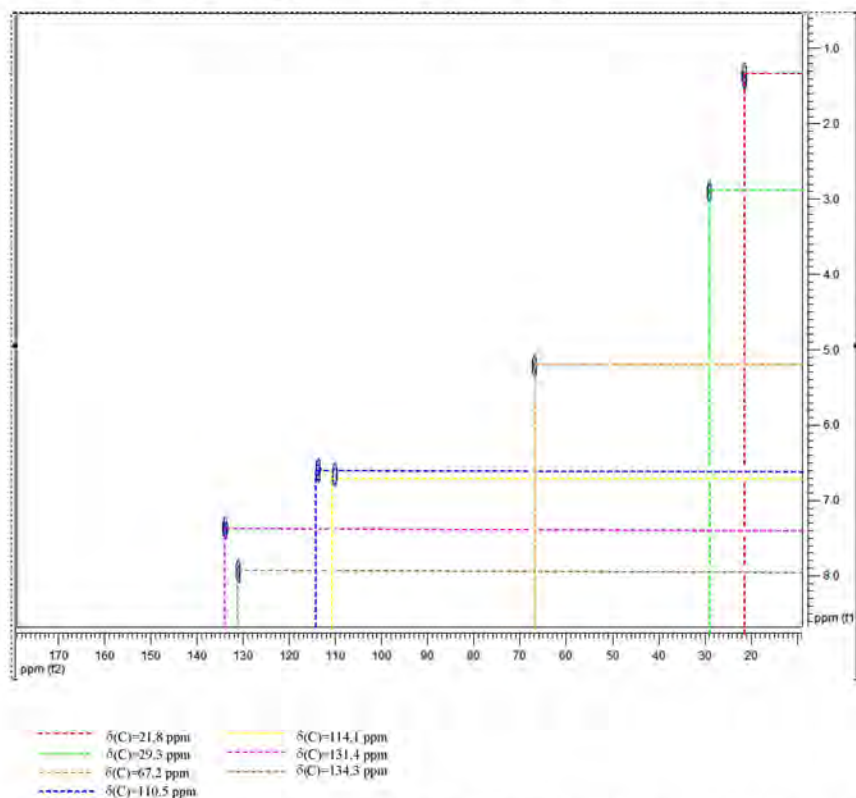
Širok signal u ^1H NMR spektru na $\delta 7,75$ potiče od protona koji je direktno vezan za azotov atom, a širina pika posledica je građenja vodonične veze. Naime, u rastvorima supstanci u nepolarnom rastvaraču, kakav je CDCl_3 , postoji ravnoteža između slobodnog i vodonično vezanog amina (slika 5.2.4) (Milosavljević, 1994). Proces konverzije između ova dva oblika je veoma brz, pa NMR spektrometar registruje prosečno stanje. U spektru se dobija samo jedan signal za N-H, čije je pomeranje između pomeranja za slobodni i vodonično vezan amin. Vodonično vezani protoni, koji učestvuju u vodoničnoj vezi, oseća elektronegativan uticaj dva atoma, čime se smanjuje elektronska gustina posmatranog protona. Vodonično vezani protoni zato imaju veće hemijsko pomeranje od istih protona u slobodnom obliku. Pomeranje δ N-H je visoko, što ukazuje da u snimanom rastvoru dominira vodonično vezani oblik. Iz HETCOR spektra (C-H

sprezanje kroz jednu vezu) se vidi da se proton na δ 7,75 ne kupluje ni sa jednim ugljenikovim atomom, što je dodatna potvrda da je direktno vezan za azot.



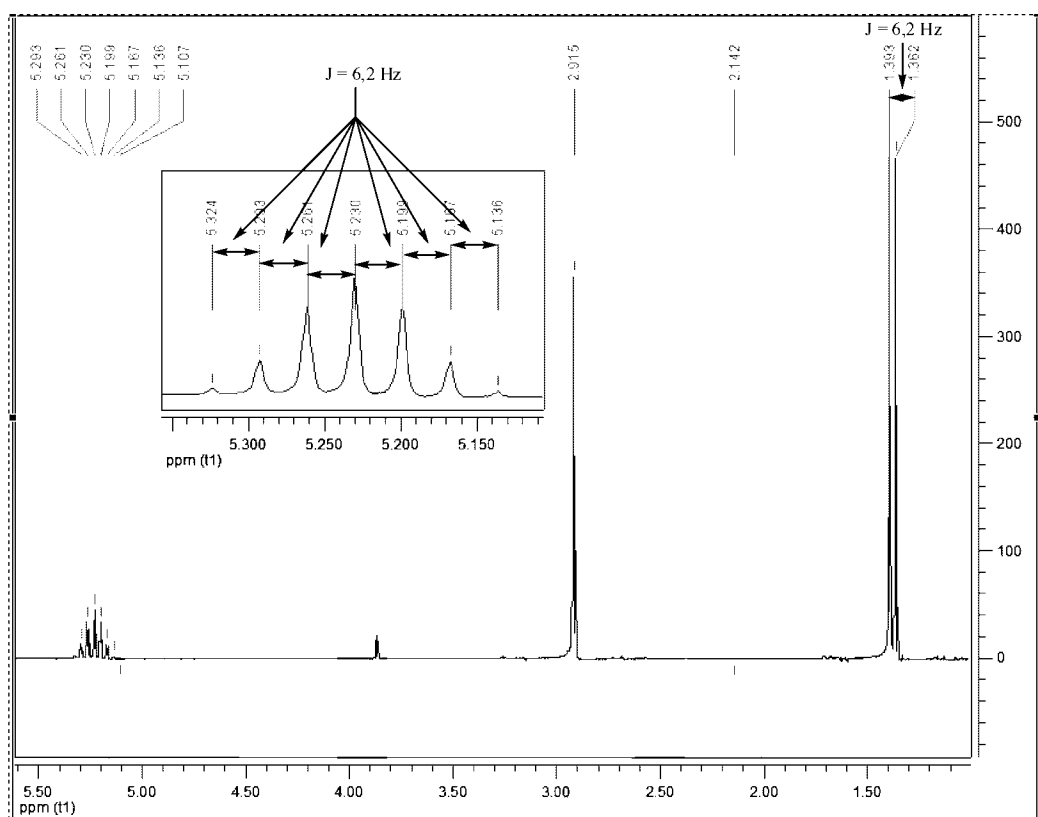
Slika 5.2.4. Ravnoteža između intramolekulski vodonično vezanog oblika izopropil-*N*-metilantranilata i oblika u kome nema vodoničnih veza

U ^{13}C NMR spektru, u oblasti signala zasićenih ugljenikovih atoma, nalaze se dva signala na 21,8 i 29,3 ppm. Kako elektronegativni atomi smanjuju elektronsku gustinu na α -ugljeniku, čime se smanjuje lokalna dijamagnetna zaštita (engl. *deshielding effect*) i povećava hemijsko pomeranje C-atoma, signal na većem hemijskom pomeranju (δ 29,3) pripisan je metil grupi, direktno vezanoj za azot, a signal na 21,8 ppm hemijski ekvivalentnim ugljenikovim atomima izopropil grupe. Na osnovu HETCOR spektra (slika 5.2.5) zaključeno je da su za ugljenik na 29,3 ppm vezani protoni, koji u ^1H NMR spektru daju signal na 2,92 ppm (singlet, sa integralom 3) (slika 5.2.6). Integral ovog signala potvrđuje da je reč o tri protona, a multiplitnost da u njihovom susedstvu ne postoje drugi protoni sa kojima bi se skalarno sprežali.

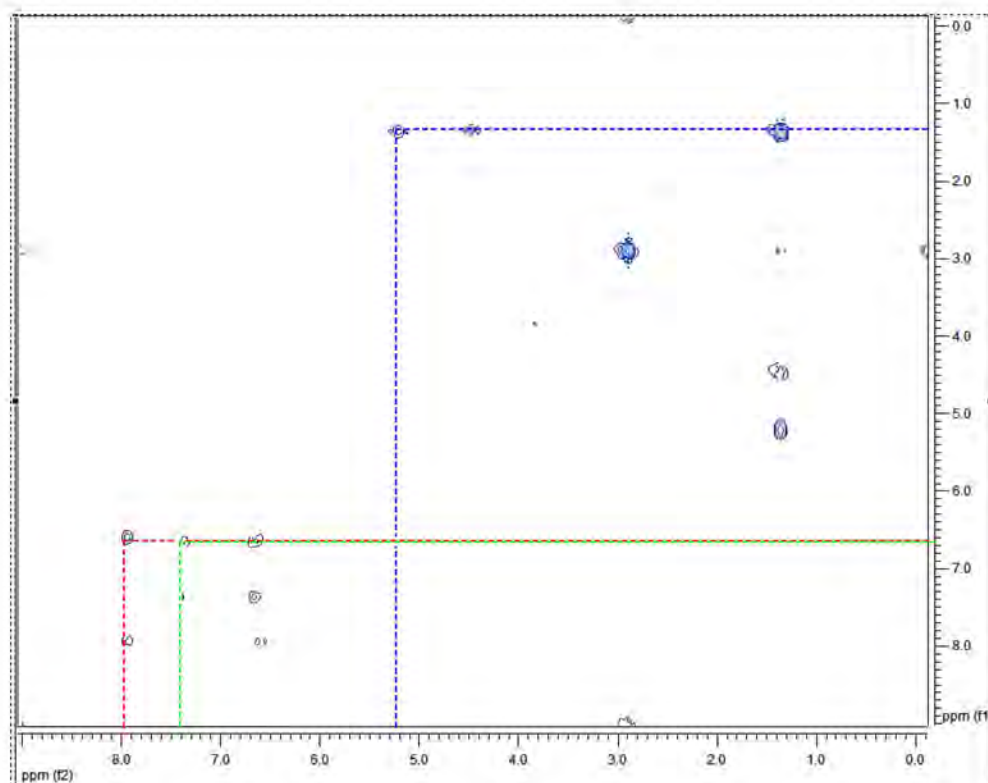


Slika 5.2.5. HETCOR (^1H - 200 MHz, ^{13}C - 50 MHz, CDCl_3) spektar izopropil-*N*-metilantranilata

Iz HETCOR spektra (slika 5.2.5) se vidi da su za C na 21,8 ppm vezani protoni, koji daju dublet, na δ 1,38, sa integralom šest (slika 5.2.6), što ukazuje na prisustvo dve ekvivalentne metil grupe. Multipletnost ovog signala ukazuje na prisustvo jednog protona sa kojim se posmatrani proton vicinalno kupluje, J 6,2 Hz. ^1H - ^1H COSY spektar (skalarno sprezanje H - H) (slika 5.2.7) potvrđuje da se protoni izopropil grupe sprežu sa protonom na δ 5,23, koji u ^1H NMR spektru daje septuplet, sa jediničnim integralom, što je potvrđeno i NOESY spektrom (sprezanje kroz prostor). U HETCOR spektru se vidi da je ovaj proton vezan za ugljenik, koji u ^{13}C NMR spektru daje signal u oblasti sp^3 hibridizovanih ugljenika koji su direktno vezani za kiseonik, na δ 67,2. Svi ovi podaci potvrđuju da alkoholni deo estra potiče od izopropanola.

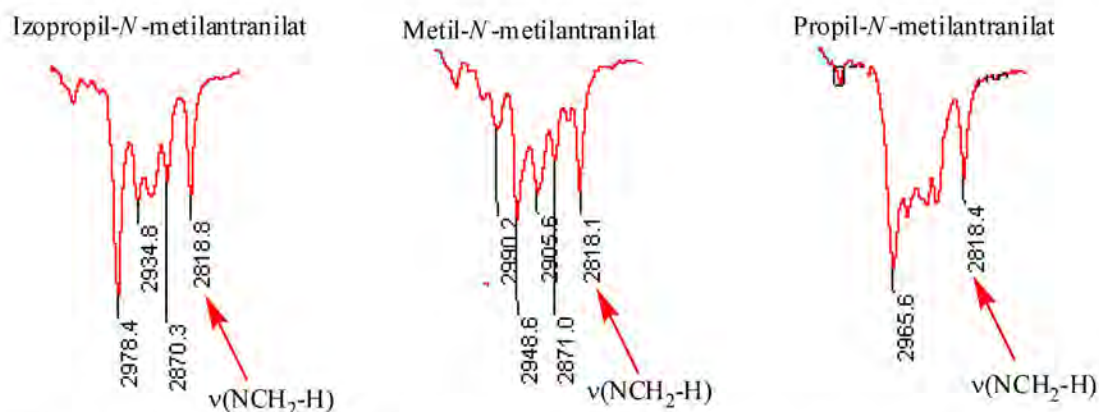


Slika 5.2.6. Deo ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) spektra izopropil-*N*-metilantranilata na $\delta < 5,50$, u kome se javljaju signali protona vezanih za $\text{C-}sp^3$, sa uvećanjem septupleta na δ 5,23



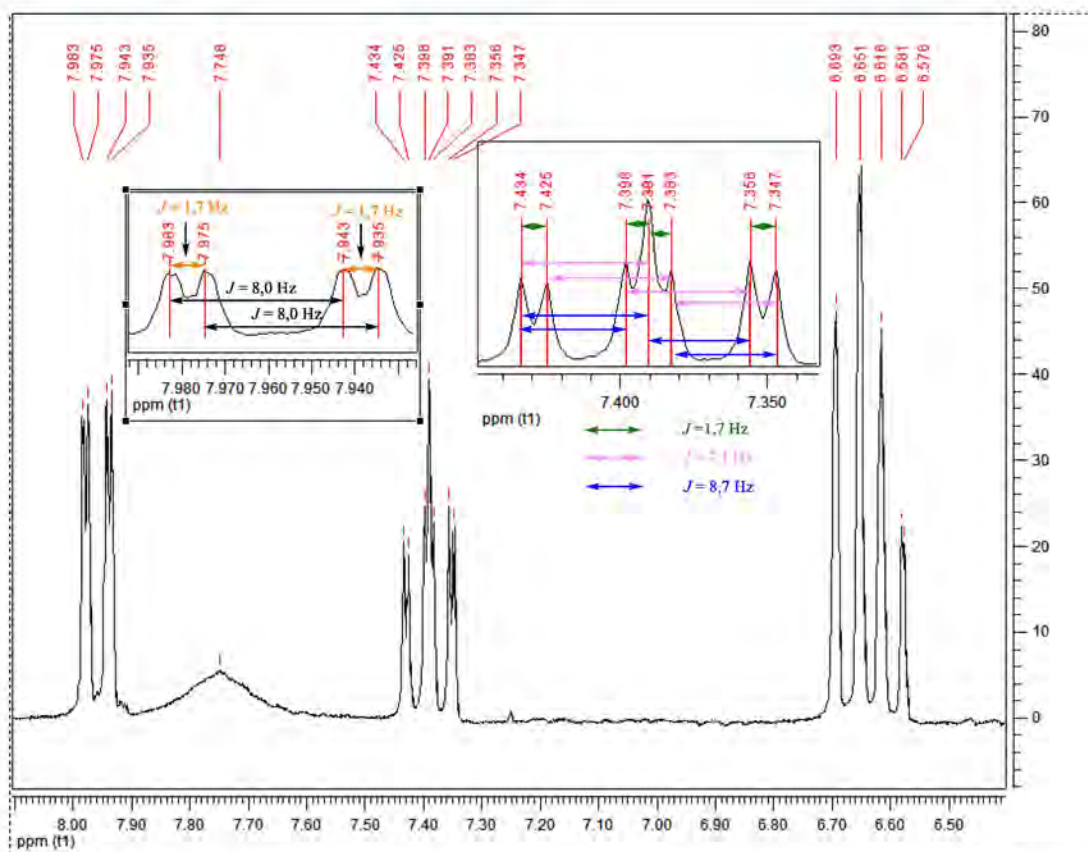
Slika 5.2.7. ^1H - ^1H COSY (200 MHz, CDCl_3) spektar izopropil-*N*-metilantranilata

Valencione $\text{Csp}^3\text{-H}$ vibracije se u IR spektrima nalaze u oblasti nešto nižoj od 3000 cm^{-1} (Milosavljević, 1994). Poređenjem delova IR spektara u oblasti talasnih brojeva od 2818 do 2990 cm^{-1} izopropil-, propil- i metil-*N*-metilantranilata (slika 5.2.8) može se uočiti da je u sva tri spektra prisutna traka (sličnog izgleda i inteziteta) na vrlo bliskim vrednostima talasnog broja ($2818,8$, $2818,4$ i $2818,1\text{ cm}^{-1}$, redom), dok se izgled i talasni brojevi ostalih traka u ovoj oblasti spektara pomenutih estara *N*-metilantranilne kiseline znatno razlikuju. Na osnovu ovoga je traka na $2818,8$ u spektru izopropil-*N*-metilantranilata pripisana valencionoj C-H vibraciji *N*-metil grupe.

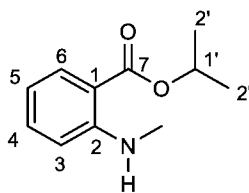


Slika 5.2.8. Delovi IR (*neat*, ATR) spektara izopropil-, metil- i propil-*N*-metilantranilata u kojima se javljaju $\nu(\text{Csp}^3\text{-H})$. Strelicama su označene trake, koje potiču od $\nu(\text{Csp}^3\text{-H})$ metil grupe direktno vezane za azot.

U IR spektru se u oblasti $1517,1 - 1685,7 \text{ cm}^{-1}$ mogu uočiti intenzivne trake skeletnih $C_{Ar} = C_{Ar}$ vibracija (slika 5.2.3). Široka traka na oko 3080 cm^{-1} potiče od valencionih $C_{Ar}-H$ vibracija, dok se trake u oblasti $854,1 - 664,9 \text{ cm}^{-1}$ pripisuju deformacionim $C_{Ar}-H$ vibracijama van ravni. U 1H NMR spektru, u oblasti u kojoj se javljaju signali protona vezanih za aromatično jezgro, od 6,5 do 8,5 ppm, uočena su četiri signala (slika 5.2.9). Kao što je već rečeno, široki signal (singlet jediničnog integrala) na δ 7,75, potiče od protona, koji je direktno vezan za azotov atom. Preostali signali, na 7,96 ppm (dd sa integralom 1), 7,39 (ddd sa integralom 1) i na 6,64 ppm (multiplet sa integralom 2), pripisani su protonima vezanim za aromatično jezgro. Na osnovu integrala signala na δ 6,64 očigledno je da dati multiplet potiče od dva protona. Oni su hemijski neekvivalentni, s obzirom na to da su vezani za jezgro sa različitim supstituentima u *o*-položaju, ali im se signali preklapaju. Imajući u vidu *orto*-položaj $-COO^iPr$ i $-NHMe$ grupe, očekivalo bi se da H(3) i H(6), odnosno H(4) i H(5), daju signale sličnog izgleda, tj. multiplernosti. Na osnovu ovoga je pretpostavljeno da je signal na 6,64 ppm nastao preklapanjem dd i ddd. Numeracija ugljenikovitih atoma propil-*N*-metilantranilata, korišćena pri asignaciji NMR spektara, data je na slici 5.2.10.



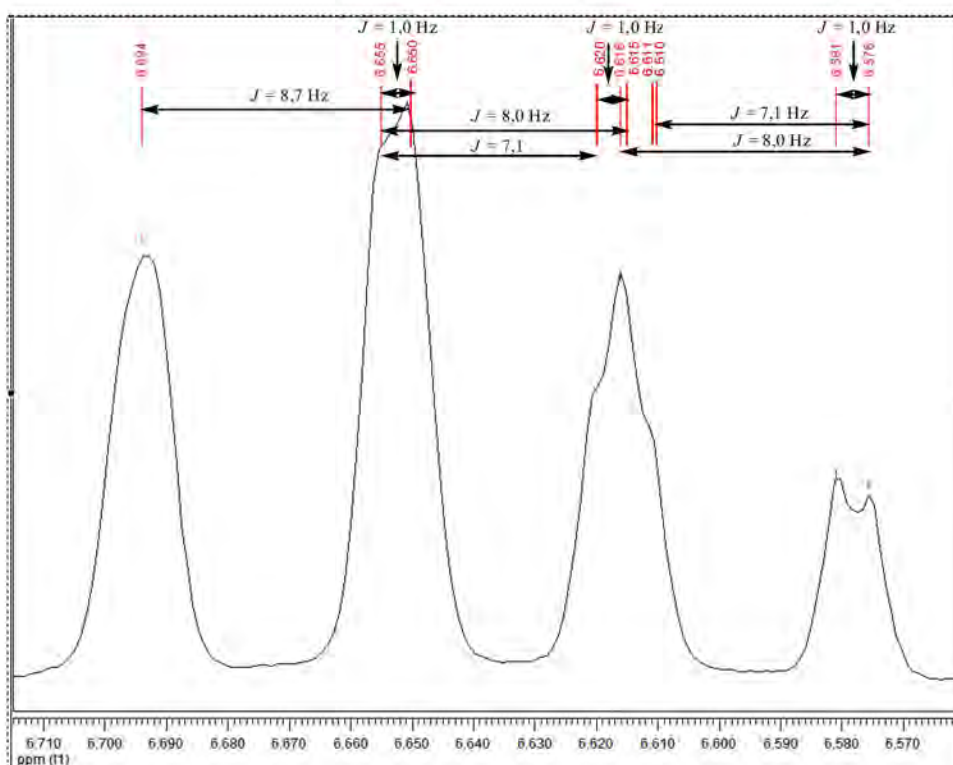
Slika 5.2.9. Deo 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) spektra izopropil-*N*-metilantranilata na δ 6,5 – 8 ppm, u kome se javljaju signali protona vezanih za $C-sp^2$ (aromatično jezgro), sa uvećanjem signala na δ 7,96 i 7,39



Slika 5.2.10. Numeracija ugljenikovih atoma izopropil-*N*-metilantranilata korišćena pri asignaciji NMR spektara

Estarska funkcionalna grupa, svojim elektron-akceptorskim efektom, smanjuje elektronsku gustinu na C(2), C(4) i C(6), dok je, zahvaljujući elektron-donorskoj *N*-metilamino grupi, elektronska gustina u položajima 1, 3 i 5 povećana. Smanjenjem elektronske gustine ugljenikovih atoma, smanjuje se dijamagnetna zaštita protona, koji su za njih vezani, što dovodi do povećanja efektivnog magnetnog polja oko protona, a time i njihovih hemijskih pomeranja, dok povećanje elektronske gustine pomera δ ka nižim vrednostima. Zato su signali na većim vrednostima δ , 7,96 i 7,39, pripisani protonima vezanim za ugljenikove atome sa smanjenom elektronskom gustinom (C(4) i C(6)), dok je multiplet na 6,64 ppm pripisan protonima H(3) i H(5). Estarska grupa ne samo da svojim elektron-akceptorskim efektom smanjuje elektronsku gustinu na C(6), a time i H(6), već na pomenuti proton deluje i magnetnim anizotropnim efektom. Pod uticajem spoljašnjeg magnetnog polja, pokretljivi π -elektroni estarske grupe indukuju magnetno polje, čije se dejstvo prenosi kroz prostor, a njegova veličina nije ista u svim pravcima – magnetni anizotropni efekat. Pošto jačina ovog efekta opada sa rastojanjem, njegov najjači uticaj oseća H(6), zbog čega se dodatno smanjuje njegova lokalna dijamagnetna zaštita, a povećava hemijsko pomeranje. Zato je signal na najvećem hemijskom pomeranju (7,96 ppm) pripisan H(6), a na δ 7,39 – H(4).

Multipletnost signala u ^1H NMR spektru na 7,96 (dd), koji potiče od H(6), ukazuje na to da se pomenuti proton kupluje sa dva protona različitim konstantama kuplovanja, $J_1 = 1,7$ Hz i $J_2 = 8,0$ Hz. Na ^1H - ^1H COSY spektru se vidi da se H(6) kupluje sa jednim od protona od kojih potiče signal na 6,64 ppm. Na osnovu ^1H - ^1H COSY spektra zaključeno je da se H(6) i H(5) kupluju većom konstantom kuplovanja ($J_2 = 8,0$), čime je potvrđeno da su ova dva protona međusobno *orto*. Prostorna bliskost H(6) i H(5) potvrđena je i signalom u NOESY spektru. Niža konstanta kuplovanja ($J_1 = 1,7$ Hz) odgovara sprezanju između H(6) i protona, koji je *meta* u odnosu na njega, H(4).



Slika 5.2.11. Deo ^1H NMR (200MHz, CDCl_3) spektra izopropil-*N*-metilantranilata – uvećanje multiplleta sa centrom na 6.64 ppm, koji nastaje preklapanjem ddd ($J_1 = 1,0$ Hz, $J_2 = 7,1$ Hz i $J_3 = 8,0$ Hz) na 6.62 ppm, koji potiče od H(5) i dd ($J_1 = 1,0$ Hz i $J_2 = 8,7$ Hz) na 6.67 ppm, koji potiče od H(3)

Signal na 7,39 ppm, ddd, sa konstantama kuplovanja $J_1 = 1,7$ Hz, $J_2 = 7,1$ Hz i $J_3 = 8,7$ Hz, ukazuje na to da se proton od koga potiče ovaj signal, pored kuplovanja sa H(6), kupluje sa H(5) i H(3), većim konstantama kuplovanja, s obzirom da su oba *orto* u odnosu na posmatrani proton. Poređenjem J za sva četiri protona, zaključeno je da konstanta kuplovanja H(4) – H(5) iznosi 7,1, a H(4) – H(3) 8,7 Hz. Uočenim kuplovanjem (engl. *cross-peak*) u ^1H - ^1H COSY spektru potvrđena je interakcija H(4) sa H(3) i H(5), a signalom u NOESY, njihova prostorna bliskost. *N*-metilamino grupa svojim elektron-donorskim efektom povećava elektronsku gustinu na H(3) i H(5), ali se u položaju 3 oseća i elektronegativni efekat –NHMe grupe. Zato je elektronska gustina u položaju 3 manja nego u položaju 5, pa je δ H(3) veće od δ H(5).

U oblasti δ od 110,5 do 152,0 ^{13}C NMR spektra uočeno je 5 signala, koji odgovaraju neekvivalentnim, sp^2 hibridizovanim ugljenikovim atomima. Kao što je već rečeno, signal na δ 110,5 se zapravo sastoji iz dva signala. Asignacija ovih ugljenika moguća je jedino na osnovu HETCOR spektra. Pošto se ugljenik sa signalom na δ 134,3 u HETCOR spektru spreže sa H(4), pomenuti signal je pripisan C(4). Na analogan način je utvrđeno da signal na δ 131,4 potiče od C(6), 114,1 od C(5), 110,5 od C(3). Na osnovu HETCOR spektra zaključeno je da ugljenici na

110,5 ppm i 152,0 ppm nisu vezani za vodonike, pa su ovi signali pripisani C(1) i C(2). Elektronegativna –NHMe grupa, kao i –R efekat *orto* –COO*iPr* grupe, smanjuje elektronsku gustinu i time povećava δ na C(2), pa je δ 152,0 pripisano C(2), a δ 110,5 - C(1).

Spektri propil- i metil-*N*-metilantranilata su asignirani analogno spektru izopropil-*N*-metilantranilata. Svi spektralni i retencioni podaci pomenutih jedinjenja dati su u tabelama (tabele 5.1 – 5.4). NMR spektri ova tri jedinjenja su dodatno snimljeni u DMSO-*d*₆, a potpuno asignirani podaci su dati u tabelama 5.5 i 5.6.

Tabela 5.1. Retenciona vremena (u min), retencioni indeksi, računati po *Van den Dool* i *Kratz-u* (1963) na osnovu retencionih vremena homologe serije *n*-alkana C₁₃-C₁₆ i pikovi molekulskog jona ($[M]^+$) *m/z* izopropil-, metil- i propil-estara-antranilne, *N*-metilantranilne i *N,N*-dimetilantranilne kiseline

Rt [min]	RI	Pik molekulskog jona ($[M]^+$) <i>m/z</i>	Jedinjenje
12,914	1345	151	metil-antranilat
14,445	1406	179	metil- <i>N,N</i> -dimetilantranilat
14,584	1412	165	metil- <i>N</i> -metilantranilat
15,532	1451	179	izopropil-antranilat
16,731	1500	207	izopropil- <i>N,N</i> -dimetilantranilat
17,057	1515	193	izopropil- <i>N</i> -metilantranilat
17,140	1518	179	propil-antranilat
18,224	1565	207	propil- <i>N,N</i> -dimetilantranilat
18,734	1586	193	propil- <i>N</i> -metilantranilat

Tabela 5.2. IR spektralni podaci izopropil-, metil- i propil-*N*-metilantranilata (λ^{-1} , cm⁻¹)

Asignacija	Izopropil- <i>N</i> -metilantranilat	Metil- <i>N</i> -metilantranilat	Propil- <i>N</i> -metilantranilat
ν (N-H)	3374,7	3379,3	3376,1
ν (C _{Ar} -H)	~ 3080	~ 3080	~ 3080
ν (C-H)	2978,4 – 2870,3	2990,2 – 2871,0	2965,6 – ~ 2880,0
ν (N-CH ₃)	2818,8	2818,1	2818,5
ν (C=O)	1672,8	1678,3	1677,0
skelet.(C _{Ar} -C _{Ar})	1605,7 – 1517,1	1606,0 – 1518,1	1606,1 – 1518,4
ν_{sim} (C-O)	1256,3	1258,5	1256,7
ν_{sim} (C-O)	1230,9	1233,5	1234,3
$\gamma_{van\ ravni}$ (C _{Ar} -H)	854,1 – 664,9	832,3 – 664,8	844,3 – 665,1

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

Tabela 5.3. ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) spektralni podaci izopropil-, metil- i propil-*N*-metilantranilata (δ ppm u odnosu na CDCl_3)

C	Izopropil- <i>N</i> -metilantranilat	Metil- <i>N</i> -metilantranilat	Propil- <i>N</i> -metilantranilat
1	110,5*	109,8	110,2
2	152,0	152,0	152,1
3	110,5*	110,6	110,7
4	134,3	134,5	134,5
5	114,1	114,2	114,3
6	131,4	131,5	131,5
7	168,2	169,0	168,8
1'	67,2	51,1	65,7
2'	21,8	-	22,0
3'	-	-	10,4
N-CH ₃	29,3	29,3	29,4

*preklopljeni pikovi

Tabela 5.4. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) spektralni podaci izopropil-, metil- i propil-*N*-metilantranilata (δ u ppm u odnosu na TMS, multipletnost, *J* u Hz)

H	Izopropil- <i>N</i> -metilantranilat	Metil- <i>N</i> -metilantranilat	Propil- <i>N</i> -metilantranilat
3	6,67, dd (8,7, 1,0)	6,66, dd (8,6, 1,0)	6,66, dd (8,6, 1,2)
4	7,39, ddd (8,7, 7,1, 1,7)	7,38, ddd (8,6, 7,1, 1,6)	7,38, ddd (8,6, 7,2, 1,6)
5	6,62, ddd (8,0, 7,1, 1,0)	6,60, ddd (8,0, 7,1, 1,0)	6,59, ddd (8,0, 7,2, 1,2)
6	7,96, dd (8,0, 1,7)	7,92, dd (8,0, 1,6)	7,93, dd (8,0, 1,6)
1'	5,23, septuplet (6,2)	3,85, s	4,21, t (6,6)
2'	1,38, d (6,2)	-	1,77, sekstuplet (7,1)
3'	-	-	1,02, t (7,5)
N-CH ₃	2,92, s	2,90, s	2,90, br s
N-H	7,75, br s	7,68, br s	7,68, br s

Tabela 5.5. ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) spektralni podaci izopropil-, metil- i propil-*N*-metilantranilata (δ u ppm u odnosu na TMS, multipletnost, *J* u Hz)

C	Izopropil- <i>N</i> -metilantranilat	Metil- <i>N</i> -metilantranilat	Propil- <i>N</i> -metilantranilat
1	109,6, m	109,1, m	109,3, m
2	151,5, m	151,4, m	151,5, m
3	110,9, dt ($^1J=158,8$, $^3J=6,2$)	111,0, dt ($^1J=159,2$, $^3J=6,1$ Hz)	110,9, dt ($^1J=159,2$, $^3J=6,4$ Hz)
4	134,7, dd ($^1J=158,0$, $^3J=8,7$)	134,8, dd ($^1J=158,1$, $^3J=8,8$)	134,8, dd ($^1J=158,1$, $^3J=8,8$)
5	114,1, dd ($^1J=163,6$, $^3J=7,7$)	114,2, dd ($^1J=163,6$, $^3J=7,7$)	114,1, dd ($^1J=163,5$, $^3J=7,9$)
6	131,0, ddd ($^1J=160,0$, $^3J=7,8$, $^2J=2,1$)	131,1, ddd ($^1J=160,3$, $^3J=8,1$, $^2J=2,0$)	131,0, ddd ($^1J=160,0$, $^3J=8,0$, $^2J=1,9$)
7	167,2, m	168,1, m	167,7, m

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

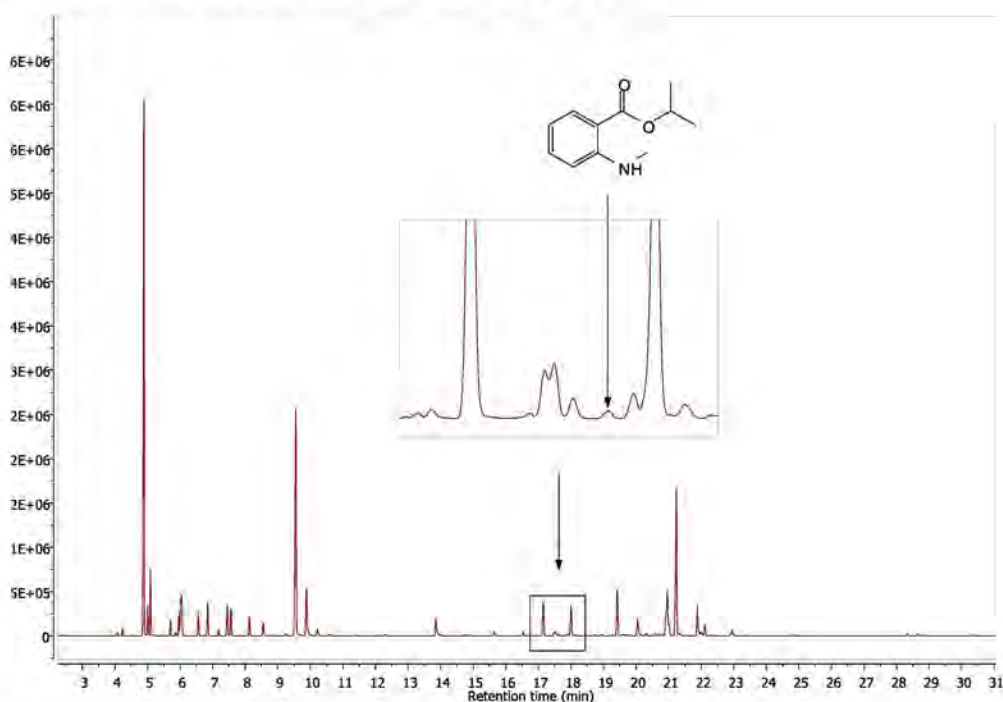
1'	67,2, dublet septupleta (¹ J = 148,6, ² J = 4,2)	51,5, q (¹ J = 147,1),	65,4, pseudotriplet sektupleta (¹ J = 147,2, ² J ≈ ³ J ≈ 5,8)
2'	21,7, qq (¹ J = 126,7, 4,6)	-	21,7, tqt (¹ J = 127,0, ² J = 4,8, ² J = 2,1)
3'	-	-	10,4, pseudo kvartet kvinteta (¹ J = 125,7, ² J ≈ ³ J ≈ 4,3)
N-CH ₃	29,3, qd (¹ J = 136,0, ² J = 3,0)	29,3, qd (¹ J = 136,1, ² J = 3,1)	29,2, qd (¹ J = 136,1, ² J = 3,0)

Tabela 5.6. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) spektralni podaci izopropil-, metil- i propil-*N*-metilantranilata (δ u ppm u odnosu na TMS, multipletnost, *J* u Hz)

H	Izopropil- <i>N</i> -metilantranilat	Metil- <i>N</i> -metilantranilat	Propil- <i>N</i> -metilantranilat
3	6,70, br d (8,4)	6,72, br d (8,4)	6,69 (br d, 8,4)
4	7,40, ddd (8,6, 7,1, 1,6)	7,41, ddd (8,6, 7,2, 1,6)	7,39 (ddd, 8,4, 7,1, 1,6)
5	6,57, ddd (7,9, 7,1, 1,0)	6,58, ddd (8,0, 7,2, 1,0)	6,57 (ddd, 8,1, 7,1, 1,1)
6	7,78, dd (7,9, 1,6)	7,79, dd (8,0, 1,6)	7,80 (dd, 8,1, 1,6)
1'	5,09, septuplet (6,2)	3,79, s	4,14 (t, 6,6)
2'	1,30, d (6,2)	-	1,68 (sektuplet, 7,1)
3'	-	-	0,94 (t, 7,4)
N-CH ₃	2,84, d (5,0)	2,85, d (5,0)	2,83d (5,0)
N-H	7,58, br q (5,0)	7,54, br q (5,0)	7,60, br q (5,0)

5.3. SASTAV ETARSKOG ULJA BILJNE VRSTE *CHOISYA TERNATA*

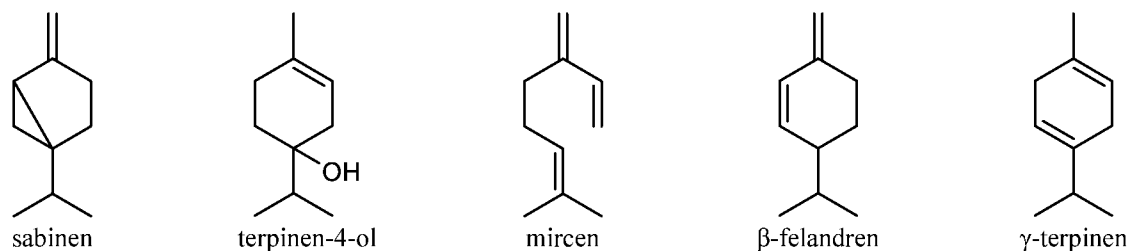
Hemijski sastav etarskog ulja biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae) je dat u tabeli 5.7, a ukupni jonski hromatogram (TIC) ulja je prikazan na slici 5.3.1. GC-MS analizom ulja identifikovano je ukupno 157 sastojaka, što čini 99,0% površina ispod detektovanih pikova u gasnom hromatogramu etarskog ulja dobijenog hidrodestilacijom svežeg biljnog materijala (etarsko ulje 1), odnosno 98,5% površine ispod detektovanih pikova etarskog ulja dobijenog hidrodestilacijom suvog biljnog materijala (etarsko ulje 2).



Slika 5.3.1. Ukupni jonski hromatogram (TIC) etarskog ulja biljne vrste *C. ternata* sa uvećanjem dela u kome je uočen pik izopropil-*N*-metilantranilata

Monoterpenoidi su glavna frakcija ulja 1 i 2 (86,4 i 83,8%). Ugljovodonici čine više od polovine te frakcije (66,1 i 65,0%). Sledeći po zastupljenosti su tujanski monoterpenoidi (39,0 i 37,7%), zatim mentanski i njima srodni monoterpenoidi (34,5 i 32,4%) i aciklični monoterpenoidi (9,1 i 9,8%). Seskviterpenoidi čine 11,8% etarskog ulja 1, odnosno 13,6% etarskog ulja 2. Oksigenovani seskviterpenoidi čine 8,1 odnosno 10,3%, a kadinanski i srodni seskviterpenoidi čine 6,4 i 8,1% seskviterpenoidne frakcije. Hemiterpenoidi su zastupljeni sa 0,1 i 0,2%, diterpenoidi sa 0,2 i 0,2%, dok ostali molekuli čine 0,7 i 0,9% u odnosu na ukupnu površinu ispod svih pikova etarskih ulja 1 i 2.

Glavni sastojci ulja (1 i 2) su: sabinen (36,5 i 35,1%, *ca.* jedna trećina ulja), terpinen-4-ol (10,5 i 9,9%), mircen (7,8 i 8,3%), β -felandren (5,4 i 6,6%) i γ -terpinen (4,7 i 4,2%) (slika 5.3.2). Nasuprot ovome, *Respaud* sa saradnicima (1997) je publikovao da su glavni sastojci etarskog ulja listova biljne vrste *C. ternata* α -felandren (64-71%) i mircen (11,5%). Pomenuta grupa autora je identifikovala samo osamnaest sastojaka od kojih su svi detektovani i u ovom radu.



Slika 5.3.2. Strukture sastojaka zastupljenih u najvećem procentu u etarskom ulju biljne vrste *C. ternata*

Tabela 5.7. Procentni sastav etarskog ulja biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (uzorci 1 i 2)

Rt/min \ddot{s}	RI	%1	%2	IdenMet	Klasa	Sastojci
2,256	765	0,1	0,1	a,b	HT	3-Metil-2-buten-1-ol (sin. prenol)
2,343	778	tr	tr	a,b	HT	3-Metil-2-butenal (sin. prenal)
2,424	800	tr	tr	a,b,c	O	Oktan
2,439	802	tr	tr	a,b,c	GL	Heksanal
2,882	847	tr	tr	a,b,c	HT/E	Etil-izovalerat
2,920	851	tr	tr	a,b	GL	(<i>E</i>)-2-Heksenal
2,931	852	tr	tr	a,b	GL	(<i>E</i>)-3-Heksen-1-ol
3,026	862	tr	tr	a,b	GL	(<i>E</i>)-2-Heksen-1-ol
3,038	863	tr	tr	a,b,c	GL	1-Heksanol
3,317	892	tr	tr	a,b,c	HT/E	Izopropil-izovalerat
3,751	923	tr	tr	a,b	M	Triciklen
3,826	928	0,5	0,5	a,b	MT	α -Tujen
3,954	936	1,0	1,0	a,b,c	MP	α -Pinen
4,083	945	tr	tr	a,b,c	HT/E	Propil-izovalerat
4,196	953	0,1	0,1	a,b,c	M	Kamfen
4,370	964	tr	tr	a,b,c	O	Benzaldehid
4,448	969	tr	tr	a,b,c	HT/E	Izoamil-propionat
4,628	980	36,5	35,1	a,b,c	MT	Sabinen
4,677	984	2,7	2,8	a,b,c	MP	β -Pinen
4,724	987	tr	tr	a,b	O	Metil-5-metilheksanoat
4,808	993	7,8	8,3	a,b,c	MA	Mircen
4,861	996	tr	tr	a,b	MM	Dehidro-1,8-sineol
4,912	999	tr	tr	a,b,c	O	Mezitilen
5,026	1005	tr	tr	a,b,c	HT/E	Izobutil-izovalerat
5,040	1006	tr	tr	a,b	GL	(<i>E</i>)-3-Heksenil-acetat
5,083	1008	tr	tr	a,b	MM	<i>p</i> -Menta-1(7),8-dien (sin. pseudolimonen)
5,086	1008	0,2	0,2	a,b	MM	α -Felandren
5,199	1014	tr	tr	a,b	M	Δ^3 -Karen
5,309	1019	3,2	2,8	a,b,c	MM	α -Terpinen
5,457	1027	0,3	0,2	a,b,c	MM	<i>p</i> -Cimen

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

5,552	1031	2,3	2,0	a,b,c	MM	Limonen
5,555	1034	5,4	6,6	a,b	MM	β -Felandren
5,615	1035	3,0	2,2	a,b,c	MM	1,8-Sineol
5,790	1043	tr	tr	a,b,c	HT/E	Butil-izovalerat
5,855	1047	0,1	0,1	a,b	MA	(<i>E</i>)- β -Ocimen
6,132	1060	4,7	4,2	a,b,c	MM	γ -Terpinen
6,315	1069	1,2	1,3	a,b	MT	<i>cis</i> -Sabinen-hidrat
6,570	1082	tr	tr	a,b	O	4-Metilheksil-acetat
6,762	1091	1,3	1,1	a,b	MM	Terpinolen
6,885	1098	tr	tr	a,b	GL	(<i>Z</i>)-3-Heksenil-propionat
6,961	1101	1,2	1,3	a,b,c	MA	Linalol
6,984	1102	0,8	0,8	a,b	MT	<i>trans</i> -Sabinen-hidrat
7,053	1105	tr	tr	a,b	HT/E	Izopentil-izovalerat
7,121	1108	tr	tr	a,b	HT/E	2-Metilbutil-izovalerat
7,291	1115	tr	tr	a,b	MM	1,3,8- <i>p</i> -Mentatrien
7,313	1116	tr	-	a,b	M	(<i>E</i>)-4,8-Dimetil-1,3,7-nonatrien
7,316	1116	tr	tr	a,b	HT/E	3-Metil-3-butenil-3-metilbutanoat
7,513	1124	0,8	0,7	a,b	MM	<i>cis-p</i> -Menta-2-en-1-ol
7,922	1142	0,5	0,4	a,b	MM	<i>trans-p</i> -Menta-2-en-1-ol
7,941	1142	tr	tr	a,b	GL	(<i>Z</i>)-3-Heksenil-izobutanoat
8,052	1147	tr	tr	a,b	MA	Ipsdienol
8,065	1148	tr	tr	a,b	MA	(<i>E</i>)-Miroksid
8,078	1148	tr	tr	a,b	HT/E	3-Metil-3-butenil-valerat
8,280	1157	tr	0,1	a,b	MA	2,6-Dimetil-1,5,7-oktatrien-3-ol* (sin. Ocimenol)
8,409	1162	tr	tr	a,b	GL	(<i>Z</i>)-3-Heptenil-propionat
8,595	1170	0,1	0,1	a,b	MM	δ -Terpineol
8,714	1175	tr	-	a,b,c	GL	1-Nonanol
8,896	1183	10,5	9,9	a,b	MM	Terpinen-4-ol
9,022	1188	tr	tr	a,b	MM	<i>p</i> -Cimen-8-ol
9,048	1189	tr	tr	a,b,c	O	Naftalen
9,103	1192	tr	tr	a,b	MM	Kripton
9,167	1194	1,7	1,6	a,b	MM	α -Terpineol
9,281	1199	0,2	0,2	a,b	MM	<i>cis</i> -Piperitol
9,420	1205	tr	0,1	a,b	HT/E	Izoheksil-2-metilbutirat
9,560	1210	0,3	0,2	a,b	MM	<i>trans</i> -Piperitol
9,649	1214	tr	tr	a,b	HT/E	Izoamil-izoheksanoat
9,988	1228	tr	tr	a,b	MA	Citronelol
10,027	1229	tr	tr	a,b,c	MA	Nerol
10,087	1232	tr	-	a,b	GL	(<i>Z</i>)-3-Heksenil-2-metilbutanoat
10,172	1235	tr	tr	a,b	GL	(<i>Z</i>)-3-Heksenil-3-metilbutanoat
10,371	1243	tr	tr	a,b,c	MM	Askaridol
10,661	1255	tr	tr	a,b	O	Kavikol
10,661	1255	tr	tr	a,b,c	MA	Geraniol
10,717	1257	tr	tr	a,b	O	9-Metil-2-dekanon
10,844	1262	tr	tr	a,b	GL	(<i>E</i>)-2-Decenal
11,089	1272	tr	tr	a,b	MA	Geranial
11,277	1279	tr	tr	a,b	GL	(<i>Z</i>)-2-Heksenil-valerat
11,506	1289	tr	tr	a,b,c	M	Izobornil-acetat
11,628	1293	0,1	0,1	a,b	O	2-Undekanon
11,643	1294	-	tr	a,b	MA	<i>trans</i> -Tiorozoksid
12,148	1314	tr	-	a,b	O	1-Metilnaftalen
12,207	1317	tr	tr	a,b	O	<i>p</i> -Vinilguajakol
12,238	1318	tr	tr	a,b	GL	(<i>2E,4E</i>)-2,4-Dekadienal
12,319	1321	tr	-	a,b	O	Izoamil-benzil-etar

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

12,388	1324	tr	tr	a,b	GL	(Z)-3-Heksenil-tiglat
12,576	1331	tr	tr	a,b	MM	<i>p</i> -Menta-1,4-dien-7-ol
12,900	1344	tr	tr	a,b	MM	<i>egzo</i> -2-Hidroksisineol-acetat
13,106	1355	tr	tr	a,b	MA	Citronelil-acetat
13,238	1358	tr	tr	a,b	O	10-Metil-2-undekanon
13,286	1360	0,6	0,8	a,b,c	O	Eugenol
13,390	1364	tr	tr	a,b,c	MA	Neril-acetat
13,762	1379	tr	tr	a,b,c	M	Izobornil-propanoat
13,793	1380	tr	tr	a,b	S	α -Kopaen
13,869	1383	tr	tr	a,b,c	MA	Geranil-acetat
13,939	1386	tr	tr	a,b,c	O	Metil-(<i>E</i>)-cinamat
13,974	1387	tr	tr	a,b	O	(<i>E</i>)- β -Damascenon
14,024	1389	0,1	tr	a,b	S	β -Burbonen
14,169	1395	0,1	tr	a,b	S	β -Elemen
14,340	1402	-	tr	a,b	O	(Z)-Jasmon
14,421	1405	tr	tr	a,b	O	Metil-eugenol
14,566	1412	tr	tr	a,b,c	O	Metil- <i>N</i> -metilantranilat
14,885	1424	0,3	0,2	a,b,c	SCAR	β -Kariofilen
15,107	1434	tr	tr	a,b	S	β -Kopaen
15,475	1449	tr	-	a,b,c	S	Aromadendren
15,620	1455	tr	tr	a,b	SCAD	<i>cis</i> -Murola-3,5-dien
15,714	1458	0,2	0,2	a,b,c	SCAR	α -Humulen
15,897	1466	tr	tr	a,b	SCAR	9- <i>epi</i> -(<i>E</i>)-Kariofilen
15,935	1468	tr	tr	a,b	SCAD	<i>cis</i> -Kadina-1(6),4-dien
16,026	1472	tr	tr	a,b	SCAD	<i>cis</i> -Murola-4(14),5-dien
16,169	1477	tr	tr	a,b	SCAD	<i>trans</i> -Kadina-1(6),4-dien
16,235	1480	tr	tr	a,b	SCAD	γ -Murolen
16,378	1486	1,8	1,4	a,b	SGER	Germakren D
16,645	1497	tr	-	a,b	SCAD	<i>trans</i> -Murola-4(14),5-dien
16,685	1499	tr	0,1	a,b	S	<i>epi</i> -Kubebol
16,742	1501	0,1	tr	a,b	SGER	Biciklogermakren
16,797	1503	0,1	0,2	a,b	SCAD	α -Murolen
16,810	1504	-	tr	a,b	SCAD	Epizonaren
16,914	1508	tr	tr	a,b	S	(<i>E,E</i>)- α -Farnezen
16,956	1510	tr	tr	a,b	SGER	Germakren A
17,042	1514	tr	tr	a,b,c	O	Izopropil- <i>N</i> -metilantranilat
17,143	1518	0,1	0,1	a,b	SCAD	γ -Kadinen
17,178	1520	tr	tr	a,b	S	Kubebol
17,347	1527	1,0	1,2	a,b	SCAD	δ -Kadinen
17,380	1528	tr	tr	a,b	O	Kavibetol-acetat
17,406	1530	tr	tr	a,b	SCAD	Zonaren
17,562	1536	tr	tr	a,b	SCAD	<i>trans</i> -Kadina-1,4-dien
17,689	1542	tr	tr	a,b	SCAD	α -Kadinen
17,953	1553	tr	tr	a,b	SGER	Hedikariol
18,025	1556	tr	tr	a,b	S	Mintoksid
18,148	1561	tr	tr	a,b	SCAD	<i>cis</i> -Murola-5-en-4 β -ol
18,222	1565	tr	tr	a,b	S	(<i>E</i>)-Nerolidol
18,402	1572	tr	tr	a,b	S	1,5-Epoksisalvial-4(14)-en
18,599	1581	1,1	1,5	a,b	SGER	Germakren D-4-ol
18,660	1583	tr	tr	a,b,c	S	Spatulenol
18,788	1589	0,1	0,1	a,b,c	SCAR	Kariofilen-oksid
18,898	1594	tr	-	a,b	S	4- <i>epi</i> -Kubebol
18,973	1597	tr	-	a,b	S	Globulol
19,030	1599	tr	tr	a,b	S	Salvial-4(14)-en-1-on

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

19,251	1609	0,1	0,1	a,b	S	Ledol
19,365	1614	0,5	0,6	a,b	S	β -Oplophenon
19,491	1620	tr	0,1	a,b	SCAD	1,10-di- <i>epi</i> -Kubenol
19,523	1621	tr	tr	a,b	O	(<i>E</i>)-Izoeugenil-acetat
19,783	1633	0,1	0,1	a,b	SCAD	1- <i>epi</i> -Kubenol
20,073	1646	0,5	0,5	a,b	SCAD	<i>epi</i> - α -Kadinol (sin. τ -kadinol)
20,097	1647	1,1	1,5	a,b	SCAD	<i>epi</i> - α -Murolol (sin. τ -murolol)
20,181	1651	0,3	0,4	a,b	SCAD	α -Murolol (sin. torejol)
20,247	1654	tr	-	a,b	S	β -Himahalol
20,396	1661	3,2	4,0	a,b	SCAD	α -Kadinol
20,962	1686	tr	tr	a,b	S	Eudezma-4(15),7-dien-1 β -ol
21,087	1692	0,6	0,9	a,b	SGER	Germakra-4(15),5,10(14)-trien-1 α -ol
21,199	1697	0,3	0,4	a,b	S	Šiobunol
22,214	1744	0,1	-	a,b	S	Mintsulfid
22,726	1769	tr	-	a,b,c	O	Benzil-benzoat
27,402	2003	0,1	0,1		D	Neidentifikovan diterpen 1**
27,702	2020	0,1	0,1		D	Neidentifikovan diterpen 2***
27,832	2027	tr	tr		D	Neidentifikovan diterpen 3****
29,415	2116	tr	tr	a,b	D	(<i>E</i>)-Fitol
38,788	2700	tr	tr	a,b,c	O	Heptakozan
41,566	2900	tr	tr	a,b,c	O	Nonakozan
44,153	3100	tr	tr	a,b,c	O	Hentriakontan
		99,0	98,5			Ukupno identifikovano
		0,1	0,2			Hemiterpenoidi (HT)
		tr	0,1			Estri (HT/E)
		86,4	83,8			Monoterpenoidi (M)
		66,1	65,0			Ugljovodonici
		20,3	18,8			Oksigenovani
		39,0	37,7			Tujanski (MT)
		3,7	3,8			Pinanski (MP)
		9,1	9,8			Aciklični (MA)
		34,5	32,4			Mentanski i srodni (MM)
		11,8	13,6			Seskviterpenoidi (S)
		3,8	3,3			Ugljovodonici
		8,0	10,3			Oksigenovani
		0,6	0,5			Kariofilanski i srodni (SCAR)
		6,4	8,1			Kadinanski i srodni (SCAD)
		3,6	3,8			Germakranski i srodni (SGER)
		0,2	0,2			Ditrepenoidi (D)
		tr	tr			<i>Green leaf</i> isparljivi sastojci (GL)
		0,7	0,9			Ostalo (O)

§ Jedinjenja su navedena po redosledu eluiranja sa HP-5MS kolone (Rt-retenciono vreme (u min) i RI-eksperimentalno određeni retencioni indeksi za gore pomenutu kolonu na osnovu koinjektiranih homologa serije *n*-alkana C₇-C₃₁);

* tačan stereoizomer nije određen;

** MS, 70 eV, 230 °C, *m/z*(rel. int.): 39(15,5), 40(2,9), 41(62,1), 43(18,8), 53(26,4), 55(55,7), 57(7,1), 65(13,1), 67(32,5), 68(10,6), 69(47,4), 77(34,0), 78(7,9), 79(52,1), 80(34,7), 81(48,8), 82(5,2), 83(9,2), 91(49,7), 92(17,6), 93(99,9), 94(25,9), 95(35,6), 96(2,9), 105(40,2), 106(14,8), 107(72,6), 108(26,0), 109(29,2), 115(1,3), 117(4,0), 119(45,2), 120(17,9), 121(39,0), 122(18,7), 123(20,2), 131(5,2), 133(24,4), 134(30,7), 135(29,7), 136(25,1), 137(20,0), 145(8,7), 147(23,2), 148(14,0), 149(9,1), 150(1,7), 159(11,8), 160(1,6), 161(19,7), 162(7,0), 173(5,1), 175(2,7), 187(3,2), 189(9,6), 201(1,7), 203(1,3), 229(14,4), 244(5,6), 257(11,6), 272(13,8);

*** MS, 70 eV, 230 °C, *m/z*(rel. int.): 39(23,9), 41(84,0), 43(25,3), 44(5,8), 53(43,1), 55(66,8), 56(2,6), 57(5,9), 65(20,4), 66(2,1), 67(69,1), 68(19,3), 69(38,8), 77(54,4), 78(11,1), 79(88,9), 80(16,9), 81(86,3), 82(8,1), 83(8,1), 91(84,2), 92(19,5), 93(91,9), 94(19,6), 95(48,4), 96(5,4), 97(3,3), 105(77,8), 106(24,3), 107(73,0), 108(24,0), 109(34,7), 117(13,6), 118(15,2), 119(89,0), 120(34,4), 121(99,9), 122(21,6), 123(24,8), 131(29,0), 132(23,9),

133(83,0), 134(47,4), 135(40,0), 136(12,5), 145(36,4), 146(19,9), 147(35,8), 148(17,6), 149(12,3), 159(37,0), 160(5,1), 161(50,6), 162(9,0), 173(40,4), 175(25,9), 187(23,3), 189(14,8), 201(25,4), 203(2,1), 229(28,5), 243(9,5), 257(61,0), 258(9,5), 272(17,7);

**** MS, 70 eV, 230 °C, m/z (rel. int): 39(21,0), 41(74,7), 43(31,1), 53(42,7), 55(57,9), 67(55,2), 68(18,0), 69(37,5), 77(61,0), 79(75,9), 80(5,9), 81(77,5), 91(89,4), 92(11,2), 93(86,2), 95(46,9), 105(92,2), 106(26,8), 107(87,8), 108(37,7), 109(50,9), 119(96,7), 120(40,9), 121(99,7), 122(26,0), 123(15,4), 133(99,9), 134(79,8), 135(67,9), 136(26,5), 145(15,1), 147(33,7), 148(19,2), 159(18,4), 161(50,5), 162(30,2), 175(16,1), 189(28,1), 229(5,7), 257(66,5), 272(6,2).

a - sastojak identifikovan poređenjem masenih spektara;

b - sastojak identifikovan poklapanjem retencionih indeksa sa literaturnim vrednostima;

c - sastojak identifikovan ko-injektiranjem standarda;

-, sastojak nije detektovan;

sin, sinonim;

tr, sastojak prisutan u procentu manjem od 0,05% (trag).

5.3.1. Gasna ko-hromatografija metil-, izopropil- i propil-*N*-metilantranilata sa etarskim uljem biljne vrste *Choisya ternata*

Tokom analize hemijskog sastava etarskog ulja listova biljne vrste *C. ternata*, uočena su dva sastojka prisutna u malim količinama. Dva pika u gasnim hromatogramima etarskih ulja 1 i 2, koja su tentativno identifikovana (na osnovu poređenja masenih spektara sa masenim spektrima iz WILEY10NIST2014baze podataka) kao metil- i (izo)propil-*N*-metilantranilat mogu biti od interesa, s obzirom da je isparljiva jedinjenja koja sadrže azot teško detektovati i da ona često ostaju neidentifikovana tokom analize (Jabalpurwala *et al*, 2009). Sintetisani standardi metil-, izopropil- i propil-*N*-metilantranilata su ko-hromatografisani sa etarskim uljem biljne vrste *C. ternata*, a porast intenziteta pika na Rt 14,566 min je potvrdio da je sastojak etarskog ulja na ovom retencionom vremenu metil-*N*-metilantranilat, dok je porast pika na Rt 17,796 min nesumnjivo potvrdio da je sastojak etarskog ulja na ovom retencionom vremenu izopropil-*N*-metilantranilat.

Daljim analizama je utvrđeno da izopropil-*N*-metilantranilat nije prisutan u etarskim uljima narandže (*Citrus × sinensis*), mandarine (*Citrus reticulate*), grejpfruta (*Citrus × paradisi*) i bergamota (*Citrus bergamia*), koja su ili izolovana hidročestilacijom ili komercijalna, a pretragom literature nisu nađeni podaci da je pomenuto jedinjenje do sada detektovano u živom svetu. Zato se izopropil-*N*-metilantranilne kiseline može smatrati potpuno novim sekundarnim metabolitom biljaka (protoalkaloidom). S obzirom na to da je do sada detektovan samo u biljnoj vrsti *C. ternata* on predstavlja veoma važan hemotaksonomski marker na nivou vrste i zato je nazvan ternantranin.

Pretragom literature je utvrđeno da je metil-*N*-metilantranilne kiseline detektovan kao sastojak većeg broja vrsta porodice Rutaceae (koje pripadaju jednoj od dve sestrinske

podfamilije *Rutoideae* i *Aurantioideae*, i to rodovima *Zanthoxylum* (Dreyer i Brenner, 1980; Detoni *et al*, 2009), *Citrus* (Lota *et al*, 2000; Brophy *et al*, 2001; Tomi *et al*, 2008; Jabalpurwala *et al*, 2009), *Fortunella* (Umano *et al*, 1994; Quijano i Pino, 2009a,b) i *Murraya* (Imai *et al*, 1989)), dok se sporadično (i u malim količinama) javlja i u nesrodnim rodovima *Chamaecyparis* (Thomas *et al*, 1966), *Corydalis* (Olesen i Knudsen, 1994), *Jasminum* (Calvarano, 1966; Cheng i Chao, 1979; Toda *et al*, 1983; Kaiser, 1988; Ito *et al*, 2002), *Mangifera* (Pino *et al*, 2005), *Michelia* (Kaiser, 1991), *Siphonochilus* (Viljoen *et al*, 2002) i *Trifolium* (Honkanen *et al*, 1969). Metil-*N*-metilantranilat se smatra hemotaksonomskim markerom etarskog ulja mandarine (*Citrus recutita*), a izotopski $^{14}\text{N} - ^{15}\text{N}$ odnos se koristi pri kontroli autentičnosti ovog etarskog ulja i njegovog porekla (Faulhaber *et al*, 1997). Utvrđeno je da je on nosilac arome ulja kore mandarine i ukusa soka od mandarine (Wilson i Shaw, 1981; Fanciullino *et al*, 2006). Metil-*N*-metilantranilat je atraktant meksičke voćne mušice (*Anastrepha ludens*, Massa *et al*, 2008) i tripsa (*Thrips coloratus*, Imai *et al*, 2001), a odbojno deluje na neke vrste ptica (npr. obični čvorak, *Sturnus vulgaris* (Clark *et al*, 1991) i neke druge vrste (Schafer *et al*, 1983)). *N*-demetilovani estar (metil-antranilat) je karakteristika citrusnih ulja (Jabalpurwala *et al*, 2009), ali nije identifikovan prilikom analize etarskog ulja biljne vrste *C. ternata*. Važno je napomenuti da on igra značajnu biološku ulogu jer deluje odbojno na ptice (prouzrokuje hemosenzorne iritacije), pa je našao primenu, ne samo u zaštiti biljaka od ptica (Curtis *et al*, 1994; Avery *et al*, 2001), već se i na aerodromima koristi za sprečavanje nesreća koje su prouzrokovane sudarom aviona i ptica (Engeman *et al*, 2002).

S obzirom na mirisne osobine, metil-*N*-metilantranilat je našao primenu u industriji kozmetičkih preparata, šampona, sapuna, parfema, kao i nekozmetičkih proizvoda, sredstva za čišćenje i deterdženata. Procenjuje se da je njegova godišnja potrošnja od 10 do 100 tona (SCCS, 2011). Pored toga pomenuti estar antranilne kiseline se koristi i u prehrambenoj industriji jer se hrani dodaje kao aroma (naročito konditorskim proizvodima: slatkišima, sladoledima, žvakaćim gumama) (Yamaori *et al*, 2005), a prirodno se nalazi i u voću, pri čemu ga najviše ima u ulju mandarine (6500 mg/kg), pa je deo svakodnevne ishrane ljudi (Council of Europe, 2000). U ljudski organizam dospeva preko kože (parfemi, kozmetički preparati i slično) i putem hrane. Smatra se da je maksimalno sistemsko izlaganje ovoj supstanci preko kože 0,0027 mg po kg telesne mase dnevno, a da se u Evropi oralnim putem unese 60 µg ove supstance dnevno (1 µg/kg t.m/dan), pri čemu je utvrđeni dozvoljeni dnevni unos (ADI – engl. *acceptable daily intake*) do 0,2 mg po kg telesne mase (EFSA, 2011).

5.4. SINTEZA I TERMALNA DEGRADACIJA

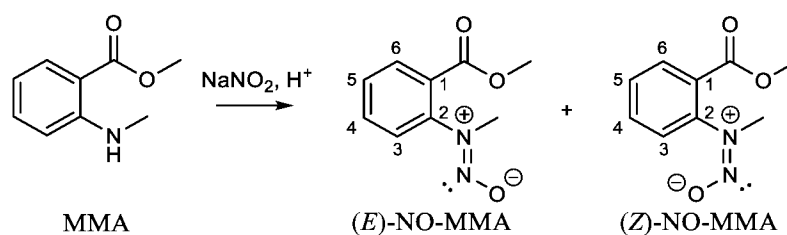
METIL-*N*-METIL-*N*-NITROZOANTRANILATA

Metil-*N*-metilantranilat (MMA), koji je deo naše svakodnevne ishrane, može da podleže nitrozovanju *in vivo*, u želucu čoveka, reakcijom sa nitritima prisutnim u pljuvački, kao i unošenjem hrane koja sadrži konzervanse, tj. nitrite, pri čemu nastaje metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilat (NO-MMA) (Lijinsky i Epstein, 1970). Reakciju nitrozovanja metil-*N*-metilantranilata natrijum-nitritom pri uslovima sličnim onim u ljudskom stomaku ispitivao je Sakai sa saradnicima (1978).

Uzimajući u obzir moguće građenje metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata u hrani i činjenicu da hrana često podleže termičkoj obradi, pri čemu može doći do termičke razgradnje (npr. pri pečenju, prženju, grilovanju, karamelizaciji), odlučili smo da proučavamo proizvode termalne razgradnje metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata. Tokom pirolize, organske supstance podležu nepovratnom procesu promene hemijskog sastava i fizičkog stanja, pri čemu se organska jedinjenja, kada se zagreju iznad određene temperature, raspadaju (Moldoveanu, 2009; Pitchaimari i Vijayakumar, 2013; Krzyzak *et al*, 2014). U zavisnosti od strukture polaznog molekula i uslova pirolize, pirolizat može da sadrži jedinjenja koja su posledica razlaganja polaznog materijala, i/ili jedinjenja koja nastaju rekombinacijom fragmenata nastalih od polaznog materijala. Imajući na umu moguće toksikološke probleme i posledice po životnu sredinu do kojih može doći prilikom pirolize (Moldoveanu, 2009), rešili smo da NO-MMA podvrgnemo preparativnoj termalnoj degradaciji, da izolujemo i okarakterišemo proizvode reakcione smeše.

Metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilat je sintetisan direktnim nitrozovanjem metil-*N*-metilantranilata (slika 5.4.1) nakon čega je reakciona smeša podvrgnuta NMR analizi, pri čemu je utvrđeno da ona ne sadrži neizreagovani metil-*N*-metilantranilat. Međutim, u ¹H NMR spektru uočena su dva seta analognih signala nejednakog inteziteta (u odnosu 1 : 12,9). Na osnovu hemijskih pomeranja i multipletnosti signala činilo se da oba seta odgovaraju strukturi NO-MMA. Analizom HSQC i HMBC spektara potvrđena je očekivana C-H konektivnost. Najveća razlika u hemijskim pomeranjima analognih parova signala uočena je za NCH₃ i H(3) protone. Ovo bi se moglo objasniti time da, usled sprečene slobodne rotacije oko N-N veze, NO-MMA postoji u dva stereoisomerna oblika od kojih potiču dva seta analognih signala (slika 5.4.1).

NMR podaci za pomenuta dva diastereoizomera su dati u tabeli 5.8. Pretpostavljeno je da se signal NCH₃ protona (*E*)-izomera nalazi na nižem hemijskom pomeranju u odnosu na odgovarajući signal (*Z*)-izomera usled antiperiplanarne (*trans*-) orijentacije slobodnog elektronskog para sa azotovog atoma i odgovarajuće metil grupe (Karabatsos i Taller, 1968). Iako se NO-MMA pominje u literaturi (Estrada *et al*, 2006; Serra *et al*, 2003; Sakai *et al*, 1977), nisu pronađeni NMR podaci, kao ni podaci koji ukazuju na postojanje 2 stereoizomera. Mi nismo pokušali da razdvojimo pomenuta dva diastereoizomera, već smo u daljim eksperimentima koristili dobijenu reakcionu smešu.



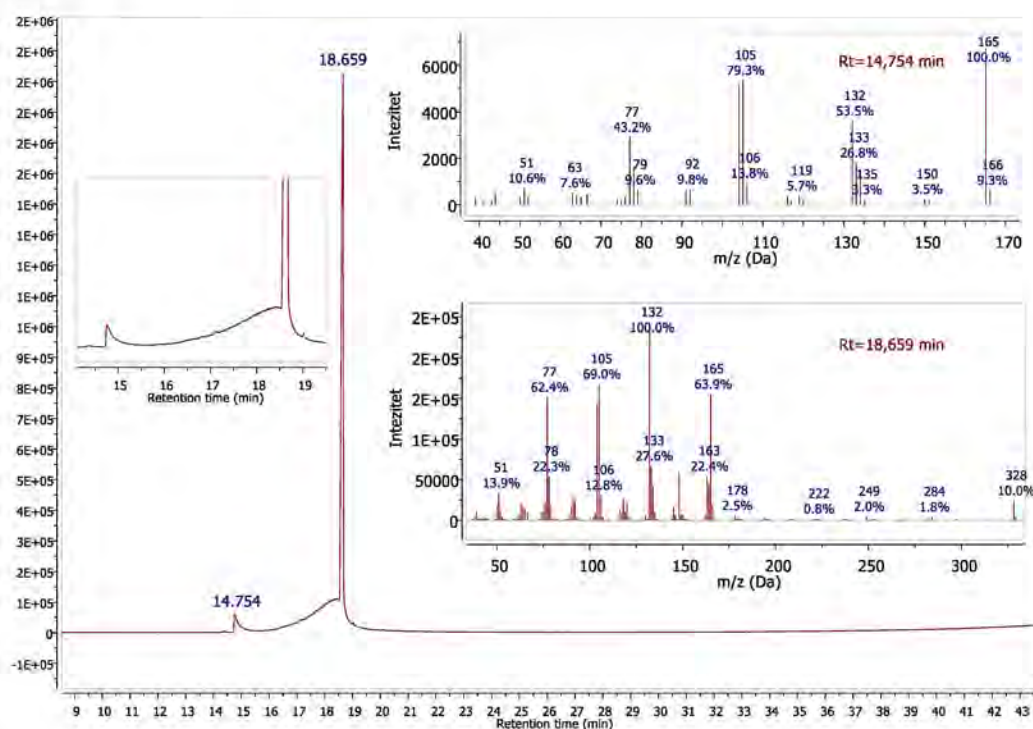
Slika 5.4.1. Sinteza metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata (NO-MMA)

Tabela 5.8. ¹H- (400 MHz) i ¹³C- (100 MHz) NMR spektralni podaci (CDCl₃) za jedinjenja (*E*)- i (*Z*)-NO-MMA

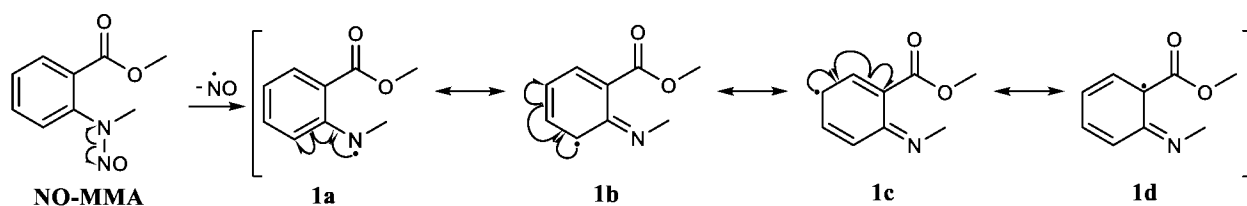
Položaj	(<i>E</i>)-Metil- <i>N</i> -metil- <i>N</i> -nitrozoantranilat (<i>E</i>)-NO-MMA		(<i>Z</i>)-Metil- <i>N</i> -metil- <i>N</i> -nitrozoantranilat (<i>Z</i>)-NO-MMA	
	δ _C , mult.	δ _H (J u Hz)	δ _C , mult.	δ _H (J u Hz)
1	127,1 C	-	127,0 C	-
2	141,6 C	-	138,9 C	-
3	126,0 CH	7,40 dd (7,9, 1,1)	127,1 CH	7,05 dd (7,8, 1,1)
4	133,0 CH	7,67, td (7,7, 1,6)	133,7 CH	7,64, td (7,7, 1,6)
5	128,9 CH	7,53, td (7,7, 1,1)	129,6 CH	7,49, td (7,7, 1,2)
6	131,4 CH	8,01, dd (7,8, 1,6)	131,3 CH	8,03, dd (8,1, 1,5)
-COOCH ₃	166,1 C	-	164,9 C	-
-COOCH ₃	52,6 CH ₃	3,82, s	52,5 CH ₃	3,82, s
-N(NO)CH ₃	35,3 CH ₃	3,41, s CH ₃	41,0 CH ₃	4,15, s CH ₃

GC-MS analiza (temperature injektora, kolone i transfer linije tokom GC eksperimenta su bile 250, 70-315 i 320 °C) proizvoda nitrozovanja ukazivala je na interesantno ponašanje metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata pri zagrevanju. U gasnom hromatogramu (slika 5.4.2) nije postojao pik koji bi odgovarao pomenutom jedinjenju, ali su se javila dva pika na retencionim vremenima 14,754 min (RI 1419) i 18,659 min (RI 1583) međusobno povezana podignutom osnovnom linijom. Prvi pik, na manjem retencionom vremenu (14,754 min), odgovarao je metil-*N*-metilantranilatu. Maseni spektar drugog jedinjenja (18,659 min) je bio veoma sličan masenom

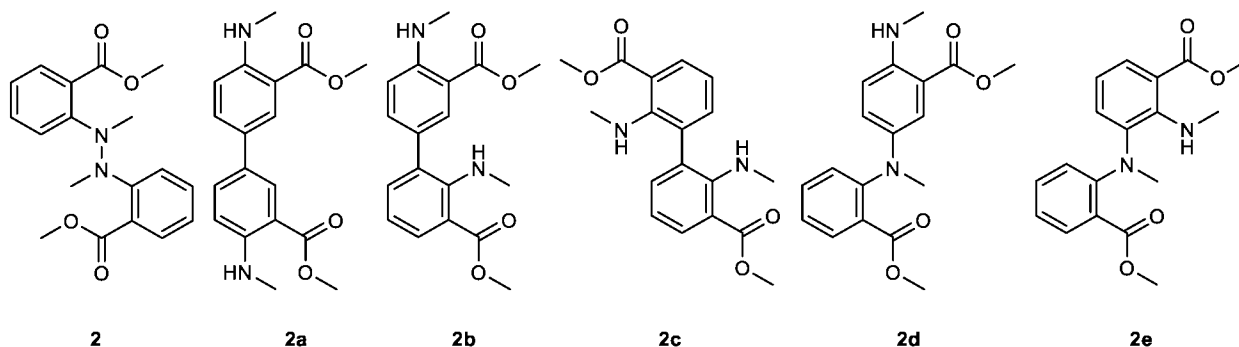
spektru jedinjenja NO-MMA, s tim što se molekulski jon nalazio na vrednosti m/z 328. Parna m/z vrednost M^{+} jona ukazala je da jedinjenje sadrži paran broj N atoma. Na osnovu relativnog inteziteta $[M+1]^{+}$ i M^{+} jona utvrđeno je da jedinjenje na Rt 18,659 min sadrži 18 C-atoma (odnos $M : [M+1]$ je bio 5,0). Ovo i preciznija vrednost m/z M^{+} jona (328,20) ukazivali su da bi molekulska formula pomenutog jedinjenja mogla da bude $C_{18}H_{20}N_2O_4$. Na osnovu fragmentacije iz MS spektra (slične onoj MMA) i činjenice da molekulska masa odgovara dvostrukoj molekulskoj masi MMA umanjenoj za masu 2 H-atoma, pretpostavljeno je da nepoznato jedinjenje predstavlja proizvod oksidativnog kuplovanja dva molekula MMA. Do ove reakcije bi moglo da dođe usled rekombinacije dva slobodna radikala nastala termalnom degradacijom NO-MMA tokom GC eksperimenta pri kome dolazi do homolitičkog raskidanja N-NO veze (slika 5.4.3). Usled delokalizacije nesparenog elektrona u benzenov prsten (**1a-1d**), slobodni radikali se mogu rekombinovati na šest različitih načina (slika 5.4.4). Kod svih struktura (**2a-e**), osim strukture **2**, neophodno je da nakon rekombinacije radikala dođe do transfera protona koji vodi rearomatizaciji nagrađenog proizvoda. Uzimajući u obzir sterne i energetske faktore, najverovatnije su strukture **2a** i **2d**. Međutim, iako je N-N veza slabija od C-N i C-C veza, ako bi došlo do C-C i C-N kuplovanja nastala bi složena smeša različitih proizvoda koji svi zahtevaju i korak rearomatizacije, a što nije slučaj kod N-N kuplovanja. Pored rekombinacije, druga sudbina slobodnog radikala metil-*N*-metilantranilata je apstrakcija H-atoma koja vodi građenju MMA (Rt 14,754 min).



Slika 5.4.2. Gasni hromatogram (TIC) sirovog proizvoda dobijenog nitrozovanem jedinjenjem NO-MMA



Slika 5.4.3. Homolitičko raskidanje N-NO veze i prikaz rezonantnih struktura nastalog slobodnog radikala



Slika 5.4.4. Moguće strukture jedinjenja nastalog rekombinacijom slobodnih radikala dobijenih termalnom degradacijom NO-MMA tokom GC analize

Razvlačenje (engl. *tailing*) pika metil-*N*-metilantranilata ukazuje na to da se jedan deo metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata raspao u injektoru (250 °C), dok je drugi (preostali) deo ispario i kretao se kroz hromatografsku kolonu, nakon čega je (na koloni i/ili u transfer liniji) podlegao potpunoj termalnoj degradaciji. Oštrina pika koji potiče od jedinjenja **2** ukazuje na to da ovo jedinjenje nije nastajalo postepeno u toku GC analize, već je nastalo u kratkom vremenskom intervalu, najverovatnije u transfer liniji, delu instrumenta sa najvišom temperaturom (320 °C). Termalnom degradacijom jedinjenja NO-MMA na koloni nastaje samo jedinjenje MMA, jer je na koloni verovatnoća apstrakcije vodonika sa stacionarne faze veća od verovatnoće rekombinacije dva radikala, što uzrokuje dizanje osnovne linije u hromatogramu.

Kako bismo potvrdili pretpostavku da jedinjenje **2** nastaje u transfer liniji, a ne u injektoru ili koloni, izvedena je serija eksperimenata u kojima je temperatura GC sistema (injektora, kolone i transfer linije) varirana od 190 do 250 °C. Najviša temperatura odgovarala je temperaturi transfer linije i ona je uvek bila za najmanje 10 °C viša od najviše temperature hromatografske kolone. Na temperaturama nižim od 220 °C nije dolazilo do termalne degradacije nitrozo jedinjenja i u hromatogramu se javio samo pik metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata. Dakle, proizvod kuplovanja **2** nastaje u kratkom vremenskom intervalu kada

nitrozo jedinjenje dođe do transfer linije i to najverovatnije u parnoj fazi (npr. u zagrejanom helijumu). Ovakva sredina (razblaženi radikali u inertnom gasu) pogodna je za rekombinaciju dva slobodna radikala, dok za transfer protona najverovatnije „nema dovoljno vremena“ (intramolekulski transfer protona nije moguć s obzirom da usled geometrije molekula nije moguće sigmatropno premeštanje).

Još jedna činjenica koja ide u prilog da rekombinacijom radikala nastaje derivat hidrazina, a ne bifenila ili difenilamina, je to što rekombinacijom radikala nastaje samo jedan proizvod, proizvod kinetičke kontrole reakcije (u gasnom hromatogramu nisu detektovani drugi proizvodi rekombinacije), iako su gotovo svi ostali izomeri (**2a-e**) termodinamički stabilniji u odnosu na **2**. Na osnovu ovoga, kao i fragmentacije u masenom spektru jedinjenja **2**, koji je jako podsećao na maseni spektar „monomera“, i činjenice da bi fragmentacija bifenil i difenilamino derivata dala drugačija, zaključeno je da je jedinjenje **2** dimetil-2,2'-(1,2-dimetil-hidrazin-1,2-diil)dibenzoat.

Kako bismo potvrdili strukturu jedinjenja **2** i NMR-om spektralno okarakterisali nastale proizvode termalne tegradiacije, izvedena je preparativna termoliza NO-MMA. Metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilat je zatopljen u evakuisani stakleni sud i zagrevan u uljanom kupatilu na 220 °C tokom 15 minuta. Promena boje reakcione smeše (tamnjenje) je ukazala da na temperaturi 220 °C dolazi do značajne degradacije jedinjenja NO-MMA. Serijom eksperimenata u kojima je varirano vreme trajanja termolize utvrđeno je da je 15 min dovoljno da se pomenuto jedinjenje u potpunosti razgradi (praćenje toka reakcije je vršeno pomoću tankoslojne hromatografije). Nakon *dry flash* hromatografije termolizata, spojene frakcije su analizirane metodama GC-MS i NMR.

Frakcija 4 je bila dovoljno čista za NMR analizu. GC-MS analizom je utvrđeno da je glavni isparljivi sastojak ove frakcije jedinjenje koje eluira na 36,941 min (RI (DB-5MS) 2570). Pik molekuskog jona na m/z 267 je ujedno bio i osnovni pik. Neparna m/z vrednost M^{+} ukazivala je da pomenuto jedinjenje sadrži neparan broj N atoma, što je potvrđeno masenom spektrometrijom visoke rezolucije, kojom je utvrđeno da je molekulska formula jedinjenja $C_{16}H_{13}NO_3$. Visok indeks manjka vodonika (11 nezasićenja) ukazuje da je došlo do rekombinacije dva molekula metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata i da 8 od 11 nezasićenja potiče od dva aromatična prstena. Molekulska formula ukazuje da ovo jedinjenje sadrži 2 C, 7 H, 3 N i 3 O atoma manje od dva molekula jedinjenja NO-MMA.

^{13}C NMR spektar je sadržavao signale za 16 neekvivalentnih ugljenikovih atoma čime je potvrđeno prisustvo 16 C-atoma u molekulu. Intezitet pet signala je bio vrlo slab. Na osnovu

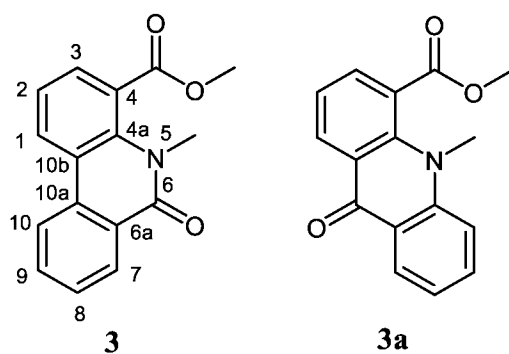
DEPT90/135 spektara je zaključeno da jedinjenje sadrži samo CH₃ i CH grupe. U ¹H NMR spektru, u oblasti hemijskih pomeranja u kojoj se javljaju signali protona vezanih za aromatično jezgro uočeno je 7 signala: tri dubleta dubleta (dd, 7,74, 8,39, 8,54 ppm), dva dubleta dubleta dubleta (ddd, 7,62 i 7,79 ppm), jedan dublet (d, 8,29 ppm) i jedan triplet (t, 7,33 ppm), što je ukazivalo na prisustvo dva aromatična jezgra u molekulu od kojih je jedno bilo 1,2-disupstituisano, a drugo 1,2,3-trisupstituisano. Dva signala u ¹H NMR spektru (singleti na 3,63 i 3,98 ppm) ukazivali su na prisustvo *N*-metil i *O*-metil grupa. Asignacija svih ¹H- i ¹³C-signala je izvršena na osnovu korelacija uočenih u 2D NMR spektrima (¹H-¹H COSY i HMBC) (tabela 5.9). U HMBC spektru je uočena korelacija između protona na 3,98 ppm i ugljenika na 169,3 ppm što je ukazivalo na prisustvo estarske grupe. Prisustvo estarske funkcionalne grupe je potvrđeno prisustvom jona u masenom spektru koji odgovaraju gubitku OCH₃ ili COOCH₃ grupa, kao i trakom na 1722 cm⁻¹ u IR spektru.

Tabela 5.9. ¹H (400 MHz) i ¹³C (100 MHz) NMR spektralni podaci (CDCl₃) glavnog sastojka frakcije 4

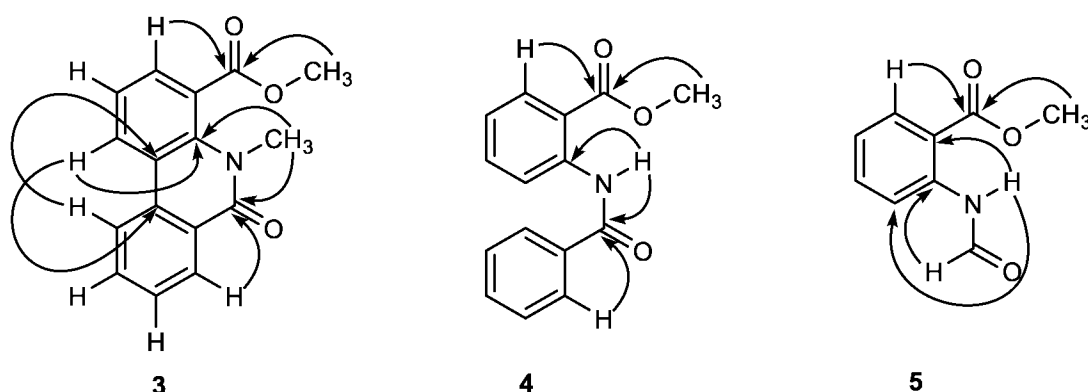
Položaj	δ _C , mult.	δ _H (J u Hz)
1	125,2 CH	8,39, dd (8,3, 1,5)
2	121,9 CH	7,33, t (7,8)
3	130,9 CH	7,74, dd (7,5, 1,5)
4	122,4 C	–
4a	137,6 C	–
6	162,8 C	–
6a	125,4 C	–
7	128,8 CH	8,54, dd (8,0, 1,0)
8	128,6 CH	7,62, ddd (8,1, 7,2, 1,0)
9	132,8 CH	7,79, ddd (8,3, 7,2, 1,5)
10	121,8 CH	8,29, d (8,2)
10a	133,1 C	–
10b	121,2 C	–
-COOCH ₃	169,3 C	–
-COOCH ₃	52,8 CH ₃	3,98, s
-NCH ₃	36,4 CH ₃	3,63, s

Multipletnosti i odgovarajuće konstante kuplovanja protona u ¹H NMR i korelacije u ¹H-¹H COSY spektrima ukazale su da protoni na 7,33, 7,74 i 8,39 ppm pripadaju trisupstituisanom, a protoni na 7,62, 7,79, 8,29 i 8,54 ppm disupstituisanom aromatičnom jezgru. Ovi podaci bi mogli da odgovaraju strukturama predstavljenim na slici 5.4.5. Vrednost hemijskog pomeranja karbonilnog ugljenika više odgovara amidnom ugljeniku, nego ugljeniku konjugovane keto grupe. *Cross*-pikom između protona na 3,63 ppm i ugljenika na 162,8 ppm u HMBC spektru je potvrđeno da su *N*-metilamino i karbonilna grupa deo amidne grupe što je u saglasnosti sa strukturom **3**, tj. da nisu međusobno udaljene kao u strukturi **3a**. Struktura **3** je dodatno

potvrđena prisustvom *cross*-pikova u HMBC spektru (slika 5.4.6) i u ^1H - ^1H COSY spektru (H(1)-H(2), H(2)-H(3), H(7)-H(8), H(9)-H(10)). Nedavno je Han sa saradnicima (2014) izvršio sintezu i objavio spektralne podatke za jedinjenje **3** (međutim bez asignacije ^1H - i ^{13}C -NMR spektara). NMR i IR podaci jedinjenja **3** se slažu sa pomenutim literaturnim podacima (Han *et al*, 2014).



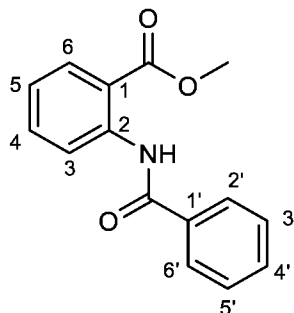
Slika 5.4.5. Moguće strukture glavnog sastojaka frakcije 4



Slika 5.4.6. Odabrane HMBC interakcije jedinjenja **3**, **4** i **5**

GC-MS analizom frakcija 1, 2 i 3 detektovano je jedinjenje koje eluira na 31,951 min (RI (DB-5MS) 2249) i čiji se molekulski jon javlja na vrednosti m/z 255 u masenom spektru. Neparna m/z vrednost M^+ (255) ukazala je na neparan broj N-atoma u jedinjenju, a masa je odgovarala molekulknoj formuli $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_3$. Poređenjem masenog spektra ovog jedinjenja sa masenim spektrima iz MS biblioteka pretpostavljeno je da je jedinjenje derivat antranilne kiseline i da pored toga sadrži i benzamidnu grupu. Uzimajući sve ovo u obzir pretpostavljeno je da je jedinjenje metil-*N*-benzoilantranilat (**4**, slika 5.4.7). Kako bismo potvrdili ovu pretpostavku pomenuto jedinjenje je sintetisano polazeći od benzoil-hlorida i metil-antranilata u prisustvu Et_3N (Schneider *et al*, 2013). Struktura sintetisanog jedinjenja je potvrđena 1D- i 2D-NMR (na slici 5.4.6 su date značajne HMBC interakcije koje su korišćene pri asignaciji ^1H - i ^{13}C -NMR

spektara, dok se u tabeli 5.10 nalaze NMR spektralni podaci). GC ko-injekcijom je potvrđeno da je jedinjenje **4** sastojak frakcija 1-3.



Slika 5.4.7. Numeracija atoma jedinjenja **4**

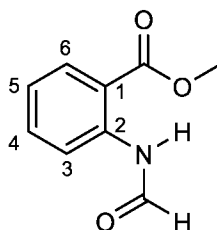
Tabela 5.10. ^1H (400 MHz) i ^{13}C (100 MHz) NMR spektralni podaci (CDCl_3) jedinjenja **4** i **5**

Položaj	Metil- <i>N</i> -benzoilantranilat (4)		Metil- <i>N</i> -formilantranilat (5)	
	δ_{C} , mult.	δ_{H} (<i>J</i> u Hz)	δ_{C} , mult.	δ_{H} (<i>J</i> u Hz)
1	115,3 C	-	115,2 C	-
2	141,9 C	-	140,8 C	-
3	131,0 CH	8,09, dd (8,1, 1,6)	121,2 CH	8,72 dd (8,6, 1,0)
4	122,6 CH	7,12, ddd (8,1, 7,2, 0,9)	134,8 CH	7,57, ddd (8,6, 7,2, 1,6)
5	134,8 CH	7,61, ddd (8,5, 7,2, 1,6)	123,2 CH	7,11, ddd (8,4, 7,2, 1,0)
6	120,5 CH	8,94, dd (8,5, 0,9)	130,9 CH	8,05, dd (8,4, 1,6)
1'	134,9 C	-	-	-
2', 6'	127,4 CH	8,06, dd (8,1, 1,6)	-	-
3', 5'	128,8 CH	7,55, ddd (8,1, 7,6, 0,6)	-	-
4'	132,0 CH	7,53, br d (7,6)	-	-
-COOCH ₃	169,1 C	-	168,6 C	-
-COOCH ₃	52,5 CH ₃	3,96, s	52,5 CH ₃	3,94, s
-NHCO	165,7 NHCO	12,04, br s	159,6 NHCO	8,52, s NHCHO 7,55, s NHCHO

^aU NMR spektrima je uočeno prisustvo dva rotamera, kao što je i prethodno objavljeno (Chen *et al.*, 2014). Ovde su dati spektralni podaci samo glavnog rotamera.

Frakcija 3 je bila složena smeša od dvadesetak jedinjenja među kojima je bio najzastupljeniji metil-*N*-formilantranilat (**5**, slika 5.4.8) (oko 50%). Njegov identitet je potvrđen na osnovu analize MS spektra (jonima koji odgovaraju gubitku OCH₃ grupe ili COOCH₃ je potvrđeno prisustvo estarske grupe, a jonom koji odgovara gubitku CO je potvrđeno prisustvo *N*-formil grupe). Frakcija 3 je podvrgnuta NMR analizi bez daljeg prečišćavanja čime je potvrđen identitet jedinjenja **5**. ^1H NMR je sadržavao signale, dva dd (8,05 i 8,72 ppm) i dva ddd (7,11 i 7,57 ppm), karakteristične za *orto*-disupstituisano aromatično jezgro. Asignacija svih signala protona i ugljenika-13 je izvršena zahvaljujući 2D NMR (^1H - ^1H COSY i HMBC) spektrima. Na primer, hemijska pomeranja za C(1) i C(2) su utvrđena na osnovu HMBC spektra, pošto signali

ta dva ugljenika nisu uočeni u ^{13}C NMR spektru. Izmenljivi proton vezan za azotov atom –NHCHO grupe je asigniran zahvaljujući *cross*-pikovima u HMBC spektru koji potiču od kuplovanja datog protona sa C(1) i C(3) ugljenicima. Iako je prisustvo dva rotamera uočeno i u našim NMR spektrima jedinjenja **5**, kao što je prethodno i bilo poznato (Chen *et al*, 2014), ovde su dati ^1H - i ^{13}C -NMR podaci samo za glavni rotamer (tabela 5.10). Odabrane HMBC interakcije su predstavljene na slici 5.4.6.



Slika 5.4.8. Numeracija atoma jedinjenja **5**.

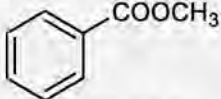
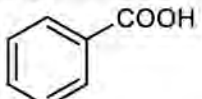
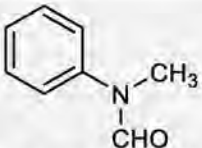
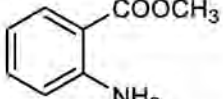
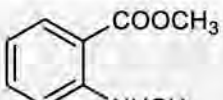
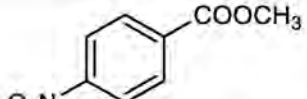
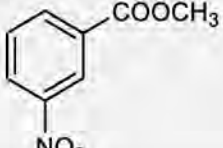
GC i GC-MS analizom frakcija identifikovano je 46 različitih jedinjenja što je činilo od 25,2 do 94,7% površina ispod detektovanih pikova u gasnim hromatogramima ovih frakcija. Identifikovani sastojci, njihova relativna zastupljenost u frakcijama, molarne mase, Rt i RI vrednosti i način identifikacije su dati u tabeli 5.11. Prilikom donošenja konačne odluke o tome koja struktura odgovara kom piku, uzeta su u obzir tri argumenta. Molekulska masa i MS fragmentacioni šablon su korišćeni kako bi se dobila ideja o strukturi određenog jedinjenja, a za koju bi se moglo očekivati da nastaje prilikom termolize. Smislenost predložene strukture je potvrđena korelacionom analizom predviđenih tačaka ključanja ovih jedinjenja (ChemBio3D Ultra 13.0) sa njihovim eksperimentalno određenim retencionim indeksima (Heberger i Kowalska, 1998). Sva jedinjenja čije su se vrednosti T_k predviđene korelacionom jednačinom značajno razlikovale od izračunatih vrednosti (za 30 i više stepeni K) isključena su iz liste identifikovanih jedinjenja, a ovo je urađeno nekoliko puta, sve dok nije postignuta dobra korelacija. Konačna dobijena korelaciona jednačina zavisnosti T_k od RI je:

$$T_k = 351,73604 + 0,14209\text{RI}, R^2 = 0,95742$$

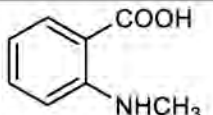
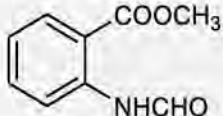
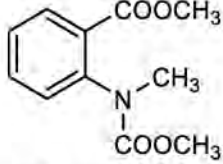
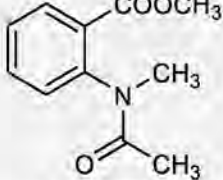
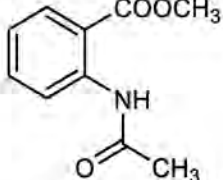
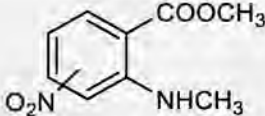
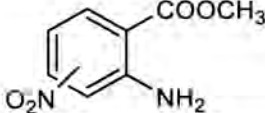
gde T_k predstavlja predviđenu tačku ključanja, a RI eksperimentalni retencioni indeks jedinjenja, a R^2 korelacioni koeficijent.

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

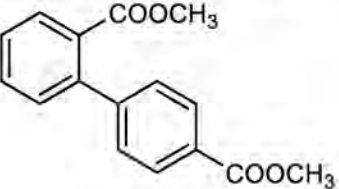
Tabela 5.11. Proizvodi preparativne termolize NO-MMA

N ^o	Struktura jedinjenja ^a	M [g/mol]	Rt [min]	RI	IdenMet ^b	Fr1 [%]	Fr2 [%]	Fr3 [%]	Fr4 [%]	Fr5 [%]	Fr6 [%]	Fr7 [%]	
1.		(6)	136	6,989	1103	RI, MS, Col	0,3	tr	-	-	-	-	
2.		(7)	122	8,979	1181	RI, MS, Col	-	0,1	0,3	-	-	-	
3.		(8)	135	11,545	1285	RI*, MS	-	tr	0,1	-	-	-	
4.		(9)	151	13,181	1353	RI, MS, Col	4,0	10,7	0,2	-	tr	4,0	1,7
5.		(MMA)	165	14,754	1419	RI, MS, Col	82,7	15,8	5,4	-	0,9	1,3	0,3
6.		(10)	181	15,697	1458	RI, MS	-	18,8	2,0	-	-	-	-
7.		(11)	181	16,385	1486	RI, MS	-	0,2	-	-	-	-	-

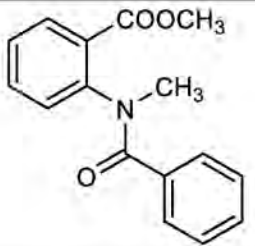
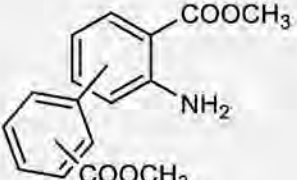
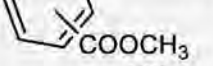
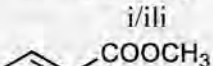

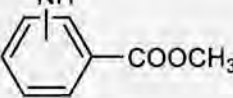
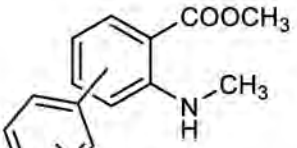
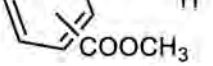
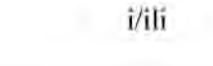
Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

8.		(12)	151	16,808	1503	RI*, MS, Col	-	0,8	0,2	-	-	-	-
9.		(5)	179	18,307	1568	RI*, MS, NMR	-	18,3	48,7	-	tr	3,3	-
10.		(13)	223	18,988	1597	RI*, MS	-	-	-	-	1,1	-	-
11.		(14)	207	19,152	1605	RI*, MS*	-	0,1	0,7	-	-	-	-
12.		(15)	193	19,241	1609	RI*, MS	-	0,2	0,2	-	-	-	24,8
13.		(16)	210	19,650	1627	RI*, MS	-	1,4	1,1	-	-	-	tr
14.		(17)	196	21,001	1688	RI*, MS	-	tr	tr	-	tr	tr	-

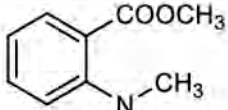
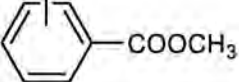
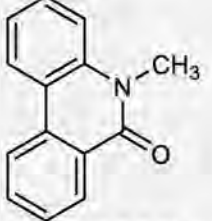

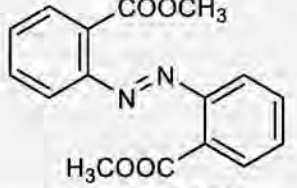
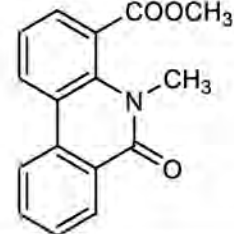
Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

15.		(18)	241	24,767	1869	RI*, MS*	tr	0,1	-	-	-	-	-
16.		(19a)	270	25,842	1923	RI*, MS	-	2,7	0,3	-	tr	-	-
17.		(19b)	270	29,001	2081	RI*, MS	0,6	3,4	0,1	-	tr	-	tr
18.		(19c)	270	29,434	2102	RI*, MS*	0,5	1,8	0,1	-	tr	-	-
19.		(20)	227	26,343	1949	RI*, MS*	tr	tr	-	-	-	-	-

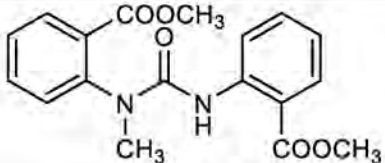
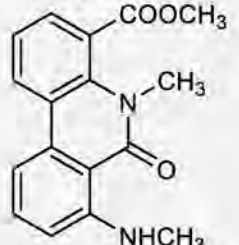
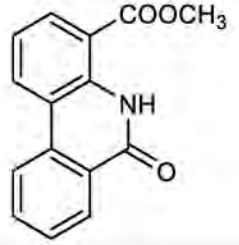
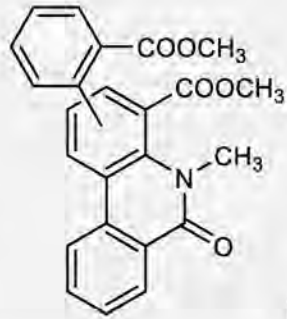
Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

20.		(21)	269	29,374	2099	RI*, MS*	-	-	-	-	tr	0,5	0,8
21.				29,924	2130	RI*, MS*	-	0,1	tr	1,6	tr	tr	tr
22.				32,862	2304	RI*, MS*	1,1	0,6	0,2	-	-	-	tr
23.		(22)		32,964	2311	RI*, MS*	tr	0,1	-	-	tr	-	-
24.			285	33,641	2353	RI*, MS*	-	0,3	0,7	1,3	-	-	tr
25.		(23)		33,694	2357	RI*, MS*	-	tr	-	-	2,1	tr	tr
26.				34,195	2389	RI*, MS*	0,2	0,1	0,1	-	-	0,4	tr
27.				35,985	2505	RI*, MS*	-	tr	tr	-	-	tr	0,2
28.		(24)		30,577	2167	RI*, MS*	-	0,2	tr	-	tr	-	tr
29.			299	30,790	2180	RI*, MS*	0,4	3,8	0,2	0,4	-	0,4	-
30.				31,792	2240	RI*, MS*	-	tr	-	-	-	-	-
31.		(25)		32,268	2269	RI*, MS*	0,3	0,7	tr	-	-	-	-

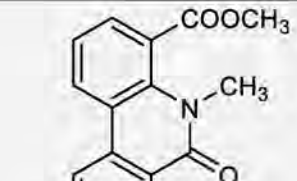
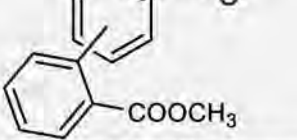
Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

32.				34,085	2382	RI*, MS*	2,1	1,9	0,1	1,7	tr	tr	tr
33.				34,591	2414	RI*, MS*	1,2	2,3	tr	1,3	tr	tr	tr
34.		(26)	209	31,016	2194	RI*, MS*	-	-	0,2	-	-	-	-
35.		(4)	255	31,951	2249	RI*, MS*, Col, NMR	0,8	0,4	tr	-	-	-	-
36.		(27)	298	33,090	2319	RI*, MS*	0,5	0,5	0,5	-	tr	tr	tr
37.		(3)	267	36,941	2570	RI*, MS*, NMR	-	-	4,8	80,8	51,7	1,5	tr

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

38.		(28)	342	37,020	2576	RI*, MS*	-	tr	-	tr	3,5	-	-
39.		(29)	296	37,060	2578	RI*, MS*	-	-	-	-	-	-	0,7
40.		(30)	253	37,291	2594	RI*, MS*	-	-	tr	5,5	6,5	-	-
41.		(31)	401	46,742	3320	RI*, MS*	-	-	-	-	-	2,7	1,1
42.				46,866	3331	RI*, MS*	-	-	-	-	-	1,7	0,4
43.				48,008	3430	RI*, MS*	-	-	-	-	-	2,9	1,7
44.				i/ili	(32)	49,288	3544	RI*, MS*	-	tr	-	-	-

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

45.		50,333	-	RI*, MS*	-	-	-	-	-	2,6	0,6
46.		51,392	-	RI*, MS*	-	-	-	-	-	1,5	1,3
Ukupno identifikovano					94,7	85,4	66,2	92,6	65,8	25,2	34,2

^a Jedinjenja su navedena po redosledu eluiranja sa DB-5MS kolone (Rt - retenciono vreme (u min) i RI - eksperimentalno određeni retencioni indeksi za gore pomenutu kolonu na osnovu ko-injektiranih homologa serije *n*-alkana C₁₁-C₃₆);

^b RI, sastojak identifikovan slaganjem retencionih indeksa sa literaturnim vrednostima;

RI*, sastojak identifikovan korelisanjem izračunate tačke ključanja za pretpostavljenu strukturu i eksperimentalnog RI;

MS, sastojak identifikovan poređenjem masenih spektara;

MS*, sastojak identifikovan analizom fragmentacionog šablona u masenom spektru;

CoI, sastojak identifikovan ko-injektiranjem standarda;

NMR, struktura izolovanog čistog sastojka potvrđena ¹H- i ¹³C-NMR spektralnom analizom;

-, sastojak nije detektovan;

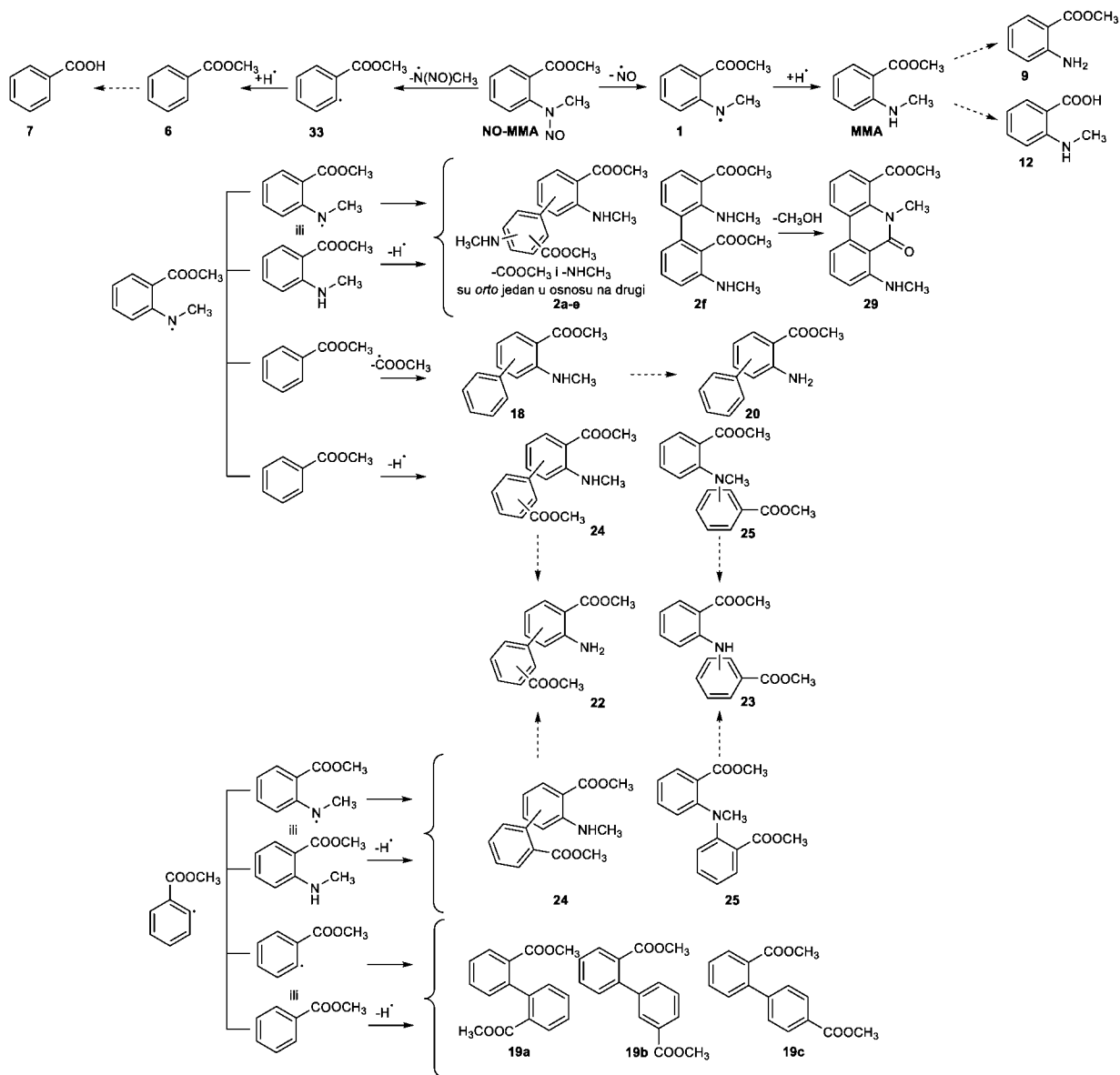
tr, sastojak prisutan u procentu manjem od 0,05% (trag).

Korelacija predviđene tačke ključanja (T_k) i eksperimentalnog retencionog indeksa (RI) je izvršena i za jedinjenje **2**, bez obzira što ono nije detektovano tokom GC-MS analize proizvoda pirolize metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata u kondenzovanoj fazi. Na osnovu date jednačine, RI jedinjenja **2** bi trebalo da iznosi 2500 što je za oko 1000 RI jedinica više od eksperimentalno nadene vrednosti (RI 1583). Ovo potvrđuje pretpostavku da značajna količina jedinjenja NO-MMA prolazi kroz GC kolonu nepromenjena i da do termalne degradacije i rekombinacije metil-*N*-metilantranilatnih radikala dolazi tek u znatno toplijoj transfer liniji. Deo nitrozo jedinjenja koji se nije raspao u injektoru i na koloni, biva potpuno transformisan u jedinjenje **2** u transfer liniji, čime je objašnjeno brzo „eluiranje“ jedinjenja **2** sa GC kolone, s obzirom da nastaje na njenom samom kraju.

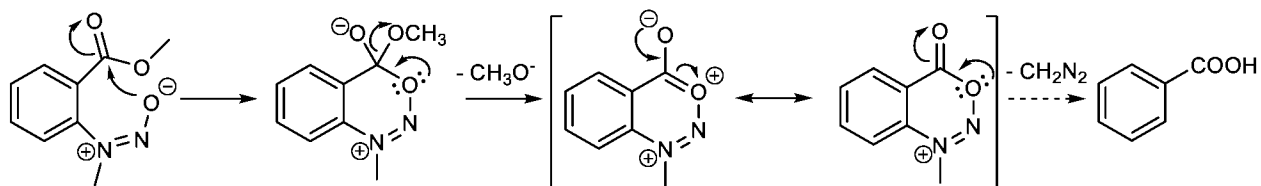
Pažljivim razmatranjem struktura identifikovanih sastojaka termolizata pretpostavljeni su glavni putevi termolize metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata. Kako nijedan od identifikovanih proizvoda ne sadrži nitrozo grupu, pretpostavljeno je da metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilat prvobitno podleže raskidanju N-NO ili C_{Ar} -NNO veze. S obzirom na stabilnost NO i delokalizovanog metil-*N*-metilantranilatnog radikala, N-NO veza lako podleže homolitičkom raskidanju (slika 5.4.3), pri čemu nastaju radikali **1a-1d**. Najveći broj proizvoda identifikovanih analizom termolizata predstavlja proizvode reakcija u kojima učestvuju upravo ovi radikali (MMA, **9**, **12**, **29**, i delimično **3**, **4**, **18**, **20**, **21**, **22**, **23**, **24**, **25**, **26**, **30**, **31**, **32**).

Takođe je identifikovano i nekoliko jednostavnih derivata benzoeve kiseline, tj. proizvoda koji ne sadrže *orto*-NHCH₃ grupu (**6**, **7**, **19a-c**, i delimično **18**, **20**, **22**, **23**, **24**, **25**, **31**, **32**). Ovi proizvodi mogu da nastanu iz hipotetičkog metil-benzoatnog radikala (**33**) ili reakcijom metil-*N*-metilantranilatnog radikala (**1**) sa metil-benzoatom (**6**). Mehanizam nastanka **6** i radikala **33** nije u potpunosti razjašnjen, mada postoji mogućnost da tokom termolize pored homolitičkog raskidanja N-NO, dolazi i do homolitičkog raskidanja C_{Ar} -NNO veze (slika 5.4.9). Pored toga, moguće je da metil-benzoatni radikal i njemu srodne reakcione vrste nastaju prema nekom složenijem mehanizmu, npr. mehanizmom na slici 5.4.10. Međutim, ne treba isključiti ni mogućnost simultanog odvijanja oba mehanizma. Nakon homolitičkog raskidanja N-NO i C_{Ar} -NNO veza, radikali koji nastaju, metil-*N*-metilantranilatni (**1a-d**) i metil-benzoatni (**33**) radikal, mogu da apstrahuju vodonike, pri čemu nastaju metil-*N*-metilantranilat i metil-benzoat (**6**), mogu da se rekombinuju na nekoliko različitih načina ili da reaguju sa jedinjenjima MMA i **6** pri čemu nastaju različiti proizvodi koji podležu daljim modifikacijama (npr. *O*- ili *N*-demetilovanju ili dekarboksilaciji) (slike 5.4.9 i 5.4.11).

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

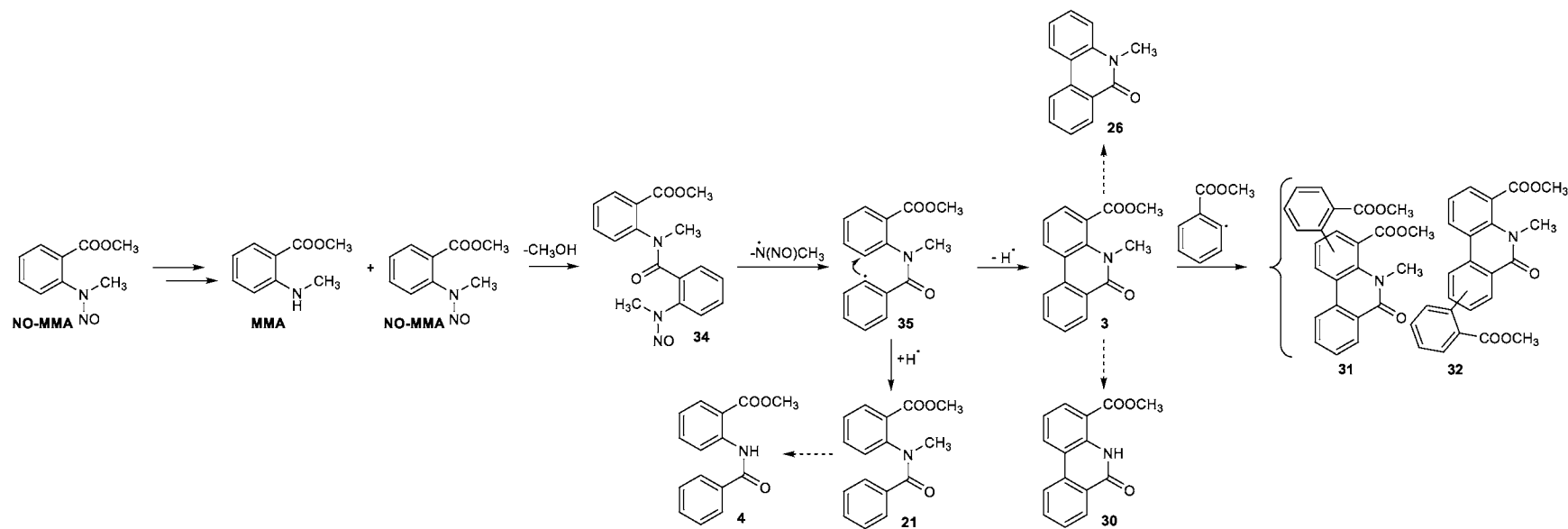


Slika 5.4.9. Mogući mehanizmi nastajanja proizvoda termolize NO-MMA



Slika 5.4.10. Mogući mehanizam nastanka benzojeve kiseline (6)

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost



Slika 5.4.11. Dodatni putevi građenja proizvoda termolizata u kondenzovanoj fazi

Dva metil-*N*-metilantranilatna radikala mogu da se rekombinuju na tri različita načina kao što je gore i pomenuto (strukture **2** i **2a-d**). Nijedan od ovih proizvoda nije detektovan među proizvodima termolize metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata u kondenzovanoj fazi. Međutim, ne treba isključiti mogućnost da radikal **1b** reaguje sa metil-antranilatnom pri čemu nastaje **2f**, još jedan regioizomer strukture **2**. Iako jedinjenje **2f** nije identifikovano tokom analize frakcija, pretpostavljeno je da do njegovog građenja dolazi, ali da usled odgovarajuće orijentacije –NHCH₃ i –COOCH₃ grupa, ono podleže intramolekularnoj aminolizi koja vodi građenju šestočlanog laktama **29** koji je detektovan u frakciji 7.

Druga sudbina metil-*N*-metilantranilatnog slobodnog radikala je reakcija sa metilbenzoatnim radikalom ili metilbenzoatom pri čemu nastaju **24** i/ili **25**. U slučaju rekombinacije metil-*N*-metilantranilatnog radikala i metilbenzoatnog radikala broj mogućih regioizomernih proizvoda je manji nego kad reaguju metil-*N*-metilantranilni radikal i metilbenzoat. Nespareni elektron metilbenzoatnog radikala nije delokalizovan i novoformirana C_{Ar}-C_{Ar} veza mora da bude *orto*- u odnosu na -COOCH₃ grupu metilbenzoata. Metil-*N*-metilantranilatni radikal može da reaguje sa metilbenzoatom tako da dođe do *ipso* napada, pri čemu metilbenzoat podleže dekarboksilaciji čime nastaje jedinjenje **18**. Jedinjenja **18**, **24** i **25** dalje podležu *N*-demetilovanju pri čemu dolazi do građenja jedinjenja **20**, **22** i **23**.

Još jedan reakcioni put koji se odvija prilikom termolize u kondenzovanoj fazi je aminoliza metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata metil-*N*-metilantranilatnom, pri čemu nastaje jedinjenje **34** koje dalje podleže homolitičkom raskidanju C_{Ar}-NNO veze (slika 5.4.11). Novoformirani radikal (**35**) može da apstrahuje H[•] pri čemu nastaje **21** ili da intramolekularski ciklizuje pri čemu nastaje **3**. Jedinjenje **3** može da podleže *N*-demetilovanju pri čemu se gradi **30**, dekarboksilovanju da nagradi **26** ili može da reaguje sa metilbenzoatnim radikalom da da jedinjenje **31** i/ili **32**. Drugi mogući mehanizam nastanka jedinjenja **21** je aminoliza metilbenzoata metil-*N*-metilantranilatnom. Pored gore pomenutih reakcija u kojima učestvuje aromatično jezgro bar jednog reaktanta još jedna grupa jedinjenja je detektovana analizom termolizata koja ukazuje da prilikom termolize dolazi i do acilovanja (**4**, **5**, **8**, **13**, **14**, **15**, **21** i **28**). Na primer, jedinjenje **14** nastaje acilovanjem MMA. Moguća su dva mehanizma građenja jedinjenja **4** i **15**; demetilovanje jedinjenja **21** i **14**; jedinjenje **4** može da nastane aminolizom metil-antranilata i metilbenzoata, dok **15** može da nastane acilovanjem jedinjenja **9**. Takođe su identifikovana i dva proizvoda formilovanja (**5** i **8**). Poreklo sirćetne i mravlje kiseline nije u potpunosti razjašnjeno.

Rekombinacijom dva metil-benzoatna radikala gradi se samo **19a**, dok reakcijom metil-benzoatnog radikala i metil-benzoata mogu da nastanu **19a**, **19b** i **19c**. Termolizat sadrži četiri nitro-jedinjenja, dva nitro-derivata metil-benzoata (**10** i **11**), dok se **16** i **17** dobijaju hipotetičkim nitrovanjem metil estara antranilne i *N*-metilantranilne kiseline. Azo-jedinjenje **27** najverovatnije nastaje kuplovanjem dva radikala metil-*N*-metilantranilata, praćena oksidacijom.

5.5. ANTIOKSIDANTNA AKTIVNOST

Antioksidantna aktivnost metil-*N*-metilantranilata (MMA) i izopropil-*N*-metilantranilata (IMA) je procenjena u tri *in vitro* modela (sposobnost hvatanja DPPH[•] radikala, ABTS^{•+} radikal-katjona i superoksidnog radikala). Rezultati ovih testova su dati u tabeli 5.12. Kao pozitivne kontrole korišćeni su butilovani hidroksitoluen (BHT) i kvercetin. Butilovani hidroksitoluen je sintetska supstanca koja se zbog svojih antioksidantnih osobina prvenstveno koristi kao dodatak hrani, a zatim i kozmetičkim preparatima, lekovima itd. (Bondet *et al*, 1997). Kvercetin je, s druge strane, prirodni flavonoidni antioksidans prisutan u voću i povrću (Murota i Terao, 2003).

Pozitivne kontrole, lipofilni BHT i kvercetin, pokazale značajnu *in vitro* antioksidantnu aktivnost, sa IC₅₀ vrednostima u opsegu od 10 do 30 µg/ml (tabela 5.12), MMA i IMA su pokazali veoma lošu aktivnost (do 8%) pri najvišoj testiranoj koncentraciji od 250 µg/ml. Drugim rečima, rezultati testiranja sposobnosti hvatanja slobodnih radikala pokazuju da dok je manje od 2 (1,6) molekula BHT potrebno sa se neutrališe jedan DPPH radikal, potrebno je više od 700 molekula MMA ili IMA kako bi se proizveo isti efekat. Rastvore antranilata koncentracije koja bi dovela do hvatanja 50% DPPH, ABTS^{•+} ili superoksidnih radikala je nemoguće dobiti rastvaranjem ovih jedinjenja u vodenom medijumu usled njihove slabe rastvorljivosti/mešljivosti sa vodom.

Tabela 5.12. Sposobnost jedinjenja IMA i MMA (rastvora koncentracija 0,25 mg/ml) da hvataju slobodne radikale

Supstanca/radikal	DPPH [•] (%)	ABTS ^{•+} (%)	Superoksid (%)
IMA	2,0	8,0	4,0
MMA	1,8	1,2	0,3
BHT ^a	16,5	7,0	23,3
Kvercetin ^a	10,2	21,3	31,6

^aIC₅₀ (koncentracija supstance u µg/ml čija je sposobnost hvatanja slobodnih radikala 50%) vrednosti za BHT i kvercetin

Međutim, treba imati na umu da stehiometrija reakcije sa radikalima ne objašnjava u potpunosti sve aspekte antioksidantne efikasnosti, s obzirom da i kinetika igra značajnu ulogu (Bondet *et al*, 1997). Na primer, poznato je da je BHT spori antioksidans (Bondet *et al*, 1997). Izgleda da postoji inverzna zavisnost između stehiometrije i brzine reakcije, a ovo ukazuje da što

je reakcija sporija, to je složeniji mehanizam. Znači, moglo bi se očekivati da IMA i MMA deluju po istom (sporom) mehanizmu sličnom mehanizmu delovanja BHT s obzirom da on predstavlja aromatično jedinjenje bogato elektronima koji nema očigledan put koji bi vodio građenju stabilne hinonske strukture (za koju je poznato da je krajnji proizvod mnogih efikasnih antioksidanasa) već najverovatnije podrazumeva građenje di- ili oligomernih struktura (Bondet *et al*, 1997).

5.6. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST

Pretragom literature je utvrđeno da ne postoje podaci o antimikrobnoj aktivnosti etarskog ulja biljne vrste *C. ternata*, kao ni metil- i izopropil-*N*-metilantranilata. Jedini pronađeni podaci, koji se bave dejstvom pomenutih estara *N*-metilantranilne kiseline na mikroorganizme, odnose se na dejstvo MMA i njegovu mogućnost da izazove veći hemotaktički odgovor bakterije *Escherichia coli* u poređenju sa najčešće korišćenim repelentom, indolom (Ohba i Hayashi, 1979). Takođe, MMA je startni materijal za dobijanje metil-antranilata iz metil-*N*-metilantranilata *N*-demetilovanjem od strane bakterije *Bacillus megaterium* (Taup *et al*, 2005). Pretragom literature su pronađeni podaci o antimikrobnoj aktivnosti metil estra antranilne kiseline. Utvrđeno je da metil-antranilat ispoljava inhibitornu aktivnost protiv nekoliko biljnih patogenih gljivica (Dev *et al*, 2004; Nidiry *et al*, 2005; Chambers *et al*, 2013) i jedne vrste biljne patogene bakterije *Xanthomonas fragariae* (Chambers *et al*, 2013), dok ne postoji puno podataka o aktivnosti ovog jedinjenja protiv ljudskih patogenih mikroorganizama, osim što je utvrđeno da pomenuto jedinjenje inhibira rast *Candida albicans*, pri čemu MIC vrednost iznosi 1 mg/ml (Tampieri *et al*, 2005).

Ispitivanjem antimikrobne aktivnosti etarskog ulja biljne vrste *C. ternata* utvrđeno je da ono poseduje veoma dobru antimikrobnu aktivnost protiv soja *Staphylococcus aureus* otpornog na meticilin (MRSA), kao i da inhibira rast bakterije *Escherichia coli* i gljive *Cryptococcus neoformans*. Međutim, s obzirom na vrednost minimalne koncentracije koja inhibira rast pomenutih mikroorganizama (MIC), ovo etarsko ulje se, kao takvo, ne bi moglo koristiti u farmaceutске svrhe (tabela 5.13).

Tabela 5.13. Antimikrobna aktivnost etarskog ulja biljne vrste *C. ternata*

	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i> t444
Zona inhibicije (prečnik) u disk difuzionom testu u dozi od 4 mg po disku	2,5 cm	1,2 cm	0	1,5 cm
MIC	4 mg/ml	> 4 mg/ml	> 4 mg/ml	2 mg/ml

Antimikrobna aktivnost metil- i izopropil-*N*-metilantranilata je ispitivana mikrodilucionom metodom na pet sojeva mikroorganizama: jedan soj Gram-pozitivnih bakterija, tri soja Gram-negativnih bakterija i dva soja gljivica (jedan kvasac i jedna buđ), a rezultati su prikazani u tabeli 5.14.

Tabela 5.14. Minimalna inhibitorna koncentracija metil- i izopropil-*N*-metilantranilata

Bakterijska/fungalna vrsta	ATCC broj	MMA (mg/ml)	IMA (mg/ml)	Antibiotik (µg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	5,00	>5,00	0,19
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	>5,00	>5,00	0,78
<i>Escherichia coli</i>	8739	1,25	>5,00	0,19
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	>5,00	5,00	0,19
<i>Candida albicans</i>	10231	0,62	1,25	0,06
<i>Aspergillus niger</i>	16404	1,25	>5,00	0,96

Antibiotik – hloramfenikol u slučaju bakterija, nistatin u slučaju gljivica

Testiranje antimikrobne aktivnosti metil- i izopropil-*N*-metilantranilata je ukazalo da metil estar poseduje veći antimikrobni potencijal, kao i da oba antranilata poseduju selektivnu aktivnost prema gljivicama. Aktivnost testiranih jedinjenja prema gljivicama se kreće u opsegu 0,62-1,25 mg/ml, a prema bakterijama u opsegu od 1,25 do 5,00 mg/ml. MMA je ispoljio aktivnost protiv dva soja bakterija, *S. aureus* i *E. coli*, dok je IMA inhibirao rast samo jednog bakterijskog soja *P. aeruginosa* (tabela 5.14). Sojevi gljivica su bili osetljiviji na prisustvo oba jedinjenja u hranljivom medijumu, gde je MMA pokazao značajnu aktivnost protiv sojeva i buđi i kvasca, dok IMA, u testiranom opsegu koncentracija, nije inhibirao rast buđi.

Kako su ovo prvi podaci o antimikrobnoj aktivnosti metil- i izopropil estara *N*-metilantranilne kiseline, poređenje rezultata je moguće jedino sa literaturnim podacima za analogni metil estar antranilne kiseline. Metil- i izopropil-*N*-metilantranilat, kao i metil-antranilat, ispoljavaju antifungalnu aktivnost, pri čemu je antikandidalni efekat metil-*N*-metilantranilata (MIC=0,62 mg/ml) vrlo sličan antikandidalnom efektu metil-antranilata (MIC=1,00 mg/ml, Tampieri *et al*, 2005). Ovi podaci ukazuju da MMA i IMA zavreduju dalja ispitivanja antifungalne aktivnosti protiv šireg spektra humanih fungalnih patogena, a naročito protiv patogenih *Candida* vrsta.

5.7. FARMAKOLOŠKA AKTIVNOST

Nakon što su izopropil-(IMA), metil- (MMA) i propil-*N*-metilantranilati (PMA) sintetisani, određena je njihova akutna toksičnost na miševima i ispitivana je njihova farmakološka aktivnost i to: dejstvo na centralni nervni sistem pacova (testovi anksioznosti - svetlo/tamno (*light/dark*) i test otvorenog polja (*open field*), testovi depresije – test prinudnog plivanja (*forced swimming*) i test vešanja o rep (*tail suspension*), test spavanja izazvanog dijazepamom); antinociceptivna aktivnost (test abdominalnih grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom (*writhing test*), test osetljivosti na termalni nadražaj - metoda vruće ploče (*hot-plate test*), testovi formalinom, kapsaicinom i glutamatom izazvane nocicepcije i test refleksa naglog pokreta repom (*tail flick test*)); proučavan je mehanizam antinociceptivnog dejstva ovih estara pri termalnom nadražaju; ispitivano je i hepato- i nefroprotektivno dejstvo ovih jedinjenja u modelu oštećenja jetre i bubrega izazvanog ugljen-tetrahloridom kod pacova, kao i njihov uticaj na nastanak lezija na sluznici želuca pacova izazvanih diklofenakom i etanolom.

Ispitivanju farmakološke aktivnosti jedinjenja IMA, MMA i PMA prethodilo je ispitivanje njihove akutne toksičnosti na miševima. Pomenuta jedinjenja su data oralno u dozi od 100 mg/kg t.m. grupi od 10 miševa. Nakon 5 dana od aplikacije, tretirani miševi nisu pokazali promene u ponašanju, a posle žrtvovanja, analizom želuca nisu uočene lezije ni krvarenje. Tokom ovog perioda posmatranja nisu uočeni znaci intoksikacije, kao što su konvulzije, čir na želucu, a nije bilo ni smrtnih slučajeva. Ovi rezultati ukazuju da oralna aplikacija jedinjenja IMA, MMA i PMA u dozi od 100 mg/kg t.m. ne dovodi ni do kakvih promena u ponašanju, niti utiče na zdravlje miševa.

Nakon toga je ispitivano potencijalno pirogeno dejstvo ovih supstanci. Telesna temperatura životinja, merena je pre i 24 h nakon davanja testiranih supstanci u pravilnim vremenskim intervalima i nije se razlikovala od grupe do grupe, a iznosila je između 35 i 37 °C. Ovo je ukazivalo da nijedna od testiranih supstanci nema pirogeno dejstvo.

Kako bi se isključio mogući uticaj antranilata na spontanu aktivnost i motoričku koordinaciju životinja, izvedeni su test otvorenog polja i *rotarod* test. Nijedan od testiranih estara *N*-metil-antranilne kiseline (100 mg/kg t.m, *p.o.*) nije uticao na spontanu aktivnost niti na motoričke sposobnosti miševa 0,5, 2 ili 3,5 h nakon aplikacije supstanci (tabela 5.15).

Tabela 5.15. Efekat IMA, MMA i PMA na spontanu i lokomotornu aktivnost tretiranih miševa

	Broj sati nakon tretmana			
	0,5	1	2	3,5
<i>Spontana aktivnost</i>				
Rastvarač	62±9,8	60,9±,1	55,9±8,8	57,3±6,6
IMA	65,4±10,3	68,1±11,8	66,7±8,4	61,5±7,7
MMA	61,8±9,7	58,4±9,3	55,9±10,6	57,9±8,9
PMA	55,4±8,7	59,4±7,6	53,6±5,4	55,9±8,8
<i>Lokomotorna aktivnost</i>				
Rastvarač	15,1±4,8	13,6±6,6	11,7±6,5	13,7±3,7
IMA	13,2±5,2	12,9±5,5	13,7±6,1	11,9±3,3
MMA	14,6±3,1	13,7±2,8	10,7±3,6	11,3±2,9
PMA	14,1±2,9	11,8±2,7	12,7±3,8	13,4±4,2

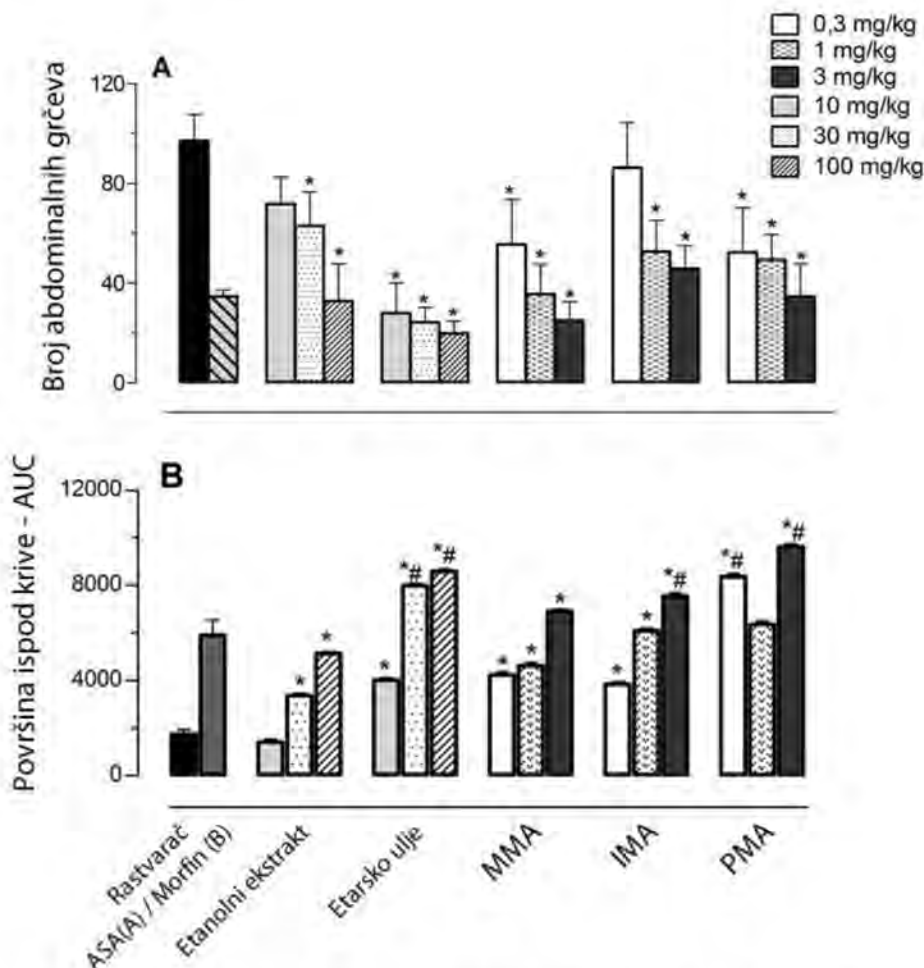
5.7.1. Antinociceptivna aktivnost

5.7.1.1. Periferna i centralna antinociceptivna aktivnost IMA, MMA i PMA –

Test abdominalnih grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom (writhing test) i test osetljivosti na termalni nadražaj - metoda vruće ploče (hot-plate test)

U radu je po prvi put ispitivana potencijalna periferna i centralna antinociceptivna aktivnost dobijenih sintetskih uzoraka jedinjenja IMA, MMA i PMA, etarskog ulja i etanolnog ekstrakta listova, pri čemu su korišćena dva testa, test abdominalnih grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom (*writhing test*) i test osetljivosti na termalni nadražaj - metoda vruće ploče (*hot-plate test*). Oba testa su pokazala da etarsko ulje i sirovi etanolni ekstrakt listova biljne vrste *C. ternata*, kao i svi sintetisani antranilati, ispoljavaju značajanu antinociceptivnu aktivnost kada se oni miševima daju oralno (slika 5.7.1). U testu abdominalnih grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom MMA, u dozi od 1 mg/kg t.m, bio je približno aktivan kao aspirin u dozi od 200 mg/kg t.m, a u dozi 3 mg/kg t.m. bio je aktivniji od aspirina (200 mg/kg t.m.). U testu vruće ploče svi antranilati u dozi 3 mg/kg t.m. su ispoljili veću aktivnost od morfina u dozi 5 mg/kg t.m. IMA i PMA u dozama 1 mg/kg t.m. su bili efikasniji, a PMA je čak i u dozi 0,3 mg/kg t.m. bio efikasniji od morfina (5 mg/kg t.m.) u inhibiciji nociceptivnog odgovora na termalni nadražaj (slika 5.7.1). Rezultati ispitivanja antinociceptivne aktivnosti ukazali su na interesantnu činjenicu da oralna aplikacija etarskog ulja listova biljne vrste *C. ternata* ispoljava približno 100 puta manju aktivnost u poređenju sa izopropil-*N*-metilantranilatatom u sprečavanju bola izazvanog

sirćetnom kiselinom. Ovo indicira da antinociceptivna aktivnost ulja (koje bi se moglo smatrati 100-1000 puta razblaženim rastvorom antranilata) potiče od prisustva metil- i izopropil-*N*-metilantranilata, čiji je ukupni sadržaj u ulju oko 0,1%.



Slika 5.7.1. (A) Efekat antranilata IMA, MMA i PMA, etarskog ulja i etanolnog ekstrakta listova biljne vrste *C. ternata* na abdominalno grčenje izazvano sirćetnom kiselinom; (B) Rezultati *hot-plate* testa. Kontrolnim grupama su *p.o.* dati rastvarač, acetilsalicilna kiselina (ASA, 200 mg/kg t.m.) ili morfin (5 mg/kg t.m.) (* $p < 0,05$ pri poređenju grupa tretiranih test supstancama i grupe tretirane rastvaračem. # $p < 0,05$ pri poređenju grupa tretiranih test supstancama i grupe tretirane ASA/morfinom)

Kako su nociceptivni neuroni osetljivi na nesteroidne antiinflamatorne lekove, narkotike i ostale lekove sa dejstvom na CNS (Calixto *et al.*, 2000; Yunes *et al.*, 2005), a s obzirom da antranilati poseduju visok stepen strukturne sličnosti sa acetilsalicilnom kiselinom, poznatim antinociceptivnim jedinjenjem, a imaju drugačiju prirodu dejstva u odnosu na morfin, za razumevanje potpunog mehanizmama dejstva pomenutih jednostavnih jedinjenja (antranilata)

nastavljeno je istraživanje kroz studiju sa odgovarajućim antagonistima u modelu nocicepcije izazvane termalnim nadražajem.

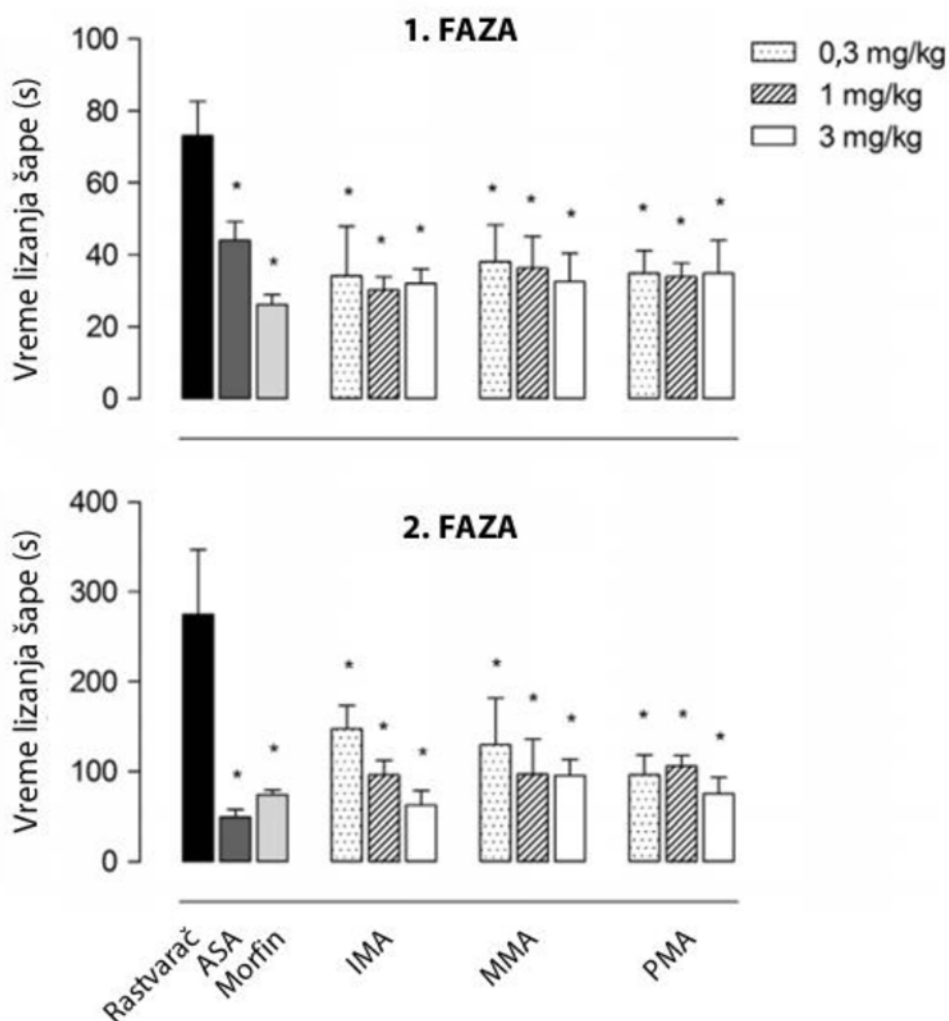
5.7.1.2. Formalinski test

S obzirom da su IMA, MMA i PMA u testu abdominalnih grčeva i testu vruće ploče pokazali dobru antinociceptivnu aktivnost ispitana je i antinociceptivna aktivnost ovih jedinjenja u drugim modelima.

Prvi model je bio formalinski model upalnog bola. Nakon injektiranja ratvora formalina u šapu životinja, dolazi do pojave spontane reakcije na bolni stimulus, poput trzanja i lizanja šape. Formalinski upalni bol karakterišu dve faze: prva, neurogena faza, koja je posledica stimulacije nociceptora formalinom i predstavlja nociceptivni bol, nastupa odmah nakon injektiranja formalina i traje 15 minuta; druga, upalna faza, posledica je delovanja oslobođenih upalnih medijatora i senzitivacije, pa predstavlja upalni bol.

Sve tri doze IMA, MMA i PMA (0,3, 1 i 3 mg/kg t.m.) značajno su smanjivale vreme koje životinja provodi ližući šapu u koju je injektiran formalin i to u obe faze (slika 5.7.2). U toku prve faze kod životinja koje su pre formalina primile IMA, MMA i PMA došlo je do značajnog ublažavanja reakcije. Najveća doza (3 mg/kg t.m.) IMA, MMA i PMA je smanjivala ukupno vreme lizanja za 46,6% (34 ± 13 s), 56,1% (32 ± 8 s) i 52,0% (35 ± 9 s) u poređenju sa rastvaračem (73 s). Standardni antiinflamatorni agens, ASA, je smanjivao vreme lizanja za 38,4% (45 ± 5 s), dok je morfin smanjivao za 64,4% (26 ± 3 s).

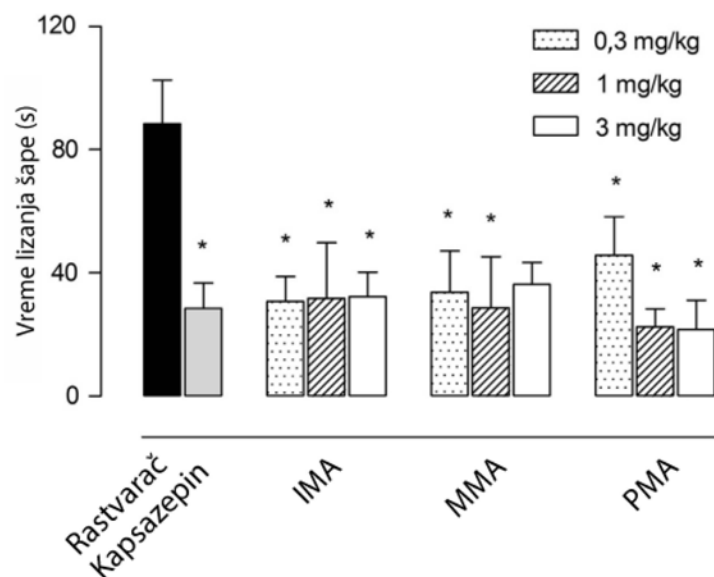
Ista doza antranilata (3 mg/kg t.m.) u drugoj fazi pokazuje značajniji efekat: IMA - 77,1% (63 ± 17 s), MMA - 65,1% (96 ± 20 s) i PMA - 72,4% (76 ± 18 s) u poređenju sa kontrolnom grupom, tj. životinjama koje su primile rastvarač (275 ± 72 s). Kod kontrolne grupe koja je primila ASA došlo je do smanjenja reakcije na bolni stimulus za 82,2% (49 ± 8 s), a kod grupe koja je primila morfin za 73,1% (74 ± 6 s).



Slika 5.7.2. Efekat IMA, MMA i PMA na vreme koje su životinje provodile ližući šapu nakon injekcije formalina (* $p < 0,05$ u poređenju sa grupom koja je primila rastvarač)

5.7.1.3. Model kapsaicinom izazvane nocicepcije

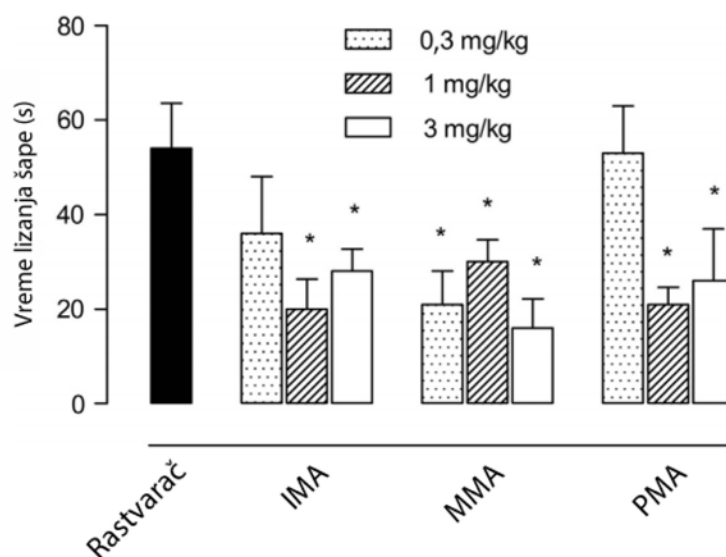
Efekti izopropil-, metil- i propil- estara *N*-metilantranilne kiseline na kapsaicinom indukovanu nocicepciju kod miševa su prikazani na slici 5.7.3. Injektiranje kapsaicina u dorzalnu površinu zadnje šape miša izaziva upalnu reakciju koju karakterišu mali edem i crvenilo šape, zbog čega su životinje provodile prosečno 89 ± 14 s ližući šapu. Ukoliko se životinjama pre kapsaicina oralno daju IMA, MMA i PMA, pri svim dozama (0,3, 1 i 3 mg/kg t.m.), dolazi do značajnog smanjenja vremena tokom kog životinje ližu šapu. Ova inhibicija je uporediva sa dejstvom antagonista vaniloidnih receptora, kapsazepina (28 ± 8 s).



Slika 5.7.3. Antinociceptivni efekat IMA, MMA i PMA na vreme koje životinje provedu ližući šapu nakon intraplantarne injekcije kapsaicina (* $p < 0,05$ u poređenju sa grupom koja je primila rastvarač)

5.7.1.4. Model glutamatom izazvane nocicepcije

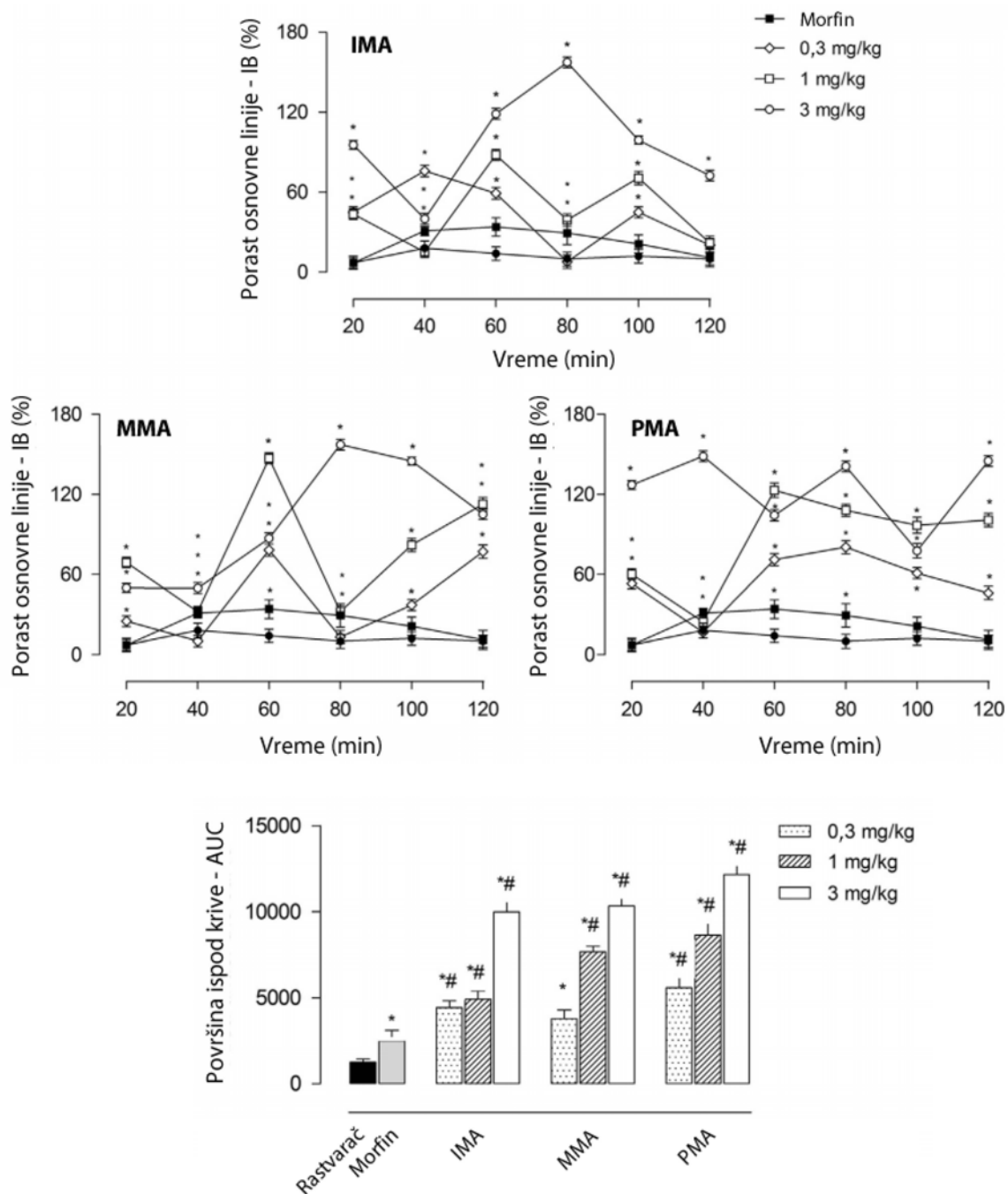
Reakcija životinja izazvana intraplantarom injekcijom glutamata se značajno smanjivala ukoliko su se miševi pre glutamata tretirali antranilatima. MMA u dozi 3 mg/kg t.m. je smanjivao reakciju životinja za 69% (16 ± 6 s), dok ista doza IMA i PMA je smanjivala reakciju za 45% (28 ± 4 s) i 50% (26 ± 11 s). Vreme koje su miševi kontrolne grupe, tretirane rastvaračem, proveli ližući šapu iznosilo je 55 ± 10 s (slika 5.7.4).



Slika 5.7.4. Efekat IMA, MMA i PMA na vreme koje životinje provedu ližući šapu nakon intraplantarne injekcije glutamata (* $p < 0,05$ u poređenju sa grupom koja je primila rastvarač)

5.7.1.5. Model refleksa naglog pokreta repom (tail flick model)

Test refleksa naglog pokreta repom je izveden kako bi se ispitalo da li antinociceptivni efekat IMA, MMA i PMA uključuje spinalne mehanizme. Tretman životinja izopropil-, metil- i propil-*N*-metilantranilatom je značajno i na dozno-zavisan način povećavao vreme potrebno mišu da izvuče rep iz tople vode (vreme latencije) (slika 5.7.5). Dvadeset minuta nakon što su životinje primile PMA u dozi 3 mg/kg t.m. osnovna linija je porasla za 90%, a tokom eksperimenta, kod životinja koje su primile PMA, nivo reakcija je bio veći od 60%. U testu refleksa naglog pokreta repom izopropil- i propil-*N*-metilantranilat (3 mg/kg t.m.) su ispoljavali najveći efekat 80 minuta nakon oralne aplikacije pomenutih jedinjenja i obe supstance su povećavale vrednost osnovne linije za skoro 157%. U cilju bolje vizualizacije rezultata grafici zavisnosti porasta osnovne linije od vremena (u minutima) nakon aplikacije supstanci su konvertovani u histograme površina (AUC) zavisnosti reakcija životinja od vremena. Vrednost AUC za sve antranilate je bila veća od one dobijene za opioidni agonist, morfin (slika 5.7.5).

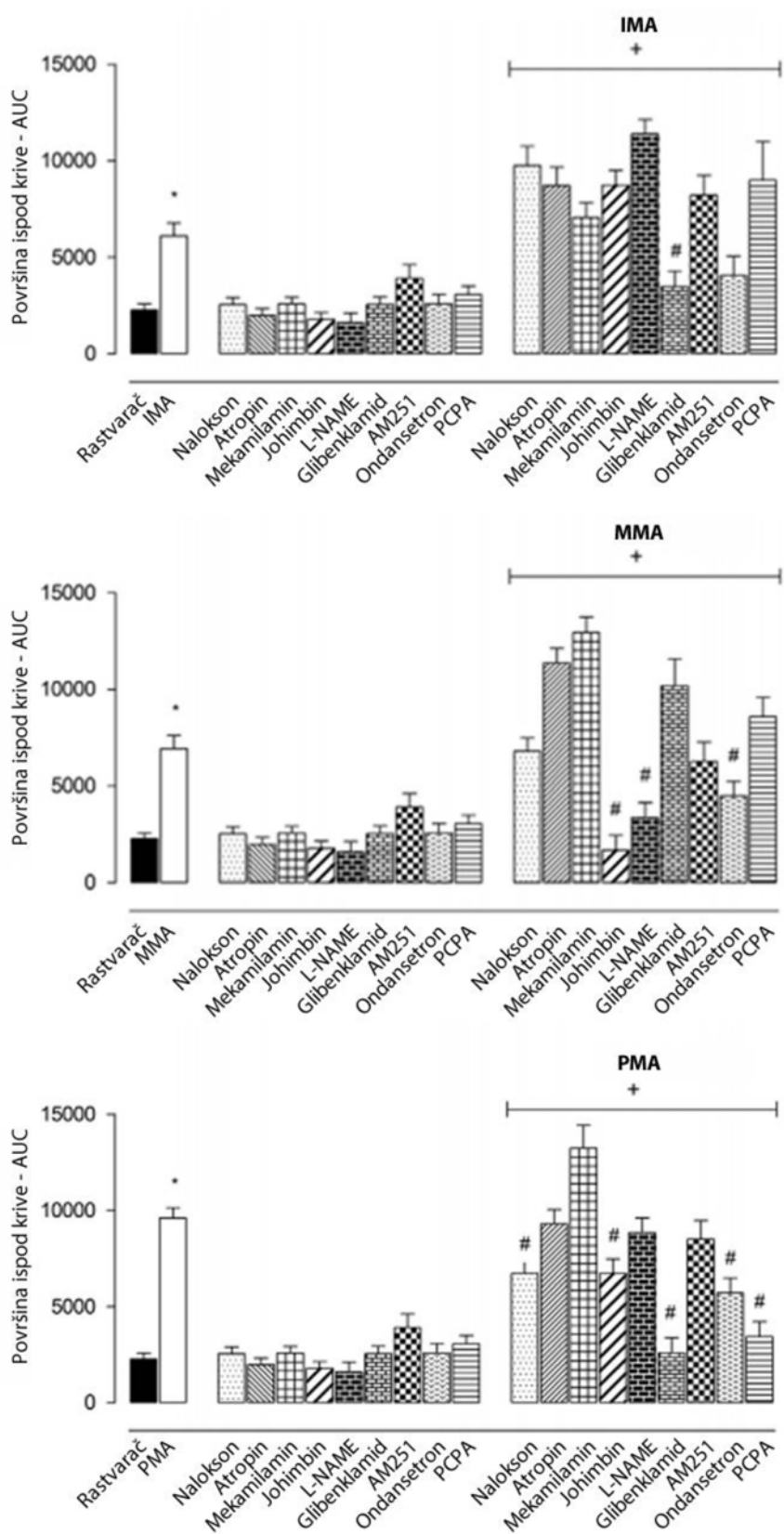


Slika 5.7.5. Efekat IMA, MMA i PMA u testu refleksa naglog pokreta repom (*tail flick model*) (* $p < 0,05$ u poređenju grupe koja je primila IMA, MMA ili PMA sa grupom koja je primila morfin; greška nije prikazana u slučajevima kada je ona bila manja od simbola)

5.7.1.6. Ispitivanje mehanizma dejstva IMA, MMA i PMA u modelu vruće ploče

Pošto su IMA, MMA i PMA ispoljili značajnu perifernu i centralnu antinociceptivnu aktivnost u nekoliko modela rešili smo da ispitamo učešće različitih endogenih sistema u antinociceptivnoj aktivnosti svakog antranilata. S obzirom na rezultate testa abdominalnih grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom i testa vruće ploče, za ispitivanje mehanizma antinocicepcije korišćeni su antranilati u dozi od 3 mg/kg t.m.

Nijedan od antagonista receptora (nalokson, atropin, mekamilamin, johimbin, AM-251 i ondansetron), niti blokator ATP-zavisnih kalijumovih kanala (glibenklamid), kao ni inhibitori enzima (L-NAME i PCPA), nisu pokazali *per se* antinociceptivno dejstvo u testu vruće ploče. Tretman glibenklamidom (2 mg/kg t.m, *i.p.*) 30 minuta pre aplikacije antranilata (3 mg/kg t.m, *p.o.*) značajno je smanjivao antinociceptivni efekat IMA i PMA. Ukoliko su pre MMA i PMA miševima dati ondansetron (antagonist serotoninskih receptora, 0,5 mg/kg t.m, *i.p.*) i johimbin (antagonist α -adrenergičkih receptora, 2 mg/kg t.m, *i.p.*) dolazilo je do značajnog smanjenja antinociceptivnog efekta pomenuta dva antranilata. Dejstvo MMA se značajno smanjivalo i prethodnim tretmanom sa L-NAME (inhibitorom sintaze-azot-monoksida, 3 mg/kg t.m, *i.p.*). Nalokson, antagonist opioidnih receptora (5 mg/kg t.m, *i.p.*) i PCPA (inhibitor triptofan-hidroksilaze, 100 mg/kg t.m, *i.p.*, 4 dana uzastopno) značajno su smanjivali antinociceptivni efekat PMA (slika 5.7.6).



Slika 5.7.6. Uticaj različitih antagonista na antinociceptivno dejstvo IMA, MMA i PMA u testu vruće ploče (* $p < 0,05$ u poređenju grupe koja je primila IMA, MMA ili PMA sa grupom koja je primila rastvarač; # $p < 0,05$ u poređenju grupe koja je pre jedinjenja IMA, MMA ili PMA primila antagonist ili inhibitor sa grupom koja je primila samo antranilate)

Izopropil-, metil- i propil-*N*-metilantranilat pokazuju značajnu antinociceptivnu aktivnost u različitim testiranim modelima nocicepcije. Kako bismo odredili *modus operandi* pomenutih estara *N*-metilantranilne kiseline ispitali smo njihovo dejstvo koristeći različite metodologije i koristeći antagoniste različitih endogenih sistema u testu vruće ploče.

Rezultati formalinskog testa su ukazali da testirani estri *N*-metilantranilne kiseline utiču na obe faze nociceptivnog odgovora (na neurogensku i inflamatornu fazu). Antinociceptivno dejstvo *N*-metilantranilata je proučavano i u modelu kapsaicinom-indukovane nocicepcije. Istraživanja pokazuju da kapsaicin deluje na vaniloidne receptore tipa-1 (TRPV-1) koji su eksprimirani na nervnim vlaknima za prenos bola (npr. amijelinska C vlakna i tanko mijelizovana senzorna A vlakna) (Jancso, 1978), na dorzalnim ganglionima kičmene moždine, trigeminalnom ganglionu i u centralnom nervnom sistemu (Palazzo *et al*, 2002). IMA, MMA i PMA dovode do značajne inhibicije reakcije na bol izazvan injekcijom kapsaicina. Poznato je da se stimulacija TRPV-1 receptora odigrava putem različitih neurotransmitera, uključujući glutamat i supstancu P iz perifernih i centralnih terminalnih primarnih senzornih neurona koji doprinose nociceptivnom procesu (Afrah *et al*, 2001; Medvedeva *et al*, 2008). Glutamat je glavni ekscitatorni neurotransmiter uključen u nociceptivnu transmisiju, razvoj i održavanje nociceptivnog odgovora i on, kroz aktivaciju iGluR (jonotropnih glutamatnih receptora) ili mGluR (metabotropnih glutamatnih receptora), dovodi do ekscitacije i senzitivacije perifernih i centralnih spinalnih i supraspinalnih nociceptora (Aanonsen i Wilcox, 1989; Budai *et al*, 1995; Carlton, 2001). Intraplantarna injekcija glutamata oslobađa ekscitatorne aminokiseline, PGE₂, NO i kinine (Beirith *et al*, 2002; Sakurada *et al*, 2003) i aktivira senzitivna vlakana koja izazivaju oslobađanje supstanci u dorzalnim rogovima koje takođe mogu da aktiviraju TRPV-1 receptore u kičmenoj moždini (Julius i Basbaum, 2001; Millan, 1999). Naši rezultati pokazuju da IMA, MMA i PMA smanjuju nociceptivnu reakciju na bol uzrokovan glutamatom. Ovo ukazuje da antinociceptivna aktivnost antranilata uključuje, makar delimično, glutamatergički sistem. Na osnovu rezultata testa kapsaicinom indukovane nocicepcije, moguće je da antranilati učestvuju u regulaciji TRPV-1 receptora i na taj način doprinose modulaciji nociceptivne transmisije.

Kako bismo ispitali da li antinociceptivna aktivnost IMA, MMA i PMA uključuje spinalne nociceptivne mehanizme rešili smo da izvedemo test refleksa naglog pokreta repom u kome se na rep životinje deluje termalnim stimulusom u cilju izazivanja refleksnog odgovora, koji je karakteristika spinalnog mehanizma transmisije nocicepcije (Jones, 1996). Naši rezultati su pokazali da već 20 minuta nakon oralne aplikacije supstanci, sva tri antranilata izazivaju značajan porast osnove linije što se slaže sa činjenicom da jedinjenja ispoljavaju supraspinalnu

antinociceptivnu aktivnost koja je pokazana u testu abdominalnih grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom i testu vruće ploče. Ovakav centralni efekat se može porediti sa već poznatim efektom opioida (npr. morfina, fentanila i etorfina) koji pokazuju centralnu antinocicepciju koja barem delimično uključuje spinalni mehanizam (Aceto *et al*, 1997; Millan, 2002).

Pokušali smo da okarakterišemo mehanizame uključene u centralnu antinocicepciju estara *N*-metilantranilne kiseline kroz predtretman životinja različitim supstancama koje mogu da posreduju u različitim sistemima uključenim u proces nociceptivne transmisije (Xie *et al*, 2009). Odlučili smo se za model vruće ploče pošto je on povezan sa supraspinalnim mehanizmom nocicepcije. Rezultati su pokazali da antinociceptivna aktivnost PMA biva značajno smanjena ukoliko pre pomenutog jedinjenja životinje prime nalokson, neselektivni antagonist opioidnih receptora, što ukazuje na učešće opioidnog sistema u ispoljavanju antinociceptivne aktivnosti antranilata.

Ispitivanjem učešća adrenergičkog sistema, uočeno je da johimbin, selektivni antagonist α -2 adrenergičnih receptora, smanjuje antinociceptivno dejstvo PMA i MMA. α -2 Adrenergički receptori (α -2A, 2B i 2C) su gusto smešteni u centralnom i perifernom nervnom sistemu, naročito u predelu *locus coeruleus*, neuronima dorzalnog roga kao i dorzalog gangliona. Istraživanja pokazuju da α -2 adrenergični agonisti izazivaju stanje analgezije (Millan, 2002). Naši rezultati ukazuju da PMA i MMA mogu da deluju i stimulisanjem α -2A adrenergičkih receptora, što dovodi do smanjenog oslobađanja glutamata u dorzalnim rogovima i/ili stimulisanjem α -2 adrenergičkih receptora smeštenih u *locus coeruleus*, što dovodi do inhibicije kalcijumovih kanala simpatičkih neurona i stimulacije kalijumovih kanala, čime se zajedno inhibira nociceptivna transmisija. Smanjenje antinociceptivne aktivnosti PMA usled predtretmana životinja naloksonom i johimbinom se može smatrati odrazom sinergističkih interakcija opioidnog i noradrenergičkog sistema u kontroli bola (Pan *et al*, 2008). Istraživanja pokazuju da koekspresija opioidnih i adrenergičkih receptora u predelu *locus coeruleus* vodi ka izrazitoj hiperpolarizaciji kroz otvaranje kalijumovih kanala što može doprineti analgeziji (Fairbanks *et al*, 2002, Stein *et al*, 2009). Smanjenje antinociceptivnog dejstva PMA i MMA pod dejstvom johimbina je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u modelu refleksa naglog pokreta repom pošto aktivacija nekih noradrenergičkih struktura u moždanom stablu, kao što su periakveduktalna siva masa ili *nucleus raphe magnus*, dovodi do spinalnog oslobađanja noradrenalina (Hentall *et al*, 2003).

Spinalni α -2 adrenergički receptori su takođe lokalizovani na kapsaicin-senzitivnim aferentnim vlaknima i oni su zaslužni za suzbijanje noradrenergičkog bola na nivou kičmene

moždine (Chen *et al*, 2007; Li i Eisenach, 2001). Reverzijom dejstva PMA i MMA johimbinom bi se mogla objasniti aktivnost u modelu kapsaicinom-indukovane nocicepcije.

Mnoga istraživanja su pokazala da nitrergični sistem učestvuje u transmisiji nocicepcije (Riedel i Neeck, 2001) i pokazala njegovu ulogu u antinociceptivnoj aktivnosti (Brito *et al*, 2006; Lorenzetti i Ferreira, 1996). Predtretman sa L-NAME, inhibitorom sintaze-azot-monoksida (NOS), smanjuje se samo antinociceptivni efekat MMA, što ukazuje na učešće L-arginin-azot-oksida-cGMP puta. Utvrđeno je da postoji veza između azot-oksida-cGMP puta i ATP-senzitivnih kalijumovih kanala (Sachs *et al*, 2004; Vale *et al*, 2007; Wang *et al*, 2008). Antinociceptivni efekat IMA i PMA je bio smanjen glibenklamidom, blokatorom ATP-senzitivnih kalijumovih kanala. Kako se antinociceptivni efekat MMA smanjuje u slučaju predtretmana sa L-NAME, ali ne i glibenklamidom, moguće je da aktivacija NOS posreduje u antinociceptivnom efektu ovih jedinjenja. Šta više, mehanizam dejstva IMA i PMA bi mogao biti sličan mehanizmu opioidnih analgetika s obzirom da deluju preko ATP-senzitivnih kalijumovih kanala (Stein *et al*, 2009; Zhang *et al*, 2011).

Eksperiment u kome je korišćen ondansetron, antagonist 5-HT₃-serotoninskih receptora, ukazao je da je u antinociceptivnu aktivnost MMA i PMA uključen serotoninski put. Proučili smo i da li je njihova aktivost povezana sa stvaranjem i oslobađanjem endogenog serotonina i/ili sa direktnim antagonizmom 5-HT₃-serotoninskih receptora. Dakle, nakon kortikalne deplecije serotonina injekcijom 4-hlor-DL-fenilalanina (PCPA), zabeležena je reverzija antinociceptivnog efekta PMA, što ukazuje na učešće serotoninergičkih puteva. Pošto PCPA nije uticao na antinociceptivni efekat MMA, antinociceptivni efekat ovog antranilata bi se mogao objasniti, barem delimično, aktivacijom serotoninergičkih receptora. Atropin, mekamilamin i AM-251 nisu značajno uticali na antinociceptivnu aktivnost IMA, MMA i PMA, što ukazuje da holinergični i kanabinoidni sistemi nisu uključeni u antinociceptivno dejstvo ovih jedinjenja.

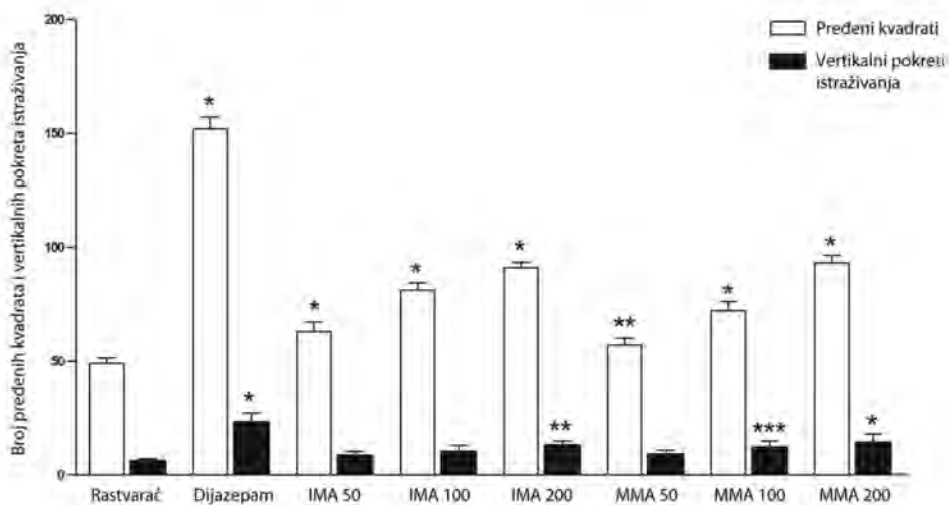
Razmatrajući strukturu tri proučavana *N*-metilantranilata, njihova hidrofobnost, koja potiče od prisustva aromatičnog prstena, olakšava prolazak kroz biološke membrane, uključujući barijeru krv-mozak. Prisustvo estarske karbonilne i amino grupe omogućava građenje vodoničnih veza sa ciljnim biomolekulima. Uočena je razlika u trajanju i intezitetu perifernog i centralnog antinociceptivnog dejstva ova tri jedinjenja. Ove razlike su primećene i u slučaju izomernih jedinjenja sa istim brojem ugljenikovih atoma (*n*-propil spram izopropil). Najverovatnije je da je linearni ugljovodonični lanac propil-*N*-metilantranilata hidrofobniji u poređenju sa izomernim izopropil-*N*-metilantranilatom i ubrzava pojavu antinociceptivnog delovanja. Ovi antranilati su strukturno slični salicilatima, pa se mogu smatrati njihovim aza-

analozima, ali su značajno aktivniji. Moguće je da ove dve klase jedinjenja deluju na iste biomolekule, ali sa različitom efikasnošću, odnosno da nukleofilniji *orto*- (azotov) atom i/ili neutralna estarska grupa čine antranilate jačim antinociceptivnim agensima.

5.7.2. Uticaj IMA i MMA na anksioznost i depresiju kod miševa

5.7.2.1. Uticaj i.p. aplikacije IMA i MMA na motornu aktivnost - Test otvorenog polja (open field test) i test horizontalne žice (horizontal wire test)

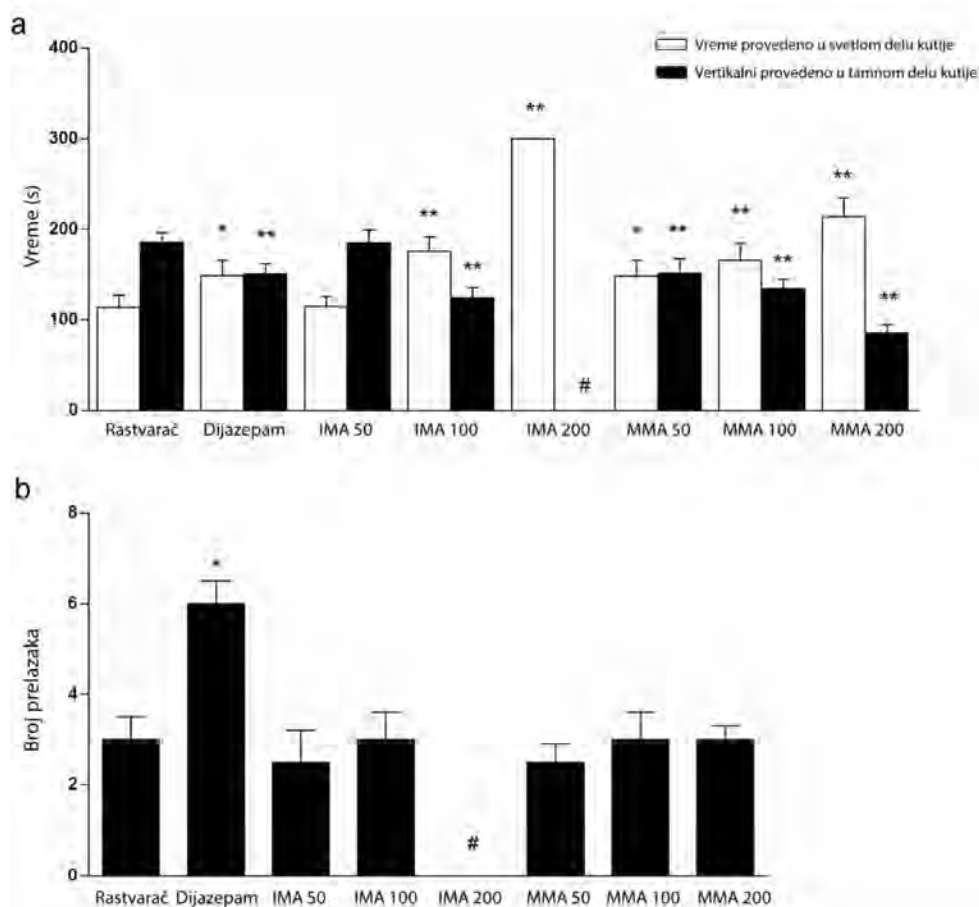
Kako bi se isključila mogućnost da testirane supstance imaju stimulatívno dejstvo na motorne aktivnosti ili miorelaksantno dejstvo i time izbegli lažni rezultati u bihevioralnim testovima, životinje su podvrgnute testu otvorenog polja (*open field test*) i testu horizontalne žice (*horizontal wire test*) (Bourin, 1990). Najpre je u testu otvorenog polja izvršena preliminarna procena nespecifičnog povećanja ili smanjenja lokomotorne aktivnosti u nepoznatom prostoru (što ukazuje na moguće sedativno dejstvo supstanci). Dokazano je postojanje statistički značajne razlike u broju pređenih kvadrata (engl. *crossings*) i vertikalnih pokreta istraživanja (engl. *rearings*) između jedinki kojima su aplicirani IMA i MMA i negativne kontrole (rastvarač) (slika 5.7.7). Životinje koje su primile IMA i MMA bile su manje aktivne (manji broj pređenih kvadrata i vertikalnih pokreta istraživanja) od onih koje su primile dijazepam (slika 5.7.7). Za razliku od životinja koje su primile dijazepam, životinje tretirane jedinjenjima IMA i MMA su bile sposobne da se u testu horizontalne žice hvataju žicu. Ovo ukazuje da IMA i MMA nemaju miorelaksantni efekat, što je neželjeni efekat najčešće propisivanih anksiolitika iz grupe benzodijazepina (npr. dijazepama).



Slika 5.7.7. Efekat IMA i MMA u dozama 50, 100 i 200 mg/kg t.m. na ukupan broj pređenih kvadrata (engl. *crossings*) i vertikalnih pokreta istraživanja (engl. *rearings*) BALB/c miševa u testu otvorenog polja (* $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$ spram rastvarača)

5.7.2.2. Anksiolitičko dejstvo MMA i IMA - test svetlo/tama (light/dark test)

Poznato je da anksiolitici produžavaju vreme koje životinje provode u potencijano opasnom prostoru (osvetljeni deo kutije za izvođenje testa svetlo/tama (*light/dark test*)) i povećavaju lokomotornu aktivnost (i broj vertikalnih pokreta istraživanja). Dakle, merenjem ova dva parametra se može odrediti anksiolitička aktivnost supstanci (Hascoet i Bourin, 1998). Izopropil- i metil-*N*-metilantranilat u testu svetlo/tama produžavaju vreme koje miševi provode u svetlom, a skraćuju vreme koje miševi provode u tamnom delu kutije i to na dozno-zavisani način (slika 5.7.8), dok ne utiču na broj prelazaka između odeljaka kutije (slika 5.7.8). Na osnovu ovih rezultata moguće je zaključiti da IMA i MMA imaju anksiolitičko dejstvo.

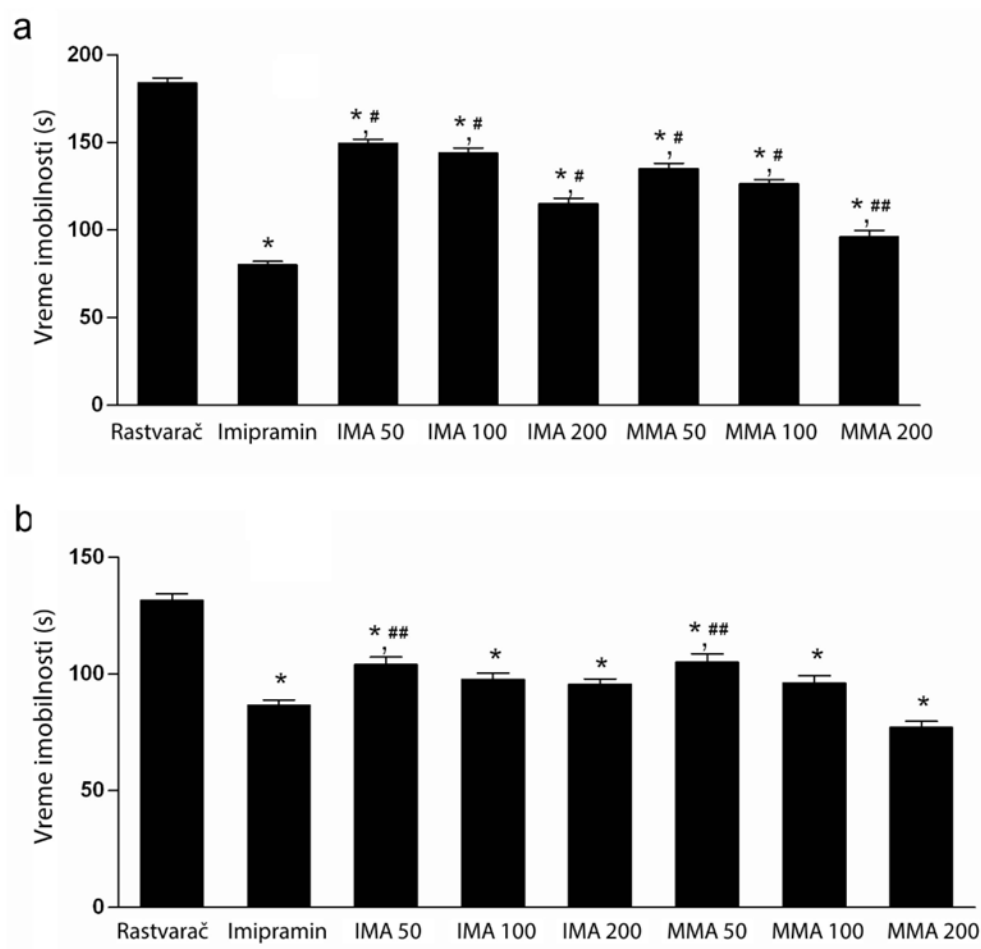


Slika 5.7.8. Uticaj IMA i MMA (50, 100 i 200 mg/kg t.m.) i dijazepama (2 mg/kg t.m.) na: (a) vreme provedeno u svetlom, odnosno i tamnom delu kutije za izvođenje testa svetlo/tama. (b) broj prelazaka iz svetlog u tamni deo kutije za izvođenje testa svetlo/tama. Vrednosti su iskazane kao srednja vrednost \pm SD, $n = 6$ (* $p < 0,01$ i ** $p < 0,001$ spram rastvarača; # miševi nisu ulazili u tamni deo kutije)

5.7.2.3. Antidepresivno dejstvo jedinjenja MMA i IMA - test prinudnog plivanja (forced swimming test) i test vešanja o rep (tail suspension test)

Test prinudnog plivanja (*forced swimming test*) i vešanja o rep (*tail suspension test*) su opšte prihvaćeni testovi za određivanje antidepresivnog dejstva lekova i primenjeni su prilikom ispitivanja antidepresivnog dejstva jedinjenja IMA i MMA. Imobilnost miševa, koji se u ovim testovima nalaze u bezizlaznoj situaciji, se smatra odrazom stanja bespomoćnosti životinje, tj. nemogućnosti da se jedinka prilagodi stresnoj situaciji (Borosini i Meli, 1988). Rezultati pokazuju da IMA i MMA na dozno-zavisan način smanjuju vreme imobilnosti miševa koji su podvrgnuti testu prinudnog plivanja i vešanja o rep (slika 5.7.9). Jedinjenja IMA i MMA ispoljavaju bihevioralne efekte slične efektima antidepresiva, kao što je imipramin (slika 5.7.9),

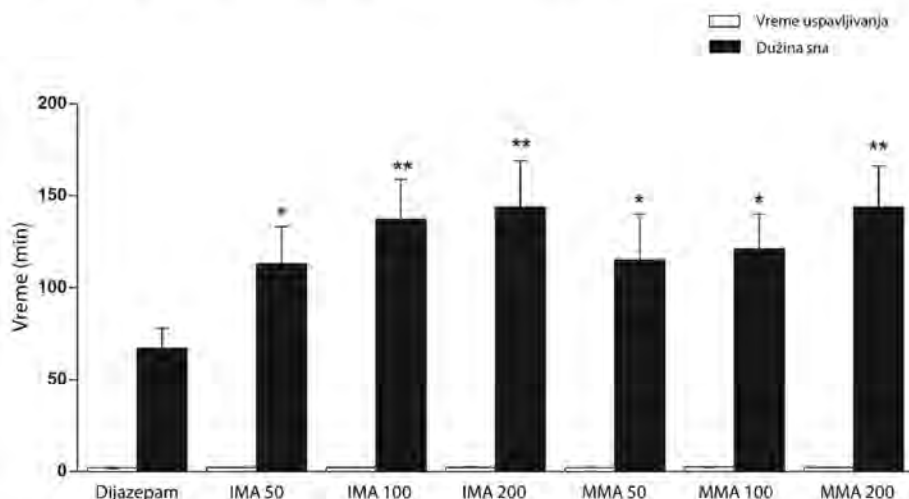
tako što povećavaju vreme tokom kog životinja pliva pokušavajući da nađe izlaz (Porsolt *et al*, 1977; Borsini i Meli, 1988). Kako je u testu otvorenog polja utvrđeno da supstance IMA i MMA, u svim testiranim dozama ne povećavaju broj pređenih kvadrata (i vertikalnih pokreta istraživanja), a poznato je da opšti stimulatori motornih aktivnosti mogu da daju lažan rezultat u testu prinudnog plivanja i testu vešanja o rep (Bourin *et al*, 2001), može se isključiti mogućnost da je uočeno smanjenje perioda imobilnosti u oba testa rezultat dejstva na motornu aktivnost. Poređenje efekta imipramina i efekta testiranih supstanci u ova dva testa zavređuje dalji komentar. Hipotermija, do koje često dolazi tokom testa prinudnog plivanja, čine ovaj test manje pogodnim za ispitivanje antidepresivnog dejstva u poređenju sa testom vešanja o rep (Cryan *et al*, 2005).



Slika 5.7.9. Efekat jedinjenja IMA i MMA u dozama od 50, 100 i 200 mg/kg t.m. na vreme imobilnosti miševa u testovima prinudnog plivanja i vešanja o rep. Testirane supstance su miševima date 60 minuta pre izvođenja testova. Svaka od kolona predstavlja srednju vrednost \pm SD, $n = 6$ (* $p < 0,001$ spram rastvarača; # $p < 0,001$ spram imipramina (15 mg/kg t.m.); ## $p < 0,01$ spram imipramina)

5.7.2.4. Hipnotičko/sedativno dejstvo jedinjenja IMA i MMA – test spavanja izazvanog dijazepamom

Hipnotičko/sedativno dejstvo jedinjenja IMA i MMA je proučavano određivanjem vremena koje je potrebno da miš tretiran dijazepamom utone u san i dužinom tog sna. Testirane supstance nisu imale značajan efekat na vreme koje je bilo potrebno da miš zaspi, ali su značajno produžavale vreme dijazepamom-uzrokovano sna, pri čemu je dužina sna zavisila od doze jedinjenja. Ovo ukazuje da testirana jedinjenja utiču na centralni nervni sistem i da imaju sedativne osobine (slika 5.7.10) koje bi mogle biti povezane sa aktiviranjem benzodijazepinskih i/ili GABA vezujućih regiona na GABA receptoru. Smatra se da supstance koje ispoljavaju hipnotičko dejstvo (skraćenje latencije spavanja, povećanje ukupnog vremena sna i efikasnosti sna, kao i povećanje elektroencefalografske aktivnosti u opsegu delta frekvenci) dovode do izraženije depresije centralnog nervnog sistema u poređenju sa onima koje pokazuju sedativno dejstvo (Tobler *et al*, 2001). Ovaj efekat se može izazvati povećanjem doze leka sa sedativno-hipnotičkim dejstvom što je potencijalno slučaj sa oba antranilata. Sami antranilati u dozama od 50-200 mg/kg t.m. ne utiču na vreme potrebno za uspavljivanje kod miševa. Mnogo veće doze (1,5 g/kg t.m.) ispoljavaju potencijalno hipnotičko dejstvo, a nisu dovodile smrti.



Slika 5.7.10. Efekat IMA i MMA na dijazepamom-izazvani san. Kontrolna grupa životinja je primila dijazepam (2 mg/kg t.m.), a eksperimentalne grupe su primile jedinjenja IMA i MMA (u dozama 50, 100 i 200 mg/kg t.m, *i.p.*) 1 h pre nego što su primile dijazepam (20 mg/kg t.m.). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD, $n = 6$ (* $p < 0,01$ spram dijazepama; ** $p < 0,001$ spram dijazepama)

Ukupan sadržaj metil- i izopropil-*N*-metilantranilata u suvom biljnom materijalu je mali (0,01 g/100 g), međutim ekstrakt i etarsko ulje biljne vrste *C. ternata* sadrži veliki broj drugih (potencijalno) biološki i farmakološki aktivnih sastojaka (Boyd *et al*, 2007). Ispitivanje aktivnosti glavnih metabolita predstavlja vrlo značajan korak prilikom standardizacije biljnog ekstrakta i same biljne droge.

Iako relativno visoke doze (do 1,5 g/kg t.m, *i.p.*) ova dva isparljiva alkaloida koja ispoljavaju anksiolitičku aktivnost nisu letalne, neophodno je izvršiti dalja farmakološka i toksikološka ispitivanja ovih jedinjenja i biljnog ekstrakta pre potencijalne upotrebe. S druge strane, pomenuta jedinjenja se mogu dobiti relativno kratkom i jednostavnom sintezom iz komercijalno dostupnog materijala što predstavlja dobru alternativu ekstrakciji biljnog materijala.

5.7.3. Ispitivanje hepatoprotektivnog dejstva IMA i MMA u modelu oštećenja jetre pacova izazvanog ugljen-tetrahloridom

5.7.3.1. Određivanje aktivnosti alanin- (ALT) i aspartat-aminotransferaze (AST), koncentracije holesterola (Cho) i totalnog (TB) i direktnog (DB) bilirubina u serumu pacova

Nivoi ALT, AST, Cho, TB i DB u serumu pacova koji su primili i MMA i CCl₄ su bili značajno povišeni u poređenju sa grupom koja je primila samo rastvarač (maslinovo ulje), a značajno manji u poređenju sa grupom koja je primila samo CCl₄. Povećanje ovih parametara, a naročito nivoa ALT, ukazuje na povrede jetre (Lin i Wang, 1986). Kod životinja koje su pre CCl₄ primile jedinjenje IMA nije došlo do povećanja nivoa AST i ALT. Nivoi TB i DB u serumu životinja grupe koja je primila i IMA i CCl₄ su bili značajno povišeni u poređenju sa grupom koja je primila samo maslinovo ulje, ali značajno manji u poređenju sa grupom koja je primila samo CCl₄. Efektivna kontrola DB i TB nivoa ukazuje na rano poboljšanje sekretornih mehanizama ćelija jetre. Pored toga, nije bilo značajne razlike u nivou holesterola između eksperimentalnih grupa (tabela 5.16).

Tabela 5.16. Biohemijski parametri u serumu i statističko poređenje grupa životinja nakon različitih eksperimentalnih tretmana

Grupe	AST (U/l)	ALT (U/l)	Cho (mmol/l)	TB (μ mol/l)	DB (μ mol/l)
Maslinovo ulje	176 \pm 32	37 \pm 2	1,5 \pm 0,3	2,1 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1
CCl ₄	3070 \pm 513*	1306 \pm 147*	1,9 \pm 0,2	11 \pm 3*	8,9 \pm 1,8*
IMA+CCl ₄	2985 \pm 124*	1119 \pm 373*	1,6 \pm 0,3	7,6 \pm 0,9* [#]	4 \pm 1* [#]
MMA+CCl ₄	528 \pm 55 ^{†#}	321 \pm 22** [#]	1,6 \pm 0,4	5,7 \pm 0,7* [#]	2,4 \pm 0,9 [#]

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SD (n=6). Statistički značajne razlike su određene jednosmernom analizom varijansi (ANOVA) nakon čega je odrađen *Tukey-ev post hoc* test za višestruka poređenja (*p<0,001; **p<0,05; † p<0,01 spram kontrole, # p<0,001 spram CCl₄).

Trihlormetil radikal se vezuje za makromolekule tkiva, dovodi do peroksidne degradacije lipida membrane i remeti homeostazu Ca²⁺, što dovodi do povreda tkiva i/ili smanjenja antioksidantne odbrane. Dakle, moguće je da je protektivno dejstvo antranilata kod oštećenja tkiva izazvanih CCl₄ posledica antioksidantne aktivnosti ili inhibicije građenja slobodnih radikala (Castro *et al*, 1974). Druga mogućnost je da ove supstance sprečavaju „curenje“ intracelularnih enzima i time smanjuju nivo enzima u serumu kod CCl₄-indukovanih oštećenja jetre usled stabilizacije ćelijske membrane oštećenih ćelija. Ovo je u saglasnosti sa prihvaćenim stanovištem da isceljenje parenhima jetre i regeneracija hepatocita vraća transaminaze u serumu na normalan nivo (Thabrew *et al*, 1987). Efikasnost hepatoprotektivnih lekova zavisi od njihove sposobnosti bilo da smanje neželjene efekte hepatotoksina ili da u njihovom prisustvu održavaju normalne fiziološke mehanizme jetre (Raghavendran *et al*, 2003).

5.7.3.2. Uticaj IMA i MMA na telesnu masu i masu jetre pacova

Tokom eksperimenta došlo je do promene telesne mase, odnosno mase jetre pacova svih eksperimentalnih grupa (tabela 5.17). Kod jedinki koje su tretirane jedinjenjima IMA i MMA u kombinaciji sa CCl₄, došlo je do smanjenja telesne mase u poređenju sa jedinkama grupa koje su primile samo maslinovo ulje ili samo CCl₄ (tabela 5.17). Značajan porast apsolutne i relativne mase jetre (p<0,05) je uočen kod jedinki koje su tretirane samo CCl₄ u poređenju sa grupom koja je primila samo maslinovo ulje, dok je značajno smanjenje apsolutne mase jetre uočeno kod jedinki koje su tretirane jedinjenjima MMA ili IMA u kombinaciji sa CCl₄ (tabela 5.17).

Tabela 5.17. Telesna masa i masa jetre pacova nakon različitih eksperimentalnih tretmana

Grupa	Počena telesna masa (g)	Krajnja telesna masa (g)	Procenat promene telesne mase (%)	Apsolutna masa jetre (g)	Relativna masa jetre (% u odnosu na telesnu masu)
Maslinovo ulje	238±24	267±30	12±4	9,2±0,3	3,4±0,3
CCl ₄	253±28	258±29	3,4±0,1*	11,2±0,3 [†]	4,3±0,5*
IMA + CCl ₄	243±26	181±16 ^{‡#}	-28±5 ^{‡#}	6,1±0,3 ^{‡#}	3,8±0,4
MMA + CCl ₄	226±22	172±15 ^{‡#}	-25±4 ^{‡#}	6,8±0,6 ^{‡#}	4,0±0,4

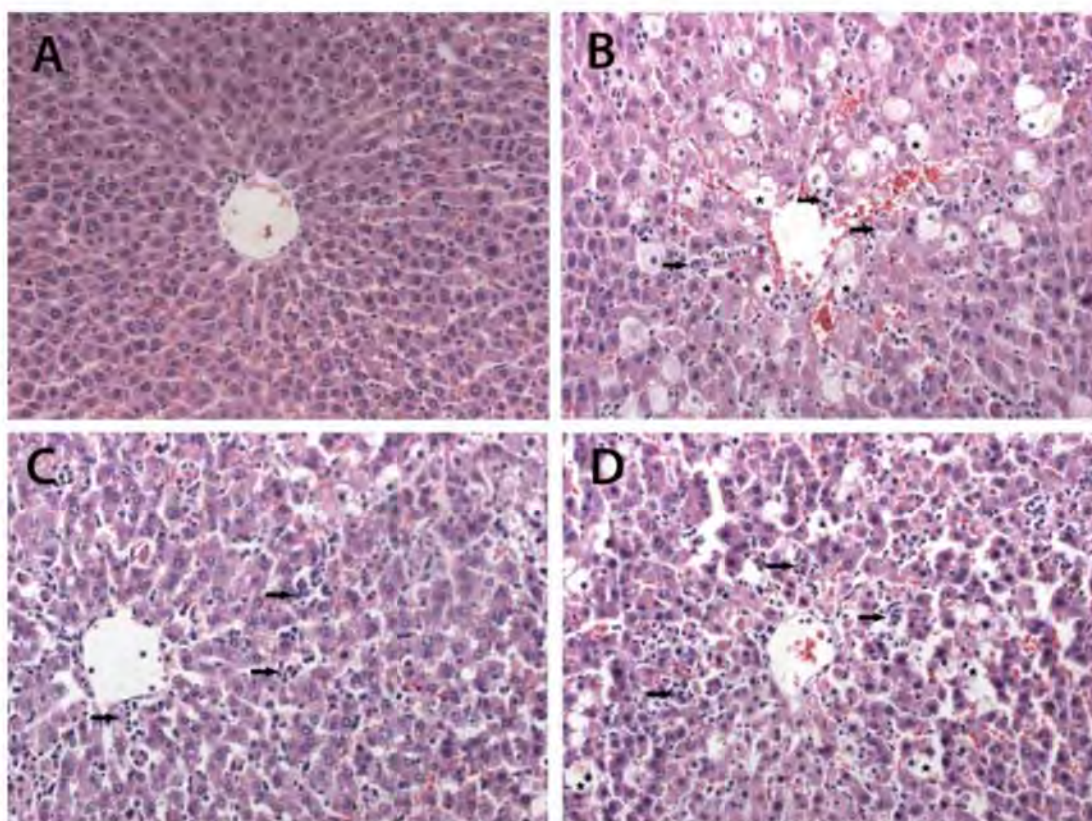
Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (*p<0,05; [†]p<0,001 spram maslinovog ulja; [‡]p<0,001 spram CCl₄).

Primena CCl₄ dovela je do značajnog porasta relativne i apsolutne mase jetre u poređenju sa grupom koja je primila samo maslinovo ulje. Povećanje mase jetre bi moglo da bude posledica povećanog sadržaja krvi usled dilatacije centralnih vena i sinusoida, povećanog transporta vode u ćelijama, bubrenja hepatocita i masnog oštećenja jetre usled povećane akumulacije masti u hepatocitima (Cotran *et al*, 1989). Sve ove promene uočene su prilikom histopatološkog pregleda tkiva. Relativna masa jetre životinja koje su primile antranilate u kombinaciji sa CCl₄ su bile slične masama jetri životinja grupe koja je primila samo maslinovo ulje. Ovo bi moglo biti posledica kako smanjenja ukupne telesne mase tako i protektivnog dejstva testiranih supstanci na CCl₄-indukovano oštećenje jetre.

5.7.3.3. Histopatološka analiza isečaka jetre

Izgled histoloških preparata tkiva jetre životinja koje su primile samo maslinovo ulje, samo CCl₄ i antranilate u kombinaciji sa CCl₄ predstavljen je na slici 5.7.11. Kod jedinki grupe koja je primila samo maslinovo ulje uočena je karakteristična arhitektura jetre, a centralne vene, portni prostori, hepatociti i sinusoidi su imali normalan izgled (slika 5.7.11-A). Histološki pregled jetre pacova koji su primili CCl₄ pokazao je da je došlo do masivne masne degeneracije i izražene vakuolizacije pri čemu je došlo do iščezavanja jedara, izražene nekroze, infiltracije limfocita i *Kupffer*-ovih ćelija oko centralne vene, kao i do gubitka granica ćelija (slika 5.7.11-B). Kod jedinki koje su primile i MMA i CCl₄ lobuli su imali normalnu konfiguraciju i došlo je do smanjenja degenerativnih lipidnih kapljica oko centrilobularne vene i do smanjenja vakuoliziranih ćelija u poređenju sa grupom koja je primila samo CCl₄, međutim i dalje je bilo inflamatornih ćelija (slika 5.7.11-C). Histopatološkim pregledom jetre uočeno je poboljšanje

histološke strukture jetre jedinki koje su tretirane jedinjenjem MMA u poređenju sa onima koje su primile samo CCl_4 što ukazuje na mogućnost da ispitivane supstance ubrzavaju regeneraciju jetre. Kod jedinki koje su tretirane i jedinjenjem IMA i CCl_4 došlo je do pojave nekrotičnih polja u centru lobusa, kao i inflamatorne infiltracije, međutim nekrotični delovi su bili manjeg obima u poređenju sa nekrotičnim delovima jetre pacova koji su tretirani samo CCl_4 što je u saglasnosti sa rezultatima analize nivoa AST i ALT u serumu. Dakle, aplikacija jedinjenja IMA ograničila je širenje zona oštećenja na centralnu zonu lobule. Histomorfološke promene su sumirane u tabeli 5.18. Biohemijski nalazi se dobro slažu sa histopatološkim nalazima. Oko centralne vene došlo je do široke infiltracije limfocita i *Kupffer*-ovih ćelija uz gubitak ćelijskih granica (tabela 5.18).



Slika 5.7.11. Izgled histološkog preparata tkiva jetre bojenog HE (200 \times). (A) Grupa koja je primila samo maslinovo ulje; (B) Grupa koja je primila CCl_4 ; (C) Grupa koja je primila MMA + CCl_4 ; (D) Grupa koja je primila IMA + CCl_4 . *nekrotične ćelije, \rightarrow inflamatorne ćelije

Tabela 5.18. Stepen histopatoloških lezija jetre pacova nakon različitih eksperimentalnih tretmana

Grupa	Mikroskopska analiza isečaka jetre		
	Hidropsna i vakuolarna degeneracija	Infiltracija mononuklearnih ćelija	Nekroza
Maslinovo ulje	–	–	–
CCl ₄	+++	+++	+++
IMA + CCl ₄	++	++	++
MMA + CCl ₄	+	++	+

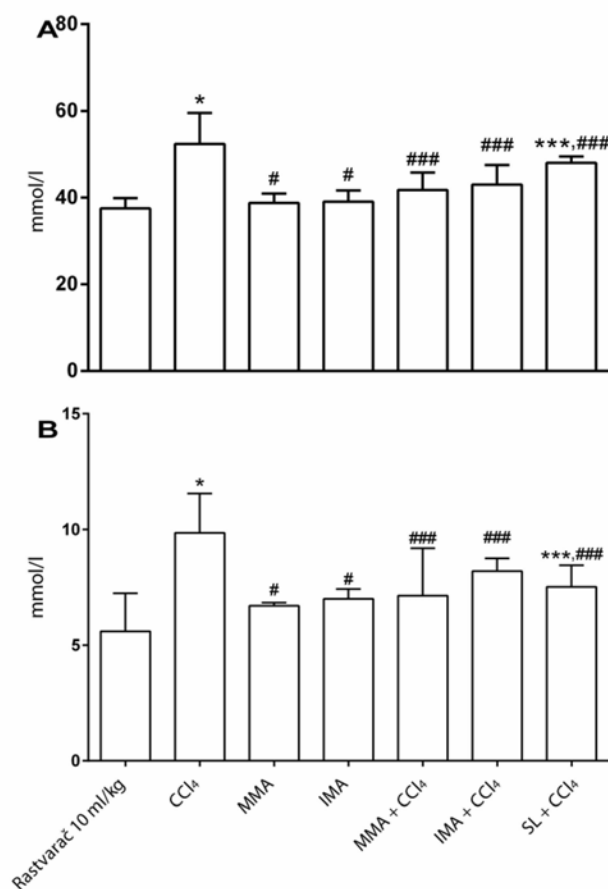
Bodovanje stepena oštećenja definisan na sledeći način: odsutan (–), blag (+), umeren (++) i jako izražen (+++).

Pored toga što slobodni radikali mogu direktno da dovedu do oštećenja tkiva, oni mogu da dovedu do nagomilavanja leukocita u tkivima i da time prouzrokuju njihovo indirektno oštećenje aktivacijom neutrofila. Dokazano je da aktivirani neutrofili luče enzime (npr. mijeloperoksidaze, elastaze i proteaze) i oslobađaju kiseonične radikale (Randjelović *et al*, 2012; Hecker *et al*, 1990). Takođe je uočena i infiltracija mononuklearnih ćelija u ispitivanim tkivima jetre, što može biti u vezi sa prethodnim nalazima (slika 5.7.11).

5.7.4. Ispitivanje nefroprotektivnog dejstva IMA i MMA u modelu oštećenja bubrega pacova izazvanog ugljen-tetrahloridom

5.7.4.1. Određivanje nivoa uree i kreatinina u serumu

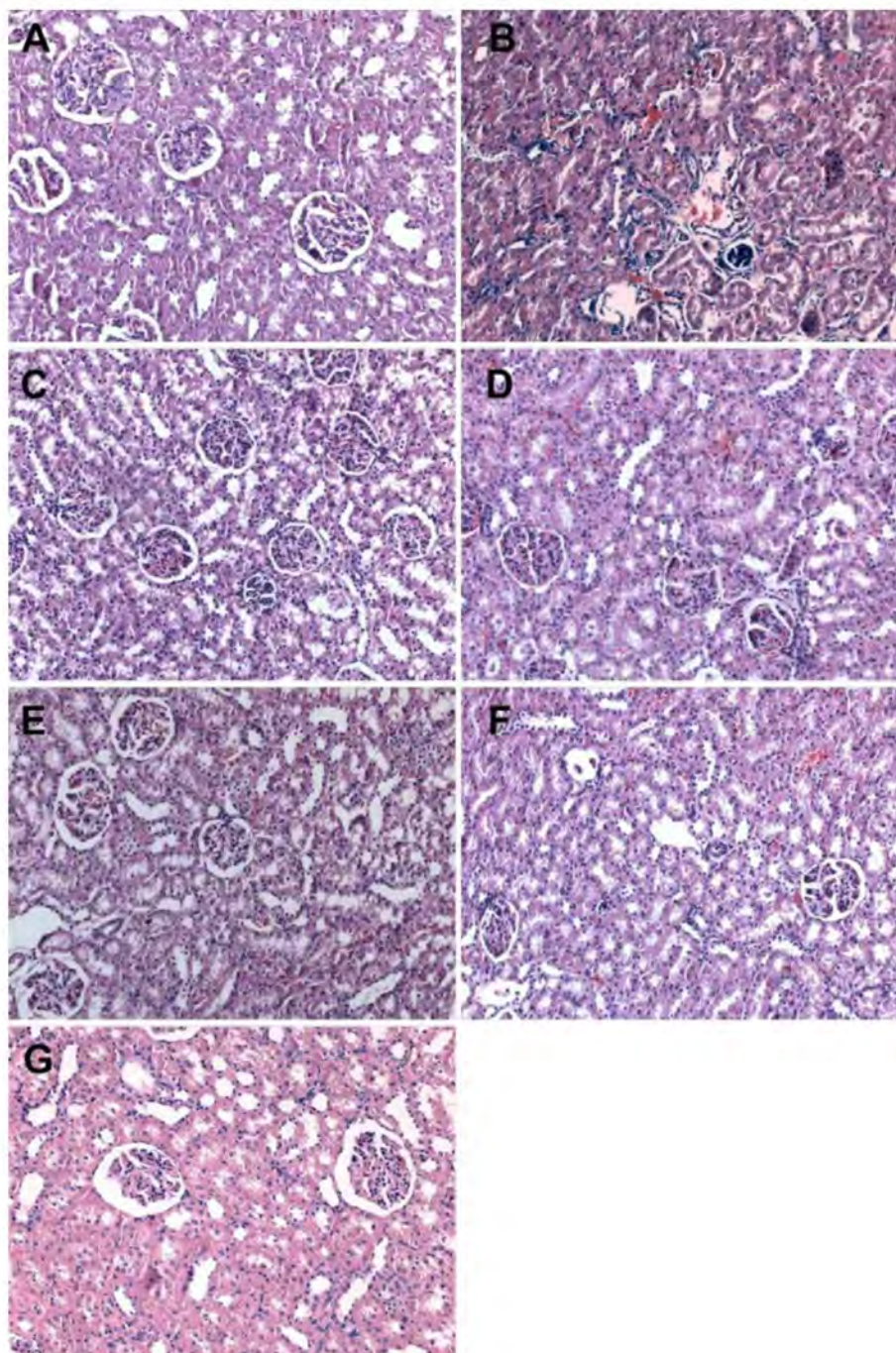
Nivoi uree i kreatinina u serumu životinja koje su tretirane jedinjenjima IMA i MMA se nisu značajno razlikovali u odnosu na kontrolnu grupu (slika 5.7.12). Izmereni nivoi uree i kreatinina životinja koje su primile i IMA i CCl₄ ili samo CCl₄ bili su značajno viši u poređenju sa kontrolnom grupom (slika 5.7.12), što je ukazivalo na značajno redukovanu funkciju bubrega životinja ovih grupa. Međutim, nivoi uree i kreatinina u serumu životinja grupe koja je primila i MMA i CCl₄ po vrednosti su bili bliski kontrolnoj grupi. Kod životinja kojima je sedam dana pre CCl₄ apliciran standardni lek silimarin (SL) takođe je došlo do smanjenog porasta nivoa uree i kreatinina u poređenju sa kontrolnom grupom (slika 5.7.12).



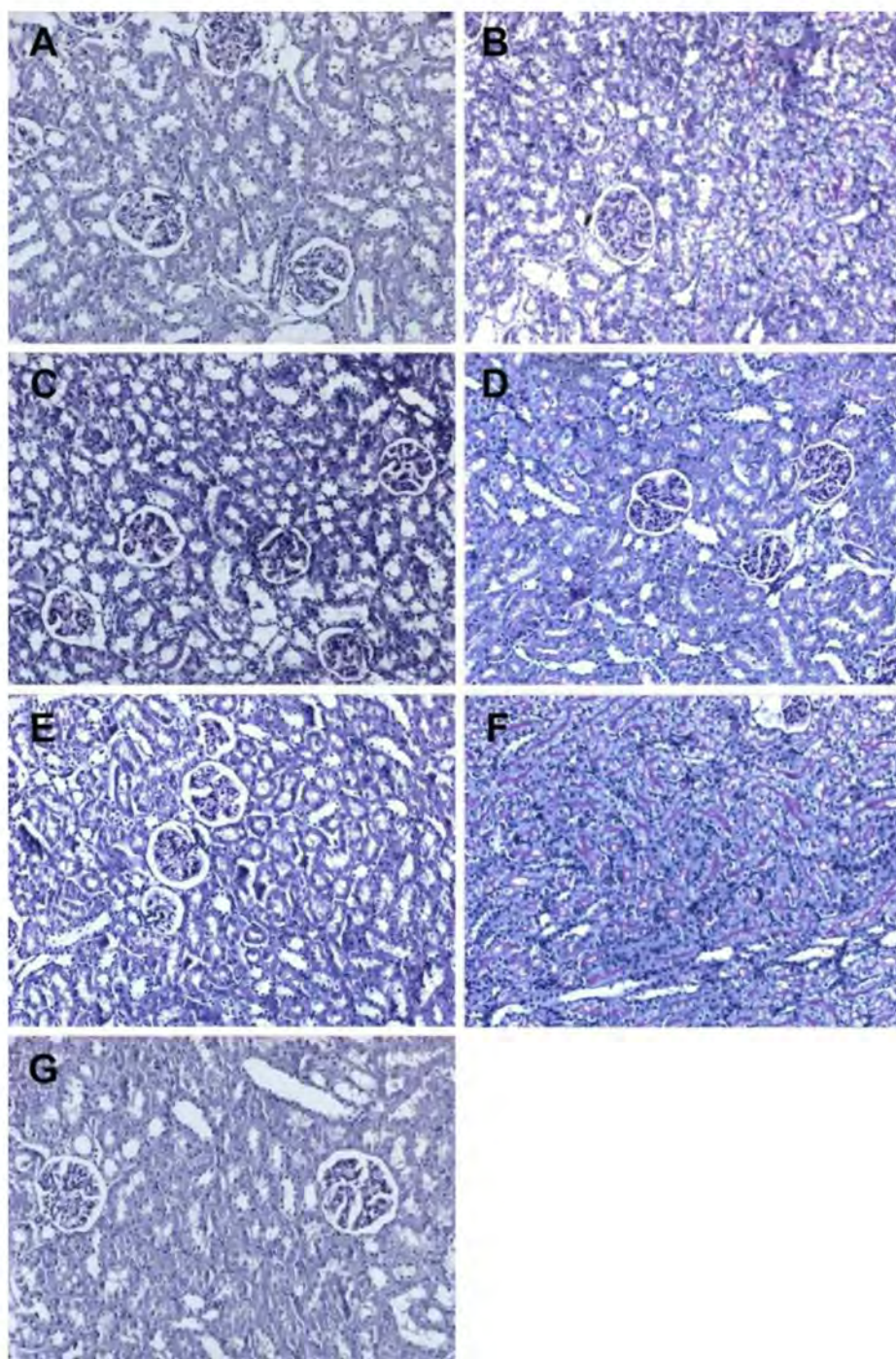
Slika 5.7.12. Nivoi kreatinina (A) i uree (B) u serumu i statističko poređenje grupa životinja nakon različitih eksperimentalnih tretmana. Vrednosti su date kao srednja vrednost \pm SD (n=6). Statistički značajne razlike su određene jednosmernom analizom varijansi (ANOVA) nakon čega je odrađen *Tukey-ev post hoc* test za višestruka poređenja (* $p < 0,0001$; *** $p < 0,01$ spram rastvarača 10 ml/kg t.m; # $p < 0,0001$; ### $p < 0,01$ spram CCl₄)

5.7.4.2. Histopatološka analiza isečaka bubrega

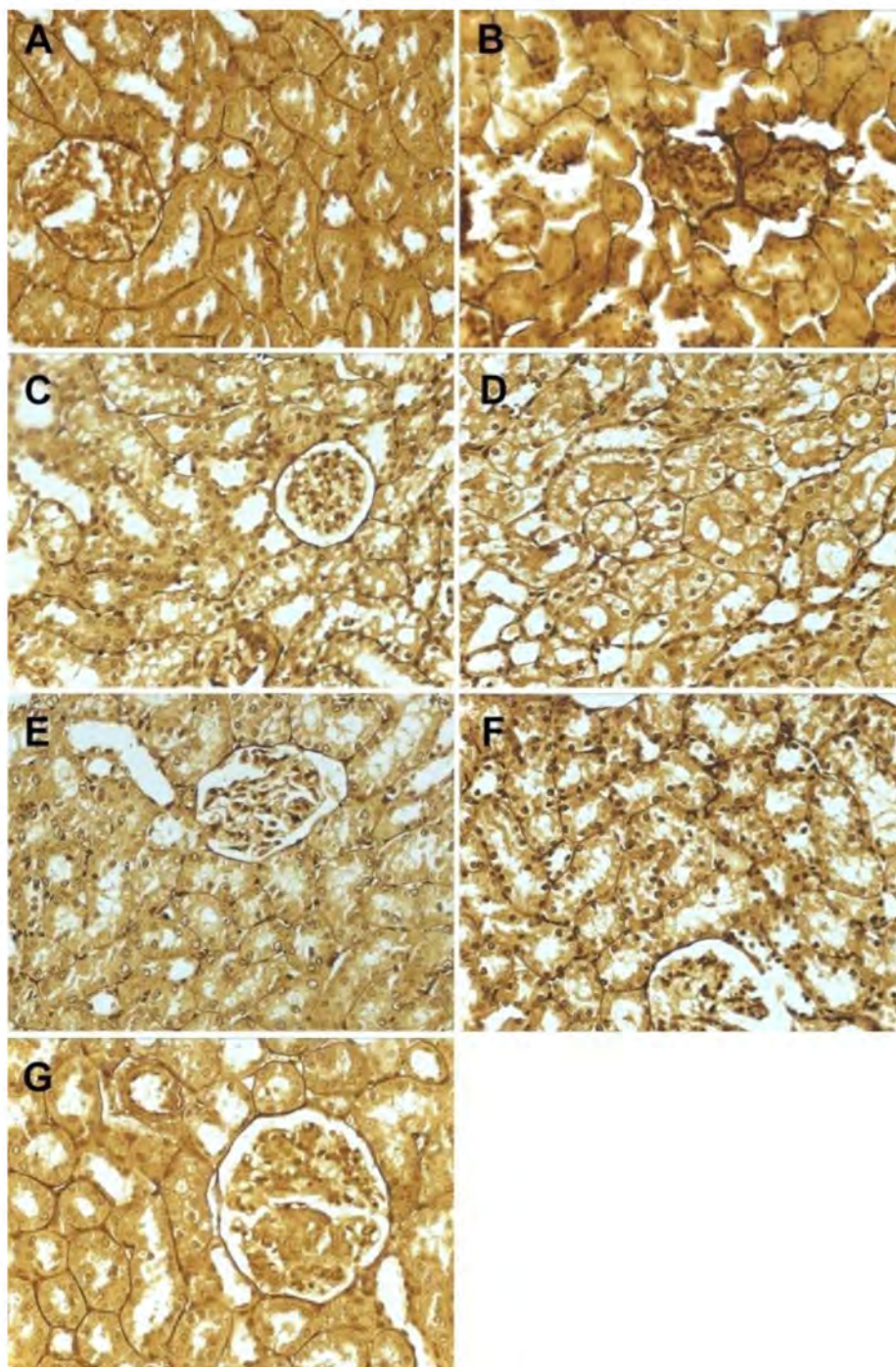
Proučavanjem isečaka bubrega pod mikroskopom utvrđena je normalna morfologija renalnog parenhima sa dobro definisanim tubulima i glomerulima kod životinja koje su primile samo rastvarač (slike 5.7.13-A i 5.7.14-A). Aplikacija CCl₄ uzrokovala je značajne abnormalnosti u morfologiji bubrega i dovela je do nekroze proksimalnih tubula, parenhimatozne degeneracije (mutno bubrenje), porasta glomerularne celularnosti, deskvamacije (sljušćivanja) i infiltracije mononuklearnih ćelija uglavnom lokalizovanih u subkapsularnim i jukstamedularnim regijama korteksa bubrega (slika 5.7.13-B). Takođe je uočeno i povećanje PAS pozitivnih tubularnih cilindara (slika 5.7.14-B) i nekoliko fokusa sa gubitkom bazalne membrane u proksimalnim tubulima (slika 5.7.15-B).



Slika 5.7.13. Efekat metil- (MMA) i izopropil-(IMA) *N*-metilantranilata na histološke promene bubrega pacova tretiranih ugljen-tetrahloridom (HE×200). (A) Kontrolna grupa: normalna histološka struktura tkiva bubrega; (B) Grupa tretirana CCl₄: izražena nekroza proksimalnih tubula, parenhimatozna degeneracija, deskvamacija i infiltracija mononuklearnih ćelija; (C) Grupa tretirana jedinjenjem MMA: skoro normalna arhitektura bubrega (fokalne zone mutnog bubrenja); (D) Grupa tretirana i MMA i CCl₄: značajno smanjenje nekroze i inflamacije prouzrokovane CCl₄; (E) Grupa tretirana jedinjenjem IMA: blaga parenhimatozna degeneracija i inflamacija; (F) Grupa tretirana i IMA i CCl₄: parenhimatozna degeneracija, inflamacija i glomerularna hiperemija; (G) Grupa tretirana i CCl₄ i SL: gotovo da nema histopatoloških promena



Slika 5.7.14. Efekat metil- (MMA) i izopropil-(IMA) *N*-metilantranilata na histološke promene bubrega pacova tretiranih CCl_4 (PAS \times 200). (A) Kontrolna grupa: normalna histološka struktura tkiva bubrega; (B) Grupa tretirana CCl_4 : povećanje PAS-pozitivnih tubularnih cilindara; (C) Grupa tretirana MMA: blage fokalne parenhimatozne degeneracije; (D) Grupa tretirana i MMA i CCl_4 : značajno smanjenje količine hijalina cilindara u tubularnim lumenima; (E) Grupa tretirana jedinjenjem IMA: blaga infiltracija mononuklearnih ćelija u korteksu bubrega; (F) Grupa tretirana i IMA i CCl_4 : velika količina PAS-pozitivnih tubularnih cilindara; (G) Grupa tretirana i CCl_4 i SL: skoro normalan izgled isječka uz minimalne znake oštećenja



Slika 5.7.15. Efekat metil-(MMA) i izopropil-(IMA) *N*-metilantranilata na promene tubularne bazalne membrane bubrega pacova tretiranih CCl_4 (Jones \times 400). (A) Kontrolna grupa: neoštećene i kontinuirane tubularne bazalne membrane; (B) Grupa tretirana CCl_4 : isprekidanost i ireverzibilno oštećenje bazalnih membrana proksimalnih tubula; (C) Grupa tretirana MMA: očuvane bazalne membrane tubula; (D) Grupa tretirana i MMA i CCl_4 : minimalni znakovi promena bazalne membrane; (E) Grupa tretirana jedinjenjem IMA: nema gubitka bazalne membrane; (F) Grupa tretirana i IMA i CCl_4 : fokalni gubitak tubularne bazalne membrane; (G) Grupa tretirana i CCl_4 i SL: minimalni znaci oštećenja bazalne membrane

Aplikacija samo jedinjenja MMA dovodi do pojave fokalnih zona mutnog bubrenja sa minimalnom količinom PAS-pozitivnih tubularnih cilindra lokalizovanih u subkapsularnim zonama kore bubrega (slika 5.7.14-C). Kod životinja koje su primile jedinjenje MMA došlo je do značajnog smanjenja oštećenja prouzrokovanog CCl₄ (smanjenja nekroze i inflamacije) (slika 5.7.13-D). Aplikacija jedinjenja MMA pre CCl₄ smanjila je CCl₄-indukovanu infiltraciju mononuklearnih ćelija u korteksu bubrega (slika 5.7.13, tabela 5.19). S druge strane, kod životinja koje su primile IMA bilo je više parenhimatoznih degeneracija, inflamacija i PAS-pozitivnih tubularnih cilindra u poređenju sa pacovima kontrolne ili grupe tretirane jedinjenjem MMA. Analizom isečaka bubrega ove grupe utvrđena je parenhimatozna degeneracija, visok stepen inflamacije, glomerularna hiperemija, velika količina PAS-pozitivnih tubularnih cilindra i fokalni gubitak bazalne membrane proksimalnih tubula (slike 5.7.14-F i 5.7.15-F). Kao što je i očekivano kod bubrega životinja tretiranih i silimarinom i CCl₄ došlo je do promena u vidu parenhimatozne degeneracije, perivaskularne infiltracije inflamatornih ćelija, minimalne količine PAS-pozitivnih tubularnih cilindra i lokalizovanog gubitka bazalne membrane oko tubularnih ćelija (slike 5.7.14-G i 5.7.15-G). Rezultati semi-kvantitativne analize mikroskopskih promena prikazani su u tabeli 5.19.

Tabela 5.19. Stepent histopatoloških lezija bubrega pacova nakon različitih eksperimentalnih tretmana

Grupa	Mikroskopska analiza isečaka bubrega				
	Tubularna degeneracija	Tubularna nekroza	Infiltracija mononuklearnih ćelija	Hijalini cilindri	Gubitak bazalne membrane
Kontrolna	–	–	–	–	–
CCl ₄	+++	+++	++	+++	+++
IMA	++	–	+	+	–
MMA	+	–	–	+	–
IMA + CCl ₄	++	–	++	++	+
MMA + CCl ₄	+ / +++	–	- / +	–	- / +
SL + CCl ₄	++	–	++	- / +	- / +

Sistem bodovanja stepena oštećenja je definisan na sledeći način: odsutan (–), minimalan (-/+), blag (+), umeren (++) i jako izražen (+++).

5.7.4.3. Morfometrijska analiza glomerula bubrega

Morfometrijska analiza glomerula tretiranih životinja pokazala je da akutna aplikacija CCl_4 izaziva ozbiljne promene u glomerularnoj morfologiji. Morfometrijski parametri (površine, perimetri, *Feret*-ovi prečnici, male i velike ose) glomerula životinja koje su primile CCl_4 su bili značajno manji u poređenju sa istim parametrima glomerula kontrolne grupe (tabela 5.20). S druge strane glomerularna optička gustina grupe tretirane CCl_4 je bila značajno veća u poređenju sa kontrolnom grupom. Aplikacija CCl_4 nije imala uticaja na cirkularnost glomerula s obzirom da nije bilo značajne razlike između parametara kontrolne i grupe životinja koja je primila CCl_4 .

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

Tabela 5.20. Morfometrijska analiza glomerula isečaka bubrega eksperimentalnih grupa.

Grupa	Izmereni morfometrijski parametri glomerula						
	Površina (μm^2)	Perimetar (μm)	Cirkularnost	Optička gustina	Feret-ov dijametar (μm)	Velika osa (μm)	Mala osa (μm)
Kontrolna	3098±580	208,4±25,99	0,835±0,021	0,445±0,073	70,27±9,22	68,44±7,89	54,76±4,97
CCl ₄	2043±300***	169,0±11,61***	0,864±0,017	0,975±0,177**	59,24±3,86****	57,09±3,75****	44,12±3,93****
IMA	1807±275**	172,3±8,47****	0,752±0,053	0,925±0,136**	56,59±3,17***	53,58±3,52***	41,33±4,30***
MMA	1776±170**	165,0±4,81***	0,816±0,071	0,812±0,061***	55,18±1,46***	52,65±1,92***	42,15±2,58***
IMA + CCl ₄	1624±208**	157,2±9,87**	0,814±0,065	0,797±0,119****	53,58±4,06**	51,34±4,34**	39,14±2,05**
MMA + CCl ₄	1768±97**	169,4±6,79***	0,773±0,071	0,860±0,083***	55,63±1,09***	52,95±1,28***	41,21±1,20**
SL + CCl ₄	2972±520####	210,8±16,05####	0,802±0,0299	0,815±0,181***	73,66±5,02###	68,66±6,34####	52,00±5,52

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (**p<0,001 spram kontrolne grupe, ***p<0,01 spram kontrolne grupe, ****p<0,05 spram kontrolne grupe, ###p<0,01 spram CCl₄, ####p<0,05 spram CCl₄).

Suplementacija jedinjenjima IMA i MMA nije značajno uticala na CCl₄-izazvanu morfometrijsku glomerularnu alteraciju kod životinja. Prosečna zona, *Feret*-ov prečnik, velika i mala osa glomerula ovih grupa (MMA + CCl₄ i IMA + CCl₄) bili su značajno manji, dok je optička gustina bila značajno veća u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe (tabela 5.20). Morfometrijske vrednosti glomerula životinja tretiranih CCl₄ i referentnim lekom silimarinom su bile slične vrednostima kontrolne grupe i nije bilo statistički značajne razlike među njima izuzev razlike u optičkoj gustini glomerula koja je bila značajno povećana u poređenju sa kontrolnom grupom.

Funkcija bubrega je ispitivana praćenjem nivoa uree i kreatinina u serumu. Odstupanje koncentracija ova dva parametra od normalnih vrednosti ukazuje na oštećenje bubrežnih nefrona (ili trošenja mišića u slučaju kreatinina) (Rahmat *et al*, 2014). Aplikacija CCl₄ uzrokuje značajan porast koncentracije ova dva markera bubrežne funkcije usled narušavanja normalne funkcije bubrega. Tretman jedinjenjem MMA pre CCl₄ smanjuje porast nivoa uree i kreatinina u serumu izazvan aplikacijom CCl₄, što dovodi do normalizacije funkcije bubrega. Silimarin predstavlja lipofilni ekstrakt semena biljne vrste *Silybum marianum* i sastoji se uglavnom od tri izomerna flavonolignana (silibinina, silidianina i silikristina). Antioksidantne, antiinflamatorne i antiapoptotične osobine ukazuju da bi silimarin pored hepatoprotektivnog mogao da poseduje i nefroprotektivno dejstvo (Dashti-Khavidaki *et al*, 2012). Poznato je da CCl₄ pretežno utiče na korteks bubrega koji sadrži citohrom P-450, ključni enzim kod CCl₄-izazvane nefrotoksičnosti (Jaramillo-Juarez *et al*, 2008), što je u saglasnosti sa našim rezultatima.

Ovi rezultati su veoma značajni jer analgetici koji se uobičajeno koriste (kao što su acetaminofen, aspirin, indometacin, itd.) mogu da uzrokuju analgetsku nefropatiju sa jasno vidljivim nekrozama proksimalnih izvijuganih tubula i renalnu papilarnu nekrozu (Porter, 1996). Na primer, visoke doze acetaminofena, više od onih koje se koriste u terapiji bola (500-1000 mg/kg t.m.), dovode do izraženih oštećenja bubrega pacova uz smanjenje *Bowman*-ovog prostora, ekstravazaciju eritrocita, povećanja mezangijalnih ćelija, gubitka *brush borders* u proksimalnim tubulima, mitohondrijalnog oštećenja, odlublivanja ćelija i oštećenja bazalne membrane (Blank, 1996). Čak i znatno više doze antranilata (200 mg/kg t.m.) od onih koje ispoljavaju značajno analgetsko dejstvo (0,3 mg/kg t.m.) ne uzrokuju morfološke promene bubrega (ekstenzivne degeneracije ili nekroze) (slika 5.7.13).

Cirkularnost je mera koliko je dati predmet okrugao, savršeni krug ima faktor oblika 1, dok faktor oblika linije teži 0 (Bertelli *et al*, 2002). Ovaj parameter se koristi da bi se kvantifikovao kolaps glomerula. CCl₄ nije uzrokovao morfometrijsku alteraciju glomerula. Uočene morfometrijske promene glomerula grupe životinja koje su tretirane sa CCl₄ su očekivane imajući u vidu nefrotoksične osobine CCl₄ (što je primećeno i mikroskopskom analizom kore bubrega). Vrednosti morfometrijskih parametara određenih u ovom eksperimentu ukazuju da akutna aplikacija CCl₄ uzrokuje glomerulosklerozu i glomerularnu atrofiju bez kolapsa, koja je već dokazana u sličnim studijama, ali ne kvantitativno, već samo kvalitativno na osnovu histopatološkog nalaza (Al-Sowayan *et al*, 2014; Hermenean *et al*, 2013).

Naši rezultati ukazuju da antranilati ne ispoljavaju protektivno dejstvo na morfometrijske promene glomerula izazvane ugljen-tetrahloridom. Na prvi pogled ovi rezultati nisu u saglasnosti sa histološkom analizom gde je MMA jasno pokazao izvesan stepen ameliorativnog dejstva na mikroskopske promene korteksa bubrega indukovane CCl₄ (slike 5.7.13-D i 5.7.14-D), naročito pošto je mikroskopska analiza manje objektivna od morfometrijske. Rezultati histopatoloških ispitivanja su kvalitativne i semi-kvantitativne, dok je morfometrijska analiza kvantitativne prirode. Objašnjenje diskrepance mikroskopskog nalaza koji je bio izraženiji u tubulima koji su detaljno opisani, dok se morfometrijska analiza zasnivala na morfometrijskoj analizi glomerula koji nisu bili zahvaćeni kao proksimalni i distalni tubuli.

Kao što je već rečeno, CCl₄ stimuliše oksidativni stres generisanjem trihlormetil slobodnih radikala ($\cdot\text{CCl}_3$) u krvi i različitim organima uključujući bubrege (Abraham *et al*, 1999). Trihlormetil radikal se vezuje za makromolekule tkiva, izaziva peroksidativnu degradaciju lipida membrane i narušava Ca²⁺ homeostazu što dovodi do povreda tkiva i/ili smanjenja antioksidantne odbrane. Već je dokazano da jedinjenja IMA i MMA ispoljavaju protektivno dejstvo kod CCl₄-izazvanih oštećenja jetre kod pacova, što je zaključeno na osnovu uočenog smanjenja nivoa „curenja“ hepatocelularnih enzima i smanjenja stepena oštećenja tkiva koje je zabeleženo prilikom mikroskopskih ispitivanja.

Rezultati *in vitro* ispitivanja antioksidantne daju bolje objašnjenje nefroprotektivnog efekta testiranih supstanci. Poznato je da organizmi sisara imaju efikasne odbrambene mehanizme kojima se sprečava nastanak i vrši neutralizacija slobodnih radikala koji prouzrokuju oštećenje organa enzimskim i neenzimskim putevima. Antioksidantna aktivnost ili sposobnost

hvatanja slobodnih radikala igra značajnu ulogu u zaštiti protiv CCl₄ izazvane nefro- i hepatopatije (Castro *et al*, 1974). Model oštećenja bubrega koji je korišćen u ovom ispitivanju je primarno povezan sa oštećenjem tkiva koje je uzrokovano poremećajem antioksidantne odbrane tkiva/ćelije (Khan *et al*, 2010). Kako su IMA i MMA loši hvatači slobodnih radikala njihova potencijalna nefroprotektivna aktivnost nije posledica njihovih antioksidantnih osobina.

Pored toga što direktno oštećuju tkiva slobodni radikali dovode do akumulacije leukocita u tkivima, pa tako dovode do povreda tkiva i indirektno, aktiviranjem neutrofila. Dokazano je da aktivirani neutrofili luče enzime (npr. mijeloperoksidazu, elastazu i proteazu) i oslobađaju kiseonične radikale. Ove tvrdnje su potvrđene i našim istraživanjem gde je primećena umerena infiltracija mononuklearnih ćelija u bubrezima pacova tretiranih CCl₄ (slika 5.7.13, tabela 5.19). Tretman jedinjenjem MMA značajno smanjuje infiltraciju leukocita u tkivo bubrega. Ovim nalazima se može delimično objasniti uočeno protektivno dejstvo MMA kod promena bubrega indukovanih pomoću CCl₄. Smanjenje mikroskopskih promena bubrega životinja tretiranih i sa IMA i sa CCl₄ je bilo manje izraženo, što je u dobroj korelaciji sa povećanim nivoima uree i kreatinina u serumu koji su uočeni kod ove grupe (slike 5.7.13-F i 5.7.14-F).

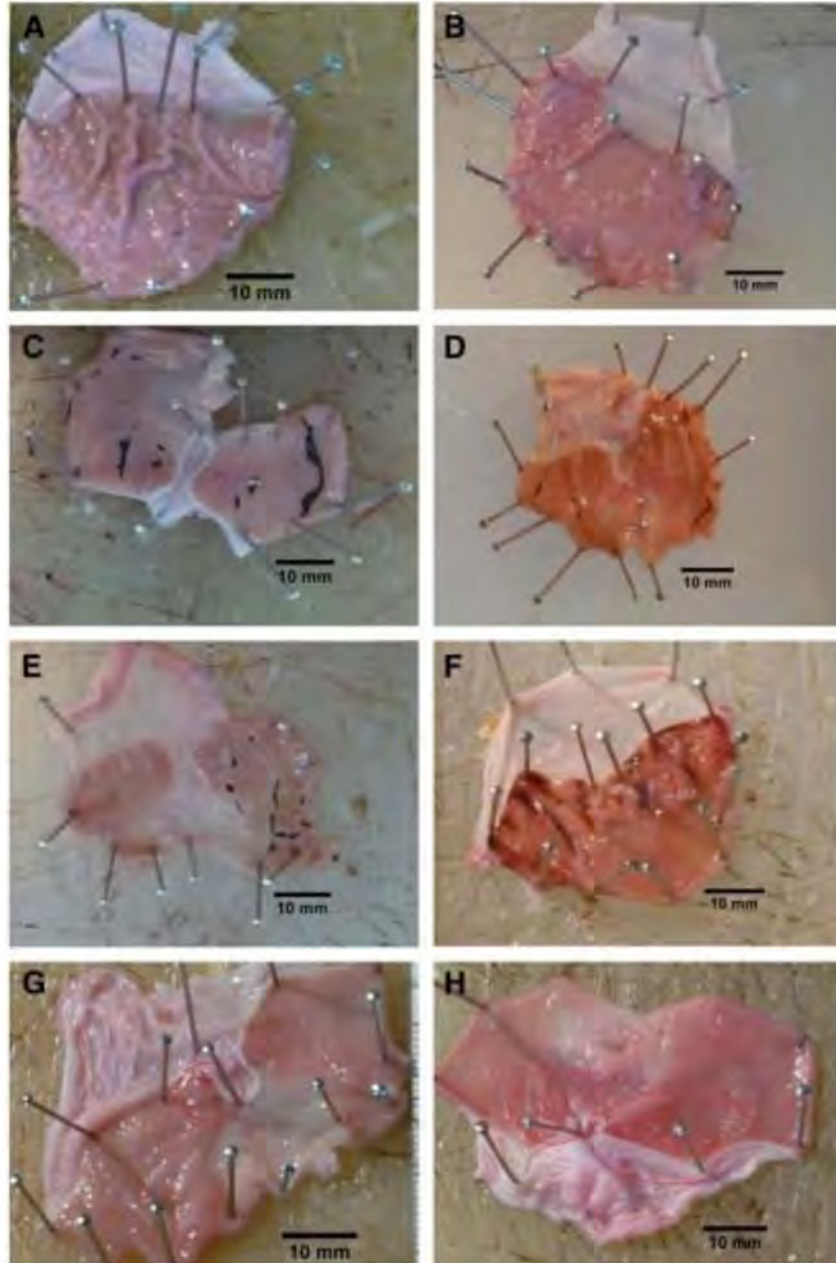
Dakle, visoke doze antranilata, za koje je dokazano da poseduju antinociceptivnu aktivnost, ne dovode do značajnih oštećenja tkiva bubrega. Naši eksperimenti pokazuju da metil-, ali ne i izopropil-*N*-metilantranilat, poseduje protektivni potencijal protiv CCl₄-uzrokovanih oštećenja bubrega kod pacova. Izgleda da (niska) antioksidantna aktivnost pomenutih jedinjenja nije uzrok protektivnog dejstva ovih jedinjenja. S obzirom da je prirodan ili sintetski metil-*N*-metilantranilat (MMA) deo svakodnevne ljudske ishrane i da oba jedinjenja pokazuju analgetske osobine, dobijeni rezultati su od velikog značaja.

5.7.5. Uticaj IMA i MMA na nastanak lezija na sluznici želuca pacova izazvanih diklofenakom i etanolom

5.7.5.1. Uticaj jedinjenja IMA i MMA na sluznicu želuca

Nakon aplikacije jedinjenja IMA i MMA nisu primećena nikakva makroskopska oštećenja (lezije) sluznice želuca (slika 5.7.16-A i B). Histopatološke analize želuca životinja

koje su primile IMA i MMA pokazale su da je očuvana arhitektura sluznice, bez ikakvih patoloških promena (slika 5.7.17-A i B).

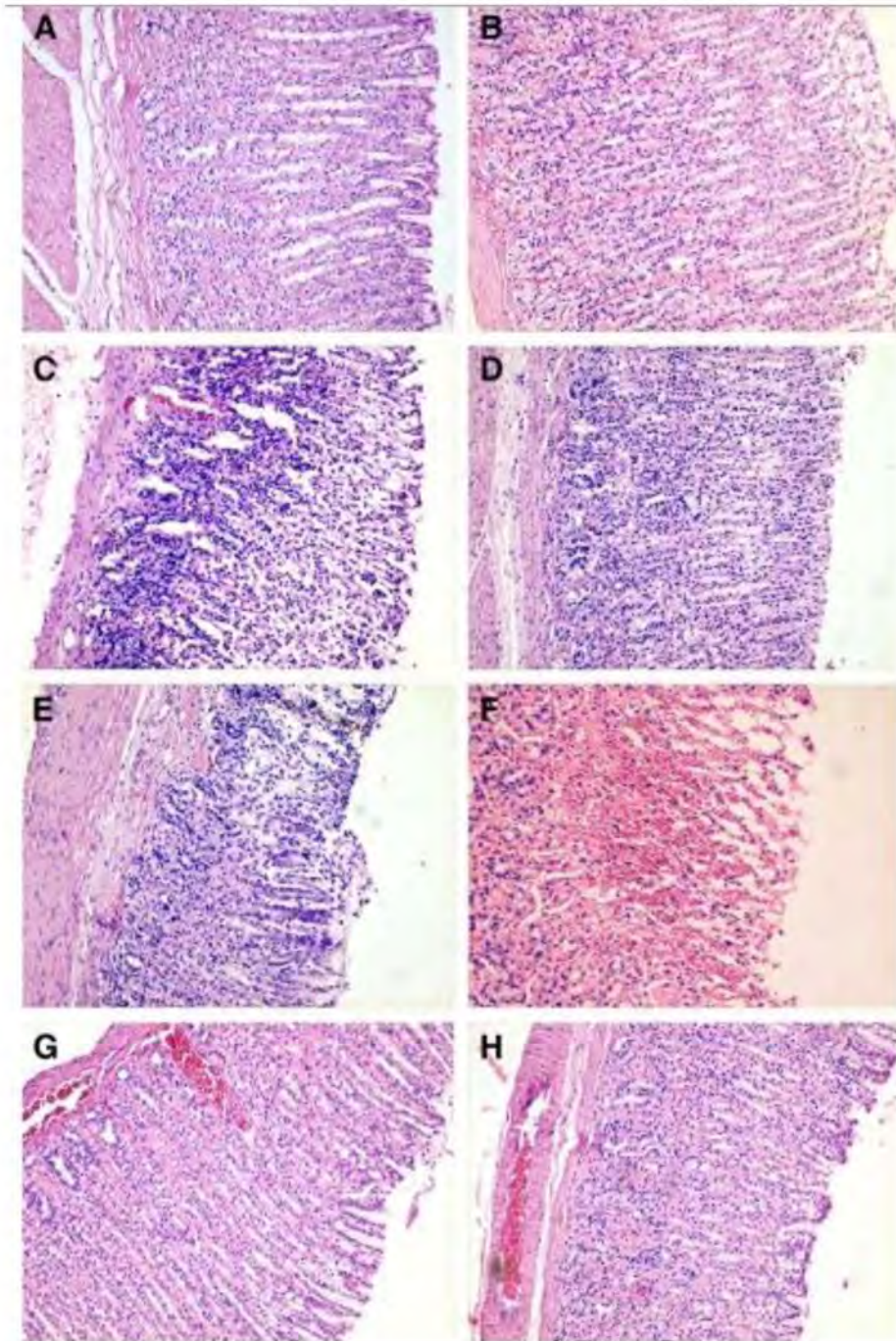


Slika 5.7.16. Makroskopski izgled sluznice želuca pacova tretiranih diklofenakom (DC) i etanolom (ET). (A) Grupa tretirana jedinjenjem IMA: normalna sluznica; (B) Grupa tretirana jedinjenjem MMA: normalna sluznica; (C) Grupa tretirana DC: na sluznici želuca vidljive su tačkaste/široke linearne lezije; (D) Grupa koja je primila i IMA i DC: tanke linearne lezije; (E) Grupa koja je primila i MA i DC: tanke linearne lezije; (F) Grupa koja je primila etanol: hemoragijske pruge uočene u telu želuca; (G) Grupa koja je primila i IMA i ET: male tačkaste lezije (zaokružene crvenom bojom); (H) Grupa koja je primila i MMA i ET: hiperemija želuca

5.7.5.2. *Uticao jedinjenja IMA i MMA na nastanak lezija na sluznici zeluca pacova izazvanih diklofenakom – Makroskopski i mikroskopski pregled lezija*

Jedna doza diklofenaka (80 mg/kg t.m.) prouzrokovala je difuzne tačkaste ili široke linearne lezije sluznice zeluca (slika 5.7.16-C) lokalizovane uglavnom na telu zeluca. Makroskopski izgled sluznice zeluca zivotinja koje su tretirane jedinjenjima IMA (slika 5.7.16-D) i MMA (slika 5.7.16-E) u dozama od 50 i 100 mg/kg t.m, blago su se razlikovale od preparata sluznice zivotinja koje su primile samo DC. Kod zivotinja koje su pre diklofenaka primile jedinjenje MMA došlo je do pojave lezija pre svega na telu zeluca koje su bile tačkaste i pojavile su se samo na jednom zidu zeluca, dok su se kod zivotinja koje su primile IMA lezije javile u vidu konfluentnih, tankih, dugih i linearnih lezija. Sluzice zeluca zivotinja koje su primile najveće doze supstanci IMA i MMA (200 mg/kg t.m.) nisu imale lezije. U ovim slučajevima je zabeležena samo hiperemija sluznice.

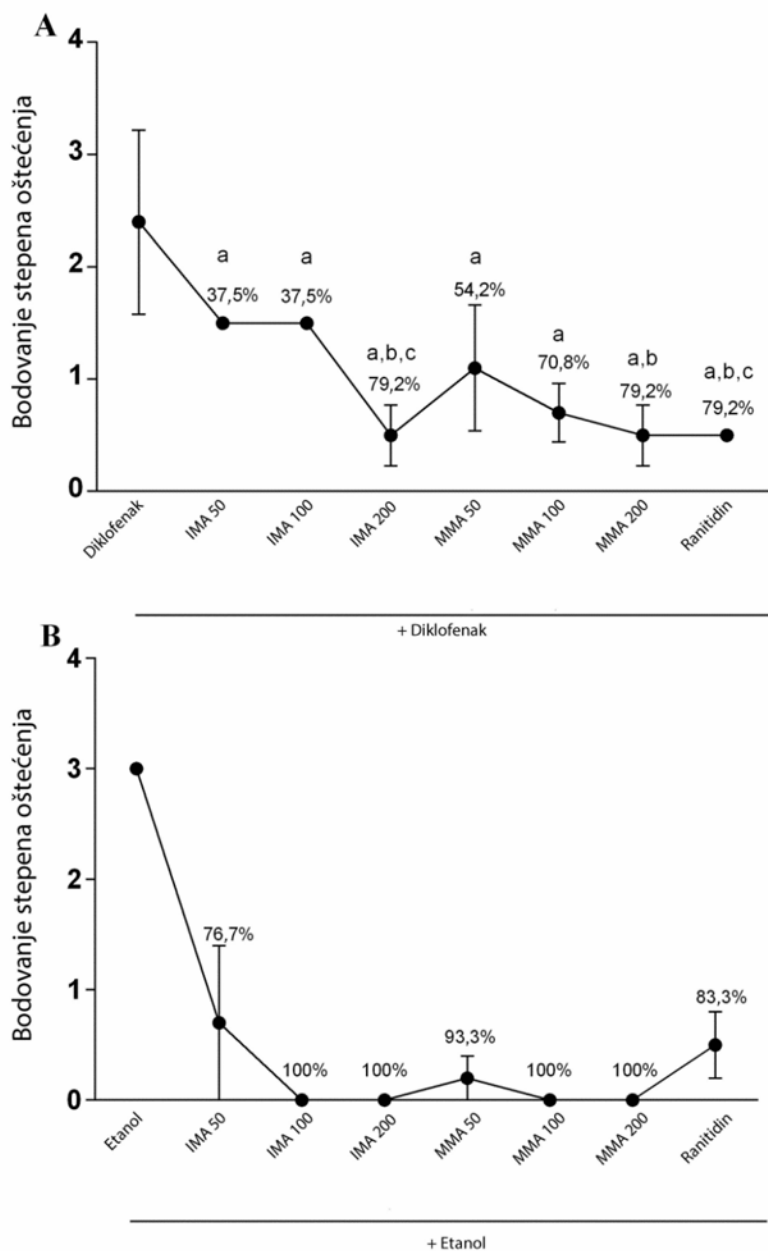
Kod zivotinja koje su tretirane samo diklofenakom došlo je do narušavanja normalne zeludačne glandularne arhitekture uz atrofiju epitelnih slojeva, hiperemiju i masivne infiltracije polimorfonuklearima (slike 5.7.17-C). S druge strane kod jedinki kojima su prethodno dati IMA i MMA došlo je samo do diskretnih erozija, dok je arhitektura zeludačne sluznice ostala očuvana uz infiltraciju leukocita (slika 5.7.17-D i E).



Slika 5.7.17. Histološki pregled sluznice želuca pacova (HE×100). (A, B) Grupe tretirane jedinjenjima IMA i MMA: normalna histoarhitektura; (C) Grupa tretirana DC: izražena oštećenja sluznice želuca u vidu atrofije sluznice, kongestije i infiltracije leukocita; (D, E) Grupe tretirane i IMA/MMA i DC: Smanjenje oštećenja sluznice izazvanog DC uz blage erozije i malo inflamatornih ćelija u sluznici; (F) Grupa tretirana etanolom: ekstenzivne ulceracije, nekrotične i hemoragijske zone; (G, H) Grupa koja je tretirana i IMA/MMA i ET: gotovo da nema etanolom izazvanog oštećenja sluznice, pojava samo blagih erozija i hiperemije

Na slici 5.7.18 predstavljen je sistem bodovanja ulcera i procenti inhibicije izračunati za životinje koje su pre diklofenaka primile jedinjenja IMA i MMA u svim dozama. Poređenjem svih eksperimentalnih grupa i grupe životinja koja je primila samo diklofenak utvrđeno je postojanje statistički značajnih razlika ($F(7,32) = 13,744$, $p < 0,001$). Kad se porede iste doze jedinjenja MMA i IMA, jedinjenje MMA pokazuje veću aktivnost, međutim za oba jedinjenja statistički značajne razlike ($p < 0,001$) postoje samo između grupa koje su primile najviše i najniže doze (slika 5.7.18).

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost



Slika 5.7.18. Uticaj jedinjenja IMA i MMA (u dozama 50, 100 i 200 mg/kg t.m.) i ranitidina na lezije na sluznici želuca pacova tretiranih sa DC (A) i ET (B) izražen kao broj bodova. Vrednosti su predstavljene kao broj bodova ± SD. Statistički značajne razlike za grafik A su određene jednosmernom analizom varijansi (ANOVA) i *Student–Newman–Keuls post hoc* testom: ^ap<0,001 spram pozitivne kontrole; ^bp<0,001 spram DC + IMA (50 mg/kg t.m.) i (100 mg/kg t.m.); ^cp<0,001 spram DC + MMA (50 mg/kg t.m.)

5.7.5.3. Uticaj jedinjenja IMA i MMA na nastanak lezija na sluznici želuca pacova izazvanih diklofenakom – Morfometrijska analiza

Rezultati morfometrijske analize koji se tiču uticaja testiranih jedinjenja na formiranje lezija na sluznici želuca prikazani su u tabeli 5.21. Izmerene vrednosti površina pojedinačnih lezija (AFL – engl. *area fraction of lesions*) eksperimentalnih grupa (sve testirane doze) i grupe koja je primila samo diklofenak su statistički različite (tabela 5.21, $F(4,15) = 7,554$, $p = 0,002$). Vrednosti ukupne površine lezija (TAL – engl. *total area of lesions*) se razlikuju za grupu tretiranu jedinjenjem IMA u dozama 50 i 100 mg/kg t.m. i jedinjenjem MMA u dozi 100 mg/kg t.m. od TAL vrednosti za grupu koja je primila samo diklofenak (Tabela 5.21, $F(4,15) = 6,014$, $p = 0,004$). Ostali izmereni parametri testiranih grupa (srednja površina lezija (MLA – engl. *mean lesions' area*), perimetar (B – engl. *mean lesions' perimeter*), srednja cirkularnost lezija (Cir – engl. *mean lesions' circularity*) i srednji Feret-ov prečnik lezija) ne razlikuju se značajno ($p > 0,05$). Kod grupa koje su pre diklofenaka primile najveće doze jedinjenja IMA i MMA nije došlo do pojave lezija, pa se može smatrati da ova doza jedinjenja pokazuje 100% inhibiciju nastajanja čira, iako su zabeleženi povremeni slučajevi hiperemije sluznice želuca.

Tabela 5.21. Efekat diklofenaka (D) i kombinacije diklofenaka sa IMA i MMA (50, 100 i 200 mg/kg t.m.) na morfometrijske parametre sluznice želuca. Grupa koja je primila ranitidin i diklofenak nije prikazana u tabeli usled 100% inhibicije diklofenakom uzrokovanih lezija

Grupa	Statistički parametar	AFL (%)	TAL (mm ²)	MLA (mm ²)	B (mm)	Circ (mm)	Feret (mm)
Diklofenak	Srednja vrednost	2,3	24,8	1,3	5,1	0,6	2,2
	SEM	0,5	5,6	0,4	0,8	0,01	0,3
	Mediana	1,9	22,9	1,0	4,6	0,6	2,0
	SD	1,1	12,4	0,9	1,7	0,3	0,7
IMA (50 mg/kg) + D	Srednja vrednost	1,2 ^a	13,8 ^b	0,8	4,3	0,5	1,8
	SEM	0,2	2,5	0,9	0,1	0,3	0,7
	Mediana	1,4	15,6	0,9	4,3	0,6	1,8
	SD	0,4	5,5	0,2	0,3	0,6	0,2
IMA (100 mg/kg) + D	Srednja vrednost	0,2 ^a	3,1 ^b	0,6	3,6	0,6	1,5
	SEM	0,1	0,6	0,2	0,5	0,5	0,2
	Mediana	0,2	2,2	0,7	3,3	0,6	1,2
	SD	0,1	1,4	0,4	1,1	0,1	0,5

MMA (50 mg/kg) + D	Srednja vrednost	1,0 ^a	12,4	0,9	4,2	0,6	1,7
	SEM	0,4	4,7	0,1	0,1	0,02	0,3
	Mediana	1,0	11,1	1,0	4,3	0,6	1,7
	SD	0,6	8,1	0,2	0,2	0,2	0,05
MMA (100 mg/kg) + D	Srednja vrednost	0,2 ^a	2,3 ^b	0,6	3,4	0,6	1,5
	SEM	0,2	0,3	0,1	0,2	0,0	0,4
	Mediana	0,2	2,3	0,6	3,4	0,6	1,5
	SD	0,2	0,4	0,1	0,3	0,0	0,5

Skraćenice u tabeli: AFL - površina pojedinačnih lezija; TAL - ukupna površina lezija; MLA - srednja površina lezija; B - perimetar; Cir - srednja cirkularnost lezija; SEM- standardna greška srednje vrednosti. Statistička analiza izvršena je jednosmernom analizom varijansi (ANOVA) nakon čega je urađen *Student–Newman–Keuls post hoc test* (^a p = 0,002; ^bp = 0,004 spram pozitivne kontrole).

5.7.5.4. Uticaj jedinjenja IMA i MMA na nastanak lezija na sluznici želuca pacova izazvanih etanolom – Makroskopski i mikroskopski pregled lezija

Apsolutni etanol izaziva pojavu lezija u vidu hemoragijskih traka koje se javljaju na telu želuca (slika 5.7.16-F). Najmanja doza jedinjenja IMA, 50 mg/kg t.m, nije bila dovoljna da spreči pojavu lezija, mada su se u ovom slučaju lezije javile u vidu malih tačkastih struktura u kardiačnom delu želuca (slika 5.7.16-G). Jedinjenje MMA, čak i u dozi od 50 mg/kg t.m, sprečava nastanak etanolom uzrokovanih lezija, u ovom slučaju je zabeležena samo hiperemija želuca. Kod životinja kojima su pre etanola date supstance IMA i MMA u dozama 100 i 200 mg/kg t.m, u potpunosti je sprečena pojava etanolom izazvanih lezija.

Sluznica želuca pacova koji su tretirani etanolom pokazuje tipične odlike oštećenja izazvanih etanolom: oštećenja koja zadiru duboko u sluznicu, sa nekrozom i hemoragijom. Oko želudačnih žlezdi uočena je pojava hiperemije i veći broj infiltriranih zapaljenskih ćelija u epitelu želuca i dilatacija krvnih sudova u submukozi. Kod životinja koje su primile IMA i MMA, oštećenih delova gotovo da nije bilo, osim u slučaju kada je životinji dato jedinjenje IMA u dozi od 50 mg/kg t.m. Dakle, nije uočena pojava nekroze, već samo dilatacija krvnih sudova sluznice želuca što je u saglasnosti sa uočenom hiperemijom (slika 5.7.17-G i H). Kako su jedinjenja IMA i MMA u dozama od 100 i 200 mg/kg t.m. pokazala 100%-nu efikasnost, nije bilo potrebe primeniti adekvatnu statističku analizu. Dobijeni rezultati su predstavljeni graficima (slika 5.7.18).

5.7.5.5. Uticaj jedinjenja IMA i MMA na nastanak lezija na sluznici želuca pacova izazvanih etanolom – Morfometrijska analiza

Morfometrijska analiza želuca životinja koje su primile jedinjenje IMA pre etanola i onih koje su primile samo etanol data je u tabeli 5.22. Izmerene AFL ($p=0,003$) i TAL ($p=0,004$) vrednosti analiziranih grupa životinja su bile različite. Prilikom poređenja vrednosti MLA, B, Circ i *Feret*-ovih prečnika nisu pronađene statistički značajne razlike ($p > 0,05$) (tabela 5.22).

Tabela 5.22. Efekat etanola (ET) i kombinacija etanola sa IMA i MMA (50, 100 i 200 mg/kg t.m.) na morfometrijske parametre sluznice želuca. Grupa koja je primila ranitidin i etanol nije prikazana u tabeli usled 100% inhibicije diklofenakom uzrokovanih lezija

Grupa	Statistički parametri	AFL (%)	TAL (mm ²)	MLA (mm ²)	B (mm)	Circ (mm)	<i>Feret</i> (mm)
Etanol	Srednja vrednost	8,0	90,7	7,9	14,6	0,5	6,1
	SEM	1,2	14,4	1,4	1,7	0,1	0,7
	Mediana	6,8	80,2	6,5	13,9	0,5	6,1
	SD	2,7	32,3	3,1	3,7	0,1	1,6
IMA (50 mg/kg) + E	Srednja vrednost	0,4 ^a	6,8 ^b	2,3	6,3	0,7	2,5
	SEM	0,1	0,5	0,2	0,2	0,1	0,2
	Mediana	0,4	6,8	2,3	6,3	0,7	2,5
	SD	0,1	0,6	0,2	0,3	0,1	0,1

Skraćenice u tabeli: AFL - površina pojedinačnih lezija; TAL - ukupna površina lezija; MLA - srednja površina lezija; B - perimetar; Cir - srednja cirkularnost lezija; SEM - standardna greška srednje vrednosti. Statistička analiza odrađena *Student*-ovim *t*-testom za nezavisne uzorke (^a $p = 0,003$ spram etanola; ^b $p = 0,004$ spram etanola).

Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL) su najčešće prepisivani lekovi za dugoročni tretman hroničnih upalnih poremećaja (npr. reumatoidnog artritisa), međutim njihova primena može da dovede do oštećenja gastrointestinalnih organa. U ovakvim slučajevima obustavlja se upotreba NSAIL i pacijent često ostaje bez adekvatnog leka za ublažavanje bola. Iako acetaminofen, salsalat, magnezijum-salicilat, morfin i lekovi slični morfinu mogu biti zadovoljavajuća zamena, širom sveta se radi na otkrivanju novih lekova za ublažavanje bola (Wolfe *et al*, 1999). Supstance IMA i MMA su nesteroidna jedinjenja koja ispoljavaju izrazite antinociceptivne aktivnosti. Primena ovih jedinjenja čak i u dozama znatno većim (200 mg/kg t.m.) od onih za koje je ispitivana antinociceptivna aktivnost (0,3 mg/kg t.m.) ne dovodi do

pojave lezija na sluznici želuca, pa bi stoga jedinjenja IMA i MMA mogla da predstavljaju nove, bezbednije NSAIL za ublažavanje bola.

Potencijalni mehanizam dejstva ovih supstanci moguće je naslutiti iz samih eksperimenata (gastroprotektivnih i antinociceptivnih). Test u kome su lezije na sluznici želuca prouzrokovane nesteroidnim antiinflamatornim lekovima je standardni model za ispitivanje jedinjenja kao antiulcer lekova (Seo *et al*, 2012). Testirana jedinjenja, na dozno-zavisani način, smanjuju broj, dužinu i debljinu lezija uzrokovanih diklofenakom (slike 5.7.16-D i E). Nastanak etanolom uzrokovanih lezija je složen proces koji uključuje brojne mehanizme kao što su smanjeno lučenje sluzi, smanjen protok krvi kroz želudačnu sluznicu, povećano lučenje histamina, influks kalcijumovih jona i povećano stvaranje kiseoničnih radikala i leukotriena. Jedna od najznačajnijih promena koja prati etanolom izazvane ulceracije je promena protoka krvi u sluznici želuca (Glavin i Szabo, 1992). Vaskularna oštećenja su vrlo progresivna i brzo prerastaju u hemoragijske pruge. U našim eksperimentima, jedinjenja IMA i MMA su pokazala izraženu antiulcer aktivnost, čak i u vrlo malim dozama, jer smanjuju broj lezija izazvanih etanolom i svode ih na nivo hiperemije sluznice (slika 5.7.16-G i H). Do nastanka lezija dejstvom diklofenaka delimično dolazi i zbog inflamacija izazvanih inhibicijom COX-1 (u slučaju diklofenaka), a u slučaju etanolom izazvanih lezija zbog disbalansa proinflamatornih (kao što su IL-1 β , IFN- γ i TNF- α) i antiinflamatornih (kao što je IL-10) citokina (Beserra *et al*, 2011). Stoga se protektivno dejstvo jedinjenja IMA i MMA u slučaju diklofenakom i etanolom izazvanih ulceracija može objasniti njihovim mogućim antiinflamatornim mehanizmom delovanja koje je uočeno u testu abdominalnih grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom.

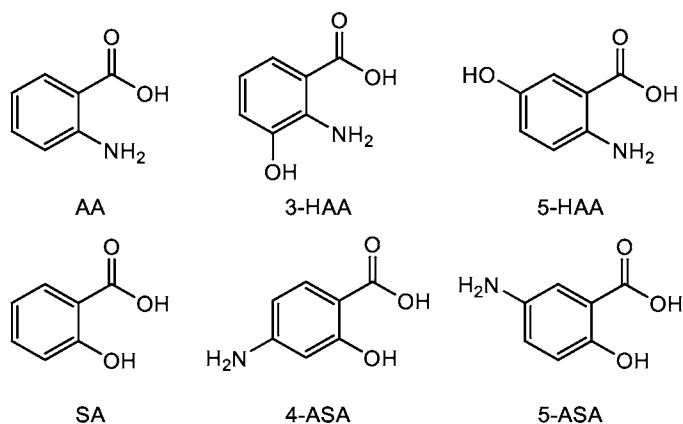
Uz gore pomenute pozitivne osobine jedinjenja IMA i MMA, njihovo antidepresivno i anksiolitičko dejstvo takođe može doprineti potencijalnoj upotrebi ovih jedinjenja kao gastroprotektivnih agenasa. Iako je teorija da do nastanka ulceracija dolazi kod osoba koje pate od anksioznosti i depresije (Rogers *et al*, 1994) napuštena, i danas se smatra da je nastanak ulcera povezan sa imunološkim i faktorima inflamacije, kao i da je genetski predodređen (Goodwin i Stein, 2002), pojedini naučnici smatraju da je stres (koji se povezuje sa anksioznošću) uzročnik nastanka ulceracija. Imunomodulatorni efekat stresa može da dovede do disbalansa u inflamatornoj reakciji izazvanoj bakterijom *Helicobacter pylori* koji je posredovan T_h1 imunim odgovorom i citokinima. Poznato je da je lečenje čira na želucu teže kod anksioznih

pacijenata, pa neki autori smatraju da kombinacija psihotropnih medikamenta (npr. antidepresiva) može da dovede do potencijalno pozitivnih efekata u kombinaciji sa anti-*H. pylori* lekovima koji se koriste za tretman gastrointestinalnih ulceracija (Goodwin i Stein, 2002). Međutim njihovo istraživanje ima nekoliko nedostataka koje su pomenuli i sami autori, pa interpretaciju i diskusiju njihovih rezultata treba uzeti sa rezervom (Goodwin i Stein, 2002). Nekoliko različitih studija je potvrdilo mogući efekat primene tricikličnih antidepresiva (TCA) za lečenje pacijenata sa peptičkim ulcerom. Prilikom poređenja efekata TCA sa efektima cimetidina, uočene su prednosti upotrebe TCA, kao na primer smanjenje lučenja želudačne kiseline, dug poluzivot leka, niska cena i mogućnost trenutnog monitoringa leka u serumu (Ries *et al*, 1984). Gore pomenuta terapijska dejstva TCA mogu biti posledica njihovog antiholinergičnog i antidepresivnog dejstva, kao i toga što deluju kao blokatori H₂-receptora. Imajući sve ovo u vidu, jedinjenja IMA i MMA, za koja je pokazano da poseduju anksiolitičku i antidepresivnu aktivnost, mogu se smatrati novim potencijalnim lekovima za tretman gastrointestinalnih ulceracija pacijenata sa i bez psihijatrijskih poremećaja.

Značajni aspekt uvođenja novog terapijskog sredstva, između ostalog je i cena u poređenju sa cenama poznatih proizvoda na tržištu. Kao što je rečeno, čitav postupak prilikom lečenja peptičkog ulcera je složen i zato zahteva prateću terapiju, koja kod pacijenata najčešće vodi ka niskoj komplijansi. Na tržištu su dostupne NSAIL tablete koje sadrže i COX-1 i COX-2 inhibitore, iako ova kombinacija povećava rizik od lek-lek interakcija, hipomagnezijemija, preloma, odloženog obezbojavanja i diskutabilnog efekta na gastrointestinalni trakt (Kuan *et al*, 2013). Poređenjem cene COX-2 inhibitora sa tradicionalnim NSAIL (Smalley *et al*, 2002) i kombinacijom NSAIL i antagonista H₂-receptora (Kuan *et al*, 2013), dolazi se do sledećih zaključaka: (1) upotreba COX-2 inhibitora ne može da bude isplativa po pitanju cene jer zahteva paralelnu upotrebu gastroprotektivnih sredstava (Smalley *et al*, 2002); (2) kombinacija NSAIL i antagonista H₂-receptora smanjuje cenu tretmana manje ozbiljnih gastrointestinalnih poremećaja (Kuan *et al*, 2013). Pošto su IMA i MMA relativno mali molekuli koje je moguće dobiti jednostavnim i jeftinom sintezom, oni bi mogli predstavljati novu jeftinu i efikasnu alternativu za tretman ulcera jer pokazuju niz pozitivnih dejstava uključujući anksiolitičko, antidepresivno, antinociceptivno, antiinflamatorno, hepato-, nefro-, i gastroprotektivno.

5.8. ASIGNACIJA SPEKTARA ANTRANILNE I SALICILNE KISELINE I NJIHOVIH ODABRANIH DERIVATA

Da bi se olakšalo kasnije tumačenje NMR spektara derivata antranilne kiseline snimljeni su NMR spektri antranilne (AA), 3-hidroksiantranilne (3-HAA), 5-hidroksiantranilne (5-HAA), salicilne (SA), 4-aminosalicilne (4-ASA) i 5-aminosalicilne (5-ASA) kiseline u DMSO- d_6 kao rastvaraču (slika 5.8.1). ^1H - i ^{13}C -NMR spektralni podaci su predstavljeni u tabelama 5.23 i 5.24. Hemijska pomeranja, multiplernosti i konstante kuplovanja su bili u saglasnosti sa strukturama ispitivanih jedinjenja. Broj signala u ^{13}C NMR spektrima odgovarao je broju ugljenikovih atoma u pomenutim jedinjenjima, dok su DEPT90/135 spektri ukazivali na postojanje samo CH grupa među protonovanim ugljenicima. Iz proton-kuplovanih ^{13}C NMR spektara određene su ^{13}C - ^1H konstante kuplovanja ne samo između ugljenika i za njih direktno vezanih vodonika (sprezanja kroz jednu vezu), već i konstante sprezanja kroz dve ili tri veze (tabela 5.24).



Slika 5.8.1. Strukture analiziranih kiselina: antranilne (AA), 3-hidroksiantranilne (3-HAA), 5-hidroksiantranilne (5-HAA), salicilne (SA), 4-aminosalicilne (4-ASA) i 5-aminosalicilne (5-ASA)

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

Tabela 5.23. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) spektralni podaci za AA, 3- i 5-HAA, SA, 4- i 5-ASA

^1H NMR, δ (ppm), mult. (J u Hz)						
H-atom	AA	3-HAA	5-HAA	SA	4-ASA	5-ASA
3	6,74, dd (8,4, 1,0)	-	6,61, d (8,8)	6,97, dd (8,6, 0,9)	5,98, d (2,1)	6,70, d (8,7)
4	7,22, ddd (8,4, 7,0, 1,6)	6,81, dd (7,6, 1,5)	6,78, dd (8,8, 2,9)	7,52, ddd (8,6, 7,1, 1,7)	-	6,90, dd (8,7, 2,9)
5	6,50, ddd (8,1, 7,0, 1,0)	6,38, dd (8,2, 7,6)	-	6,93, ddd (7,9, 7,1, 0,9)	6,10, dd (8,7, 2,1)	-
6	7,69, dd (8,1, 1,6)	7,22, dd (8,2, 1,5)	7,11, d (2,9)	7,82, dd (7,9, 1,7)	7,43, d (8,7)	7,20, d (2,9)
-COOH					6,03, br s, 2H	
-OH	8,58, br s, 3H*	8,18, br s, 3H	8,16, br s, 3H	11,64, br s, 2H**	11,42, br s, 1H	6,41, br s, 4 H
-NH ₂		9,57, br s, 1H	8,60, br s, 1H		12,36, br s, 1H	

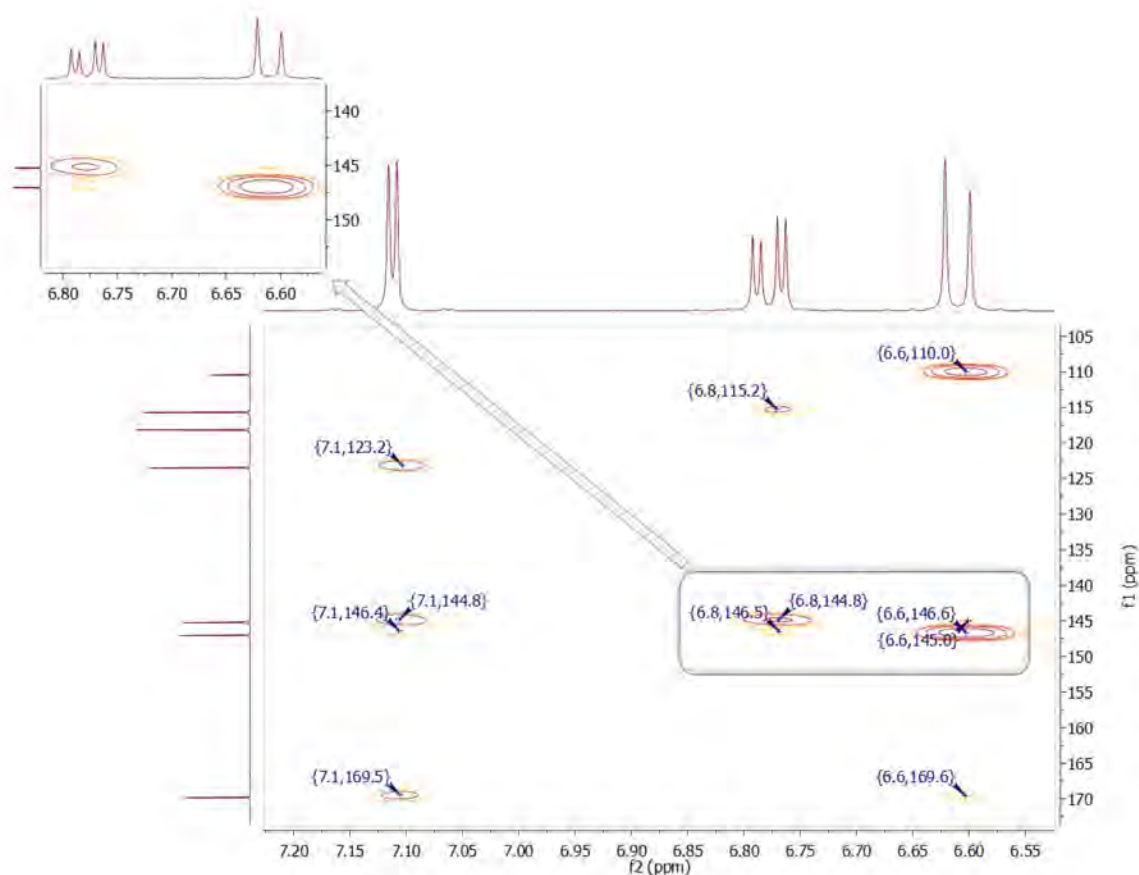
*U molekulu nije prisutna –OH grupa; ** U molekulu nije prisutna –NH₂ grupa.

Tabela 5.24. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) spektralni podaci za AA, 3- i 5-HAA, SA, 4- i 5-ASA

^{13}C NMR, δ (ppm), mult. (J u Hz)						
C-atom	AA	3-HAA	5-HAA	SA	4-ASA	5-ASA
1	109,6 C, ddd ($^3J=8,0, 5,4,$ $^2J=1,8$)	110,0 C, d ($^3J=8,8$)	110,0 C, d ($^3J=6,4$)	113,1 C, dd ($^3J=7,4, 5,6$)	100,1 C, dd ($^3J=7,7, 5,0$)	114,3 C, d ($^3J=4,7$)
2	151,5 C, pseudo t ($^3J=7,7$)	141,1 C, pseudo t ($^3J=6,7$)	144,8 C, dd ($^3J=8,5, 7,0$)	161,2 C, m	163,5 C, dd ($^3J=8,4,$ $^2J=3,0$)	154,7 C, m
3	116,4 CH, dd ($^1J=162,7,$ $^3J=8,1$)	144,5 C, dd ($^3J=9,7,$ $^2J=1,4$)	117,7 CH, d ($^1J=159,7$)	117,1 CH, dd ($^1J=161,6,$ $^3J=7,6$)	98,6 CH, dd ($^1J=157,9,$ $^3J=4,8$)	117,1 CH, m*
4	133,8 CH, ddd ($^1J=157,6,$ $^3J=9,1,$ $^2J=1,4$)	116,7 CH, ddd ($^1J=156,4,$ $^3J=9,0, ^2J=1,5$)	123,1 CH, dd ($^1J=158,9,$ $^3J=5,9$)	135,6 CH, ddd ($^1J=159,9,$ $^3J=9,1,$ $^2J=1,5$)	155,8 C, br d ($^3J=10,2$)	123,7 CH, m* ($^1J=157,1$)
5	114,6 CH, dd ($^1J=162,7,$ $^3J=8,1$)	114,0 CH, d ($^1J=161,2$)	146,6 C, pseudo dt ($^3J=9,9,$ $^2J=3,1$)	119,2 CH, dd ($^1J=163,6,$ $^3J=8,0$)	106,3 CH, dd ($^1J=161,0,$ $^3J=5,5$)	136,1 C, m
6	131,2 CH, ddd ($^1J=159,9,$ $^3J=7,8, ^2J=1,4$)	121,4 CH, ddd ($^1J=162,0,$ $^3J=8,0, ^2J=1,4$)	115,3 CH, dd ($^1J=158,8,$ $^3J=4,7$)	130,3 CH, ddd ($^1J=162,3,$ $^3J=8,4,$ $^2J=1,4$)	131,5 CH, br d ($^1J=159,6$)	116,1 CH, d ($^1J=159,8$)
COOH	169,6 C, br d ($^3J=3,8$)	169,8 C, br d ($^3J=3,6$)	169,4 C, dd ($^3J=4,4,$ $^5J=1,5$)	172,0 C, br d ($^3J=3,9$)	172,1 C, br d ($^3J=3,5$)	171,8 C, dd ($^3J=4,3,$ $^5J=1,3$)

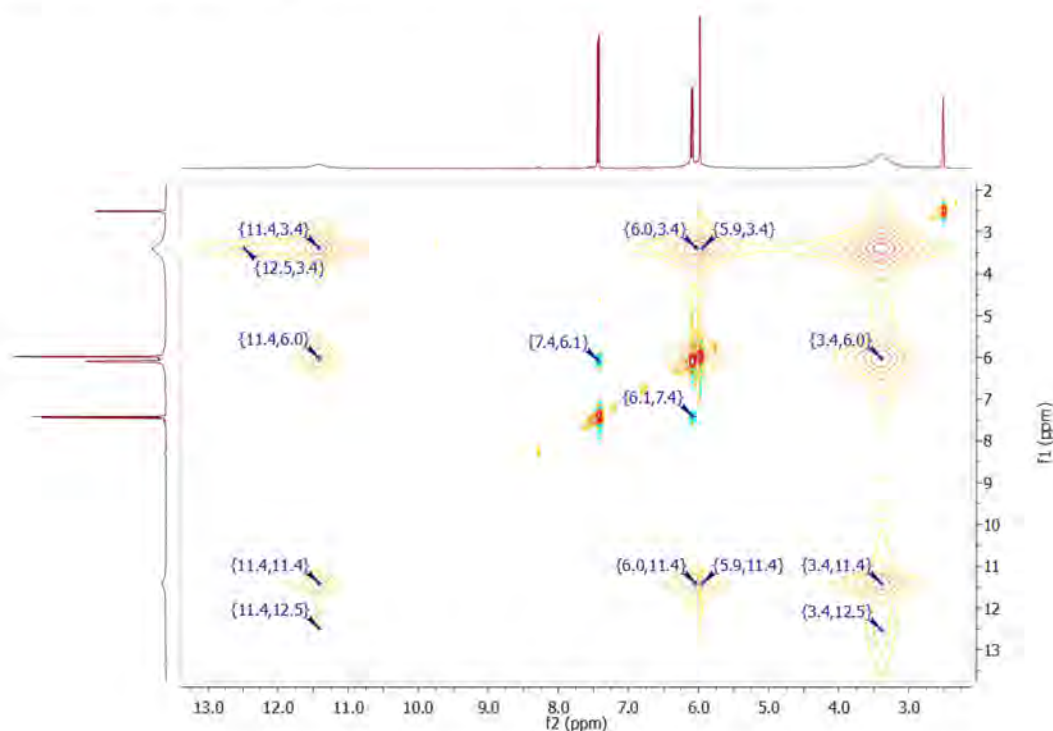
m*- multiplet višeg reda za koji je određena samo ^{13}C -H konstanta kuplovanja kroz jednu vezu (slika 5.8.4).

Asignacija svih ^1H - i ^{13}C -NMR signala je bila moguća zahvaljujući 2D NMR spektrima (^1H - ^1H COSY, NOESY, HSQC i HMBC). Na primer, hemijska pomeranja neprotonovanih ugljenika C(2) i C(5) 5-hidroksiantranilne kiseline su određena zahvaljujući *cross*-pikovima u HMBC spektru između H(3) na 6,61 i H(4) na 6,78 ppm i ugljenika na 144,8 i 146,6 ppm (slika 5.8.2). Kuplovanje između ugljenika i protona aromatičnog jezgra kroz 3 veze je jače nego kuplovanje kroz dve veze. Pošto je *cross*-pik koji odgovara interakciji H(4) i ugljenika na 144,8 intenzivniji u odnosu na pik između H(4) i C-atoma na 146,6 ppm, a intezitet *cross*-pika koji odgovara interakciji H(3) i ugljenika na 146,6 ppm veći u odnosu na onaj između H(3) i ugljenika na 144,8 ppm, signal na 144,8 ppm je dodeljen C(2), dok je signal na 146,6 pripisan C(5). Ova asignacija je dodatno potvrđena signalima u kuplovanom ^{13}C NMR spektru gde se ugljenik na 144,8 ppm javlja kao dublet dubleta (dd) sa konstantama kuplovanja 8,5 i 7,0 Hz, što ukazuje na ugljenikov atom koji se kroz tri veze kupluje sa dva protona. S druge strane signal na 146,6 ppm je pseudo dublet tripleta (pseudo dt) sa ^{13}C -H konstantama kuplovanja 9,9 i 3,1 Hz (3J i 2J).



Slika 5.8.2. Uvećanje (^1H od 6,5 do 7,2 ppm; ^{13}C od 105 do 175 ppm) HMBC spektra 5-HAA

Položaj izmenljivih protona (-COOH, -NH₂ i/ili -OH) je utvrđen iz NOESY spektra ispitivanih kiselina. Na primer, NOESY spektar 4-ASA je dat na slici 5.8.3. *Cross*-pik koji potiče od dipolarnog sprezanja prostorno bliskih protona H(5) i H(6) se razlikuje u fazi od *cross*-pikova koji se odnose na (hemijsku) izmenu (što je na samom spektru predstavljeno različitim bojama; pikovi koji se odnose na dipolarno kuplovanje su plavi, dok su oni koji potiču od kuplovanja izmenljivih protona i auto-pikovi označeni narandžastom bojom). Pik koji potiče od rezidualne vode (atmosferske vlage) se javlja na oko 3,4 ppm u ¹H NMR spektrima svih analiziranih jedinjenja (sem u spektrima SA i 5-ASA), pa su u njihovim NOESY spektrima prisutni *cross*-pikovi između signala izmenljivih protona i signala rezidualne vode.



Slika 5.8.3. NOESY spektar 4-ASA

Hemijska pomeranja ugljenika C(1) hidroksi-derivata antranilne kiseline (3-HAA – 110,0 ppm, 5-HAA – 110,0 ppm) su po vredosti bliska δ antranilne kiseline (109,6 ppm), dok se poređenjem hemijskog pomeranja C(1) salicilne kiseline (113,1 ppm) i njenih amino-derivata (4-ASA – 100,1 ppm i 5-ASA – 114,3 ppm), može uočiti da je δ C(1) kod 4-ASA pomereno ka nižim vrednostima. Pošto je u 3- i 5-HAA elektron-donorska hidroksilna grupa *meta*- u odnosu na C(1), ne očekuje se da ona značajno utiče na elektronsku gustinu na C(1), a time ni na vrednost hemijskog pomeranja ovog atoma. Kao što je i očekivano, obe -OH i -NH₂ grupe utiču

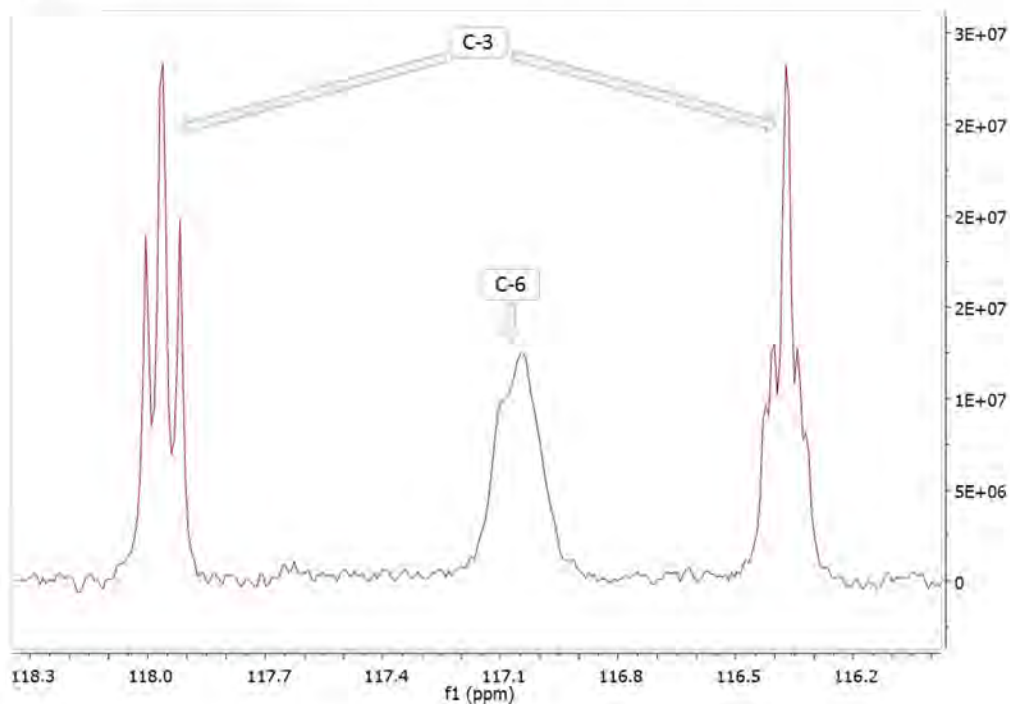
na (povećavaju) elektronsku gustinu ugljenika koji su u odnosu na njih *orto*- i *para*-. Zato su hemijska pomeranja odgovarajućih ugljenika AA i SA pomereni ka nižim vrednostima (engl. *shielding effect*). Elektron-donorske grupe, –OH i –NH₂, ne utiču značajno na ugljenikove atome koji su u odnosu na njih *meta*-, pa se vrednosti hemijskih pomeranja ovih ugljenika ne razlikuju od hemijskih pomeranja odgovarajućih ugljenika AA i SA. Ukoliko se amino grupa zameni hidroksilnom, kao na primer u paru AA i SA i u paru 5-HAA i 5-ASA, ne dolazi do značajne promene vrednosti δ ugljenika aromatičnog jezgra, sem onog koji je direktno vezan za ovu grupu. Ovo ukazuje da pomenute dve grupe imaju sličan elektron-donorski karakter, a najveća odstupanja u vrednosti δ moguće je uočiti za ugljenikov atom koji je *para*- u odnosu na –NH₂ i –OH grupe (do 5 ppm).

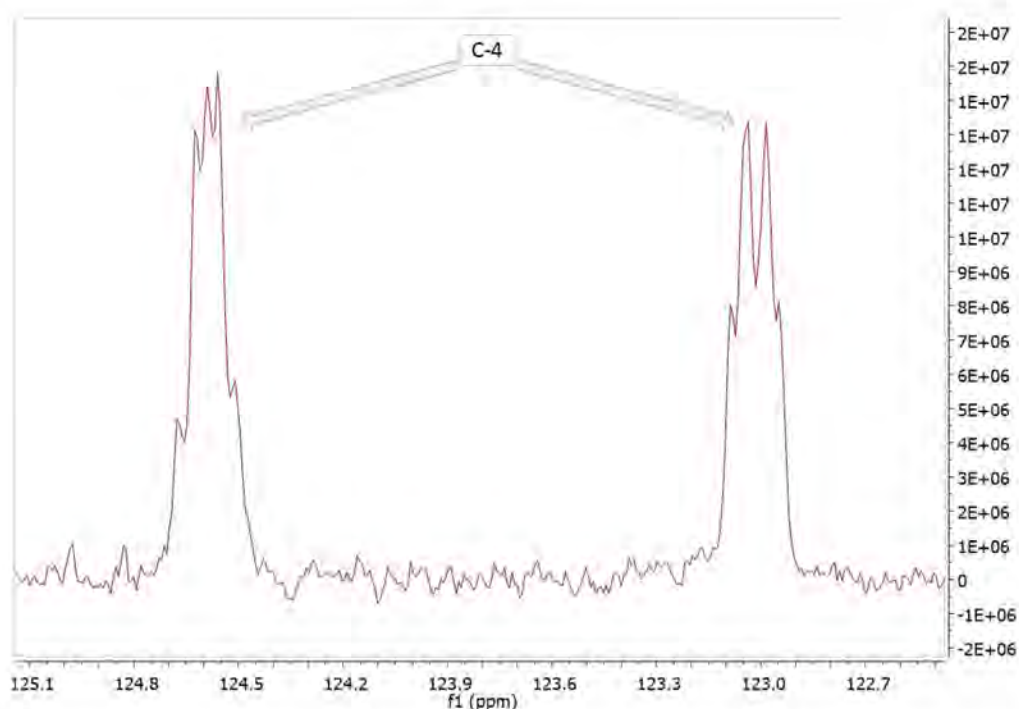
Ugljenikov atom –COOH grupe antranilne kiseline i njenih 3- i 5-hidroksi-derivata se javlja na oko 170 ppm u ¹³C NMR spektru, dok je u spektrima salicilne kiseline i njenih 4- i 5-amino-derivata pomeren ka slabijem polju (oko 172 ppm). Ovaj signal se javlja kao široki dublet sa konstantom kuplovanja oko 4 Hz, a slučaju 5-HAA i 5-ASA kao široki signal za koji je utvrđeno da je dublet dubleta sa konstantama kuplovanja *ca.* 4 (³J kuplovanje sa H(6)) i 1 Hz (⁴J, tj. „W“ kuplovanje sa H(3)). Pomenuta rezolucija signala potiče od toga što u derivatima AA i SA sa supstituentom u položaju 5 (5-HAA i 5-ASA) ne postoje kuplovanja kroz više veza između H(5) i –COOH. Slična rezolucija signala bi se mogla očekivati i za –COOH signal u 3-HAA, zbog toga što ne postoji kuplovanje kroz tri veze sa H(3), međutim ona nije uočena, iako je širina na poluvisini signala smanjena (u poređenju sa analognim signalom AA) za oko 1,5 Hz. Ove vrednosti ¹³C-H konstanti kuplovanja se slažu sa literaturnim podacima (Ihrig *et al*, 1972).

Proučavanjem ¹³C-H konstanti sprezanja analiziranih benzoevih kiselina uočeno je sledeće: (1) ³J_{CH} sprezanja su veća (6–12 Hz) u poređenju sa ²J_{CH} sprezanjima (0–4 Hz) i jednostavnije ih je uočiti (u slučaju 3-HAA, C(4) se kupluje kroz tri veze sa H(6) konstantom kuplovanja od 9 Hz, dok konstanta kuplovanja kroz dve veze sa H(5) iznosi 1,5 Hz); (2) Veličina ³J_{CH} kuplovanja je direktno proporcionalna elektronegativnosti supstituenta (u slučaju AA, J(C(6)-H(4)) = 7,8 Hz, dok je u slučaju SA, J(C(6)-H(4)) veća – 8,4 Hz); (3) Ukoliko se supstituent nalazi na „putu“ kuplovanja ³J vrednost se smanjuje sa porastom elektronegativnosti (u slučaju 3-HAA, J(C(4)-H(6)) = 9,0 Hz, dok je kod 5-HAA, J(C(4)-H(6)) manja – 5,9 Hz). Ovo je u saglasnosti sa drugim di- ili tri-supstituisanim aromatičnim sistemima (DiMichele *et al*, 2006; reference citirane u tom radu).

U proton-kuplovanom ¹³C NMR spektru 5-ASA, signali na 117,1 ppm i 123,7 ppm, dodeljeni ugljenicima C(3) i C(4), javili su se kao asimetrični multipleti što je ukazalo da oni

predstavljaju multiplete drugog reda, bez obzira što bi se očekivalo da se oni jave kao signali prvog reda (slika 5.8.4). Deo multipleta na višem polju se razlikovao od dela multipleta na nižem polju. Signali protona direktno vezanih za pomenute ugljenike bili su signali prvog reda. *Douglas i Shapiro* (1980) su utvrdili da se „neočekivani“ spektri drugog reda javljaju čak i kada je razlika u hemijskim pomeranjima protona veća od konstante kuplovanja između datih protona. Sistemi C(3)-H(3)-H(4) i C(4)-H(4)-H(3) bi se mogli posmatrati kao dva ABX sistema, s obzirom na to da je razlika hemijskih pomeranja protona (u Hz) po vrednosti bliska razlici ^{13}C -H spreznja kroz jednu i više veza. Signali drugog reda se mogu očekivati kada je $1/2|\nu_A - \nu_B|$ približno jednaka $1/4|J(\text{AX}) - J(\text{BX})|$ kada je vrednost $J(\text{AB})$ nekoliko Hz (*Douglas i Shapiro*, 1980). Kako u našem slučaju $1/2|\nu_{\text{H}(3)} - \nu_{\text{H}(4)}| = 39,6$ Hz, iz izraza $1/4|J(\text{H}(3) - \text{C}(3)) - J(\text{H}(4) - \text{C}(3))| = 39,6$ Hz, a $J(\text{H}(3) - \text{C}(3))$ iznosi 160,4 Hz može se proceniti da vrednost $J(\text{H}(4) - \text{C}(3))$ iznosi oko 2 Hz, što je u saglasnosti sa prethodno uočenim vrednostima konstanti spreznja kroz dve veze.





Slika 5.8.4. Multiplieti drugog reda (signal koji potiče od C(3), gore, i C(4), dole, na 117,1 i 123,7 ppm) uočeni u proton kuplovanom ^{13}C NMR spektru 5-ASA

Pretragom literature (*SciFinder* pretraga CAS baze podataka) o NMR podacima ovih amino- i/ili hidroksi-supstituisanih benzoevih kiselina pronađeno je sledeće:

1) Zanimljivo je da je NMR spektar AA snimljen u $\text{DMSO-}d_6$ bio vrlo sličan ^1H - i ^{13}C -NMR spektru AA snimljenom u D_2O (Regulska *et al.*, 2009); međutim, asignacija signala C(3) i C(5) je obrnuta.

2) ^1H - i ^{13}C -spektralni podaci za 3-HAA se slažu sa literaturnim podacima (Esaki *et al.*, 1996; Rajkumar *et al.*, 2012), s tim što je se u radu koji je objavio Esakai sa saradnicima (1996) ne nalaze podaci o hemijskim pomeranjima izmenljivih protona, dok se u radu koji je objavio Rajkumar sa saradnicima (2012) svi izmenljivi protoni nalaze na istoj vrednosti δ u ^1H NMR.

3) Za 5-HAA pronađeni su samo NMR podaci dostupni iz komercijalnih baza podataka (BIORAD, WSS, ACD), ali oni nisu bili predmet nekog naučnog istraživanja, pa samim tim nisu ni asignirani.

4) ^1H - i ^{13}C -NMR spektralni podaci za SA se slažu sa literaturnim vrednostima (Jadrijević-Mladar Takac i Vikić Topić, 2004).

5) Da Silva sa saradnicima (2008) je objavio sledeće NMR podatke za 4-ASA: ^1H NMR: $\delta = 7,93$ (s, $J = 8,5$ Hz, 2H), 7,80 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 7,00 (dd, $J = 8,5, 1,8$ Hz, 1H), 7,08 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 6,09–6,0 (s, 2H); ^{13}C NMR: $\delta = 171,87$ (C(7)), 159,99 (C(2)), 153,00 (C(4)), 132,51

(C(6)), 107,59 (C(1)), 107,53 (C(5)), 102,53 (C(3)), koji nisu u saglasnosti ni sa našim podacima, niti sa strukturom datog jedinjenja.

6) *SciFinder* pretragom utvrđeno je da bi rad koji je objavio Peng sa saradnicima (2004) trebalo da sadrži NMR podatke za 5-ASA, međutim, ovaj rad ih, ipak, ne sadrži.

Kako je pretragom literature utvrđeno da su do sada objavljeni NMR podaci za pomenute derivate benzoeve kiseline nepotpuni, neasignirani ili čak i pogrešno asignirani, asignacija signala u NMR spektrima zasnovana na kombinovanju ^1H - i ^{13}C -NMR sa 1D- i 2D-eksperimentima je veoma značajna, kako bi se njome premostio nedostatak tačnih i potpunih literaturnih NMR spektralnih podataka antranilne, 3- i 5-hidroksiantranilne, salicilne i 4- i 5-aminosalicilne kiseline.

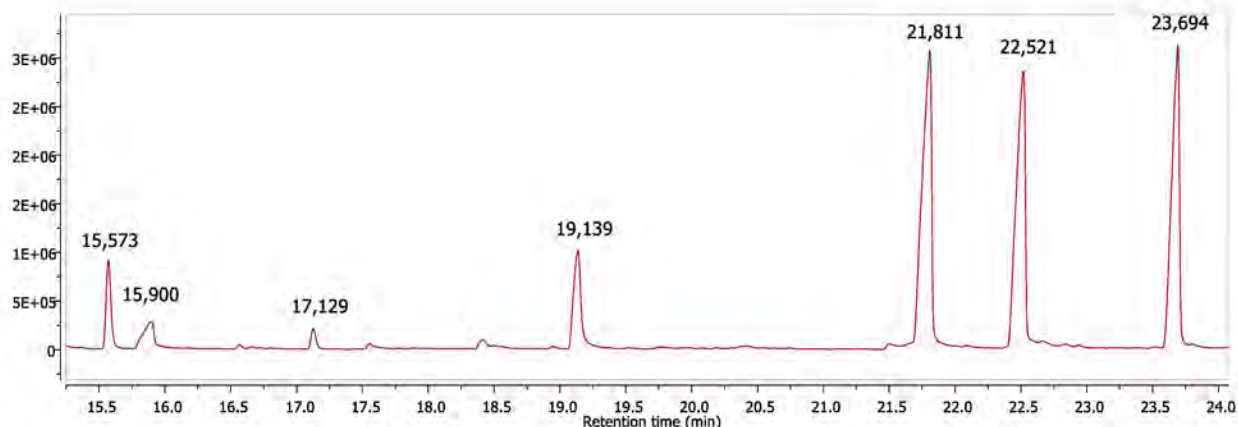
5.9. METABOLIZAM IZOPROPIL- I METIL-*N*-METILANTRANILATA KOD PACOVA

5.9.1. Analiza IMA i MMA i njihovih metabolita u urinu pacova

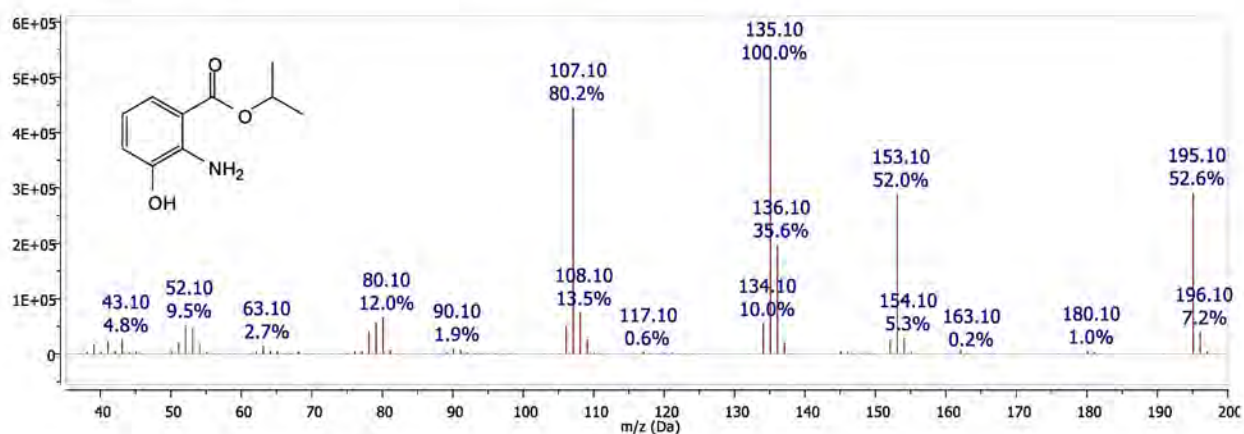
5.9.1.1. Analiza IMA i njegovih metabolita u urinu pacova

Dietil-etarski ekstrakt uzorka urina pacova tretiranih izopropil-*N*-metilantranilatom (u dozi 200 mg/kg t.m, *i.p.*) podvrgnut je GC-MS analizi. Najdominantniji pikovi u gasnom hromatogramu (slika 5.9.1) javili su se na 21,811 min (RI (DB5-MS) 1726), 22,521 min (RI (DB5-MS) 1760) i 23,694 min (RI (DB5-MS) 1814). Maseni spektri prva dva jedinjenja (21,811 min (RI 1726) (slika 5.9.2) i 22,521 min (RI 1760) (slika 5.9.3)) su bili vrlo slični, sa najvišom vrednošću m/z 195. Vrednost m/z molekuskog jona $[M]^+$ trećeg jedinjenja (23,694 min, RI 1814), m/z 209, bila je za 14 amu veća od m/z vrednosti molekuskog jona prva dva jedinjenja (slika 5.9.4). Ovo je ukazivalo na potencijalno prisustvo dodatne metil grupe. Poređenjem masenih spektara ovih jedinjenja sa spektrima iz odgovarajućih biblioteka masenih spektara (WILEY10NIST2014), zaključeno je da bi sva tri jedinjenja mogla biti derivati hidroksiantranilne kiseline. Još jedna zajednička karakteristika masenih spektara sva tri jedinjenja je bio intenzivni pik koji bi mogao da nastane *McLafferty*-jevom fragmentacijom izopropil estara $[M - H_2C=CH-CH_3]^+$. Uzimajući sve ovo u obzir, pretpostavljeno je da su jedinjenja koja su eluirala na 21,811 i 22,521 min izomerni izopropil-hidroksiantranilati, a jedinjenje na 23,694 min jedan od izomera izopropil-hidroksi-*N*-metilantranilata. Kako bismo potvrdili ovu tentativnu identifikaciju i odredili položaje hidroksilne grupe u pomenutim jedinjenjima, ekstrakt urina je podvrgnut preparativnoj *Sephadex* LH-20 hromatografiji, a u cilju dobijanja uzoraka za NMR analizu. Sakupljene frakcije (koje su pokazivale karakterističnu fluorescenciju pod UV svetlom) su objedinjene na osnovu TLC analize, pri čemu je dobijeno 5 *pool*-ovanih frakcija koje su podvrgnute GC-MS i NMR analizama.

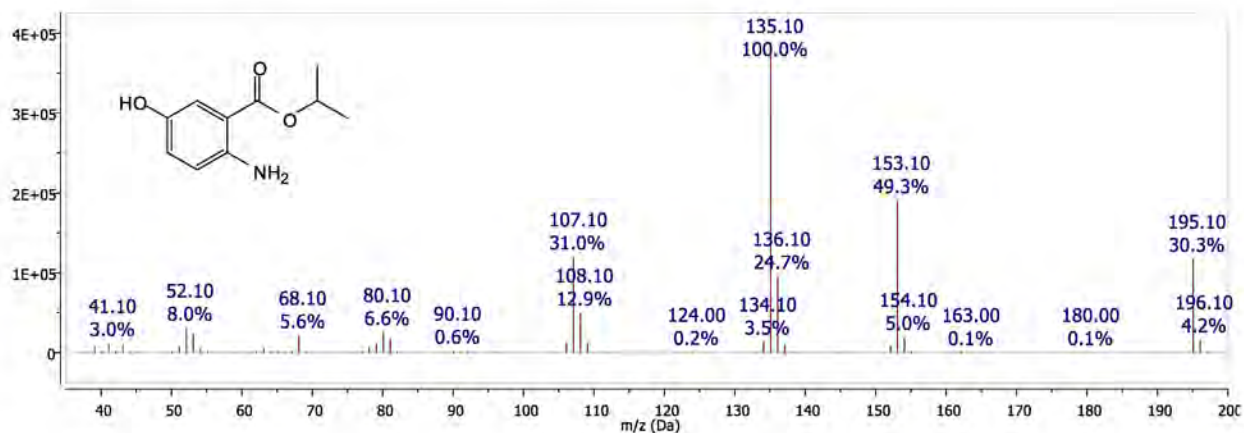
Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost



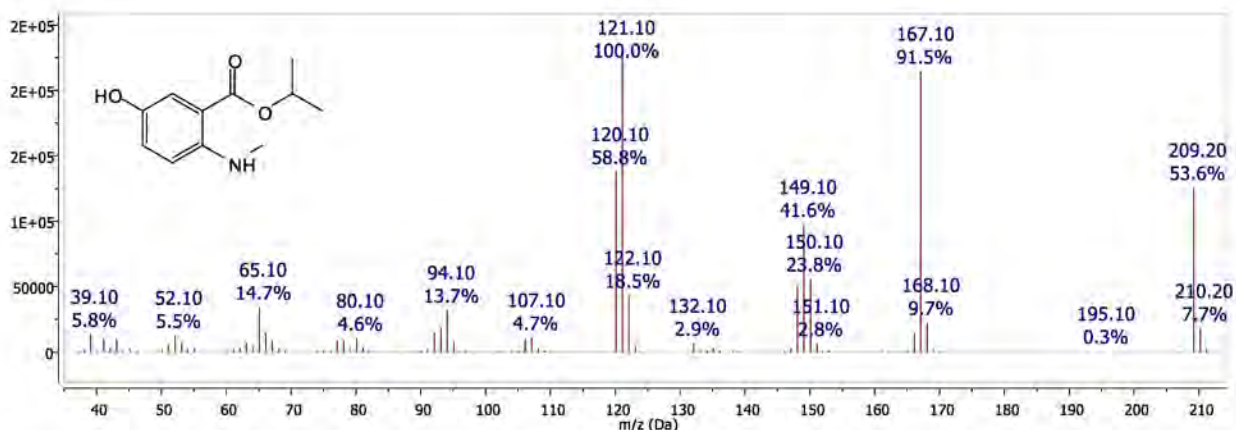
Slika 5.9.1. Deo ukupnog jonskog hromatograma (TIC) (15 – 24 min) dietil-etarskog ekstrakta urina pacova tretiranih izopropil-*N*-metilantranilatom



Slika 5.9.2. Maseni spektar sastojka dietil-etarskog ekstrakta urina pacova tretiranih izopropil-*N*-metilantranilatom na Rt 21,811 min (RI (DB5-MS) 1726) koji je identifikovan kao izopropil-3-hidroksiantranilat.



Slika 5.9.3. Maseni spektar sastojka dietil-etarskog ekstrakta urina pacova tretiranih izopropil-*N*-metilantranilatom na 22,521 min (RI (DB5-MS) 1760) koji je identifikovan kao izopropil-5-hidroksiantranilat.



Slika 5.9.4. Maseni spektar sastojka dietil-etarskog ekstrakta urina pacova tretiranih izopropil-*N*-metilantranilatom na 23,694 min (RI (DB5-MS) 1814) koji je identifikovan kao izopropil-5-hidroksi-*N*-metilantranilat.

GC-MS analizom frakcija je utvrđeno da je jedinjenje koje eluira na 22,521 min (RI 1760) glavni sastojak frakcije 2, a da je jedinjenje čije je retenciono vreme 21,811 min (RI 1726) glavni sastojak frakcije 3. Kao što je već rečeno, ova jedinjenja su tentativno identifikovana kao regioizomerni izopropil estri hidroksi-antranilne kiseline, opšte formule $C_{10}H_{13}NO_3$. Prisustvo 10 ugljenikovih atoma u molekulu potvrđeno je prisustvom 10 signala u njihovim ^{13}C NMR spektrima. Protonski NMR spektri oba jedinjenja sadržavali su po 3 signala u oblasti hemijskih pomeranja protona vezanih za aromatično jezgro. U 1H NMR spektru frakcije 2 uočena su dva dubleta (d, 6,60 ($J = 8,7$ Hz) i 7,35 ($J = 3,0$ Hz) ppm) i jedan dublet dubleta (dd, 6,88 ppm ($J = 8,7$ i 3,0 Hz)), što je ukazivalo na 5-supstituisani derivat antranilne kiseline, a u 1H NMR spektru frakcije 3 uočena su tri dubleta dubleta (dd 6,50 ($J = 8,2$ i 7,6 Hz), 6,82 ($J = 7,6$ i 1,3 Hz), 7,50 ($J = 8,2$ i 1,3 Hz) ppm), što je ukazivalo na 3-supstituisani derivat antranilne kiseline. Pored toga, 1H NMR spektri oba jedinjenja, u oblasti signala protona koji su vezani za sp^3 hibridizovane ugljenike, sadržavali su dva signala, dublet na 1,30 ($J = 6,3$ Hz) i septuplet na oko 5,2 ($J = 6,3$ Hz) ppm, što je potvrdilo prisustvo *O*-izopropil grupe u molekulu. Imajući sve ovo u vidu, glavni sastojak frakcije 2 je identifikovan kao izopropil-5-hidroksiantranilat, a frakcije 3 kao izopropil-3-hidroksiantranilat. Ovo je potvrđeno i analizom dvodimenzionalnih NMR spektara (1H - 1H COSY, NOESY, HSQC i HMBC), koji su omogućili asignaciju svih signala u protonskom i C -13 NMR spektru (Tabela 5.25). Na primer, supstitucija je potvrđena i prisustvom odgovarajućih *cross*-pikova u NOESY spektrima analiziranih jedinjenja. U NOESY spektru izopropil-3-hidroksiantranilata uočeno je dipolarno sprezanje između protona na 6,50 ppm (H(5)) i protona na 6,82 (H(4)) i 7,50 (H(6)) ppm, dok je u NOESY spektru izopropil-5-hidroksiantranilata uočena samo interakcija između protona na 6,60 (H(3)) i 6,88 (H(4)) ppm. Izmenljivi protoni (–

OH i $-NH_2$) asignirani su zahvaljujući *cross*-pikovima odgovarajućih protona iz uzorka i rezidualne vode (atmosferske vlage) u NOESY spektrima. U NOESY spektru frakcije 3 uočeni su *cross*-pikovi između signala koji potiču od vode na 1,58 ppm i širokih singleta na 5,63 i 7,60 ppm. Integraljenjem pikova utvrđeno je da signal na 5,63 ppm potiče od jednog, a signal na 7,60 ppm od dva protona, međutim nije moguće izvršiti asignaciju ovih signala.

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

Tabela 5.25. ¹H (400 MHz) i ¹³C (100 MHz) NMR (CDCl₃) spektralni podaci za izopropil-3-hidroksiantranilat, izopropil-5-hidroksiantranilat, izopropil-5-hidroksi-*N*-metilantranilat i 2-(metilamino)benzamid.

Položaj	Izopropil-3-hidroksiantranilat		Izopropil-5-hidroksiantranilat		Izopropil-5-hidroksi- <i>N</i> -metilantranilat		2-(Metilamino)benzamid	
	δ _C , mult.	δ _H (J, Hz)	δ _C , mult.	δ _H (J, Hz)	δ _C , mult.	δ _H (J, Hz)	δ _C , mult.	δ _H (J, Hz)
1	112,4 C	–	112,3 C	–	110,8 C	–	108,7 C	–
2	140,8 C	–	144,8 C	–	147,2 C	–	152,8 C	–
3	143,1 C	–	118,2 CH	6,60, d (8,7)	112,1 CH	6,59, d (9,0)	111,3 CH	6,69, dd (8,7, 1,0)
4	117,8 CH	6,82, dd (7,6, 1,3)	122,8 CH	6,88, dd (8,7, 3,0)	123,1 CH	6,99, dd (9,0, 3,0)	135,5 CH	7,42, ddd (8,7, 7,1, 1,6)
5	114,8 CH	6,50, dd (8,2, 7,6)	146,1 C	–	144,7 C	–	114,3 CH	6,61, ddd (8,1, 7,1, 1,0)
6	123,5 CH	7,50, dd (8,2, 1,3)	116,2 CH	7,35, d (3,0)	117,0 CH	7,42, d (3,0)	132,4 CH	7,94, dd (8,1, 1,6)
C=O	168,0 C	–	167,2 C	–	167,7 C	–	172,3 C	–
CH(CH ₃) ₂	22,0 CH ₃	1,35, d (6,3)	22,0 CH ₃	1,35, d (6,3)	22,0 CH ₃	1,34, d (6,3)	–	–
CH(CH ₃) ₂	67,7 CH	5,22, septuplet (6,3)	67,9 CH	5,20, septuplet (6,3)	67,7 CH	5,18, septuplet (6,3)	–	–
NHCH ₃	–	–	–	–	30,1 CH ₃	2,90, s, NHCH ₃	31,9 CH ₃	2,93, s, NHCH ₃
NHR i OH ili CONH ₂	–	5,63, br s, NH ₂ (R = H) 7,60, br s	–	(R = H) *	–	(R = CH ₃) 5,20, br s, 7,3, br s	–	4,72 (1H) 7,70 (2H)

* signali nisu uočeni (bili su veoma široki).

¹H- i ¹³C-NMR spektralni podaci za izopropil-3-hidroksiantranilat se dobro slažu sa literaturnim podacima za odgovarajuće signale metil-3-hidroksiantranilata (Huang *et al.*, 2006; Tipparaju *et al.*, 2008). ¹H NMR spektralni podaci protona vezanih za aromatično jezgro izopropil-5-hidroksiantranilata se dobro slažu sa literaturnim podacima za metil-5-hidroksiantranilat (Hara *et al.*, 2004).

¹H NMR spektralni podaci 2-(metilamino)benzamid se slažu sa literaturnim podacima (Bertini *et al.*, 2005).

Glavni sastojak frakcije 1 bilo je jedinjenje sa RI (DB5-MS) 1814 koje je tentativno identifikovano kao hidroksi-derivat izopropil-*N*-metilantranilata. Vrednosti hemijskih pomeranja i konstanti kuplovanja „aromatičnih“ protona, odnosno njihova multiplentnost (dva dubleta na 6,59 ($J = 9,0$ Hz) i 7,42 ($J = 3,0$ Hz) ppm i dublet dubleta na 6,99 ppm ($J = 9,0$ i 3,0 Hz)), ukazale su na 5-hidroksi-derivat, pa je dato jedinjenje identifikovano kao izopropil-5-hidroksi-*N*-metilantranilat. Signali izmenljivih protona su asignirani pomoću NOESY spektra. 2D NMR spektri (^1H - ^1H COSY, NOESY, HSQC i HMBC) omogućili su potpunu asignaciju svih ^1H - i ^{13}C -signala (tabela 5.26).

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

Tabela 5.26. Procentni sastav dietil-etarskog ekstrakta urina pacova tretiranih izopropil-*N*-metilantranilatom i frakcija dobijenih nakon *Sephadex* LH-20 hromatografije ovog ekstrakta

N ^{oa}	Rt [min]	RI	Ekstrakt urina	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5	IdenMet ^b	Sastojci
1.	6,534	1081	tr	-	-	-	-	0,3	RI, MS, CoI	<i>N</i> -Metilanilin
2.	8,655	1169	tr	-	-	-	-	0,8	RI, MS, CoI	Benzoeva kiselina
3.	15,573	1452	3,3	14,1	2,4	-	-	0,1	RI, MS, CoI	Izopropil-antranilat
4.	15,900	1466	2,3	-	-	-	tr	29,9	MS	<i>N</i> -Metilantranilna kiselina
5.	17,129	1517	0,7	-	-	-	-	tr	RI, MS, CoI	Izopropil- <i>N</i> -metilantranilat
6.	17,555	1536	0,3	-	-	-	-	-	MS	Izopropil-3-hidroksi- <i>N</i> -metilantranilat
7.	17,881	1550	tr	-	-	-	-	-	MS	Antranilamid
8.	19,139	1604	5,7	-	tr	2,5	18,3	39,5	MS, NMR	2-(Metilamino)benzamid
9.	20,625	1671	tr	-	-	-	-	-	RI, MS	<i>N</i> -Acetilantranilna kiselina
10.	20,745	1677	tr	-	-	-	-	-	MS*	Izopropil-2-acetamidobenzoat
11.	21,811	1726	21,7	12,3	42,1	41,0	20,4	-	MS*, NMR	Izopropil-3-hidroksiantranilat
12.	22,521	1760	18,6	19,8	32,2	15,3	3,9	0,4	MS*, NMR	Izopropil-5-hidroksiantranilat
13.	23,694	1814	17,2	53,8	4,0	-	-	tr	MS*, NMR	Izopropil-5-hidroksi- <i>N</i> -metilantranilat
14.	23,806	1822	0,4	-	-	-	-	-	MS*	Izopropil-2-acetamido-3-hidroksibenzoat
15.	28,136	2040	0,3	-	-	-	-	-	MS*	Izopropil-2-acetamido-5-hidroksibenzoat
Ukupno identifikovano			70,5	100,0	80,7	58,7	42,6	71,0		

^a Jedinjenja su navedena po redosledu eluiranja sa DB-5MS kolone (Rt-retenciono vreme (u min) i RI-eksperimentalno određeni retencioni indeksi za gore pomenutu kolonu na osnovu ko-injektiranih homologa serije *n*-alkana C₁₀-C₂₁);

^b RI, sastojak identifikovan poređenjem retencionih indeksa sa literarnim vrednostima;

MS, sastojak identifikovan poređenjem masenih spektara;

MS*, sastojak identifikovan analizom fragmentacije uočene u masenom spektru;

CoI, sastojak identifikovan ko-injektiranjem standarda;

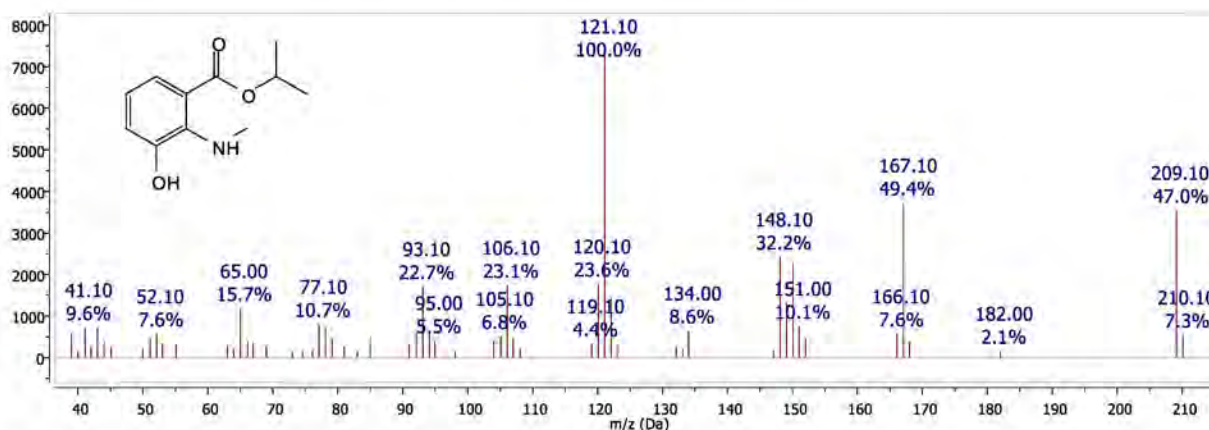
NMR, struktura izolovanog čistog sastojka potvrđena ¹H- i ¹³C-NMR spektralnom analizom;

-, sastojak nije detektovan;

tr, sastojak prisutan u procentu manjem od 0,05% (trag).

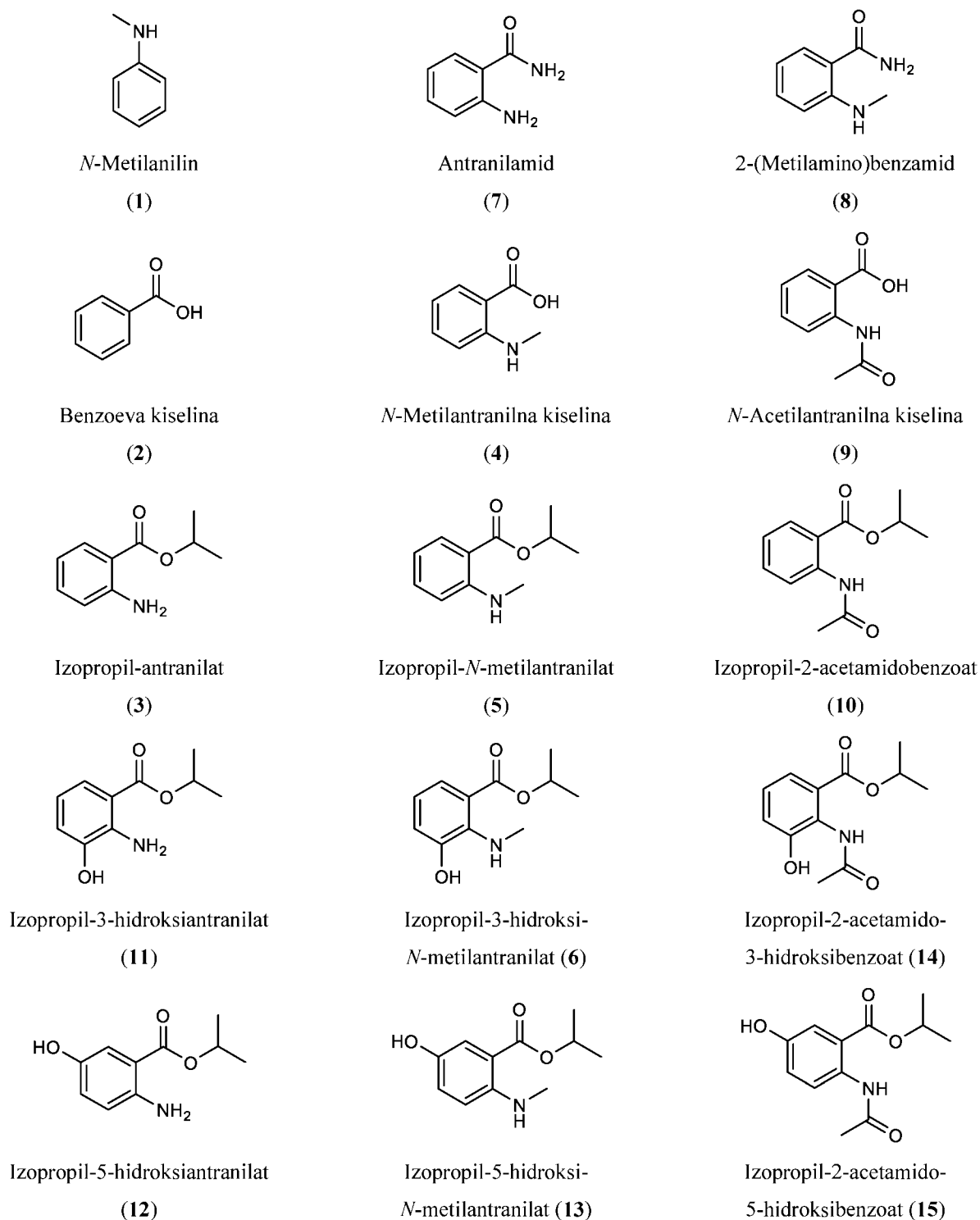
Na osnovu GC-MS analize glavni sastojak frakcije 5 je identifikovan kao 2-(metilamino)benzamid (amid *N*-metilantranilne kiseline), što je dodatno potvrđeno i NMR analizom. ^1H NMR je sadržavo signale, dva dd (6,69 ($J = 8,7$ i $1,0$ Hz) i 7,94 ($J = 8,1$ i $1,6$ Hz) ppm) i dva ddd (6,61 ($J = 8,1$, $7,1$ i $1,0$ Hz) i 7,42 ($J = 8,7$, $7,1$ i $1,6$ Hz) ppm), karakteristične za *orto*-disupstituisano aromatično jezgro. Svi protonski i C-13 NMR signali su potpuno asignirani zahvaljujući 2D NMR (^1H - ^1H COSY, NOESY, HSQC, HMBC) spektrima (tabela 5.25). Postojanjem amidnih traka u IR spektru nedvosmisleno je potvrđeno prisustvo $-\text{CONH}_2$ grupe.

Pažljivom analizom TIC hromotograma uočen je i sastojak na Rt 17,555 min (RI (DB5-MS) 1536), koji je na osnovu sličnosti njegovog masenog spektara sa masenim spektrom izopropil-5-hidroksi-*N*-metilantranilata, identifikovan kao drugi regioizomer sa hidroksilnom grupom u položaju 3, tj. kao izopropil-3-hidroksi-*N*-metilantranilat (slika 5.9.5).



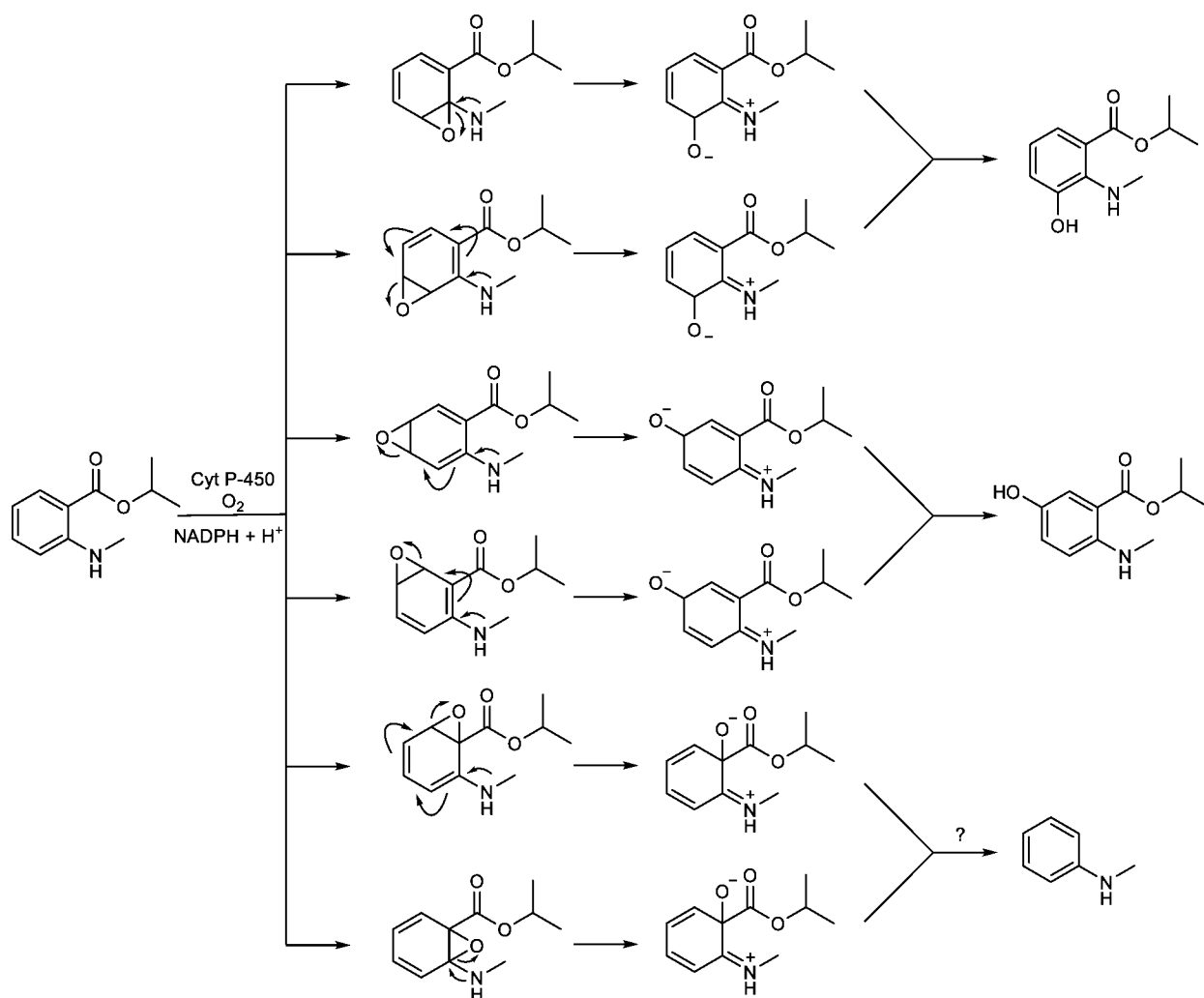
Slika 5.9.5. Maseni spektar sastojka dietil-etarskog ekstrakta urina pacova tretiranih izopropil-*N*-metilantranilatom na Rt 17,555 min (RI (DB5-MS) 1536) koji je identifikovan kao izopropil-3-hidroksi-*N*-metilantranilat.

Dakle, detaljnom GC, GC-MS i NMR analizom dietil-etarskog ekstrakta uzorka urina pacova tretiranih izopropil-*N*-metilantranilatom i *pool*-ovanih frakcija dobijenih nakon *Sephadex* LH-20 hromatografije ovog ekstrakta, identifikovano je petnaest sastojka, što je predstavljalo 70,8% površina ispod pikova u TIC hromatogramu uzorka urina. Identifikovani sastojci urina (samo oni koji su u očiglednoj vezi sa apliciranom supstancom), njihova relativna zastupljenost, Rt i RI vrednosti i metod identifikacije dati su u tabeli 5.26, a njihove strukture su predstavljene na slici 5.9.6.



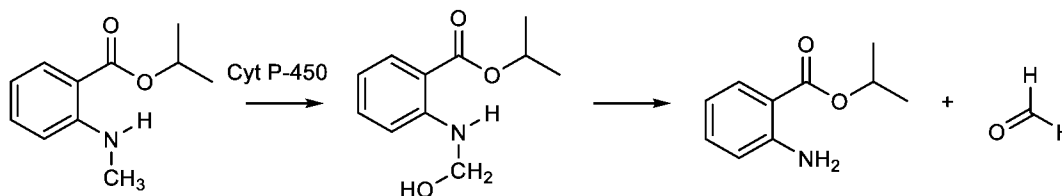
Slika 5.9.6. Strukture sastojaka dietil-etarskog ekstrakta urina pacova tretiranih izopropil-*N*-metilantranilatom i frakcija dobijenih nakon *Sephadex* LH-20 hromatografije ovog ekstrakta (u zagradi se nalazi redni broj odgovarajućeg jedinjenja iz tabele 5.26).

U uzorku urina pacova tretiranih jedinjenjem IMA najzastupljeniji metaboliti IMA su 3- i 5-hidroksi-derivati antranilne i *N*-metilantranilne kiseline, što je u saglasnosti sa činjenicom da je jedan od metaboličkih puteva kojima podležu aromatična jedinjenja hidroksilacija koju katalizuje citohrom P-450, a da elektron-donorske grupe, kao što je $-NH_2$ grupa u slučaju estara antranilne kiseline, favorizuju hidroksilaciju u *orto*- i *para*-položaju u odnosu na elektron-donorsku grupu (Lemke *et al*, 2012). Hidroksilacija aromatičnih jezgara se odvija preko intermedijernog epoksida, a elektron-donorska grupa favorizuje njegovo otvaranje tako da nastaju 3-, odnosno 5-hidroksi-derivati (slika 5.9.7). Izopropil-3-hidroksiantranilat i izopropil-5-hidroksiantranilat bi mogli nastati hidroksilacijom IMA nakon koje bi sledilo *N*-demetilovanje, pri čemu bi redosled metaboličkih koraka mogao biti i obrnut, a ne može se isključiti ni istovremeno odvijanje oba metabolička puta. Na osnovu relativnog sadržaja 3-hidroksi-*N*-metil-derivata čini se da u slučaju 3-hidroksilacije prvo dolazi do *N*-demetilovanja, a nakon toga do hidroksilacije (moguće je da *N*-metil grupa ometa građenje 3,4-epoksida).



Slika 5.9.7. Hidroksilacija izopropil-*N*-metilantranilata katalizovana citohromom P-450

Pored hidroksilacije aromatičnog jezgra antranilata, citohrom P-450 katalizuje *N*-demetilovanje, tako što inicijalno hidroksiluje *N*-metil grupu, nakon čega dolazi do raspada nagrađenog amina (slika 5.9.8).



Slika 5.9.8. *N*-demetilovanje izopropil-*N*-metilantranilata katalizovano citohromom P-450

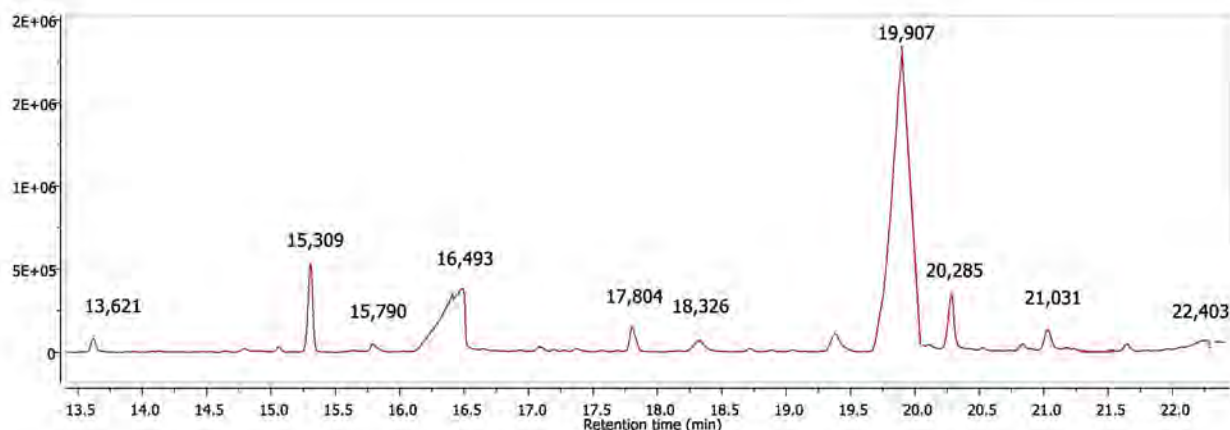
U urinu je identifikovan i proizvod hidrolize estera – *N*-metilantranilna kiselina i proizvod samo demetilovanja – izopropil-antranilat, a detektovano je i malo nemetabolisanog izopropil-*N*-metilantranilata. Takođe su detektovani i proizvodi amonolize (2-(metilamino)benzamid i antranilamid, prisutan u tragovima). Pored pomenutih metabolita faze I, detektovani su i proizvodi *N*-acetilovanja (izopropil-2-acetamido-3-hidroksibenzoat, izopropil-2-acetamido-5-hidroksibenzoat i *N*-acetilantranilna kiselina) koji pripadaju metabolitima faze II.²

5.9.1.2. Analiza MMA i njegovih metabolita u urinu pacova

GC-MS analizom dietil-etarskog ekstrakta uzorka urina pacova tretiranih metil-*N*-metilantranilatom (u dozi 200 mg/kg t.m.) identifikovano je ukupno 13 sastojka, što je činilo 68,9% površina ispod detektovanih pikova etarskog ekstrakta urina. Deo ukupnog jonskog hromatograma (TIC) ekstrakta je prikazan na slici 5.9.9. Rezultati GC-MS analize (identifikovani sastojci urina (samo oni koji su u očiglednoj vezi sa apliciranom supstancom), njihova relativna zastupljenost, Rt i RI vrednosti i metod identifikacije) su predstavljeni u tabeli 5.27, a strukture detektovanih derivata antranilne kiseline na slici 5.9.10.

² Ksenobiotici su supstance koje dospeju u organizam, ali se prirodno ne nalaze u datom organizmu. Metabolizam (biotransformacija) ksenobiotika je višestepeni proces kojim se ksenobiotik, enzimski katalizovanim hemijskim reakcijama, prevodi u jedan ili više metabolita. Reakcije biotransformacije mogu pripadati reakcijama faze I i faze II. Reakcije faze I podrazumevaju uvođenje nove funkcionalne grupe u molekul ili transformaciju postojeće, uglavnom, u cilju dobijanja hidrofilnijeg derivata. Reakcije faze II, poznate kao konjugacione reakcije, podrazumevaju konjugaciju postojeće polarne funkcionalne grupe ksenobiotika ili njegovog metabolita sa nekim hidrofilnim jedinjenjem (npr. sa glukuronskom kiselinom, sulfatima, glutationom, aminokiselinama) u cilju ekskrecije ksenobiotika ili njegovog metabolita (Cairns, 2008).

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost



Slika 5.9.9. Deo ukupnog jonskog hromatograma (TIC) (13,5 – 22,5 min) dietil-etarskog ekstrakta urina pacova tretiranih metil-*N*-metilantranilatom

Tabela 5.27. Procentni sastav dietil-etarskog ekstrakta urina pacova tretiranih metil-*N*-metilantranilatom

N ^{oa}	Rt [min]	RI	%	IdenMet ^b	Sastojci
1.	8,655	1169	tr	RI, MS, CoI	Benzoeva kiselina
2.	13,092	1350	0,7	RI, MS, CoI	Metil-antranilat
3.	14,655	1415	3,8	RI, MS, CoI	Metil- <i>N</i> -metilantranilat
4.	15,249	1439	tr	RI, MS*, CoI ^c	Metil-3-hidroksi- <i>N</i> -metilantranilat
5.	15,900	1466	12,8	MS	<i>N</i> -Metilantranilna kiselina
6.	17,881	1550	1,3	MS	Antranilamid
7.	18,465	1575	tr	MS	Acetamidofenol
8.	19,139	1604	36,1	MS, NMR	2-(Metilamino)benzamid
9.	19,748	1632	3,3	MS*, CoI ^c	Metil-3-hidroksiantranilat
10.	20,826	1661	1,2	MS*, CoI ^d	Metil-5-hidroksiantranilat
11.	21,718	1722	8,4	MS*	Metil-5-hidroksi- <i>N</i> -metilantranilat
12.	24,121	1811	tr	MS*	Metil-2-acetamido-3(i)li 5)-hidroksibenzoat
13.	26,734	1920	tr	MS*	2-(Acetilamino)-3(i)li 5)-hidroksi-benzoeva kiselina
Ukupno identifikovano			68,9		

^a Jedinjenja su navedena po redosledu eluiranja sa DB-5MS kolone (Rt-retenciono vreme (u min) i RI-eksperimentalno određeni retencioni indeksi za gore pomenutu kolonu na osnovu ko-injektiranih homologa serije *n*-alkana C₁₀-C₂₀);

^b RI, sastojak identifikovan poređenjem retencionih indeksa sa literaturnim vrednostima;

^c Sintetisan u reakciji 3-hidroksiantranilne kiseline sa diazometanom;

^d Sintetisan u reakciji 5-hidroksiantranilne kiseline sa diazometanom;

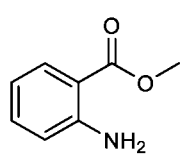
MS, sastojak identifikovan poređenjem masenih spektara;

MS*, sastojak identifikovan analizom fragmentacije uočene u masenom spektru;

CoI, sastojak identifikovan ko-injektiranjem standarda;

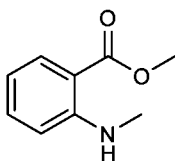
NMR, struktura izolovanog čistog sastojka potvrđena ¹H- i ¹³C-NMR spektralnom analizom;

tr, sastojak prisutan u procentu manjem od 0,05% (trag).



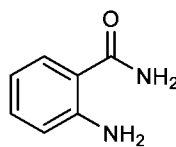
Metil-antranilat

(2)



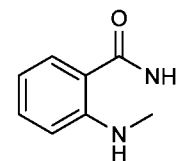
Metil-*N*-metilantranilat

(3)



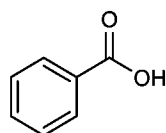
Antranilamid

(6)



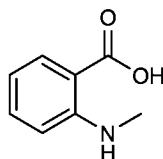
2-(Metilamino)benzamid

(8)



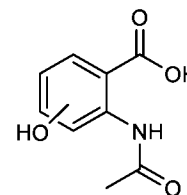
Benzoeva kiselina

(1)

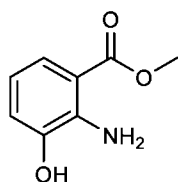


N-Metilantranilna kiselina

(5)

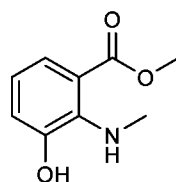


2-(Acetilamino)-3(ili 5)-
hidroksibenzoeva kiselina (13)



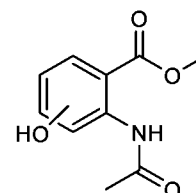
Metil-3-hidroksiantranilat

(9)

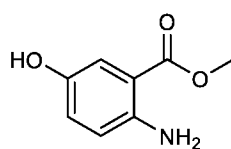


Metil-3-hidroksi-*N*-metilantranilat

(4)

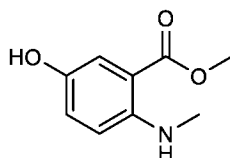


Metil-2-acetamido-3(ili 5)-
hidroksibenzoat (12)



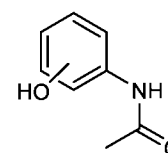
Metil-5-hidroksiantranilat

(10)



Metil-5-hidroksi-*N*-metilantranilat

(11)



Acetamidofenol

(7)

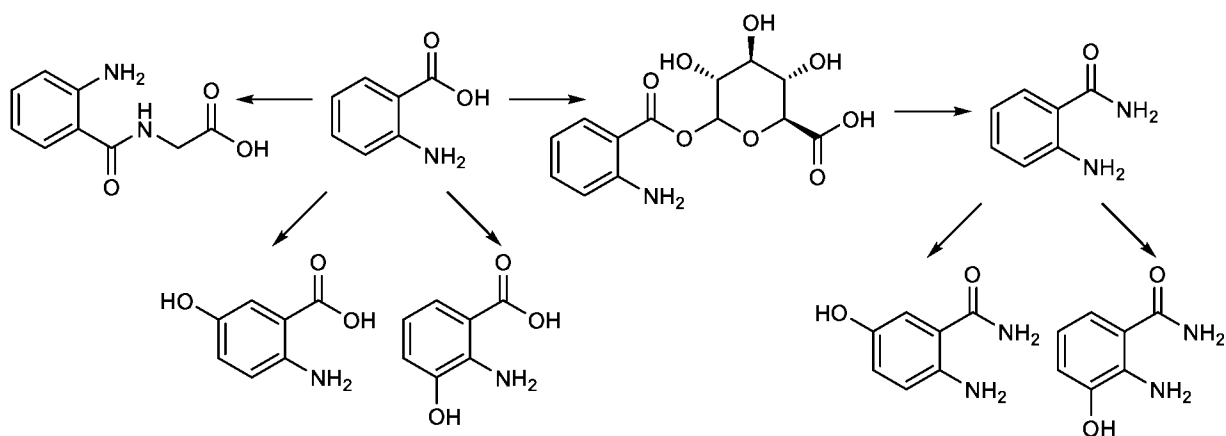
Slika 5.9.10. Strukture sastojaka dietil-etarskog ekstrakta urina pacova tretiranih metil-*N*-metilantranilatom
(u zagradi se nalazi redni broj odgovarajućeg jedinjenja iz tabele 5.27).

Kvalitativni sastav ekstrakta urina pacova tretiranih jedinjenjem MMA se nije značajno razlikovao od sastava ekstrakta urina pacova tretiranih jedinjenjem IMA (sem što se kod metabolita sa estarskom funkcionalnom grupom razlikovao deo koji potiče od alkohola). Međutim, za razliku od ekstrakta urina pacova tretiranih sa IMA gde su najzastupljeniji bili proizvodi hidroksilacije aromatičnog jezgra, u slučaju ekstrakta urina pacova tretiranih sa MMA, glavni metaboliti su bili proizvod amonolize - 2-(metilamino)benzamid (36,1%) i hidrolize estarske funkcionalne grupe - *N*-metilantranilna kiselina (12,8%). Sledeći po zastupljenosti su proizvodi hidroksilacije (ukupno 12,9%) i to: metil-5-hidroksi-*N*-metilantranilat (8,4%), metil-3-

hidroksiantranilat (3,3%), metil-5-hidroksiantranilat (1,2%), dok je metil-3-hidroksi-*N*-metilantranilat bio prisutan u tragovima. Nemetabolisanog metil-*N*-metilantranilata ima 3,8%, a antranilamida 1,3%.

Hidroksilacija MMA do 3- i 5-hidroksi-derivata antranilne i *N*-metilantranilne kiseline, kao i *N*-demetilovanje, analogni su pomenutim metabolizmima kod IMA (slike 5.9.7 i 5.9.8). Hidroksilacija aromatičnog jezgra katalizovana citohromom P-450 vrši se u *orto*- i *para*-položaju u odnosu na $-NH_2$ grupu, analogno IMA, tako da nastaju 3- i 5-hidroksi-derivati (slika 5.9.7). Kako je metil-3-hidroksi-*N*-metilantranilat prisutan u tragovima, i ovde se čini se da usled toga što *N*-metil grupa ometa građenje 3,4-epoksida u slučaju 3-hidroksilacije prvo dolazi do *N*-demetilovanja, a nakon toga do hidroksilacije.

Što se tiče amonolize, poznato je da se antranilna kiselina metaboliše do antranilamida, koji se dalje izlučuje urinom ili hidroksiluje do 3- ili 5-hidroksiantranilamida (slika 5.9.11). *Naito* sa saradnicima (1984) je, na osnovu toga što je antranilamid detektovao u žuči, ali ne i u perfuzatu jetre, pretpostavio da antranilamid nastaje u žuči neenzimskim putem iz konjugata antranilne kiseline sa glukuronskom kiselinom.



Slika 5.9.11. Šematski prikaz metabolizma antranilne kiseline

Pošto su MMA i IMA detektovani u urinu pacova tretiranih ovim jedinjenjima očigledno je da se ne metaboliše sav estar već se deo nepromenjenih estara izlučuje urinom. Sastav hidrolizata dobijenih enzimskom i kiselom hidrolizom urina se nije značajno razlikovao od sastava dietil-etarskog ekstrakata urina pacova tretiranih jedinjenjima IMA i MMA.

5.9.2. Analiza IMA i MMA i njihovih metabolita u homogenatima organa pacova

Kvalitativni i kvantitativni sastav dietil-etarskog ekstrakta homogenata organa i ekstrakata i seruma pacova tretiranih sa IMA i MMA (u dozi 2 g/kg t.m.) dat je u tabelama 5.28 i 5.29. Prikazana su samo ona jedinjenja koja su bila u očiglednoj vezi sa apliciranim supstancama. Najveći broj različitih metabolita antranilata detektovan je u jetri. Pri tom nije bilo značajne razlike u sastavu ekstrakata organa muških i ženskih pacova.

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

Tabela 5.28. Procentni sastav dietil-etarskog ekstrakta homogenata pacova tretiranih metil-*N*-metilantranilatom (broj životinja korišćen za eksperiment - 6)

	MMA		NMAA		MA		AA		3-HMA		5-HMA		5-HMMA	
	ž	m	ž	m	ž	m	ž	m	ž	m	ž	m	ž	m
Jetra	0,020 ± 0,007	0,011 ± 0,008	0,855 ± 0,006	0,749 ± 0,007	tr	tr	1,18 ± 0,04	0,703 ± 0,005	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Bubreg	0,103 ± 0,007	0,064 ± 0,002	0,161 ± 0,009	0,076 ± 0,002	tr	tr	tr	tr	-	-	-	-	tr	tr
Srce	0,045 ± 0,001	0,021 ± 0,005	0,298 ± 0,007	0,259 ± 0,002	tr	tr	0,037 ± 0,008	tr	-	-	-	-	tr	tr
Mozak	0,066 ± 0,004	0,065 ± 0,002	0,039 ± 0,007	0,045 ± 0,007	tr	0,012 ± 0,006	tr	tr	-	-	-	-	tr	tr
Pluća	0,023 ± 0,009	tr	0,027 ± 0,009	0,015 ± 0,007	-	-	tr	tr	-	-	-	-	tr	tr
Butni mišić	tr	0,057 ± 0,009	0,063 ± 0,004	tr	tr	tr	-	-	-	-	-	-	tr	tr
Slezina	tr	0,050 ± 0,005	tr	tr	tr	tr	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum	0,021 ± 0,001	0,018 ± 0,003	0,048 ± 0,009	0,058 ± 0,002	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr

-, sastojak nije detektovan;

tr, sastojak prisutan u procentu manjem od 0,05% (trag)

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

Tabela 5.29. Procentni sastav dietil-etarskog ekstrakta homogenata pacova tretiranih izopropil-*N*-metilantranilatom (broj životinja korišćen za eksperiment - 6)

	IMA		NMAA		IA		AA		3-HIA		5-HIA		5-HIMA	
	ž	m	ž	m	ž	m	ž	m	ž	m	ž	m	ž	m
Jetra	0,105 ± 0,006	tr	0,080 ± 0,009	0,020 ± 0,002	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Bubreg	0,086 ± 0,006	0,078 ±	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	-	-	tr	tr
Srce	0,074 ± 0,004	-	tr	tr	tr	tr	-	-	-	-	-	-	-	-
Mozak	0,159 ± 0,008	0,031 ± 0,003	-	-	0,037 ± 0,004	tr	-	-	-	-	-	-	-	-
Pluća	0,058 ± 0,004	-	0,047 ± 0,008	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	-	-	-	-
Butni mišić	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Slezina	-	-	tr	tr	tr	tr	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum	0,010 ± 0,001	0,006 ± 0,000	0,036 ± 0,004	0,021 ± 0,003	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr

-, sastojak nije detektovan;

tr, sastojak prisutan u procentu manjem od 0,05% (trag)

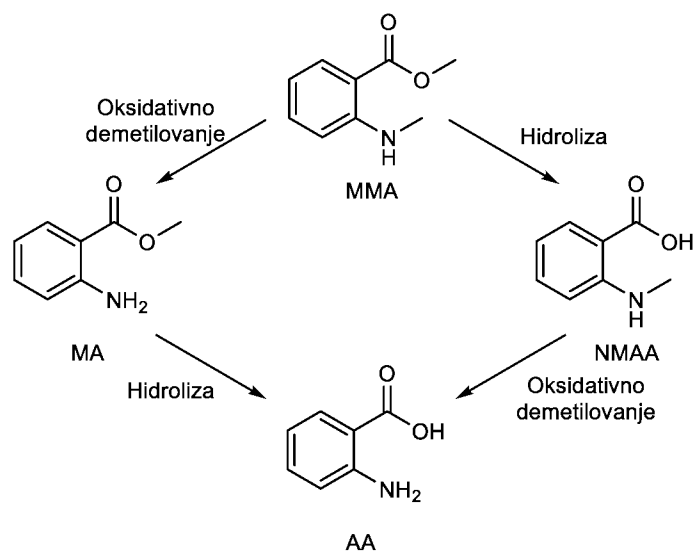
Kod pacova tretiranih izopropil-*N*-metilantranilatometabolisanog jedinjenja ima najviše u mozgu i jetri (ca. 0,1 mg po gramu organa), a zatim u bubregu, srcu, plućima, dok nije detektovan u slezini i mišićnom tkivu. Najzastupljeniji metabolit IMA u jetri je bio proizvod njegove hidrolize, *N*-metilantranilna kiselina, koji je u srcu, slezini i bubregu bio prisutan u tragovima, dok je, kao što je već rečeno, on zastupljen sa 3,3% među metabolitima u urinu. Metabolit nastao *N*-demetilovanjem IMA, izopropil-antranilat, u svim organima je, sem u mozgu, bio prisutan u tragovima, a takođe je i proizvod sukcesivne hidrolize i demetilovanja, antranilna kiselina, u svim organima u kojima je detektovana, bila prisutna u tragovima. *N*-Metilanilin, koji bi mogao nastati dekarboksilacijom IMA, bio je prisutan u svim organima, sem mišićnog tkiva i mozga, i to u tragovima, a anilin, proizvod dekarboksilacije i *N*-demetilovanja bio je prisutan samo u jetri u tragovima, a u tragovima je detektovan i u urinu.

Metaboliti nastali hidroksilovanjem aromatičnog jezgra izopropil-antranilata, izopropil-3- i 5-hidroksiantranilat, detektovani su u tragovima samo u jetri, dok je izopropil-*N*-metil-5-hidroksiantranilat detektovan u tragovima u bubregu i jetri, a izopropil-*N*-metil-3-hidroksiantranilat nije detektovan ni u jednom organu. Pomenuti hidroksi-derivati izopropil estara antranilne i *N*-metilantranilne kiseline su u urinu pacova detektovani u značajnom procentu (preko 25%, svi sem izopropil-*N*-metil-3-hidroksiantranilata – 0,4%).

Nemetabolisanog metil-*N*-metilantranilata ima najviše u bubregu i mozgu. MMA je najmanje zastupljen u jetri, dok je s druge strane u jetri najzastupljeniji derivat antranilata proizvod hidrolize MMA, *N*-metilantranilna kiselina (NMMA). Po zastupljenosti ovog metabolita slede srce i bubreg, a *N*-metilantranilna kiselina je i u značajnom procentu detektovana u urinu pacova (18,6%). Ovo je u konzistenciji sa poznatom činjenicom da je glavni metabolički put antranilatnih estara hidroliza koja se odvija u jetri, kao i da se nastala *N*-metilantranilna kiselina dalje izlučuje putem urina (Pronk i Speijers, 2006). Poznato je da u jetri pored hidrolize dolazi i do sukcesivnog *N*-demetilovanja *N*-metil estara antranilne kiseline (Yamaori *et al*, 2005), što je u ovom slučaju potvrđeno prisustvom AA u jetri ženke pacova u količini 1,1 mg po gramu organa. AA je u srcu ženke pacova prisutna sa 0,04 mg/g, dok je u bubregu, mozgu i plućima prisutna u tragovima, a nije detektovana u urinu.³ Proizvod *N*-demetilovanja MMA, metil-antranilat (MA) je u svim organima, sem u mozgu muškog pacova, prisutan u tragovima.

³ Pored toga što bi antranilna kiselina mogla da nastane kao proizvod sukcesivne hidrolize i *N*-demetilovanja estara *N*-metilantranilne kiseline, ona je i endogena supstanca koja nastaje metabolizmom triptofana.

Yamaori sa saradnicima (2005) je ispitivao metabolizam MMA u mikrozmima jetre morskog praseta pri čemu je otkriveno da MMA podleže hidrolizi do *N*-metilantranilne kiseline (NMAA) i *N*-demetilovanju do metil-antranilata (MA), pri čemu je hidroliza dominantan proces. Dalje se *N*-metilantranilna kiselina oksidativno demetiluje do antranilne kiseline (AA), a metil-antranilat hidrolizuje do antranilne kiseline. Dakle, antranilna kiselina iz MMA u jetri nastaje i preko NMAA i preko MA (slika 5.9.12). U ovom radu (*Yamaori et al*, 2005) je pokazano da je hidroliza i MMA i MA katalizovana, barem delimično, karboksilesterazama i da se ne odigrava samo u mikrozmima, već i citosolu, mada je u citosolu sporija. S druge strane, oksidacija MMA i NMAA se odigrava samo u mikrozmima u prisustvu NADP⁺ i katalizovana je citohromom P-450.



Slika 5.9.12. Mogući metabolički putevi kojima podleže MMA u mikrozmima jetre morskog praseta
(*Yamaori et al*, 2005)

Metaboliti nastali hidroksilovanjem aromatičnog jezgra metil-antranilata, metil-estri 3- i 5-hidroksiantranilne kiseline, detektovani su samo u jetri. Metil-*N*-metil-5-hidroksiantranilat je detektovan u svim organima (u tragovima) sem u slezini, a metil-*N*-metil-3-hidroksiantranilat nije detektovan ni u jednom organu (kao i u slučaju pacova tretiranih sa MMA), što još jednom potvrđuje da *N*-metil grupa ometa hidroksilaciju u položaju 3. Metabolit koji bi mogao nastati dekarboksilacijom MMA, *N*-metilanilin, u svim organima je prisutan u tragovima, a anilin, proizvod dekarboksilacije i *N*-demetilovanja je prisutan samo u jetri i bubregu, takođe u tragovima.

Činjenica da su MMA i IMA detekovani u urinu pacova ukazuje na to da se pomenuta jedinjenja ne metabolišu u potpunosti u organizmu pacova, već se nemetabolisani izlučuju putem urina. Proizvod hidrolize IMA i MMA, *N*-metilantranilna kiselina, najzastupljeniji je metabolit antranilata detektovan u jetri pacova tretiranih i sa MMA i sa IMA, što je u slozi sa činjenicom da se hidroliza antranilatnih estara odvija u jetri. Međutim, za razliku od jetre pacova tretiranih sa MMA gde je ona zastupljena sa *ca.* 0,8 mg po gramu organa, u slučaju pacova tretiranih sa IMA ona je prisutna sa manje od 0,1 mg po gramu organa. NMMA čini 18,6% metabolita detektovanih u urinu pacova tretiranih sa MMA, a u značajnom procentu je prisutan i amid ove kiseline – 2-(metilamino)benzamid (52%), dok pomenuta kiselina čini samo 3,3%, a njen amid oko 8,5% metabolita urina pacova tretiranih sa IMA. Na osnovu iznetih činjenica i s obzirom da se hidroliza antranilatnih estara odvija u jetri i da se nastala *N*-metilantranilna kiselina dalje izlučuje putem urina (Pronk i Speijers, 2006) izvodi se zaključak da se hidroliza voluminoznog IMA, odvija sporije u poređenju sa MMA. Međutim, pošto su u urinu pacova tretiranih sa IMA proizvodi hidroksilacije aromatičnog jezgra zastupljeniji nego kod pacova tretiranih sa MMA, izgleda da je u slučaju voluminoznog izopropil estra glavni metabolički put hidroksilacija (i to hidroksilacija u položaju 5 je dominantna u odnosu na onu u položaju 3), dok je kod pacova tretiranih sa MMA glavni metabolički put hidroliza estarske grupe.⁴

5.9.3. Inkubacija IMA i MMA sa homogenatom svinjske jetre

Homogenat svinjske jetre (50%) i supernatant dobijen nakon centrifugiranja homogenata jetre u koji je dodat IMA ili MMA inkubirani su 1,5 h na 37 °C nakon čega je izvršena ekstrakcija dietil-etrom, a etarski ekstrakt je podvrgnut GC-MS analizi. Pri tom je utvrđeno da je glavni metabolit oba estra *N*-metilantranilna kiselina. Pored toga ova dva estra metabolisala su se u manjoj meri i do antranilne kiseline, pri čemu je sadržaj metabolita bio veći u ekstraktu homogenata u poređenju sa supernatantom.

Dakle, metabolizam metil- i izopropil-*N*-metilantranilata je konzistentan sa metabolizmom estara antranilne kiseline, tj. glavni metabolički put ovih jedinjenja je hidroliza, a pored toga dolazi i do *N*-demetilovanja. Hidroliza estara antranilne i *N*-metilantranilne kiseline do odgovarajućih kiselina i alkohola je katalizovana enzimima karboksilesterazama, među

⁴ Kod pacova tretiranih jedinjenjima IMA i MMA nisu uočeni toksični efekti ovih antranilata, iako im je dato 10 puta više supstance u odnosu na maksimalno dozvoljeni dnevni unos MMA (0,2 mg po kg telesne mase) i oko 2 miliona puta više u odnosu na prosečan dnevni unos MMA u Evropi (1 µg po kg telesne mase dnevno) (EFSA, 2011).

kojima su najznačajnije B-esteraze. Kod sisara se ovi enzimi nalaze u različitim tkivima, ali ih najviše ima u hepatocitima (Heymann, 1980).

Prethodno je proučavana *in vitro* hidroliza metil-antranilata i metil-*N*-metilantranilata pankreatinom (Leegwater i van Straten, 1974a, Grundshober, 1977), veštačkim želudačnim sokom i pankreasnim sokom (Gangoli i Shilling, 1968; Longland *et al*, 1977), sveže pripremljenim homogenatima jetre i creva pacova (Longland *et al*, 1977) i svinja (Leegwater i van Straten, 1974b; Grundshober, 1977). Nakon dvočasovne inkubacije MA i MMA sa pankreatinom nije došlo do hidrolize (Leegwater i van Straten, 1974a, Grundshober, 1977). S druge strane, homogenati tkiva pacova i svinja znatno efikasnije hidrolizuju MA i MMA. Iako, je prilikom inkubacije homogenata intestinalne sluznice svinja sa MA i MMA nakon 2 sata hidrolizovalo samo 15% MA i 20% MMA, u slučaju inkubacije pomenutih jedinjenja sa homogenatom svinjske jetre hidroliza je bila gotovo potpuna. Dahl i saradnici (1983) su utvrdili da metabolizmom MMA u mikrozmima izolovanim iz nazalne sluznice pacova nastaje i formaldehid. Formaldehid bi mogao nastati oksidacijom metanola (koji je jedan od proizvoda hidrolize estra), kao i prilikom *N*-demetilovanja.

Hidroliza MMA je potvrđena i *in vivo* kod pacova i čoveka. Dvadeset četiri časa nakon što je pacovima oralno dat MMA, u urinu je detektovana *N*-metilantranilna i antranilna kiselina u približnom odnosu 20 : 1. (Morgareidge, 1963). *N*-Metilantranilna kiselina je bila i glavni metabolit izlučen 7 h nakon što je ispitaniku data kapsula koja je sadržala 150 mg MMA, a odnos NMMA i AA je i u ovom slučaju bio približno 20:1. Ispitivanjem intestinalne apsorpcije MMA u lumenu dvanaestopalačnog creva (duodenuma) morskog praseta u koncentracijama od 25 do 260 ppm utvrđeno je da se MMA brzo apsorbuje u ovim koncentracijama. Uzorci portalne krvi uzeti 30 minuta nakon što je životinjama data testirana supstanca ukazuju da dolazi do brze apsorpcije u svim koncentracijama, ali da hemijski oblik u kome se MMA apsorbuje zavisi od koncentracije. Pri koncentraciji 25 ppm nije detektovan nehidrolizovani estar što ukazuje da se testirano jedinjenje apsorbuje u hidrolizovanom obliku, kao NMMA. Pri dozi 260 ppm, nehidrolizovan estar se mogao detektovati tokom čitavog eksperimenta, ali ga je bilo najviše nakon 5 min (Pelling *et al*, 1980).

6. IZVOD

U doktorskoj disertaciji, pod nazivom „Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae): izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost“, analiziran je hemijski sastav etarskih ulja dobijenih hidrodestilacijom svežih i suvih listova biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae) metodama GC i GC-MS. Identitet dva sastojka, za koje je pretpostavljeno da su izopropil- i metil-estri *N*-metilantranilne kiseline, potvrđen je njihovom sintezom i GC ko-injekcijom dobijenih standarda. Oba sintetisana jedinjenja su spektralno okarakterisana (1D- i 2D-NMR, GC-MS, FTIR, UV) čime su potvrđene njihove strukture. S obzirom na etnofarmakološku primenu pomenute biljne vrste, izvršeno je testiranje antimikrobne i antinociceptivne aktivnosti etarskog ulja i sintetisanih čistih jedinjenja, testirana je antioksidantna, anksiolitička, antidepresivna, hepato-, gastro- i nefroprotektivna aktivnost sintetisanih estara, i ispitan je metabolizam ovih estara kod pacova (analiza pomenutih jedinjenja i njihovih metabolita u organima i urinu pacova).

Dobijeni su sledeći rezultati:

Prilikom analize hemijskog sastava etarskih ulja svežih i suvih listova biljne vrste *C. ternata* identifikovano je 157 sastojaka, dok je pretragom literature utvrđeno da je do sada bilo poznato samo 18 sastojaka ovog etarskog ulja (Respaud *et al.*, 1997). Tokom identifikacije, u gasnim hromatogramima uočen je pik jedinjenja, za koje je, poređenjem njegovog masenog spektra sa spektrom iz dostupne baze masenih spektara, pretpostavljeno da je izopropil-*N*-metilantranilat (IMA). U cilju potvrde identiteta navedenog jedinjenja, IMA je sintetisan, redukcijom *in situ* generisanog imina metil-antranilata i formaldehida, pri čemu je dobijen metil-*N*-metilantranilat (MMA) (takode detektovan u ulju vrste *C. ternata*), koji je transesterifikovan odgovarajućim alkoksidom. Ko-injektiranjem dobijenih standarda IMA i MMA sa etarskim uljem je potvrđeno da su oni sastojci *C. ternata*. Sintetisan je i propil-*N*-metilantranilat. Sva sintetisana jedinjenja su spektralno okarakterisana (1D- i 2D-NMR, GC-MS, FTIR, UV). IMA je po prvi put identifikovan kao prirodni proizvod, tj. predstavlja potpuno novi sekundarni metabolit (protoalkaloid) prisutan u biljnom svetu i zato je nazvan ternantranin.

S druge strane MMA je prirodni sastojak većeg broja vrsta porodice Rutaceae. S obzirom da se prirodno nalazi u voću i da se dodaje hrani kao aroma, deo je naše svakodnevne ishrane, pa može da podleže nitrozovanju *in vivo*, u želucu čoveka, reakcijom sa nitritima prisutnim u pljuvački, kao i unošenjem hrane koja sadrži konzervanse, tj. nitrite, pri čemu nastaje metil-*N*-metil-*N*-nitrozantranilat. Uzimajući u obzir moguće građenje metil-*N*-metil-*N*-nitrozantranilata u hrani i činjenicu da hrana često podleže termičkoj obradi, pri čemu može doći do termičke razgradnje, izvršena je sinteza i proučavana termalna razgradnja metil-*N*-metil-*N*-nitrozantranilata. Metil-*N*-

metil-*N*-nitrozoantranilat, je sintetisan direktnim nitrozovanjem MMA. Identitet sintetisanog jedinjenja, metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata, potvrđen je NMR analizom. Prilikom GC-MS analize utvrđeno je da pomenuto jedinjenje podleže potpunoj termalnoj degradaciji. Glavni proizvod termalne degradacije je bio nepoznati proizvod kuplovanja, a pored njega detektovan je i metil-*N*-metilantranilat. U cilju utvrđivanja strukture ovog neidentifikovanog proizvoda, izvedena je preparativna termoliza metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata, termolizat je podvrgnut hromatografiji na koloni SiO₂, a dobijene frakcije su analizirane GC-MS i NMR (kao i ostalim spektralnim) metodama pri čemu je identifikovano 46 različitih sastojaka. Među njima je identifikovan i potpuno spektralno okarakterisan novi proizvod kuplovanja metil-5-metil-6-okso-(5*H*)-fenantridin-4-karboksilat. Zanimljivo je da proizvod kuplovanja detektovan prilikom GC-MS analize metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata, tentativno identifikovan kao 2,2'-(1,2-dimetilhidrazin-1,2-diil)dibenzoat, nije detektovan u termolizatu. Pažljivim razmatranjem struktura identifikovanih sastojaka termolizata predloženi su glavni putevi termolize metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata u parnoj i kondenzovanoj fazi. Generalno, identifikovani proizvodi bi mogli da se svrstaju u dve grupe, na one koji nastaju raskidanjem N–NO veze i Ar–NNO veze, tj. na proizvode koji su derivati antranilne i benzoeve kiseline. Strukturna raznolikost identifikovanih proizvoda i značajne razlike između termolize koja se odvija u parnoj i kondenzovanoj fazi ukazuju na mogući sintetski značaj termolize *N*-nitrozo jedinjenja.

S obzirom da stanovnici Meksika od davnina koriste biljnu vrstu *C. ternata* u medicinske svrhe, ispitana je antinociceptivna aktivnost etarskog ulja, etanolnog ekstrakta i isparljivih alkaloida listova biljne vrste *C. ternata*, IMA i MMA, kao i propil-*N*-metilantranilata. Kod miševa, oralno date pomenute supstance, ulje i ekstrakt ispoljavaju značajnu antinociceptivnu aktivnost. U testu abdominalnih grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom MMA, u dozi od 1 mg/kg t.m, bio je približno aktivan kao aspirin u dozi od 200 mg/kg t.m, a, u testu vruće ploče, svi antranilati, u dozi 3 mg/kg t.m, ispoljili su veću aktivnost od morfina u dozi od 5 mg/kg t.m. Rezultati ispitivanja antinociceptivne aktivnosti ukazali su na interesantnu činjenicu da oralna aplikacija etarskog ulja listova biljne vrste *C. ternata* izaziva približno 100 puta manju aktivnost u poređenju sa IMA u sprečavanju bola izazvanog sirćetnom kiselinom. Ovo indicira da antinociceptivna aktivnost ulja (koje bi se moglo smatrati 100-1000 puta razblaženim rastvorom antranilata) potiče od prisustva IMA i MMA, čiji je ukupni sadržaj u ulju oko 0,1%.

Kako su izopropil-, metil- i propil-*N*-metilantranilat u pomenutim testovima pokazali dobru antinociceptivnu aktivnost, ispitana je i antinociceptivna aktivnost ovih jedinjenja u drugim modelima nocicepcije, a proučavan je i mehanizam antinociceptivnog dejstva ovih estara. Miševi kojima su oralnim putem data pomenuta jedinjenja u dozama 0,3, 1 i 3 mg/kg t.m. bili su manje osetljivi na hemijski ili termalni stimulus kod modela formalinom, kapsaicinom i glutamatom

izazvane nocicepcije, u modelu vruće ploče i naglog pokreta repom. Pretretmanom miševa sa antagonistima i blokatorima, utvrđeno je da mehanizmi dejstva ovih estara najverovatnije nisu povezani sa holinergičkim i kanabinoidnim sistemima, ali uključuju, barem delimično, interakcije sa kapsaicin-senzitivnim vlaknima i noradrenergičkim, nitrergičkim, ATP-senzitivnim kalijumovim kanalima, opioidnim i serotoninergičkim sistemima. Kako izopropil-, metil- i propil-*N*-metilantranilat ispoljavaju značajnu perifernu i centralnu antinociceptivnu aktivnost u manjim dozama u poređenju sa morfinom, najčešće korišćenim opioidnim analgetikom, a ne ispoljavaju toksično dejstvo, ova tri jedinjenja predstavljaju obećavajuće potencijalne prototipove za razvoj novih analgetskih lekova.

Dva prirodna estra *N*-metilantranilne kiseline, prisutna u etarskom ulju vrste *C. ternata*, IMA i MMA, podvrgnuta su ispitivanju anksiolitičke i antidepresivne aktivnosti, a ispitivan je i njihov uticaj na vreme potrebno da miš zaspi i na dužinu sna izazvanog dijazepamom. Pokazano je da ovi isparljivi alkaloidi (u dozama od 50–200 mg/kg t.m, *i.p.*) značajno povećavaju vreme koje životinje provode u potencijalno opasnom prostoru u poređenju sa kontrolnom grupom, dok ne utiču na broj prelazaka iz jednog u drugi deo kutije za izvođenje testa svetlo/tama, a ne ispoljavaju miorelaksantno dejstvo. Oni smanjuju na dozno-zavisan način vreme imobilnosti miševa u testu prinudnog plivanja i vešanja o rep, dok ne povećavaju opštu lokomotornu aktivnost. Sami antranilati nemaju uspavljujuće dejstvo, ali produžavaju vreme dijazepamom uzrokovanog sna, u zavisnosti od primenjene doze, što ukazuje da deluju na GABA receptore. U svim testovima oba testirana jedinjenja su pokazala slične i uporedive rezultate, što ukazuje da je jezgro *N*-metilantranilne kiseline nosilac aktivnosti.

Ispitano je potencijalno hepato- i nefroprotektivno dejstvo izopropil- i metil-*N*-metilantranilata (u dozi od 200 mg/kg t.m, *i.p.*, 7 dana) u modelu akutne intoksikacije pacova ugljen-tetrahloridom (CCl₄) praćenjem serumskih markera i promena u morfologiji i funkciji jetre i bubrega. Oba isparljiva alkaloida, ispoljila su hepatoprotektivni potencijal u modelu CCl₄-uzrokovanih oštećenja jetre, a samo metil-*N*-metilantranilat nefroprotektivni potencijal, kod pacova. Ispitano je i dejstvo izopropil- i metil-*N*-metilantranilata na sluznicu želuca pacova (u dozi 200 mg/kg t.m, *p.o.*) i na nastanak lezija na sluznici želuca pacova (u dozama 50, 100 i 200 mg/kg t.m, *p.o.*) koje su izazvane diklofenakom (nesteroidnim anti-inflamatornim lekom) ili etanolom. Oralna aplikacija ovih jedinjenja, čak i u visokim dozama (200 mg/kg t.m.), ne dovodi do pojave lezija, a oba alkaloida ispoljavaju značajnu antiulceroznu aktivnost, čak i u dozi 50 mg/kg t.m. U cilju utvrđivanja mehanizma nefro-, gastro- i hepatoprotektivne aktivnosti, ispitivana je antioksidantna aktivnost izopropil- i metil-*N*-metilantranilata, međutim oni nisu pokazali značajnu antioksidantnu aktivnost. Testirana je i antimikrobna aktivnost ovih estara, kao i etarskog ulja vrste *C. ternata*, pri čemu je utvrđeno da metil estar poseduje veći antimikrobni potencijal, kao i da oba antranilata poseduju selektivnu aktivnost prema gljivicama.

Izvršena je i analiza izopropil- i metil-*N*-metilantranilata, i njihovih metabolita u urinu i organima pacova tretiranih ovim supstancama. Dietil-etarski ekstrakt urina pacova tretiranih izopropil-*N*-metilantranilatom (200 mg/kg t.m, *i.p.*, 7 dana) je podvrgnut hromatografiji na *Sephadex*-u LH 20, a dobijene frakcije su analizirane GC-MS, NMR, FTIR i UV metodama. Utvrđeno je da su glavni sastojci urina pacova tretiranih izopropil-*N*-metilantranilatom proizvodi hidrosilacije (izopropil-5-hidroksi-*N*-metilantranilat, izopropil-5-hidroksi- i 3-hidroksi-antranilat). Glavni metaboliti, na osnovu GC-MS analize ekstrakta urina pacova tretiranih metil-*N*-metilantranilatom (200 mg/kg t.m, *i.p.*, 7 dana) su bili proizvod amonolize - 2-(metilamino)benzamid i hidrolize estarske funkcionalne grupe - *N*-metilantranilna kiselina. Činjenica da su izopropil- i metil-*N*-metilantranilati detekovani u urinu pacova ukazuje na to da se pomenuta jedinjenja ne metabolišu u potpunosti u organizmu pacova, već se delom izlučuju putem urina nemetabolisani.

Dietil-etarski ekstrakti homogenata organa pacova (jetre, bubrega, srca, mozga, pluća, butnog mišića, slezine, kao i seruma), tretiranih izopropil- i metil-*N*-metilantranilatima (2 g/kg t.m, *i.p.*), analizirani su GC-MS metodom. Najveći broj metabolita, i izopropil- i metil-*N*-metilantranilata, detektovan je u jetri, pri čemu je najzastupljeniji metabolit u jetri u oba slučaja bio proizvod hidrolize ovih estara, *N*-metilantranilna kiselina. Utvrđeno je se hidroliza estara *N*-metilantranilne kiseline vrši u jetri, da se proizvodi hidrolize izlučuju putem urina, kao i da je hidroliza estara *N*-metil antranilne kiseline i voluminoznijeg izopropil-alkohola sporija u odnosu na hidrolizu metil-*N*-metilantranilata. S obzirom da su u urinu pacova tretiranih izopropil-*N*-metilantranilatom, hidroksi-derivati pomenutog estara dominantniji nego kod pacova tretiranih metil-*N*-metilantranilatom, zaključeno je da je u slučaju izopropil estara *N*-metilantranilne kiseline glavni metabolički put hidrosilacija (i to hidrosilacija u položaju 5 je dominantna u odnosu na onu u položaju 3), dok je u slučaju metil-*N*-metilantranilata glavni metabolički put hidroliza estarske grupe.

Kod pacova tretiranih izopropil- i metil-*N*-metilantranilatom nisu uočeni toksični efekti ovih jedinjenja, iako im je dato 10 000 puta više supstance u odnosu na maksimalno dozvoljeni dnevni unos metil-*N*-metilantranilata (0,2 mg po kg telesne mase) i oko 2 miliona puta više u odnosu na prosečan dnevni unos ovog jedinjenja u Evropi (1 µg po kg telesne mase dnevno) (EFSA, 2011). Doze antranilata, za koje je dokazano da poseduju antinociceptivnu aktivnost, ne dovode do značajnih oštećenja tkiva bubrega, jetre i želuca, već ispoljavaju hepato-, nefro- i gastroprotektivno dejstvo. S obzirom da izopropil- i metil-*N*-metilantranilati ispoljavaju niz farmakoloških aktivnosti, uključujući anksiolitičko, antidepresivno, antinociceptivno, gastroprotektivno dejstvo, i s obzirom da je njihova sinteza jeftina, oni bi mogli da predstavljaju potencijalnu alternativu u lečenju čira na želucu i/ili nove, bezbednije nesteroidne anti-inflamatorne lekove za terapiju bola. Gore navedenim činjenicama se može, barem delimično, opravdati etnofarmakološka primena biljne vrste *Choisya ternata*.

7. SUMMARY

The PhD thesis, entitled: "Secondary metabolites of *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae): isolation, synthesis, spectral characterization and biological activity", puts forward the results of GC and GC-MS analyses of the chemical composition of the essential oils obtained by hydrodistillation of fresh and dry leaves of *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae). The identity of two minor constituents, tentatively identified as isopropyl- and methyl *N*-methylantranilates, was confirmed by their synthesis and GC co-injection of the obtained standards. The synthesized compounds were spectrally characterized (1D- and 2D-NMR, GC-MS, FTIR, UV) in order to corroborate their structures. Based on the ethnopharmacology of *C. ternata*, the obtained synthetic samples and the essential oil were assayed for antimicrobial and antinociceptive activities. Moreover, anxiolytic and antidepressant, hepato-, gastro- and nephroprotective activities of the synthesized compounds were evaluated, as well as their metabolism (analyses of these compounds and their metabolites in the organs and urine of rats treated with the two anthranilic esters).

The following results were obtained:

Detailed GC and GC-MS analyses of the essential oil of *C. ternata* enabled the identification of 157 constituents. In contrast, the previously investigated leaf oil of *C. ternata* (Respaud et al., 1997) showed the presence of only 18 components. In the course of the identification procedure, a constituent was tentatively identified as isopropyl *N*-methylantranilate (IMA), according to the comparison of its MS with the MS from the available database. In order to corroborate this tentative identification, IMA was synthesized via the reduction of *in situ* generated imine of methyl anthranilate and formaldehyde, leading to methyl *N*-methylantranilate (MMA), also a constituent of the oil of *C. ternata*, which was then transesterified with a suitable alkoxide. The result of the GC co-injection experiment of the obtained standards of IMA and MMA with the essential oil sample of *C. ternata* confirmed the identity of the two compounds. Propyl *N*-methylantranilate (PMA) was also synthesized in an analogous manner. All of the synthesized compounds were spectrally characterized (1D- and 2D-NMR, GC-MS, FTIR, UV) that provided conclusive proof of their structure. IMA was therefore detected for the first time as a natural product, i.e. it represents a new secondary metabolite (protoalkaloid) from the Plant kingdom and it is named ternanthranin.

On the other hand MMA is a natural constituent found in a number of Rutaceae species. It is a part of our everyday diet as it naturally occurs in various fruits and plants and is used as a food flavor. Within foodstuff, it can react with nitrites, which are widely used as food preservatives, to form methyl *N*-methyl-*N*-nitrosoanthranilate (NO-MMA) and it can be nitrosated by nitrites present in the saliva, as well as by the ingestion of nitrite-rich foods. Due to a possible formation of NO-

MMA in food and the fact that food frequently undergoes thermal treatment, where thermolysis plays an important role, thermal degradation of NO-MMA was investigated. Methyl *N*-methyl-*N*-nitrosoanthranilate was prepared by a direct nitrosation of MMA. The identity of the synthesized compound was confirmed by NMR analysis. A GC-MS analysis of the product revealed that the compound undergoes complete thermal degradation under gas chromatographic conditions yielding a major unidentified coupling product and MMA. In an attempt to elucidate the structure of the formed degradation product, a preparative scale thermolysis of the nitroso compound was carried out. A chromatographic separation of the thermolysate, followed by GC-MS and NMR (and other spectral techniques) analyses enabled the identification of in total 46 different products. Among them a novel coupling product, methyl 5-methyl-6-oxo-(5*H*)-phenanthridine-4-carboxylate, was identified and fully spectrally characterized. Interestingly, the initially detected coupling product formed under GC conditions, tentatively identified as dimethyl 2,2'-(1,2-dimethylhydrazine-1,2-diyl)dibenzoate, was not detected in the thermolysate. A careful consideration of the structures of the identified thermolysate constituents led us to propose major thermolysis pathways of NO-MMA both in condensed and vapor phases. Generally, the identified products could be classified as those arising from fission of the N–NO bond or rather unexpectedly, the Ar–NNO bond, i.e. products related to anthranilic and benzoic acids, respectively. The latter represents a novel chemical transformation up to now unreported and unutilized. The structural diversity of the identified products and the noted marked differences between vapor and condensed phases point to the possible synthetic utility of thermolysis of carefully designed *N*-nitroso compounds.

Based on the ethnopharmacological usage in Mexico of *Choisya ternata*, we decided to investigate the antinociceptive activity of the essential oil and ethanol extract of leaves and volatile alkaloids of the leaves of *C. ternata*, IMA and MMA, as well as PMA. The results showed that the essential oil and the crude ethanol leaf extract of *C. ternata*, and all of the anthranilates, when given orally, produce significant antinociception. In the acetic acid-induced writhing assay MMA at 1 mg/kg was more potent than aspirin at 200 mg/kg, and all the anthranilates were, at 3 mg/kg, of a similar efficacy as morphine at 5 mg/kg in inhibiting the heat-induced nociceptive response. Another interesting result of this study was the fact that *p.o.* administration of the essential oil of the leaves of *C. ternata* exhibited one hundred times less potency when compared to IMA in preventing the acetic acid-induced pain. This fits nicely with the idea that the antinociceptive activity of the oil (that can roughly be regarded as a 100–1000 fold dilution of the anthranilates) is caused by the presence of the two anthranilates (the summed content of IMA and MMA is *ca.* 0.1%).

As IMA, MMA and PMA exhibited significant antinociceptive activity, we decided to investigate their antinociceptive properties in other models of nociception in mice, as well as the possible mechanism(s) of antinociception. Mice orally pre-treated with these compounds (at 0.3, 1

and 3 mg/kg) were less sensitive to chemical or thermal stimuli in different nociception models (formalin-, capsaicin- and glutamate-induced licking response, tail flick and hot plate tests). Pre-treatment of mice with antagonists and blockers revealed that the mechanism of action of the investigated esters seems to be unrelated to cholinergic and cannabinoid systems, but could involve, at least in part, an interaction with capsaicin-sensitive fibers and noradrenergic, nitrenergic, ATP-sensitive potassium channel, opioid and serotonergic systems. As IMA, MMA and PMA produced significant peripheral and central antinociception at doses lower than that of morphine, the classical opioid analgesic drug, without causing toxicity, these three compounds could be regarded as promising potential lead compounds for the development of new analgesic drugs.

The two natural esters of *N*-methylantranilic acid, present in *C. ternata* essential oil, IMA and MMA, were assayed for anxiolytic and antidepressant activity, and for the effect on the onset and duration of diazepam-induced sleep in mice. The volatile alkaloids (at 50–200 mg/kg, *i.p.*), without having a muscle relaxant effect, caused a significant increase in the time the animals spent in an unsecured and putatively dangerous area when compared with the control group, but had no effect on the number of crossings between the light/dark compartments. The administration of IMA and MMA produced, in a dose-dependent manner, a decrease of the immobility time of mice exposed to forced swimming and tail suspension tests, which was not due to an increase in locomotive activity. Additionally, these esters administered on their own did not induce sleep in mice but significantly prolonged the diazepam-induced sleep, in a dose-dependent manner, suggesting an interaction with the GABA receptor complex. In all of the performed tests, IMA and MMA scored comparative results indicating that the core of the *N*-methylantranilic acid is essential for the noted activities.

The potential hepato- and nephroprotective effects of IMA and MMA (at 200 mg/kg, *i.p.*, 7 days), was investigated in a rat model of acute intoxication with carbon tetrachloride (CCl₄) by tracking serum levels of liver and kidney damage markers, as well as by tracking changes in the liver and kidney morphology and function. Both volatile alkaloids, showed hepatoprotective potential in the model of CCl₄-induced liver damage, while only MMA exhibited a nephroprotective potential in the same model of kidney damage in rats. The influence of IMA and MMA on the gastric mucosa integrity was assessed by its oral administration in doses of 200 mg/kg, while their gastroprotective action in doses of 50, 100 and 200 mg/kg was analyzed in the diclofenac- (nonsteroidal anti-inflammatory drug) and ethanol-induced gastric lesion models in rats. The oral application of these compounds on their own, even in quite high doses (200mg/kg), did not induce gastric lesions, while both alkaloids exhibited significant anti-ulcer activity, even at 50 mg/kg. In order to establish a mechanism of gastro-, nephro- and hepatoprotective activities, the antioxidant activity of the two anthranilate esters was assayed, however, they did not exhibit a significant antioxidant potential. Also, the antimicrobial activity of the two mentioned esters, as well as of the essential oil, was tested.

It has been shown that MMA possesses a higher antimicrobial potential and that both anthranilates exhibit selective antifungal activity.

Analyses of IMA and MMA, and their metabolites, in the urine and organs of rats pretreated with these substances were performed. A diethyl-ether extract of the urine of rats treated with IMA (200 mg/kg, *i.p.*, 7 days) was subjected to Sephadex LH-20 column chromatography and the obtained fractions were analyzed by NMR, GC-MS, FTIR and UV methods. The principal components were products of hydroxylation (isopropyl 5-hydroxy-*N*-methylantranilate, isopropyl 5-hydroxy-antranilate and isopropyl 3-hydroxy-antranilate). GC-MS analyses of the urine of rats treated with MMA (200 mg/kg, *i.p.*, 7 days) revealed 2 major metabolites: 2-(methylamino)benzamide, a product of amonolysis, and *N*-methylantranilic acid, a product of hydrolysis of the ester group. The fact that IMA and MMA were detected in the urine, indicates that these two compounds are not completely metabolized in the rat organism and that they are partially excreted, non-metabolized, via urine.

The diethyl-ether extract of the homogenates of the organs (liver, kidney, heart, lungs, thigh muscle, spleen and serum) of the rats treated with IMA and MMA were analyzed by GC-MS. The greatest number of metabolites of both *N*-methylantranilic acid esters was found in the liver and in both cases *N*-methylantranilic acid was the predominant metabolite. It was concluded that the hydrolysis of the esters of *N*-methylantranilic acid occurs in the liver, that the product of hydrolysis are excreted via urine, and that the hydrolysis of the ester of *N*-methylantranilic acid and the more bulky isopropyl alcohol is slower than the hydrolysis of MMA. In the case of the urine of rats pretreated with IMA, the hydroxy-derivatives of the administered ester were predominant in comparison with the urine of rats pretreated with methyl *N*-methylantranilate. One could conclude that in the case of the isopropyl ester of *N*-methylantranilic acid, the predominant metabolic pathway is hydroxylation, while in the case of the methyl ester the principal pathway is the hydrolysis of the ester functional group.

Toxic effects of IMA and MMA in rats were not observed. The amount of the administered substances was 10 000 times greater than the allowed/recommended daily intake of MMA (0.2 mg/kg bw) and around 2 million times higher than the average daily intake of this compound in Europe (1 µg/kg bw) (EFSA, 2011). The doses of anthranilates, that exhibited antinociceptive activity, did not induce liver, kidney and stomach damage, but exhibited hepato-, nephro- and gastroprotective activities. Since IMA and MMA exhibit a number of important and interesting pharmacological activities, including antinociceptive, anxiolytic, antidepressant, gastro-, nephro- and hepatoprotective activities, and since there is a non-expensive synthetic route for their preparation, MMA and IMA, both alike, might represent a cost effective alternative sought for the peptic ulcers treatment and/or new safer nonsteroidal anti-inflammatory drugs for pain management. The before mentioned facts support, at least partially, the ethnomedicinal uses of *C. ternata*.

8. LITERATURA

- Aanonsen, L. M., Wilcox, G. L. (1989). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 248 (3), 1034-1038.
- Abraham, P., Wilfred, G., Cathrine, S. P. (1999). *Clin. Chim. Acta*, 289 (1-2), 177-179.
- Aceto, M. D., Harris, L. S., Bowman, E. R. (1997). *Eur. J. Pharmacol.*, 338 (3), 215-223.
- Adams, R. P. (2007). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry (4th Edition)*. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA.
- Afrah, A. W., Stiller, C. O., Olgart, L., Brodin, E., Gustafsson, H. (2001). *Neurosci. Lett.*, 316 (2), 83-86.
- Ahamad, F. F., Cowan, D. L., Sun, A. Y. (1987). *Life Sci.*, 41 (22), 2469-2475.
- Al-Sowayan, N. S., Mousa, H. M. (2014). *Life Sci. J.*, 11 (5), 238-242.
- Anonymous. (1979). *Patent No. 4135050*. US.
- Arakaki, N., Wakamura, S., Yasui, H., Sadoyama, Y., Kishita, M. (2003). *Chemoecology*, 13(4), 183-186.
- Archer, J. (1973). *Anim. Behav.*, 21 (2), 205-235.
- Ardakani, M. A., Smalley, R. K., Smith, R. H. (1983). *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 10, 2501-2506.
- Asakawa, H., Fukushima, Y., Imamiya, E., Kawamatsu, Y. (1979). *Chem. Pharm. Bull.*, 27 (2), 522-527.
- Attal, N., Fermanian, C., Fermanian, J., Lanteri-Minet, M., Alchaar, H., Bouhassira, D. (2008). *Pain*, 138 (2), 343-53.
- Avery, M. L., Tillman, E. A., Laukert, C. C. (2001). *Int. J. Pest Manage.*, 47 (4), 311-314.
- Awaad, A. S., El-Meligya, R. M., Soliman, G. A. (2013). *J. Saudi Chem. Soc.*, 17 (1), 101-124.
- Bagetta, G., Morrone, L. A., Rombola, L., Amantea, D., Russo, R., Berliocchi, L., Sakurada, S., Sakurada, T., Rotiroti, D., Corasaniti, M. T. (2010). *Fitoterapia*, 81 (6), 453-461.
- Bakke, J., Heikman, H., Nystrom, G. (1972). *Acta. Chem. Scand.*, 26 (1), 355-364.
- Bamberger, E., Elger, F. (1903). *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 36 (3), 3645-3658.
- Bamberger, E., Pyman, F. L. (1909). *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 42 (2), 2297-2330.
- Barros, H. M. T., Tannhauser, M. A. L., Tannhauser, S. L., Tannhauser, M. (1991). *J. Pharmacol. Methods*, 26 (4) 269-275.
- BASF. (1890). *Patent No. 55988*. DE.
- BASF. (1900). *Patent No. 127178*. DE.
- Baumert, A., Hieke, M., Groger, D. (1983). *Planta Med.*, 48 (8), 258-262.

- Baumert, A., Kuzovkina, I. N., Groger, D. (1985). *Planta Med.*, 51 (2), 125-127.
- Baumert, A., Creche, J., Rideau, M., Chenieux, J. C., Groger, D. (1990). *Plant Physiol. Bioch.*, 28 (5), 587-592.
- Bayer, R. J., Maberley, D. J., Morton, C., Miller, C. H., Sharma, I. K., Pfeil, B. E., Rich, S., Hitchcock, R., Sykes, S. (2009). *Am. J. Bot.*, 96 (3), 668-685.
- Beirith, A., Santos, A. R. S., Calixto, J. B. (2002). *Brain Res.*, 924 (2), 219-228.
- Bem-Bassat, J., Perets, E., Sulman, F. G. (1959). *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 122, 434-447.
- Berezhinskaya, V. V. (1979). *Postep. dziednie. Leku. Rosl. Pr. Ref. Dosw. Wygloszone Symp.*, 164-171.
- Berezhinskaya, V. V., Trutneva, E. A. (1959). *Farmakologiya i Toksikologiya (Moscow)*, 22, 117-122.
- Bertelli, A. A. E., Migliori, M., Panichi, V., Origlia, N., Filippi, C., Das, K., Giovannini L. (2002). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 957, 230-238.
- Bertini, V., Buffoni, F., Ignesti, G., Picci, N., Trombino, S., Iemma, F., Alfei, S., Pucci, M., Lucchesini, F., De Munno, A. (2005). *J. Med. Chem.*, 48 (3), 664-670.
- Beserra, A. M., Calegari, P. I., Souza Mdo, C., Dos Santos, R. A., Lima, J. C., Silva, R. M., Balogun, S. O., Martins, D. T. (2011). *J. Agric. Food Chem.*, 59 (13), 6957-6965.
- Blach, C. W. (1953). *Patent No. 2653971*. US.
- Blank, R. C. (1996). *Am. J. Kidney Dis.*, 28 (1 Suppl 1), S3-S6.
- Bohlmann, F., Franke, H., Zdero, C. (1972). *An. Quim.*, 68, 765-767.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., Berset, C. (1997). *Wiss. Technol.*, 30 (6), 609-615.
- Bonetti, E. (1982). *Psychoph. (Berl.)*, 78 (1), 8-18.
- Borsini, F., Meli, A. (1988). *Psychoph.*, 94 (2), 147-160.
- Botting, N. P. (1995). *Chem. Soc. Rev.*, 24 (6), 401-412.
- Boudoresque, B. (1895). *Du Choisya ternata. Contribution à l'étude des Zanthoxylées*. Thèse Doct. Pharm., Univ. Montpellier.
- Bourin, M. (1990). *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 4 (1), 49-64.
- Bourin, M., Fiocco, A. J., Clenet, F. (2001). *Hum. Psychopharmacol.*, 16 (1), 9-21.
- Bourne, E. J. (2010). *The Anxiety and Phobia Workbook (5th Edition)*. New Harbinger Publications, Oakland, CA, USA.
- Boyd, D. R., Sharma, N. D., Loke, P. L., Malone, J. F., McRoberts, W. C., Hamilton, J. T. (2007). *Org. Biomol. Chem.*, 5 (18), 2983-2991.
- Boyland, E., Sims, P. (1954). *J. Chem. Soc.*, 980-985.

- Branch, C. S., Lewinski, J., Justyniak, I., Bott, S. G., Lipkowski, J., Barron, A. R. (2001). *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 8, 1253-1258.
- Brand-Williams, W., Cuvellier, M. E., Berset, C. (1995). *LWT-Food Sci. Technol.*, 28 (1), 25-30.
- Brent, J. A., Rumack, B. H. (1993). *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 31 (1), 173-196.
- Brito, G. A. C., Sachs, D., Cunha, F. Q., Vale, M. I., Lotufo, C. M. C., Ferreira, S. H., Ribeiro, R. A. (2006). *Eur. J. Neurosci.*, 24 (4), 1175-1181.
- Brophy, J. J., Goldsack, R. J., Forster, P. I. (2001). *J. Essent. Oil Res.*, 13 (4), 264-268.
- Budai, D., Wilcox, G. L., Larson, A. A. (1995). *Eur. J. Pharmacol.*, 278 (1), 39-47.
- Cairns, D. (2008). *Essentials of Pharmaceutical Chemistry (3rd Edition)*. Pharmaceutical Press, London, UK.
- Calixto, J. B., Beirith, A., Ferreira, J., Santos, A. R., Filho, V. C., Yunes, R. A. (2000). *Phytother. Res.* 14 (6), 401-418.
- Calvarano, M. (1966). *Essenze, Derivati Agrumari*, 36, 237-255.
- Carlini, E. A. (2003). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75 (3), 501-512.
- Carlton, S. M. (2001). *Curr. Opin. Pharmacol.*, 1 (1), 52-56.
- Carlson, N. R. (2009). *Physiology of Behavior (10th Edition)*. Pearsons, London, UK.
- Castro, J. A., De Ferreyra, E. C., De Castro, C. R., De Fenos, O. M., Sasame, H., Gillette, J. R. (1974). *Biochem. Pharmacol.*, 23 (2), 295-302.
- Chambers, A. H., Evans, S. A., Folta, K. M. (2013). *J. Agric. Food Chem.*, 61 (51), 12625-12633.
- Chapman, S., Stephen, H. (1925). *J. Chem. Soc.*, 127, 1791-1797.
- Chaudiere, J., Ferrari-Iliou, R. (1999). *Food Chem. Toxicol.*, 37 (9-10), 949-962.
- Chavez-Morales, R. M., Jaramillo-Juarez, F., Posadas del Rio, F. A., Reyes-Romero, M. A., Rodriguez-Vazquez, M. L., Martinez-Saldana, M. C. (2011). *Hum. Exp. Toxicol.*, 30 (3), 209-216.
- Chen, S. R., Pan, H. M., Richardson, T. E., Pan, H. L. (2007). *Neuropharmacology*, 52 (8), 1624-1630.
- Chen, Z., Fu, R., Chai, W., Zheng, H., Sun, L., Lu, Q., Yuan, R. (2014). *Tetrahedron*, 70 (13), 2237-2245.
- Cheng, Y.-S., Chao, Y.-L. (1979). *International Congress of Essential Oils*, 7 (7), 467-469.
- Chenieux, J. C., Maupas, P., Rideau, M., Verchere, C., Viel, C. (1976). *Sci. Natur.*, 283 (1), 101-104.
- Chenieux, J. C., Rideau, M., Sejourne, M. (1978). *Plant. Med. Phytother.*, 12, 327-340.

- Clark, L., Shah, P. S., Mason, J., Russell, J. (1991). *J. Exp. Zool.*, 260 (3), 310-322.
- Clerc, D., Simon, S. (1982). *Tablice za određivanje strukture organskih spojeva spektroskopskim metodama*. SKTH/"Kemija u industriji", Zagreb, CRO.
- Coppola, G. M. (1980). *Synthesis*, 7, 505-536.
- Costall, B., Jones, B. J., Kelly, M. E., Naylor, R. J., Tomkins, D. M. (1989). *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 32 (3), 777-785.
- Cotran, R. S., Kumar, V., Robbins S. L. (1989). *Robbins' Pathologic Basis of Disease (4th Edition)*. Saunders, Philadelphia, USA.
- Council of Europe. (2000). *Partial Agreement in the Social and Public Health Field. Chemically-defined flavouring substances. Group 9.5.9 Esters of aromatic acids. N-Methylantranilates*. Council of Europe Publishing, Strasbourg, FR.
- Cragg, G. M., Newman, D. J., Snader, K. M. (1997). *J. Nat. Prod.*, 60 (1), 52-60.
- Crawley, J. N., Goodwin, F. K. (1980). *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 13 (2), 167-170.
- Creche, J., Guiller, J., Andreu, F., Gras, M., Chenieux, J. C., Rideau, M. (1987). *Phytochemistry*, 26 (7), 1947-1953.
- Creche, J., Tremouillaux-Guiller, J., Groeger, D., Chenieux, J. C., Rideau, M. (1993). *Choisya ternata* (Mexican orange): *In vitro* culture and the production of alkaloids. In: Bajaj, Y. P. S. (Ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 24 (Medicinal and Aromatic Plants V)*. Springer-Verlag, Berlin, DE.
- Rechnagel, R. O., Glende, E. A. Jr. (1973). *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 2 (3), 263-297.
- Crocenzi, F. A., Sanchez Pozzi, E. J., Pellegrino, J. M., Rodriguez Garay, E. A., Mottino, A. D., Roma, M. G., (2003). *Biochem. Pharmacol.*, 66 (2), 355-364.
- Cryan, J. F., Valentino, R. J., Lucki, I. (2005). *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 29 (4-5), 547-569.
- Curtis, P. D., Merwin, I. A., Pritts, M. P., Peterson, D. V. (1994). *Hortic. Sci.*, 29 (10), 1151-1155.
- Da Silva, M., Menezes, C. M., Ferreira, E. I., Leite, C. Q., Sato, D. N., Correia, C. C., Pimenta, C. P., Botelho, K. C. (2008). *Chem. Biol. Drug. Des.*, 71 (2), 167-172.
- Da Silva, R. A., Estevam, I. H., Bieber, L. W. (2007). *Tetrahedron Lett.*, 48 (43), 7680-7682.
- Dahl, A. R., Hadley, W. M. (1983). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 67 (2), 200-205.
- D'Ans, J., Kneip, A. (1915). *Ber.*, 48, 1136-1146.
- Detoni, C. B., Cabral-Albuquerque, E. C., Hohlemweger, S. V., Sampaio, C., Barros, T. F., Velozo, E. S. (2009). *J. Microencapsul.*, 26 (8), 684-691.
- Dev, U., Devakumar, C., Mohan, J., Agarwal, P. (2004). *J. Essent. Oil Res.*, 16 (5), 496-499.

- Dewkar, G. K., Nikalje, M. D., Ali, I. S., Paraskar, A. S., Jagtap, H. S., Sudlai, A. (2001). *Angew. Chem.*, 40 (2), 405-408.
- DiMichele, L., Menzel, K., Mills, P., Frantz, D., Nelson, T. (2006). *Magn. Reson. Chem.*, 44 (11), 1041-1043.
- Dobetsberger, C., Buchbauer, G. (2011). *Flavour. Frag. J.*, 26 (5), 300-316.
- Douglas, A. W., Shapiro, M. (1980). *Org. Magn. Resonance*, 14 (1), 38-39.
- Doyle, M. P., Siegfried, B., Dellaria, J. F. (1977). *J. Org. Chem.*, 42 (14), 2426-2431.
- Dreyer, D. L., Pieckering, M. V., Cohan, P. (1972). *Phytochemistry*, 11, 705.
- Dreyer, D. L., Brenner, R. C. (1980). *Phytochem.* 19, 935-939.
- Duke, J. A. (1990). Promising phytomedicinals. In: Janick, J., Simon J. E. (Eds.). *Advances in New Crops*. Timber Press, Portland, OR, USA.
- Dyke, S. F., Marshall, A. R., Watson, J. P. (1966). *Tetrahedron*, 22, 2515-2521.
- EFSA. (2011). *EFSA J.*, 9 (12), 2441.
- Eichholzer, M., Gutzwiller, F. (1998). *Nutr. Rev.*, 56 (4 Pt 1), 95-105.
- Eller, W., Klemm, L. (1922). *Ber.*, 55B, 217-224.
- Endicott, M. M., Alden, B. W., Sherrill, M. L. (1946). *J. Am. Chem. Soc.*, 68, 1303-1304.
- Engeman, R. M., Peterla, J., Constantin, B. (2002). *Int. Biodeter. Biodegr.*, 49 (2-3), 175-178.
- Eom, S. H., Yang, H. D., Weston, L. A. (2006). *J. Chem. Ecol.*, 32 (8), 1835-1848.
- Esaki, H., Onozaki, H., Kawakishi, S., Osawa, T. (1996). *J. Agric. Food Chem.*, 44 (3), 696-700.
- Estrada, E., Molina, E. J. (2006). *Mol. Graphics Modell.*, 25 (3), 275-288.
- Fadhel, Z. A., Amran, S. (2002). *Phytother. Res.*, 16 (Suppl 1), S28-32.
- Fairbanks, C. A., Stone, L. S., Kitto, K. F., Nguyen, H. O., Posthumus, I. J., Wilcox, G. L. (2002). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 300 (1), 282-290.
- Fanciullino, A.-L., Tomi, F., Luro, F., Desjobert, J. M., Casanova, J. (2006). *Flavour Frag. J.*, 21 (2), 359-367.
- Faulhaber, S., Hener, U., Mosandl, A. (1997). *J. Agric. Food Chem.*, 45 (7), 2579-2583.
- Feng, S., ElSohly, M. A., Duckworth, D. T. (2001). *J. Anal. Toxicol.*, 25 (7), 589-93.
- Figueiredo, G. S. M., Zardo, R. S., Silva, B. V., Violante, F. A., Pinto, A. C., Fernandes, P. D. (2013). *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 103 (3), 431-439.
- Foti, M. C., Daquino, C., Mackie, I. D., DiLabio, G., Ingold, K. U. (2008). *J. Org. Chem.*, 73 (23), 9270-9282.
- Ozgen, M., Reese, R. N., Tulio, A. Z., Scheerens, J. C., Miller, A. R. (2006). *J. Agric. Food Chem.*, 54 (4), 1151-1157.

- Frolova, V. I., Ban'kovski, A. I., Volynskaya, M. B. (1958). *Med. Prom.* 555R, 7, 35-40.
- Frolova, V. I., Kuzovhov, A. D. (1963). *Zh. Obshch. Khim.*, 33, 121-125.
- Furnis, B. S., Hannaford, A. J., Smith, P. W., Tatchell, A. R. (1989). *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry (5th Edition)*. Longman Scientific & Technical, Harlow, UK.
- Gangolli, S. D., Shilling, W. H. (1968). *Hydrolysis of esters by artificial gastric and pancreatic juices*. Unpublished report No. 11/1968 (Submitted to WHO by FEMA).
- Garestier, R., Rideau, M. (1972). *Sc. Nat.*, 274 (25), 3541-3544.
- Geuther, A. (1863). *Liebigs Ann. Chem.*, 128 (2), 151-156.
- Giordano, J. (2005). *Pain Physician.*, 8 (3), 277-290.
- Glavin, G. B., Szabo, S. (1992). *FASEB J.*, 6 (3), 825-831.
- Godoy, M. C. M., Figuera, M. R., Flores, A. E., Rubin, M. A., Oliveira, M. R., Zanatta, N., Martins, M. A. P., Bonacorso, H. G., Mello, C. F. (2004). *Eur. J. Pharmacol.*, 496 (1-3), 93-97.
- Goldberg, I. (1906). *Ber.*, 39, 1691-1692.
- Gomes, N. M., Rezende, C. M., Fontes, S. P., Matheus, M. E., Fernandes, P. D. (2007). *J. Ethnopharmacol.*, 109 (3), 486-492.
- Goodwin, R. D., Stein, M. B. (2002). *Psychosom. Med.*, 64 (6), 862-866.
- Gras, M. (1983). *Contribution à l'étude de la variabilité de cultures de tissus végétaux. Etudes comparative ultrastructurale et biochimique de souches établies, hétérotrophes et photoautotrophes issues d'un même génotype de Choisya ternata HBK (Rutaceae)*. Thèse Doct. 3^{ème} cycle, Pharmacochimie, Univ. Tours.
- Gray, A. (1888). *Proc. Am. Acad.*, 23, 223-227.
- Groger, D. (1984). *Stud. Org. Chem.*, 18, 165-190.
- Grundon, M. F., Harrison, D. M., Syropoulos, C. G. (1974a). *J. Chem. Soc. Perkin I: Org. Bioorg. Chem.*, 19, 2181-2184.
- Grundon, M. F., Harrison, D. M., Spyropoulos, C. G. (1974b). *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 2, 51-52.
- Grundschober, F. (1977). *Toxicology*, 8 (3), 387-390.
- Gulcin, I., Oktay, M., Kirecci, E., Kufrevioglu, O. I. (2003). *Food Chem.*, 83 (3), 371-382.
- Han, P., Zhou, J., Zhang, C.-C., Chen, K., Du, Z.-T. (2014). *Heterocycles*, 89 (9), 2151-2160.
- Hara, O., Sugimoto, K., Hamada, Y. (2004). *Tetrahedron*, 60 (42), 9381-9390.
- Harris, W. F., Sweet, T. R. (1956). *J. Phys. Chem.*, 60, 509-510.
- Hascoet, M., Bourin, M. (1998). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 60 (3), 645-653.
- Heberger, K., Kowalska, T. (1998). *Chromatographia*, 48 (1), 89-94.

- Hecker, G., Ney, P., Schror, K. (1990). *N.-S. Arch. Pharmacol.*, 341 (4), 308-315.
- Heindel, N. D., Lemke, T. F., Lemke, S. M., Fish, V. B. (1968). *J. Med. Chem.*, 11 (2), 369-370.
- Hentall, I. D., Mesigil, R., Pinzon, A., Noga, B. R. (2003). *J. Neurophysiol.*, 89 (6), 2943-2951.
- Hermenean, A., Ardelean, A., Stan, M., Herman, H., Mihali, C.V., Costache, M., Dinischiotu, A. (2013). *Chem. Biol. Interact.*, 205 (2), 138-147.
- Heumann, K. (1890). *Ber.*, 23, 3431-3435.
- Heymann, E. (1980). Carboxylesterases and amidases. In: Jakoby, W. B. (Ed.). *Enzymatic Basis of Detoxication, Vol II (2nd Edition)*. Academic Press, New York, USA.
- Hinsberger, S., Husecken, K., Groh, M., Negri, M., Hauptenthal, J., Hartmann, R. W. (2013). *J. Med. Chem.*, 56 (21), 8332-8338.
- Honkanen, E., Moisio, T., Karvonen, P. (1969). *Suom. Kemistilehti, B* 42, 448-451.
- Huang, S. T., Hsei, I. J., Chen, C. (2006). *Bioorg. Med. Chem.*, 14 (17), 6106-6119.
- Hunskar, S., Hole, K. (1987). *Pain*, 30 (1), 103-114.
- Ihrig, A. M., Marshall, J. L. (1972). *J. Am. Chem. Soc.*, 94 (9), 3268-3269.
- Imai, F., Itoh, K., Kishibuchi, N., Kinoshita, T., Sankawa, U. (1989). *Chem. Pharm. Bull.*, 37 (1), 119-123.
- Imai, T., Maekawa, M., Murai, T. (2001). *Appl. Entomol. Zool.*, 36 (4), 475-478.
- Ito, Y., Sugimoto, A., Kakuda, T., Kubota, K. (2002). *J. Agric. Food Chem.*, 50 (17), 4878-4884.
- Jadrijević-Mladar Takac, M., Vikić Topić, D. (2004). *Acta Pharm.*, 54 (3), 177-191.
- Jabalpurwala, F. A., Smoot, J. M., Rouseff, R. L., Russell, L. (2009). *Phytochemistry*, 70 (11-12), 1428-1434.
- Jaffe, E. E. (2002). Quinacridone pigments. In: Smith, H. M. (Ed.). *High Performance Pigments*. Wiley-VCH, Weinheim, DE.
- Jancso, G. (1978). *Cell Tissue Res.*, 195 (1), 145-152.
- Jaramillo-Juarez, F., Rodriguez-Vazquez, M. L., Rincon-Sanchez, A. R., Consolacion Martinez, M., Ortiz, G. G., Llamas, J., Anibal Posadas, F., Reyes, J. L. (2008). *Ann. Hepatol.*, 7 (4), 331-338.
- Jensen, T. S., Baron, R., Haanpaa, M., Kalso, E., Loeser, J. D., Rice, A. S., Treede, R. D. (2011). *Pain*, 152 (10), 2204-2205.
- Johns, S. R., Lamberton, J. A., Sioumis, A. A. (1967). *Aust. J. Chem.*, 20 (9), 1975-1981.
- Jones, S. L. (1996). *Eur. J. Pharmacol.*, 318 (1), 37-40.
- Julius, D., Basbaum, A. (2001). *Nature*, 413, 203-210.

- Kaiser, R. (1988). New volatile constituents of *Jasminum sambac* (L.) Aiton. In: Lawrence, B. M., Mookherjee, B. D., Willis, B. J. (Eds.). *Flavors and Fragrances: A World Perspective. Proceedings of the 10th International Congress Essential Oils*. Elsevier B. V., Amsterdam, NL.
- Kaiser, R. (1991). *J. Essent. Oil Res.*, 3 (3), 129-146.
- Kamochi, Y., Kudo, T. (1993). *Chem. Lett.*, 9, 1495-1498.
- Kamochi, Y., Kudo, T. (1994a). *Chem. Pharm. Bull.*, 42 (2), 402-404.
- Kamochi, Y., Kudo, T. (1994b). *Reviews on Heteroatom Chemistry*, 11, 165-190.
- Kappe, T., Stadlbauer, W. (1981). *Adv. Heterocycl. Chem.*, 28, 127-182.
- Karabatsos, G. J., Taller, R. A. (1968). *Tetrahedron*, 24 (8), 3347-3360.
- Karunakaran, C., Kamalam, R. (2002). *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II*, 12, 2011-2018.
- Khan, R. A., Khan, M. R., Sahreen, S., Bokhari, J. (2010). *Food Chem. Toxicol.*, 48 (8-9), 2469-2476.
- Klein-Junior, L. C., Gandolfi, R. B., Santin, J. R., Lemos, M., Cechinel Filho, V., Andrade, S. F. (2010). *N.-S. Arch. Pharmacol.*, 381 (2), 121-126.
- Knaggs, A. R. (2001). *Nat. Prod. Rep.*, 18, 334-355.
- Knudsen, J. T., Tollsten, L., Bergstroem, L. G. (1993). *Phytochemistry*, 33 (2), 253-280.
- Koe, B. K., Weissman, A. (1966). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 154 (3), 499-516.
- Kovalenko, V. N. (1946). *Farmatsiya*, 9, 20.
- Krzyzak, E., Szczesniak-Siega, B., Malinka, W. (2014). *J. Therm. Anal. Calorim.*, 115 (1), 793-802.
- Kuan, R., Holt, R. J., Johnson, K. E., Kent, J. D., Peura, D. A., Malone, D. (2013). *Clin. Ther.*, 35 (3), 321-332.
- Kumar, P., Chilton, W. S. (1994). *Tetrahedron Lett.*, 35 (20), 3247-3250.
- Kundu, N., Khan, W. (2000). *Tetrahedron*, 56 (27), 4777-4792.
- Kunz, K., Scholz, U., Ganzer, D. (2003). *Synlett.*, 15, 2428-2439.
- Kutyandin, L. I., Kuznetsov, A. A., Poddubnyi, I. S., Kulikova, O. A., Gura, L. N., Mil'gotin, I. M., Sergeev S.A. (2002). *Method of synthesis of anthranilic acid*, In: RU 2187496, CA 139:22498; (Volgogradskoe Otkrytoe Aktsionernoe Obschestvo).
- Landaverde, N. A., Juarez-Flores, B. I., Jimenez-Capdeville, M. E., OrtizPerez, M. D. (2009). *J. Med. Plants Res.* 3 (10), 791-798.
- Langguth, S. (1905). *Ber.*, 38, 2062-2064.

- Leegwater, D. C., van Straten, S. (1974a). In vitro *study on the hydrolysis of twenty-six organic esters by pancreatin*. Unpublished report from Naarden International, Centraal Instituut Voor Voedingsonderzoek TNO, Zeist, NL.
- Leegwater, D. C., van Straten, S. (1974b). In vitro *study on the hydrolysis of eight carboxylic esters by intestinal and liver enzymes*. Unpublished report from Naarden International, Centraal Instituut Voor Voedingsonderzoek TNO, Zeist, NL.
- Lee, P. Y., Mccay, P. B., Hornbrook, K. R. (1982). *Biochem. Pharmacol.*, 31 (3), 405-409.
- Lemos, M., Santin, J. R., Junior, L. C., Niero, R., Andrade, S. F. (2011). *J. Ethnopharmacol.*, 138 (2), 503-507.
- Li, J. J., Corey, E. J. (2007). *Name Reactions of Functional Group Transformations*. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Li, X., Eisenach, J. C. (2001). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 299 (3), 939-944.
- Lijinsky, W. (1992). *Chemistry and Biology of N-Nitroso Compounds (Cambridge Monographs on Cancer Research)*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Lijinsky, W., Epstein, S. S. (1970). *Nature*, 225, 21-23.
- Lin, J. K., Wang, C. J. (1986). *Carcinogenesis*, 7 (4), 595-599.
- Lincke, G. (1999). *Dyes and Pigm.*, 44 (2), 101-122.
- Lindley, J. (1984). *Tetrahedron*, 40 (9), 1433-1456.
- Liu, Y., Fu, X., Gou, L., Li, S., Lan, N., Zheng, Y., Yin, X. (2013). *Ren. Fail.*, 35 (3), 367-373.
- Loepky, R. N., Michejda, C. J. (1994). *Nitrosamines and Related N-Nitroso Compounds. Chemistry and Biochemistry*. ACS Symposium Series, Vol. 553, American Chemical Society, Washington, DC, USA.
- Loeser, J. D., Treede, R. D. (2008). *Pain*, 137 (3), 473-477.
- Longland, R. C., Shilling, W. H., Gangolli, S. D. (1977). *Toxicology*, 8 (2), 197-204.
- Loh, Y. H., Jakszyn, P., Luben, R. N., Mulligan, A. A., Mitrou, P. N., Khaw, K. T. (2011). *Am. J. Clin. Nutr.*, 93 (5), 1053-1061.
- Lorenzetti, B. B., Ferreira, S. H. (1996). *Inflamm. Res.*, 45 (6), 308-311.
- Lorke, D. (1983). *Arch. Toxicol.*, 54 (4), 275-287.
- Lota, M.-L., de Rocca Serra, D., Tomi, F., Casanova, J. (2000). *Biochem. Syst. Ecol.*, 28 (1), 61-78.
- Maity, B., Chattopadhyay, S. (2008). *Curr. Bioact. Compd.*, 4 (4), 225-244.
- Mani, V., Ramasamy, K., Majeed, A. B. A. (2013). *Food Funct.*, 4 (4), 557-567.
- Marchand, F., Perretti, M., McMahon, S. B. (2005). *Nat. Rev. Neurosci.*, 6 (7), 521-532.

- Massa, M. M., Robacker, D. C., Patt, J. (2008). *Fla. Entomol.*, 91 (2), 266-276.
- Matheus, M. E., Berrondo, L. F., Vieitas, E. C., Menezes, F. S., Fernandes, P. D. (2005). *J. Ethnopharmacol.*, 102 (3), 377-381.
- Matthews, J. N. S., Altman, D. G., Campbell, M. J., Royston, P. (1990). *Br. Med. J.*, 300 (6719), 230-235.
- Matzo, M., Sherman, D.W. (2010). *Palliative Care Nursing: Quality Care to the End of Life (3rd Edition)*. Springer Publishing Company, New York, USA.
- Medvedeva, Y. V., Kim, M. S., Usachev, Y. M. (2008). *J. Neurosci.*, 28 (20), 5295-5311.
- Meisenheimer, J., Zimmerman, P., Kummer, U. (1926). *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 446, 205-228.
- Merskey, H., Bogduk, N. (1994). *Classification of Chronic Pain (2nd Edition)*. International Association for the Study of Pain, Seattle, USA.
- Meyer, K. H. (1940). *Helv. Chim. Acta*, 23, 93-100.
- Millan, M. J. (1999). *Prog. Neurobiol.*, 57 (1), 1-164.
- Millan, M. J. (2002). *Prog. Neurobiol.*, 66 (6), 355-474.
- Milosavljević, S. M. (1994). *Strukturne metode instrumentalne analize*. Hemijski fakultet, Beograd, Srbija.
- Mirvish, S. S. (1995). *Cancer Lett.*, 93 (1), 17-48.
- Mirvish, S. S. (1975). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 31 (3), 325-351.
- Moio, L., Etievant, P. X. (1995). *Am. J. Enol. Viticul.*, 46 (3), 392-398.
- Moldoveanu, S. C. (2009). *Pyrolysis of Organic Molecules: Applications to Health and Environmental Issues (Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry) (1st Edition)*. Elsevier, Oxford, UK.
- Montagu, M., Levillain, P., Chenieux, J. C., Rideau, M. (1985). *J. Chromatogr.*, 331 (2), 437-444.
- Morgareidge, K. (1963). *Metabolic fate of methyl N-methyl anthranilate*. Unpublished report No. 84919 from Food and Drug Research Laboratories, New York, USA. Submitted to WHO by the Flavor and Extract Manufacturers Association of the United States, Washington DC, USA.
- Moroni, F. (1999). *Eur. J. Pharmacol.*, 375 (1-3), 87-100.
- Muller, C. H. (1940). *Am. Midl. Nat.*, 24, 729-742.
- Murao, S. (1986). *Kagaku to Seibutsu*, 24, 215-216.
- Murota, K. (2003). *Arch. Biochem. Biophys.*, 417 (1), 12-17.

- Naito, J., Sasaki, E., Ohta, Y., Shinohara, R., Ishiguro, I. (1984). *Biochem Pharmacol.*, 33 (20), 3195-3200.
- Nelson, D., Cox, M. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry (3rd Edition)*. Worth Publishers, New York, USA.
- Newman, D. J., Cragg, G. M. (2007). *J. Nat. Prod.*, 70 (3), 461-477.
- Nidiray, E. S. J., Babu, C. (2005). *Phytother. Res.*, 19 (5), 447-449.
- Niles, A. N., Dour, H. J., Stanton, A. L., Roy-Byrne, P. P., Stein, M. B., Sullivan, G., Craske, M. G. (2015). *J. Psychosom. Res.*, 78 (2), 109-115.
- Niv, D., Kreitler, S. (2001). *Pain Pract.*, 1 (2), 150-161.
- Scanlan, R. A., Tannenbaum, S. R. (Eds.) (1981). *N-Nitroso Compounds*. ACS Symposium, Vol. 174. American Chemical Society, Washington DC, USA.
- Nyquist, R. A. (2001). *Interpreting infrared, Raman, and nuclear magnetic resonance spectra, Volume 1, Variables in data interpretation of infrared and Raman spectra*. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Obi, F. O., Omogbai, L. A., Oriafio, O. S. J., Ovat, O. D. (2001). *J. Appl. Sci. Environ. Mgt.*, 5(1), 5-8.
- O'Donnell, F., Ramachandran, V. N., Smyth, W. F., Hack, C. J., Patton, E. (2006). *Anal. Chim. Acta*, 572 (1), 63-76.
- Ohba, M., Hayashi, H. (1979). *J. Biochem.*, 85 (5), 1331-1338.
- Okawa, T., Eguichi, S., Kakehi, A. (1996). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 3, 247-254.
- Oktay, M., Gulcin, I., Kufrevioglu, O. I. (2003). *LWT-Food Sci. Technol.*, 36 (2), 263-271.
- Olesen, J. M., Knudsen, J. T. (1994). *Biochem. System. Ecol.*, 22 (3), 231-237.
- Otuki, M. F., Ferreira, J., Lima, F. V., Meyre-Silva, C., Malheiros, A., Muller, L. A., Cani, G. S., Santos, A. R., Yunes, R. A., Calixto, J. B. (2005). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 313 (1), 310-318.
- Ozturk, F., Ucar, M., Ozturk, I. C., Vardi, N., Batcioglu, K. (2003). *Urology*, 62 (2), 353-356.
- Palacios, M. L., Comdom, R. F. (2003). *Synth. Commun.*, 33 (10), 1771-1775.
- Palazzo, E., De Novellis, V., Marabese, I., Cuomo, D., Rossi, F., Berrino, L., Rossi, F., Maione, S. (2002). *Eur. J. Pharmacol.*, 439 (1-3), 69-75.
- Pan, H. L., Wu, Z. Z., Zhou, H. Y., Chen, S. R., Zhang, H. M., Li, D. P. (2008). *Pharmacol. Ther.*, 117 (1), 141-161.
- Patai, S. (1996). *The Chemistry of Amino, Nitroso, Nitro, and Related Groups (The Chemistry of Functional Groups. Supplement F2)*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, West Sussex, UK.

- Pelling, D., Longland, R., Dulley, M., Gangoli, S. D. (1980). *A Study of the Intestinal Absorption of Four Flavouring Esters in the Guinea Pig*. Unpublished report by the British Industrial Biological Research Association, Carshalton, Surrey, UK. Submitted to WHO by the Flavor and Extract Manufacturers Association of the United States, Washington DC, USA.
- Peng, Y., Song, G., Ding, F. (2004). *Indian J. Chem., Sect. B*, 43B, 2021-2023.
- Petit-Paly, G. R. (1989). *Ruta graveolens: in vitro* production of alkaloids and medicinal compounds. In: Bajaj, Y. P. S. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 7 (Medicinal and Aromatic Plants II)*. Springer-Verlag, Berlin, DE.
- Petit-Paly, G., Montagu, M., Tremouillaux-Guiller, J., Chenieux, J. C., Rideau, M. (1993). *Ptelea trifoliata* (quinine tree, hop tree): *In vitro* culture and the production of alkaloids and medicinal compounds. In: Bajaj, Y. P. S. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 21 (Medicinal and aromatic plants IV)*. Springer-Verlag, Berlin, DE.
- Pinheiro, M. M. G., Bessa, S. O., Fingolo, C. E., Kuster, R. M., Matheus, M. E., Menezes, F. S., Fernandes, P. D. (2010). *J. Ethnopharmacol.*, 127 (2), 407-413.
- Pino, J. A., Mesa, J., Munoz, Y., Marti, M. P., Marbot, R. (2005). *J. Agric. Food Chem.*, 53 (6), 2213-2223.
- Pique, V., Faure, R., Galy, J.-P. (2002). *J. Heterocycl. Chem.*, 39 (5), 1083-1085.
- Pitchaimari, G., Vijayakumar, C. T. (2013). *J. Therm. Anal. Calorim.*, 114 (3), 1351-1361.
- Polietshev, N. P., Evdokinov, N., Sultanov, M. B. (1972). *Farmakol. Alkaloidov Ikh. Proizvod.*, 41-47.
- Popp, F. D. (1975). *Adv. Heterocycl. Chem.*, 18, 1-58.
- Porsolt, R. D., Bertin, A., Jalfre, M. (1977). *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 229 (2), 327-336.
- Porter, G. A. (1996). *Am. J. Kidney Dis.*, 28 (1 Suppl 1), S30-S33.
- Pronk, M. E. J., Speijers, G. J. A. (2006). Anthranilate derivatives, First draft, In: *Safety Evaluation of Certain Food Additives, Prepared by the Sixty-fifth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), WHO Food Additives Series, No 56*, 201-224.
- Quijano, C. E., Pino, J. A. (2009a). *J. Essent. Oil Res.*, 21 (3), 194-196.
- Quijano, C. E., Pino, J. A. (2009b). *J. Essent. Oil Res.*, 21 (6), 483-485.
- Rajkumar, M., Alfred Cecil Raj, S., Renuga, V. (2012). *Mater. Manuf. Process.*, 27 (11), 1217-1220.
- Radulović, N. S., Blagojević, P. D. Randjelović, P. J., Stojanović, N. M. (2013a). *Curr. Top. Med. Chem.*, 13 (17), 2134-2170.

- Radulović, N. S., Randjelović, P. J., Stojanović, N. M., Blagojević, P. D., Stojanović-Radić, Z., Ilić, I. R., Djordjević, V. B. (2013b). *Food Chem Toxicol.*, 58, 37-49.
- Radulović, N. S., Stojanović-Radić, Z., Stojanović, P., Stojanović, N., Dekić, V., Dekić, B. (2015). *J. Serb. Chem. Soc.*, 80 (3), 315-327.
- Radwanski, E. R., Last, R. L. (1995). *Plant Cell.*, 7 (7), 921-934.
- Raghavendran, B. R. H., Sathivel, A., Devaki, T. (2003). *J. Health Sci.*, 50 (1), 42-46.
- Rahmat, A. A., Dar, F. A., Choudhary, I. M. (2014). *Pharmacogn. Res.*, 6 (1), 19-28.
- Rakotonirina, S. V., Ngo Bum, E., Rakotonirina, A., Bopelet, M. (2001). *Fitoterapia*, 72 (1), 22-29.
- Randjelović, P., Veljković, S., Stojiljković, N., Veličković, Lj., Sokolović, D.; Stoilković, M., Ilić, I. (2012). *Drug Chem. Toxicol.*, 35 (2), 141-148.
- Regulska, E., Samsonowicz, M., Swislocka, R., Lewandowski, W. (2009). *J. Mol. Struct.*, 936 (1), 162-170.
- Reissenweber, G., Mangold, D. (1980). *Angew. Chem.*, 92 (3), 196-197.
- Renger, B. (1985). *Synthesis*, 9, 856-860.
- Respaud, M.-J., Moulis, C., Fouraste, I., Bessiere, J.-M. (1997). *J. Essent. Oil Res.*, 9 (4), 475-476.
- Ridd, J. H. (1961). *Q. Rev., Chem. Soc.*, 15, 418-441.
- Rideau, M. (1972). *Mise en évidence, isolement et essais d'identification d'inhibiteurs de la croissance chez quelques espèces de Rutacées*. Thèse Doct. Es. Sc. Nat., Univ. Tours.
- Rideau, M., Chenieux, J. C. (1978). *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 125 (3-4), 127-137.
- Rideau, M., Verechere, C., Hibon, P., Chenieux, J. C., Maupas, P., Viel, C. (1979). *Phytochemistry*, 18, 155-169.
- Riedel, W., Neeck, G. (2001). *Z. Rheumatol.*, 60 (6), 404-415.
- Ries, R. K., Gilbert, D. A., Katon, W. (1984). *Arch. Intern. Med.*, 144 (3), 566-569.
- Rodiguiero, G., Dall'acqua, F. (1976). *Photochem. Photobiol.*, 24, 647-653.
- Rogers, M. P., White, K., Warshaw, M. G., Yonkers, K. A., Rodriguez-Villa, F., Chang, G., Keller, M. B. (1994). *Int. J. Psychiatry. Med.*, 24 (1), 83-96.
- Sachs, D., Cunha, F. Q., Ferreira, S. H. (2004). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 (10), 3680-3685.
- Sagradas, J., Costa, G., Figueirinha, A., Castel-Branco, M. M., Silvério Cabrita, A. M., Figueiredo, I. V., Batista, M. T. (2015). *J. Ethnopharmacol.*, 173, 134-138.
- Sahley, T. L., Berntson, G. G. (1979). *Psychoph. (Berl.)*, 65 (3), 279-283.
- Sakai, A., Yoshikawa K., Kurata H., Tanimura A. (1978). *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, 19 (1), 85-90.

- Sakurada, T., Matsumura, T., Moriyama, T., Sakurada, C., Ueno, S., Sakurada, S. (2003). *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 75 (1), 115-121.
- SCCS. (2011). *Opinion on Methyl-N-methylantranilate*, Scientific Committee on Consumer Safety, 13-14 December 2011.
- Schafer Jr., E. W., Bowles Jr., W. A., Hurlbut, J. (1983). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 12 (3), 355-382.
- Schneider, T. L., Halloran, K. T., Hillner, J. A., Conry, R. R., Linton, B. R. (2013). *Chem.-Eur. J.*, 19 (45), 15101-15104.
- Schneider-Helmert, D. (1988). *Acta Psychiatr. Scand.*, 78 (6), 706-711.
- Schultz, A. G., McCloskey, P. J., Sundararaman, P., Springer, J. P. (1985). *Tetrahedron Lett.*, 26 (13), 1619-1622.
- Sejourne, M., Viel, C., Bruneton, J., Rideau, M., Chenieux, J. C. (1981). *Phytochemistry*, 20 (2), 353-355.
- Selva, M., Tundo, P., Foccardi, T. (2005). *J. Org. Chem.*, 70 (7), 2476-2485.
- Seo, P. J., Kim, N., Kim, J. H., Lee, B. H., Nam, R. H., Lee, H. S., Chang, H., Jung, H. C., Song, I. S. (2012). *Gut Liver*, 6 (2), 210-217.
- Serra, J. R., Thompson, E. D., Jurs, P. C. (2003). *Chem. Res. Toxicol.*, 16 (2), 153-163.
- Dashti-Khavidaki, S., Shahbazi, F., Khalili, H., Lessan-Pezeshki, M. (2012). *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 15(1), 112-23.
- Shure, K. B., Acree', T. E. (1994). *J. Agric. Food Chem.*, 42 (2), 350-353.
- Shvekhgeimer, M.-G. A. (2001). *Chem. Heterocycl. Comp.*, 37 (4), 386-443.
- Singer, G. M., Taylor, H. W., Lijinsky, W. (1977). *Chem.-Biol. Interact.*, 19 (2), 133-142.
- Singh, N., Singh, P., Shrivastva, S., Kumar Mishra, S., Lakshmi, V., Sharma, R., Palit, G. (2012). *N.-S. Arch. Pharmacol.*, 385 (3), 277-286.
- Smalley, W., Stein, C. M., Arbogast, P. G., Eisen, G., Ray, W. A., Griffin, M. (2002). *Arthritis Rheum.*, 46 (8), 2195-2200.
- Staiger, R. P., Miller, E. B. (1959). *J. Org. Chem.*, 24, 1214-1219.
- Standley, P. C. (1923). *Contrib. US Natl. Herb.*, 23, 517-848.
- Stein, C., Clark, J. C., Oh, U., Vasko, M. R., Wilcox, G. L., Overland, A. C., Vanderah, T. W. (2009). *Brain Res. Rev.*, 60 (1), 90-113.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P. (1985). *Psychopharmacology*, 85 (3), 367-370.
- Stiles, M., Miller, R. G., Burckhardt, U. (1963). *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 1792-1800.
- Stone, T. W. (1993). *Pharmacol. Rev.*, 45 (3), 309-379.

- Syam, A. F., Sadikin, M., Wanandi, S. I., Rani, A. A. (2009). *Acta Med. Indones.*, 41 (2), 95-98.
- Tabarelli, Z., Berlese, D. B., Sauzem, P. D., Rubin, M. A., Missio, T. P., Teixeira, M. V., Sinhorin, A. P., Martins, M. A. P., Zanatta, N., Bonacorso, H. G., Mello, C. F. (2004). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 37 (10), 1531-1540.
- Tampieri, M. P., Galuppi, R., Macchioni, F., Carelle, M. S., Falcioni, L., Cioni, P. L., Morelli, I. (2005). *Mycopathologia*, 159 (3), 339-345.
- Taupp, M., Harmsen, D., Heckel, F., Schreier, P. (2005). *J. Agric. Food Chem.*, 53 (24), 9586-9589.
- Tea, K. N. (1977). *Contribution à l'étude botanique et chimique de Choisya ternata Kunth*. Thèse Doct. Pharm. (Etat), Univ. Toulouse III.
- Tea, K. N., Gleye, J., Fouraste, I. (1975). *Plant. Med. Phytother.*, 9 (3), 187-191.
- Teeter, R. M. (1966). *Anal. Chem.*, 38 (12), 1736-1740.
- Thabrew, M. I., Joice, P. D., Rajatissa W. (1987). *Planta Med.*, 53 (3), 239-241.
- The Merck Index (12th Edition). (1996). Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, New Jersey, USA.
- Lemke, T. L., Williams, D. A., Roche, W. F., Zito, S. W. (2012). *Foye's Principles of Medicinal Chemistry (7th Edition)*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA.
- Thomas, A. F., Stoll, M., Palluy, E. (1966). *Riechstoffe, Aromen, Koerperpflegemittel*, 16, 42-48.
- Tipparaju, S. K., Joyasawal, S., Pieroni, M., Kaiser, M., Brun, R., Kozikowski, A. P. (2008). *J. Med. Chem.*, 51 (23), 7344-7347.
- Tobler, I., Kopp, C., Deboer, T., Rudolph, U. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 (11), 6464-6469.
- Toda, H., Mihara, S., Umamo, K., Shibamoto, T. (1983). *J. Agric. Food Chem.*, 31 (3), 554-558.
- Tomi, F., Barzalona, M., Casanova, J., Luro, F. (2008). *Flavour. Frag. J.*, 23 (3), 152-163.
- Tremouillaux-Guiller, J., Andreu, F., Creche, J., Chenieux, J. C., Rrideau, M. (1987). *Plant Cell Rep.*, 6 (5), 375-378.
- Tremouillaux-Guiller, J., Kodja, H., Andreu, F., Creche, J., Chenieux, J. C., Rrideau, M. (1988). *Plant Cell Rep.*, 7 (6), 456-458.
- Ullmann, F., Dieterle, P. (1907). *Ber.*, 40, 312-358.
- Ullmann, F., Maag, R. (1906). *Ber.*, 39, 1693-1696.
- Umamo, K., Hagi, Y., Tamura, T., Shoji, A., Shibamoto, T. (1994). *J. Agric. Food Chem.*, 42 (9), 1888-1890.

- Vale, M. L., Rolim, D. E., Cavalcante, I. F., Ribeiro, R. A., Souza, M. H. L. P. (2007). *Inflamm. Res.*, 56 (2), 83-88.
- Van den Dool, H., Kratz, P. D. (1963). *J. Chromatogr. A*, 11, 463-471.
- Vernon, F. (1973). *J. Chromatogr. A*, 87 (1), 29-34.
- Viljoen, A. M., Demirci, B., Baser, K. H. C., van Wyk, B.-E. (2002). *S. Afr. J. Bot.*, 68 (1), 115-116.
- Vogel, H. G., Vogel, W. H. (1997). *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays (1th Edition)*. Springer-Verlag, Berlin, DE.
- Wahab, I. R. A., Wong, N. S. H., Boylan, F. (2012). *Planta Med.*, 78 (14), 1597-1600.
- Wang, J., Zhang, L. C., Lu, Y. W., Ji, Y., Yan, X. J., Xue, J. P. (2008). *Brain Res.*, 1209, 1-7.
- Waterman, P. G. (1975). *Biochem. Syst. Ecol.*, 3, 149-180.
- Wheeler, A. S. (1909). *J. Am. Chem. Soc.*, 31, 565-569.
- Wheeler, A. S., Oates, W. M. (1910). *J. Am. Chem. Soc.*, 32, 770-773.
- Whittle, B. A. (1964). *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, 22 (2), 246-253.
- WHO. (1978). *International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria 5: Nitrates, Nitrites and N-Nitroso Compounds*. World Health Organization, Geneva, CH.
- Wiesbrock, F., Schier, A., Schmidbaur, H. (2002). *Z. Naturforsch., B: Chem. Sci.*, 57 (2), 251-254.
- Wiesbrock, F., Schmidbaur, H. (2002). *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 24, 4703-4708.
- Wiesbrock, F., Schmidbaur, H. (2003a). *Inorg. Chem.*, 42 (22), 7283-7289.
- Wiesbrock, F., Schmidbaur, H. (2003b). *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (12), 3622-3630.
- Wiklund, P., Bergam, J. (2004). *Tetrahedron Lett.*, 45 (5), 969-972.
- Wilson III, C. W., Shaw, P. E. (1981). *J. Agric. Food Chem.*, 29 (3), 494-496.
- Wolfe, M. M., Lichtenstein, D. R., Singh, G. (1999). *N. Engl. J. Med.*, 340 (24), 1888-1899.
- Woodcock, J., Witter, J., Dionne, R. A. (2007). *Nat. Rev. Drug Discov.*, 6 (9), 703-710.
- Xie, Y. F., Huo, F. Q., Tang, J. S. (2009). *Acta Pharmacol. Sin.*, 30 (1), 31-41.
- Yadav, G. D., Krishnan, M. S. (1998). *Org. Process Res. Dev.*, 2 (2), 86-95.
- Yamakawa, T., Masaki, M., Nohira, H. (1991). *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 64 (9), 2730-2734.
- Yamaori, S., Yokozuka, H., Sasama, A., Funahashi, T., Kimura, T., Yamamoto, I., Watanabe, K. (2005). *J. Health Sci.*, 51 (6), 667-675.
- Yoneda, N., Fukuhara, T. (1996). *Tetrahedron*, 52 (1), 23-36.

Yunes, R. A., Cechinel, F. V., Ferreira, J., Calixto, J. B. (2005). The use of natural products as sources of new analgesic drugs. In: Atta-ur-Rahman. *Studies in Natural Products Chemistry 30, Bioactive Natural Products (Part K)*. Elsevier B. V., Amsterdam, NL.

Web izvori

<http://mooseyscountrygarden.com/shrubs/choisya-shrub-white-flower.html>

<http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profileisymbol=CHOISidisplay=31>

http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi

<http://theplantlist.org>

<http://webbook.nist.gov/chemistry/>

https://commons.wikimedia.org/wiki/Choisya_ternata#/media/File:Choisya_ternata_7.jpg

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Salix_alba_%27Tristis%27_02_by_Line1.jpg

<https://en.wikipedia.org/wiki/Choisya>

9. PRILOZI

Spisak priloga:

UV SPEKTRI

- Prilog 1.** UV spektar (CH₃CN) izopropil-*N*-metilantranilata
- Prilog 2.** UV spektar (CH₃CN) metil-*N*-metilantranilata
- Prilog 3.** UV spektar (CH₃CN) propil-*N*-metilantranilata
- Prilog 4.** UV spektar (CH₃CN) smeše (*E*)- i (*Z*)-metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata
- Prilog 5.** UV spektar (CH₃CN) metil-5-metil-6-okso-(5*H*)-fenantridin-4-karboksilata
- Prilog 6.** UV spektar (CH₃CN) metil-*N*-benzoilantranilata
- Prilog 7.** UV spektar (CH₃CN) metil-*N*-formilantranilata
- Prilog 8.** UV spektar (CH₃CN) izopropil-3-hidroksiantranilata
- Prilog 9.** UV spektar (CH₃CN) izopropil-5-hidroksiantranilata
- Prilog 10.** UV spektar (CH₃CN) izopropil-5-hidroksi-*N*-metilantranilata
- Prilog 11.** UV spektar (CH₃CN) amida *N*-metilantranilne kiseline

IR SPEKTRI

- Prilog 12.** IR spektar izopropil-*N*-metilantranilata
- Prilog 13.** IR spektar metil-*N*-metilantranilata
- Prilog 14.** IR spektar propil-*N*-metilantranilata
- Prilog 15.** IR spektar smeše (*E*)- i (*Z*)-metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata
- Prilog 16.** IR spektar metil-5-metil-6-okso-(5*H*)-fenantridin-4-karboksilata
- Prilog 17.** IR spektar metil-*N*-benzoilantranilata
- Prilog 18.** IR spektar metil-*N*-formilantranilata
- Prilog 19.** IR spektar izopropil-3-hidroksiantranilata
- Prilog 20.** IR spektar izopropil-5-hidroksiantranilata
- Prilog 21.** IR spektar izopropil-5-hidroksi-*N*-metilantranilata
- Prilog 22.** IR spektar amida *N*-metilantranilne kiseline

MASENI SPEKTRI

- Prilog 23.** (EI)MS spektar izopropil-*N*-metilantranilata
- Prilog 24.** (EI)MS spektar izopropil-*N,N*-dimetantranilata
- Prilog 25.** (EI)MS spektar izopropil-antranilata
- Prilog 26.** (EI)MS spektar metil-*N*-metilantranilata
- Prilog 27.** (EI)MS spektar metil-*N,N*-dimetantranilata
- Prilog 28.** (EI)MS spektar metil-*N*-metilenantranilata
- Prilog 29.** (EI)MS spektar metil-*N*-(hidroksimetil)antranilata
- Prilog 30.** (EI)MS spektar propil-*N*-metilantranilata
- Prilog 31.** (EI)MS spektar propil-*N,N*-dimetantranilata
- Prilog 32.** (EI)MS spektar propil-antranilata
- Prilog 33.** (EI)MS spektar metil-*N*-metil-*N*-nitrozantranilata (NO-MMA)
- Prilog 34.** (EI)MS spektar dimetil-2,2'-(1,2-dimetilhidrazin-1,2-diil)dibenzoata
- Prilog 35.** (EI)MS spektar metil-5-metil-6-okso-(5*H*)-fenantridin-4-karboksilata
- Prilog 36.** (EI)MS spektar metil-*N*-benzoilantranilata
- Prilog 37.** (EI)MS spektar metil-*N*-formilantranilata
- Prilog 38.** (EI)MS spektar izopropil-3-hidroksiantranilata
- Prilog 39.** (EI)MS spektar izopropil-5-hidroksiantranilata
- Prilog 40.** (EI)MS spektar izopropil-5-hidroksi-*N*-metilantranilata
- Prilog 41.** (EI)MS spektar amida *N*-metilantranilne kiseline
- Prilog 42.** (EI)MS spektar metil-benzoata (Tabela 5.11, N° 1)
- Prilog 43.** (EI)MS spektar benzoeve kiseline (Tabela 5.11, N° 2)
- Prilog 44.** (EI)MS spektar *N*-metil-*N*-fenilformamida (Tabela 5.11, N° 3)
- Prilog 45.** (EI)MS spektar metil-antranilata (Tabela 5.11, N° 4)
- Prilog 46.** (EI)MS spektar metil-4-nitrobenzoata (Tabela 5.11, N° 6)
- Prilog 47.** (EI)MS spektar metil-3-nitrobenzoata (Tabela 5.11, N° 7)
- Prilog 48.** (EI)MS spektar *N*-metilantranilne kiseline (Tabela 5.11, N° 8)
- Prilog 49.** (EI)MS spektar metil-*N*-karboksimetil-*N*-metilantranilata (Tabela 5.11, N° 10)
- Prilog 50.** (EI)MS spektar metil-*N*-acetil-*N*-metilantranilat (Tabela 5.11, N° 11)
- Prilog 51.** (EI)MS spektar metil-*N*-acetilantranilata (Tabela 5.11, N° 12)
- Prilog 52.** (EI)MS spektar metil-*N*-metil-nitroantranilata (Tabela 5.11, N° 13)
- Prilog 53.** (EI)MS spektar metil-nitroantranilata (Tabela 5.11, N° 14)
- Prilog 54.** (EI)MS spektar metil-*N*-metilfenilantranilata (Tabela 5.11, N° 15)

- Prilog 55.** (EI)MS spektar dimetil-[1,1'-bifenil]-2,2'-dikarboksilata (Tabela 5.11, N° 16)
- Prilog 56.** (EI)MS spektar dimetil-[1,1'-bifenil]-2,3'-dikarboksilata (Tabela 5.11, N° 17)
- Prilog 57.** (EI)MS spektar dimetil-[1,1'-bifenil]-2,4'-dikarboksilata (Tabela 5.11, N° 18)
- Prilog 58.** (EI)MS spektar metil-fenilantranilata (Tabela 5.11, N° 19)
- Prilog 59.** (EI)MS spektar metil-*N*-benzoil-*N*-metilantranilata (Tabela 5.11, N° 20)
- Prilog 60.** (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 29,924 min i RI = 2130 (tabela 5.11, N° 21)
- Prilog 61.** (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 32,862 min i RI = 2304 (tabela 5.11, N° 22)
- Prilog 62.** (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 32,964 min i RI = 2311 (tabela 5.11, N° 23)
- Prilog 63.** (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 33,641 min i RI = 2353 (tabela 5.11, N° 24)
- Prilog 64.** (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 33,694 min i RI = 2357 (tabela 5.11, N° 25)
- Prilog 65.** (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 34,195 min i RI = 2389 (tabela 5.11, N° 26)
- Prilog 66.** (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 35,985 min i RI = 2505 (tabela 5.11, N° 27)
- Prilog 67.** (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 30,577 min i RI = 2167 (tabela 5.11, N° 28)
- Prilog 68.** (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 30,790 min i RI = 2180 (tabela 5.11, N° 29)
- Prilog 69.** (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 31,792 min i Rt = 2240 (tabela 5.11, N° 30)
- Prilog 70.** (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 32,268 min i Rt = 2269 (tabela 5.11, N° 31)
- Prilog 71.** (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 34,085 min i RI = 2382 (tabela 5.11, N° 32)
- Prilog 72.** (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 34,591 min i RI = 2414 (tabela 5.11, N° 33)
- Prilog 73.** (EI)MS spektar metil-5-metil-6-okso-(5*H*)-fenantridina (tabela 5.11, N° 34)
- Prilog 74.** (EI)MS spektar dimetil-2,2'-(diazen-1,2-diil)-dibenzoata (Tabela 5.11, N° 36)
- Prilog 75.** (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 37,020 min i RI = 2576 (tabela 5.11, N° 38)

Prilog 76. (EI)MS spektar metil-7-metilamino-5-metil-6-okso-(5*H*)-fenantridin-4-karboksilata (tabela 5.11, N° 39)

Prilog 77. (EI)MS spektar metil-6-okso-(5*H*)-fenantridin-4-karboksilata (tabela 5.11, N° 40)

Prilog 78. (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 46,742 min, RI = 3320 (tabela 5.11, N° 41)

Prilog 79. (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 46,866 min, RI = 3331 (tabela 5.11, N° 42)

Prilog 80. (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 48,008 min, RI = 3430 (tabela 5.11, N° 43)

Prilog 81. (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 49,288 min, RI = 3544 (tabela 5.11, N° 44)

Prilog 82. (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 50,333 min (tabela 5.11, N° 45)

Prilog 83. (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 51,392 min (tabela 5.11, N° 46)

NMR SPEKTRI

Prilog 84. ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) spektar izopropil-*N*-metilantranilata

Prilog 85. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) spektar izopropil-*N*-metilantranilata

Prilog 86. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) spektar izopropil-*N*-metilantranilata

Prilog 87. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) spektar izopropil-*N*-metilantranilata

Prilog 88. Deo ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) spektra izopropil-*N*-metilantranilata

Prilog 89. ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) spektar metil-*N*-metilantranilata

Prilog 90. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) spektar metil-*N*-metilantranilata

Prilog 91. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) spektar metil-*N*-metilantranilata

Prilog 92. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) spektar metil-*N*-metilantranilata

Prilog 93. ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) spektar propil-*N*-metilantranilata

Prilog 94. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) spektar propil-*N*-metilantranilata

Prilog 95. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) spektar propil-*N*-metilantranilata

Prilog 96. Deo ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) spektra propil-*N*-metilantranilata

Prilog 97. Deo ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) spektra propil-*N*-metilantranilata

Prilog 98. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) spektar antranilne kiseline

Prilog 99. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) spektar antranilne kiseline

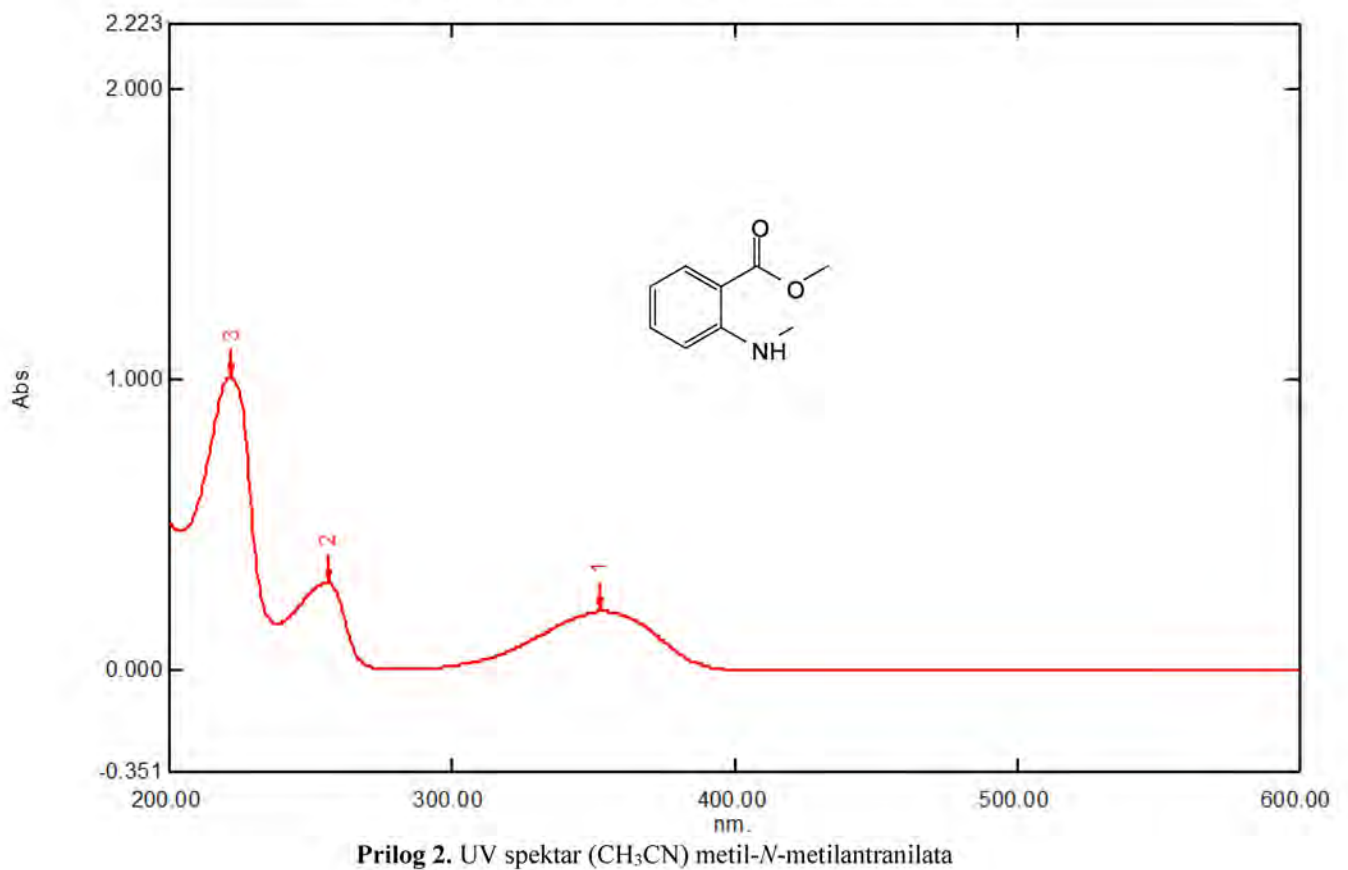
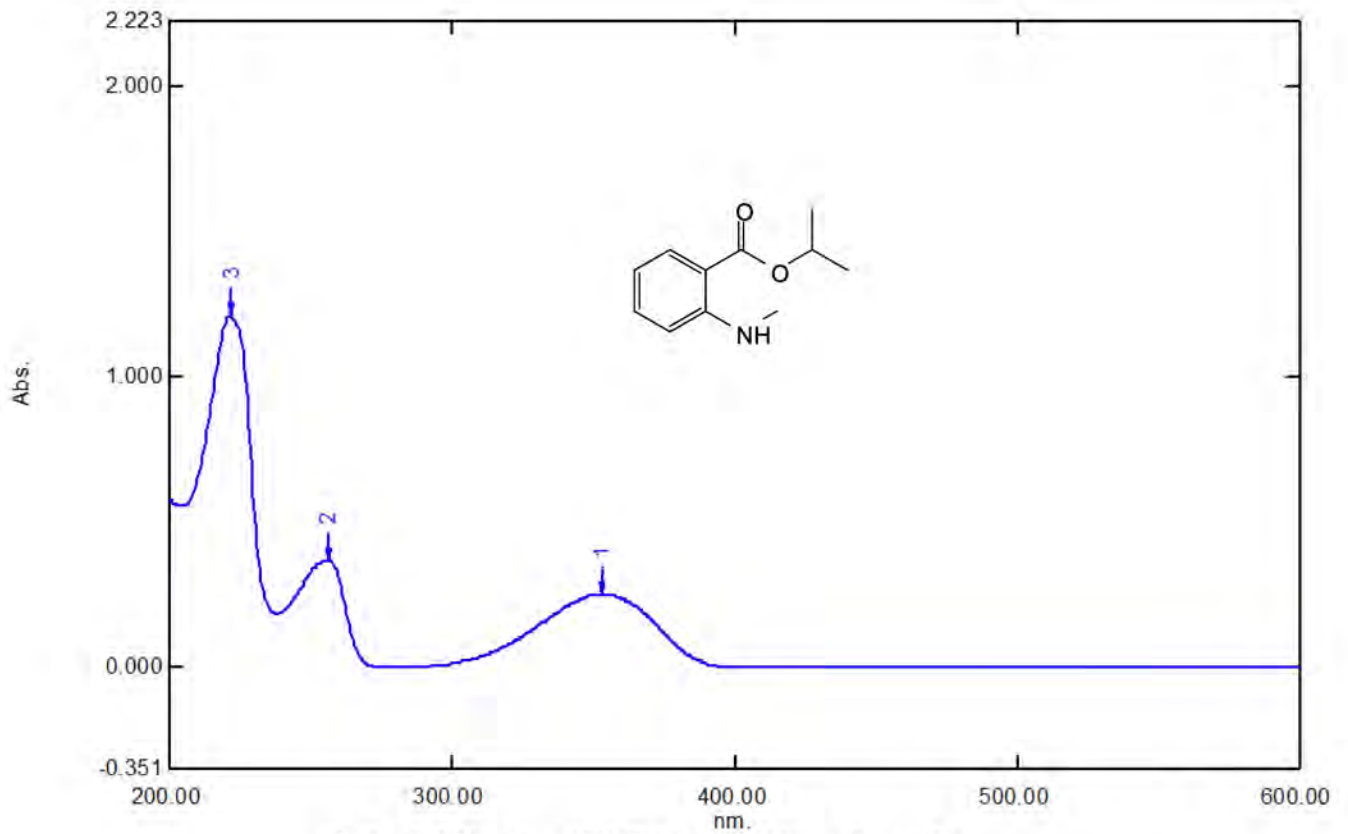
Prilog 100. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) spektar 3-hidroksiantranilne kiseline

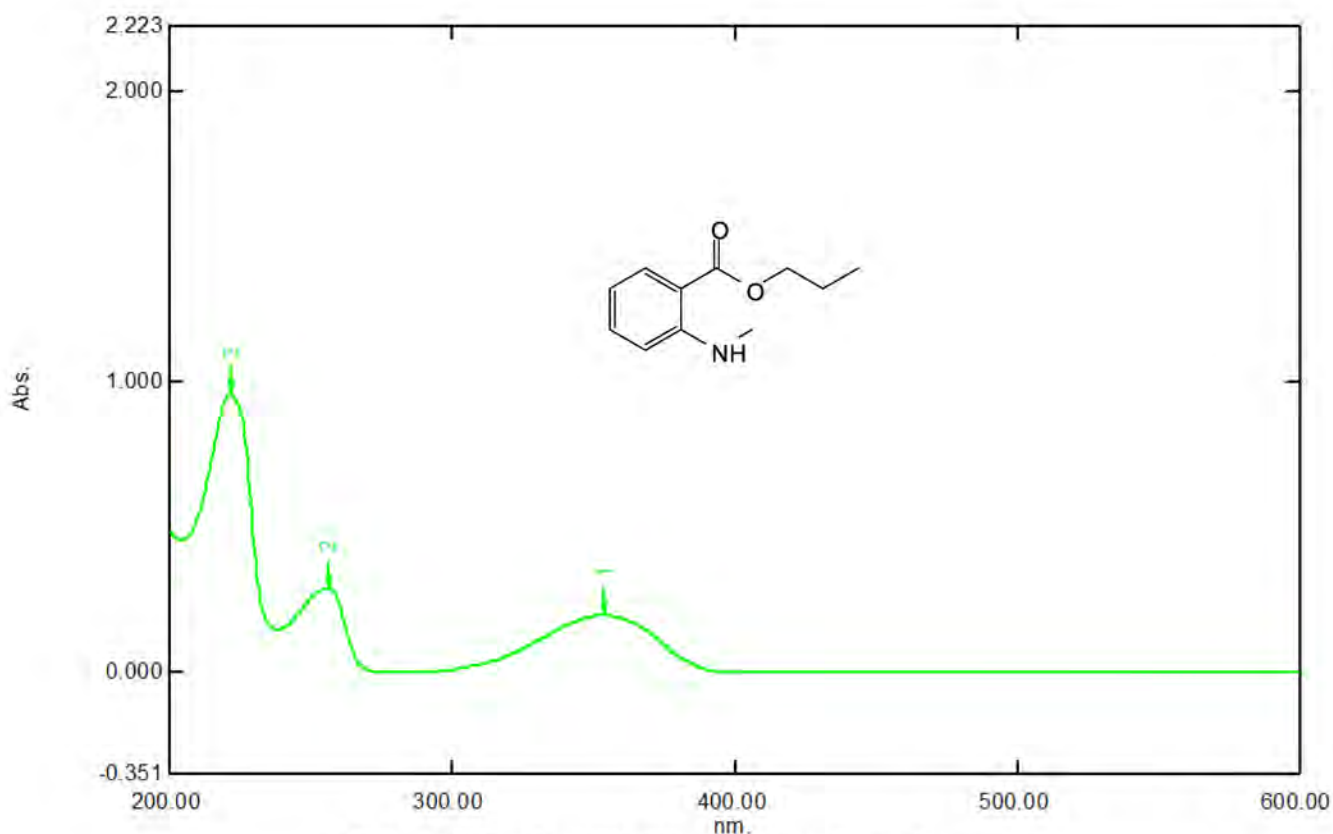
- Prilog 101.** ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) spektar 3-hidroksiantranilne kiseline
- Prilog 102.** ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) spektar 5-hidroksiantranilne kiseline
- Prilog 103.** ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) spektar 5-hidroksiantranilne kiseline
- Prilog 104.** ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) spektar salicilne kiseline
- Prilog 105.** ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) spektar salicilne kiseline
- Prilog 106.** ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) spektar 4-aminosalicilne kiseline
- Prilog 107.** ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) spektar 4-aminosalicilne kiseline
- Prilog 108.** ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) spektar 5-aminosalicilne kiseline
- Prilog 109.** ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) spektar 5-aminosalicilne kiseline
- Prilog 110.** ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spektar smeše (*E*)- i (*Z*)-metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata (NO-MMA) sa asignacijom C-13 signala koji potiču (*E*)-metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata
- Prilog 111.** ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spektar smeše (*E*)- i (*Z*)-metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata (NO-MMA) sa asignacijom C-13 signala koji potiču od (*Z*)-metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata
- Prilog 112.** Deo ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spektra smeše (*E*)- i (*Z*)-metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata (NO-MMA) sa asignacijom signala koji potiču od protona vezanih za aromatično jezgro (*E*)-metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata
- Prilog 113.** Deo ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spektra smeše (*E*)- i (*Z*)-metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata (NO-MMA) sa asignacijom signala koji potiču od protona vezanih za aromatično jezgro (*Z*)-metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata
- Prilog 114.** ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spektar smeše (*E*)- i (*Z*)-metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata (NO-MMA) sa asignacijom signala protona COOCH_3 i $\text{N}(\text{NO})\text{CH}_3$ grupa
- Prilog 115.** ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spektar metil-5-metil-6-okso-(5*H*)-fenantridin-4-karboksilata
- Prilog 116.** ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spektar metil-5-metil-6-okso-(5*H*)-fenantridin-4-karboksilata
- Prilog 117.** ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spektar metil-*N*-benzoilantranilata
- Prilog 118.** ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spektar metil-*N*-benzoilantranilata
- Prilog 119.** Deo ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spektra metil-*N*-benzoilantranilata
- Prilog 120.** ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spektar metil-*N*-formilantranilata
- Prilog 121.** ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spektar metil-*N*-formilantranilata
- Prilog 122.** ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spektar izopropil-3-hidroksiantranilata
- Prilog 123.** ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spektar izopropil-3-hidroksiantranilata
- Prilog 124.** ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spektar izopropil-5-hidroksiantranilata
- Prilog 125.** ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spektar izopropil-5-hidroksiantranilata
- Prilog 126.** ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spektar izopropil-5-hidroksi-*N*-metilantranilata

Prilog 127. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spektar izopropil-5-hidroksi-*N*-metilantranilata

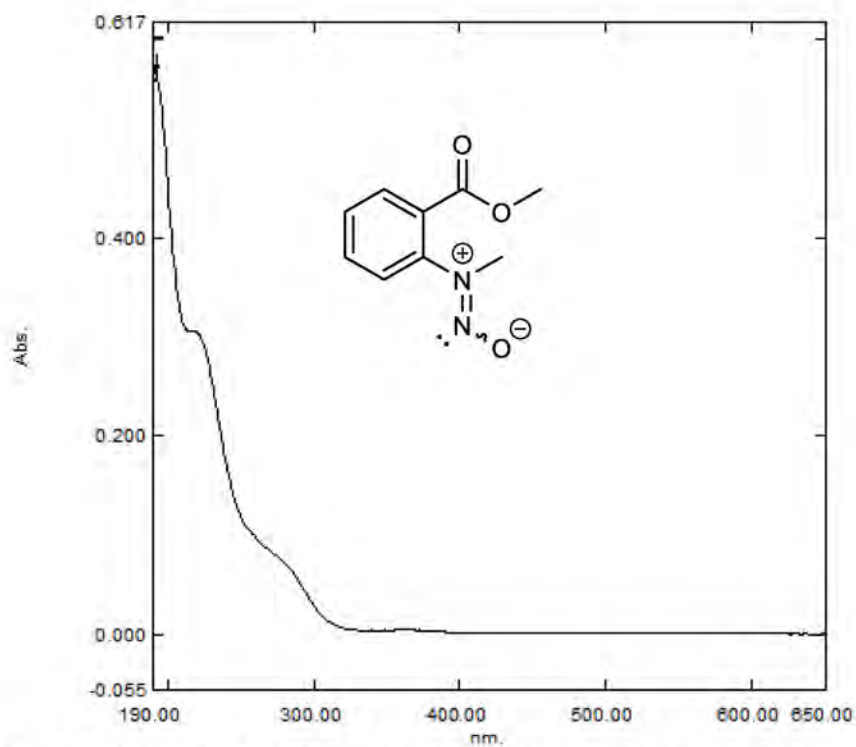
Prilog 128. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spektar amida *N*-metilantranilne kiseline

Prilog 129. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spektar amida *N*-metilantranilne kiseline

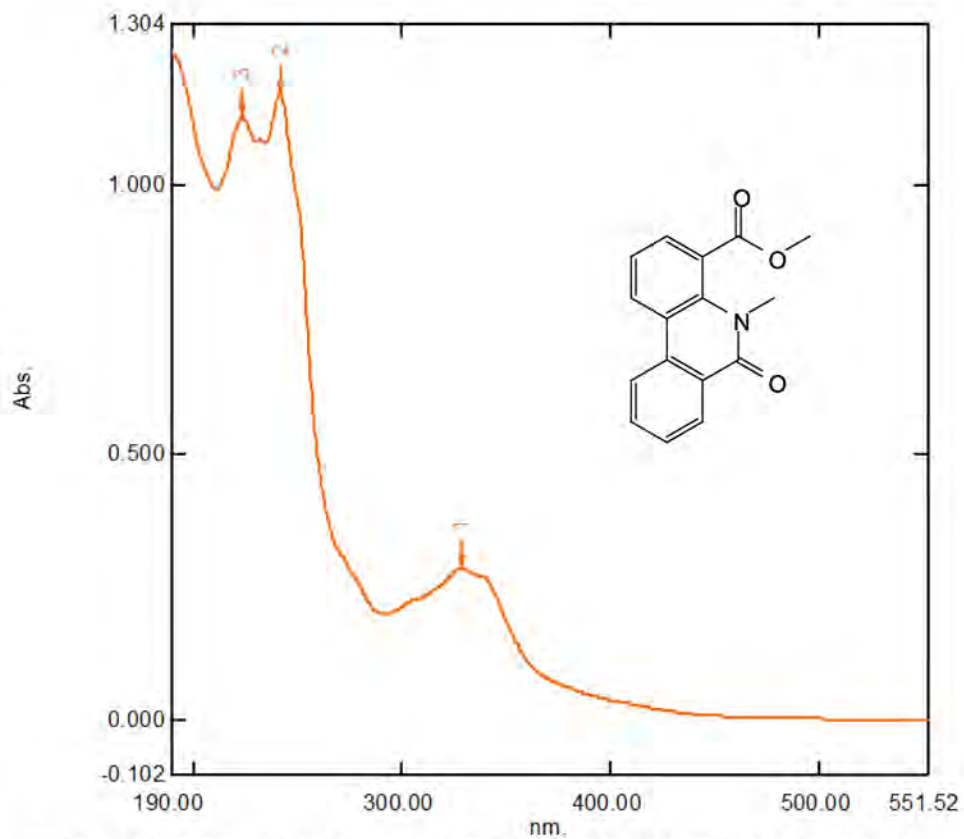




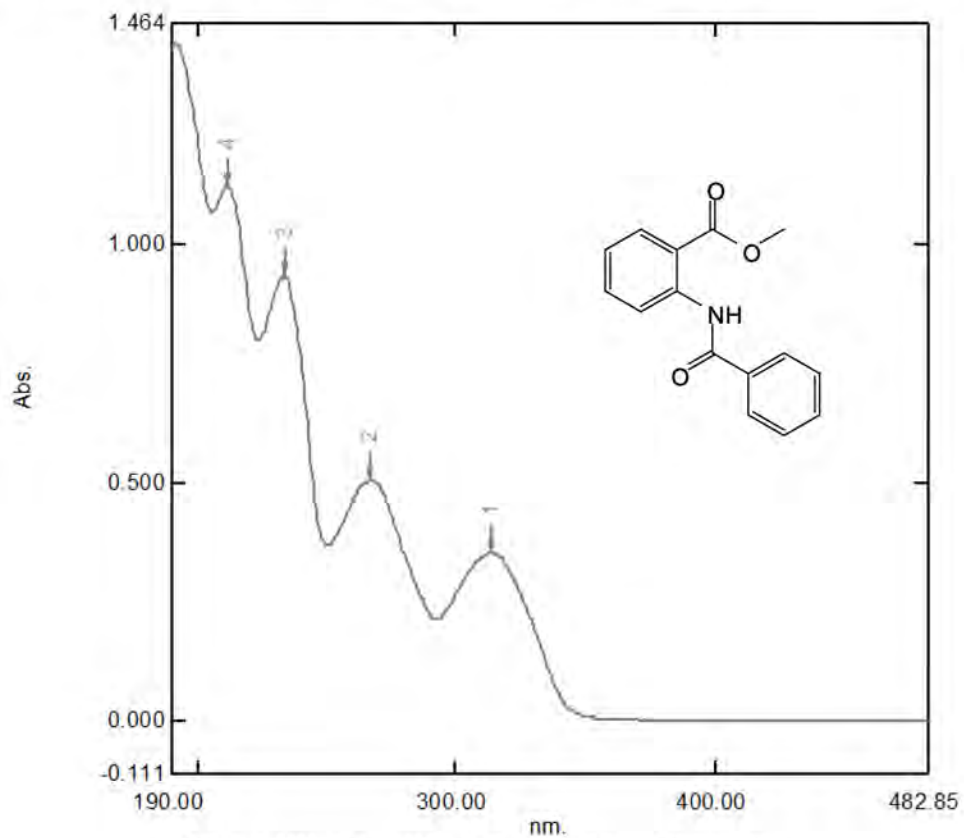
Prilog 3. UV spektr (CH₃CN) propil-*N*-metilantranilata



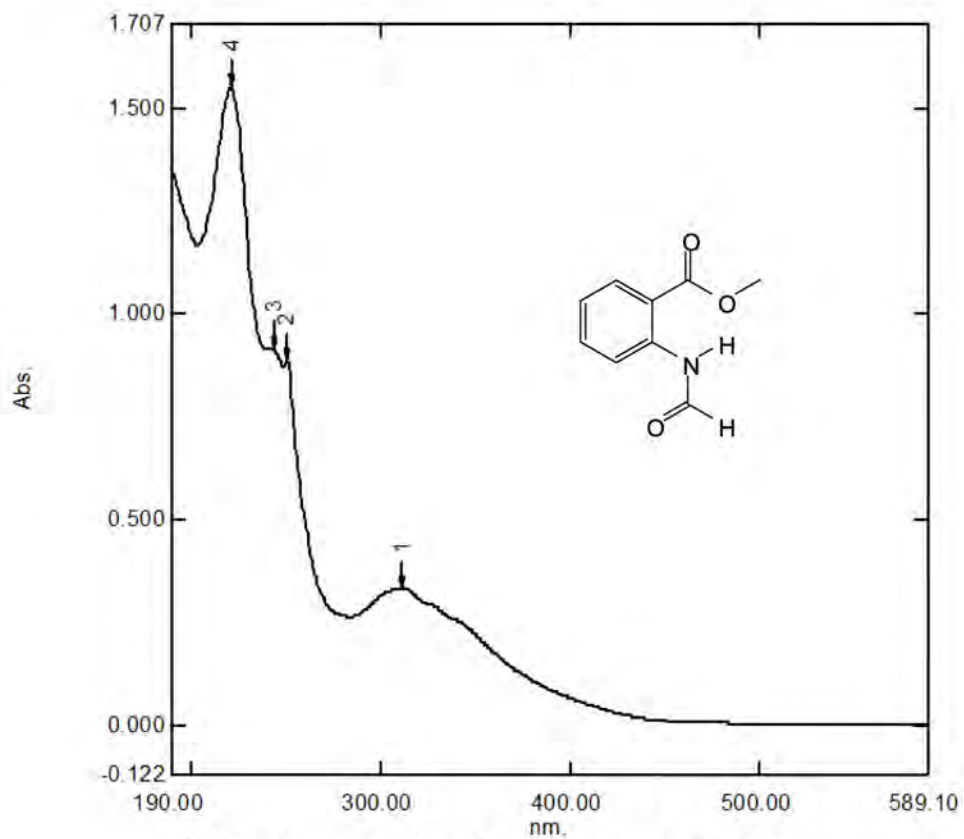
Prilog 4. UV spektr (CH₃CN) smeše (*E*)- i (*Z*)-metil-*N*-metil-*N*-nitrozantranilata



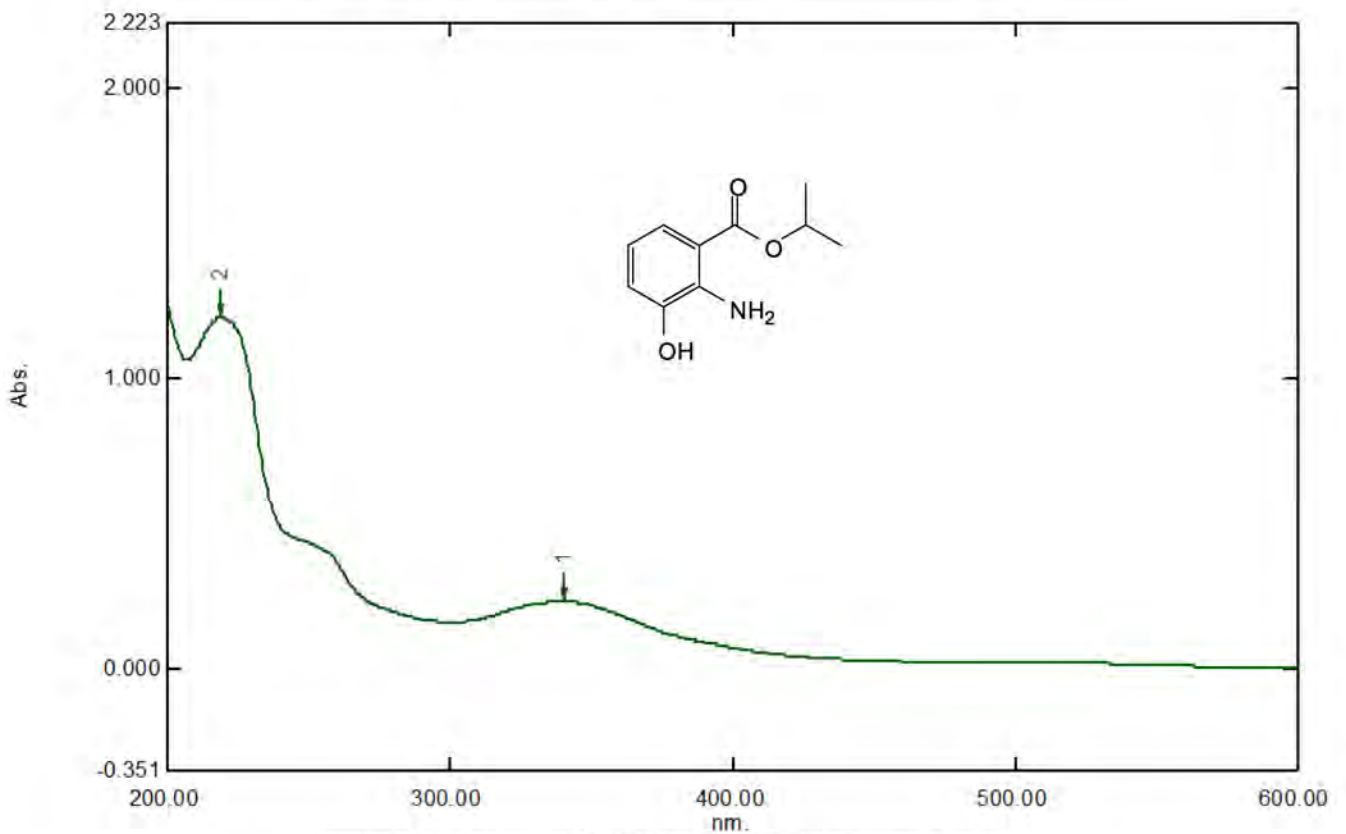
Prilog 5. UV spektr (CH₃CN) metil-5-metil-6-okso-(5H)-fenantridin-4-karboksilata



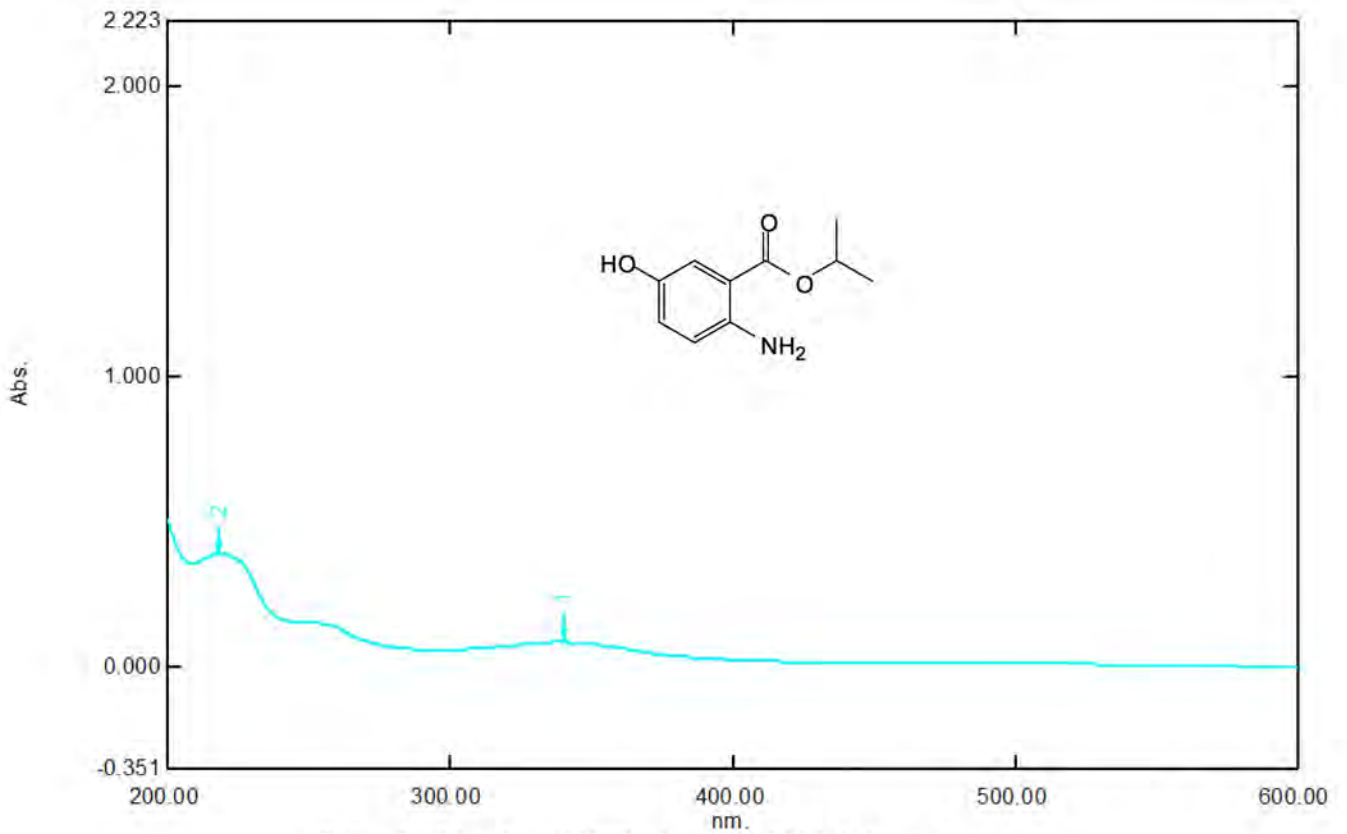
Prilog 6. UV spektr (CH₃CN) metil-N-benzoil-antranilata



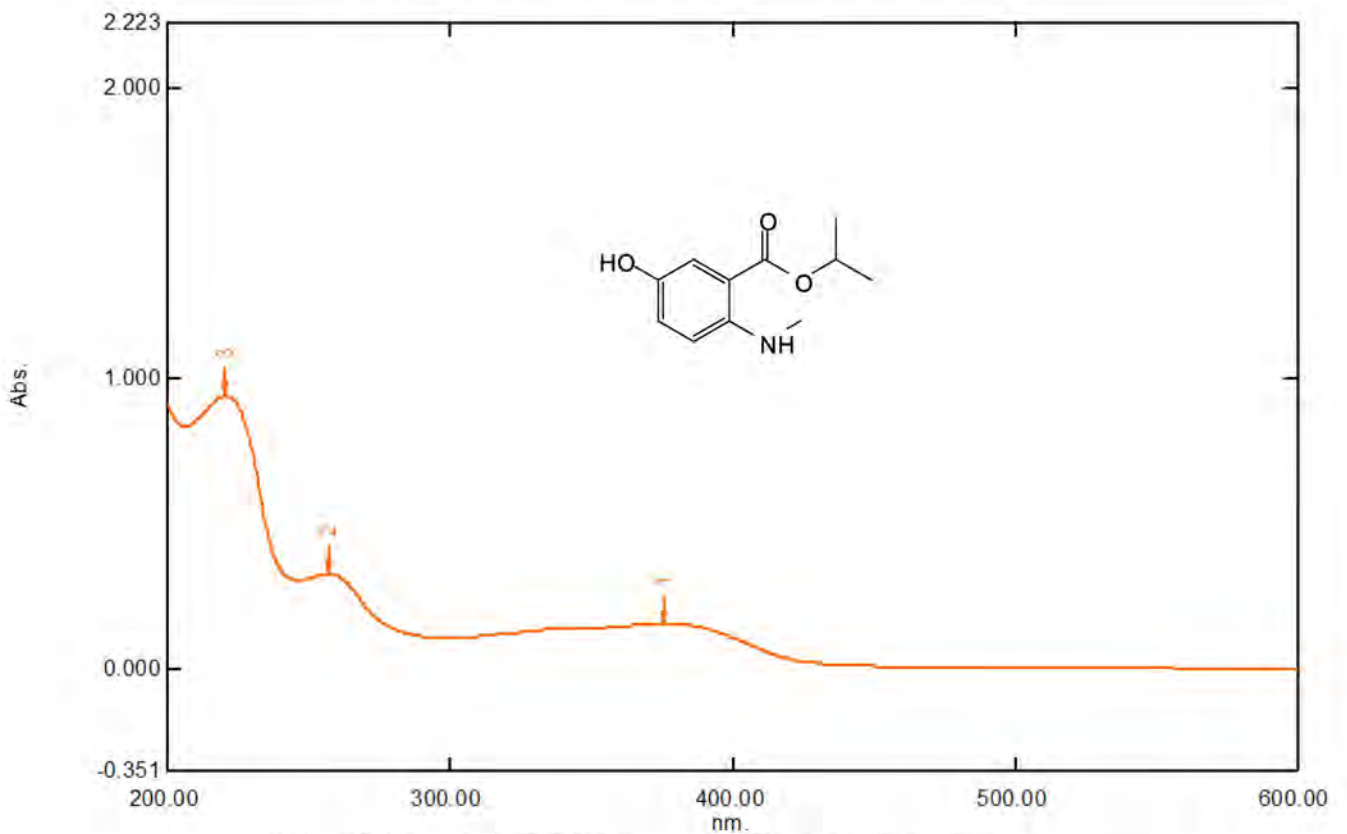
Prilog 7. UV spektar (CH₃CN) metil-*N*-formilantranilata



Prilog 8. UV spektar (CH₃CN) izopropil-3-hidroksiantranilata

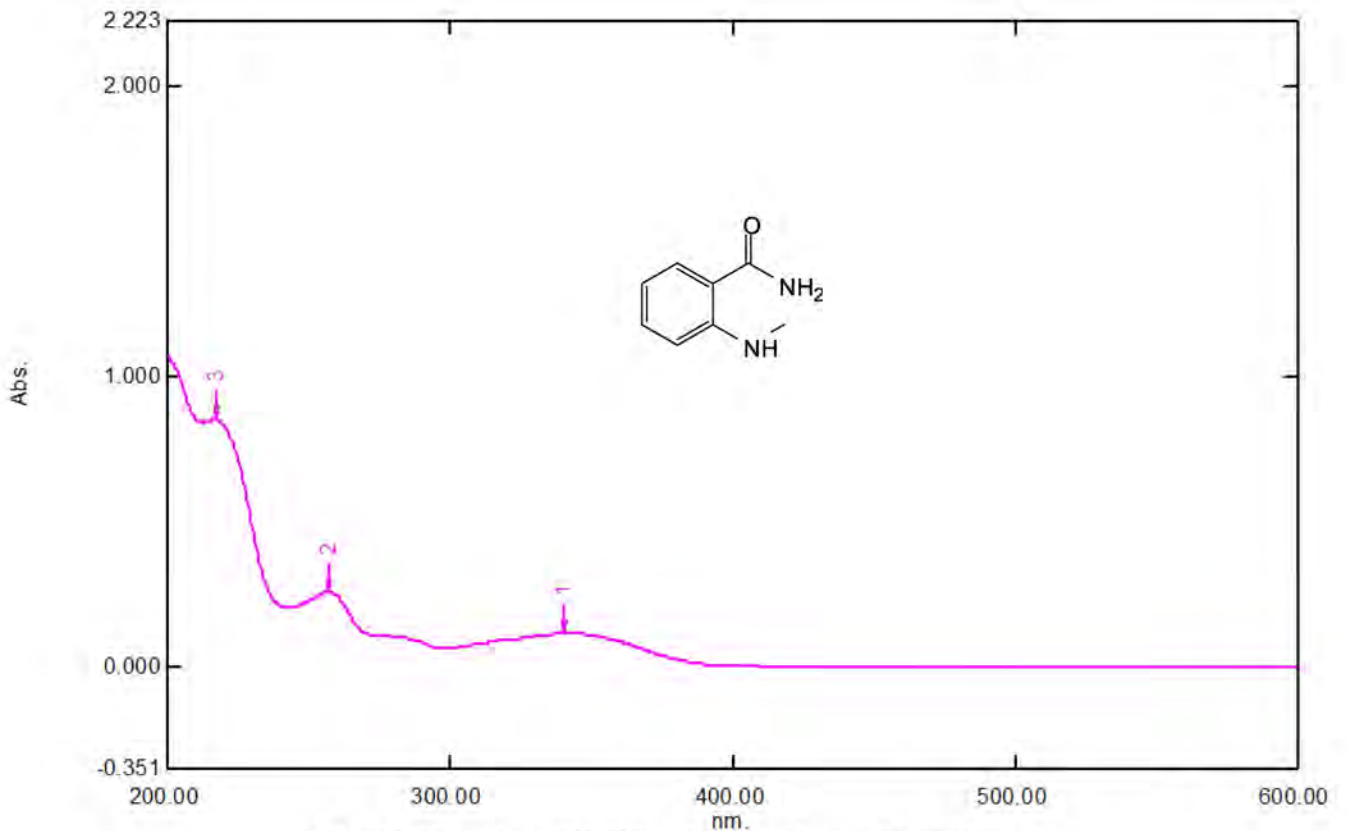


Prilog 9. UV spektar (CH₃CN) izopropil-5-hidroksiantranilata

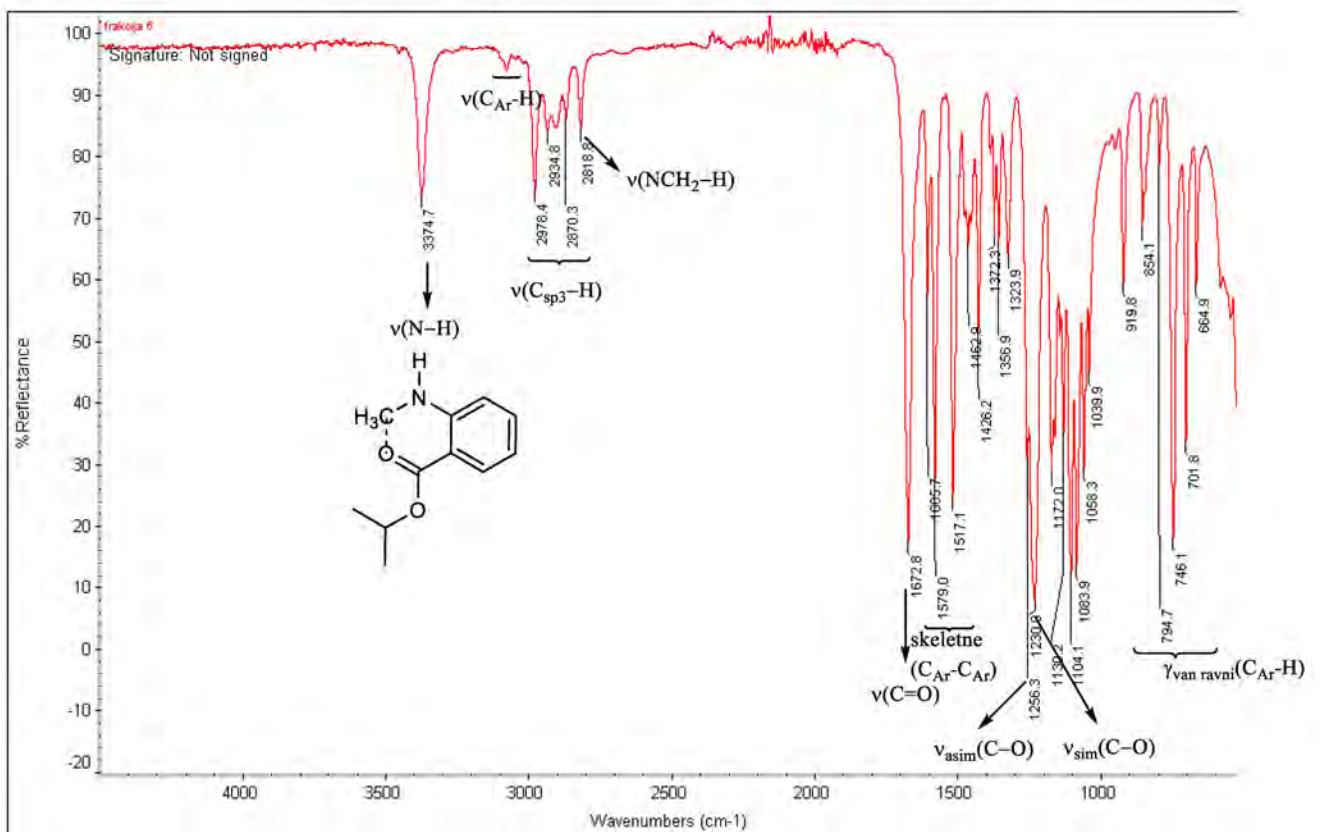


Prilog 10. UV spektar (CH₃CN) izopropil-5-hidroksi-N-metilantranilata

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

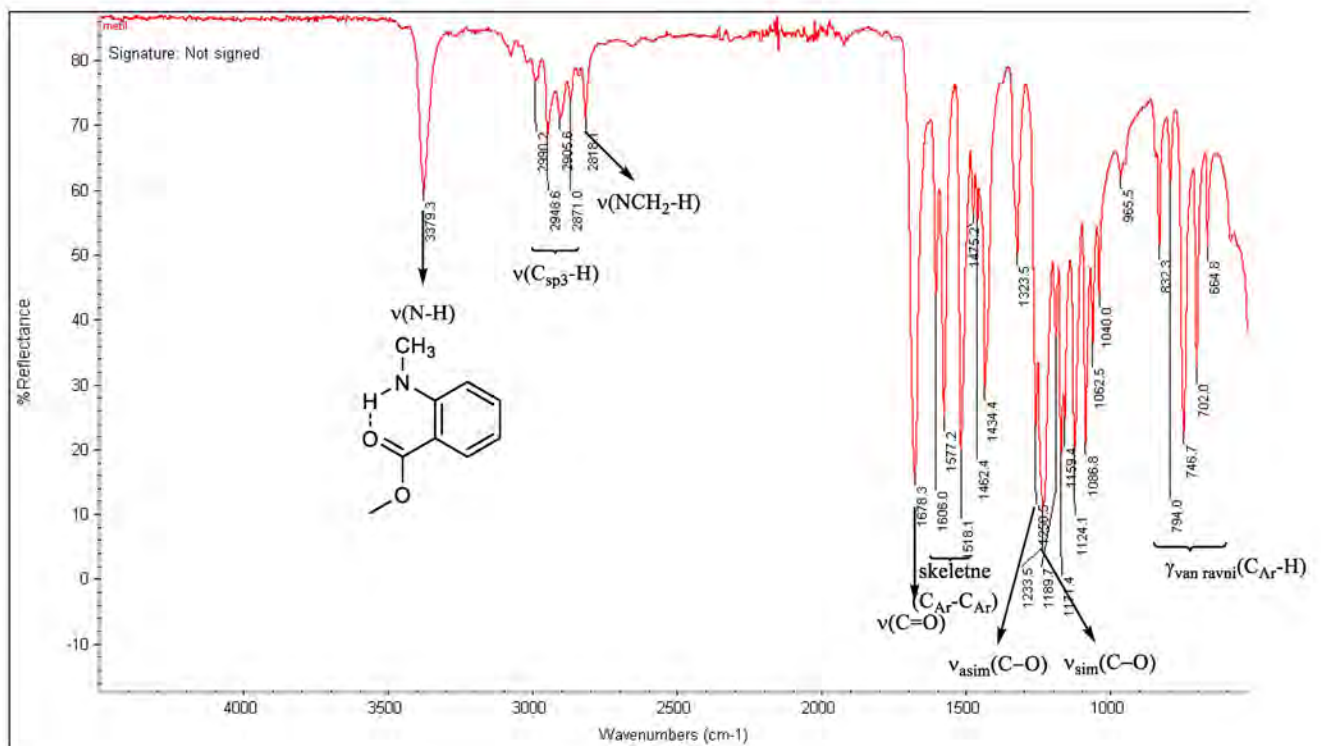


Prilog 11. UV spekter (CH_3CN) amida *N*-metilantranilne kiseline

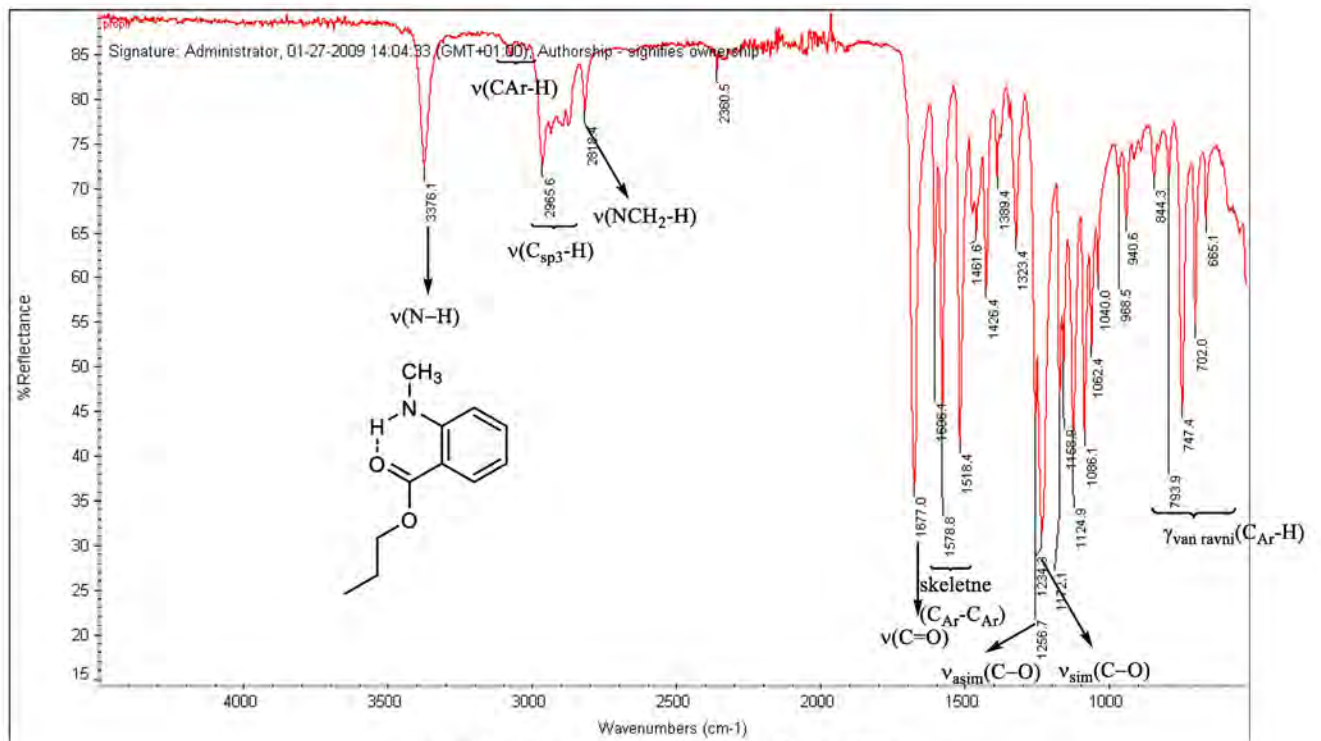


Prilog 12. IR spekter izopropil-*N*-metilantranilata

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

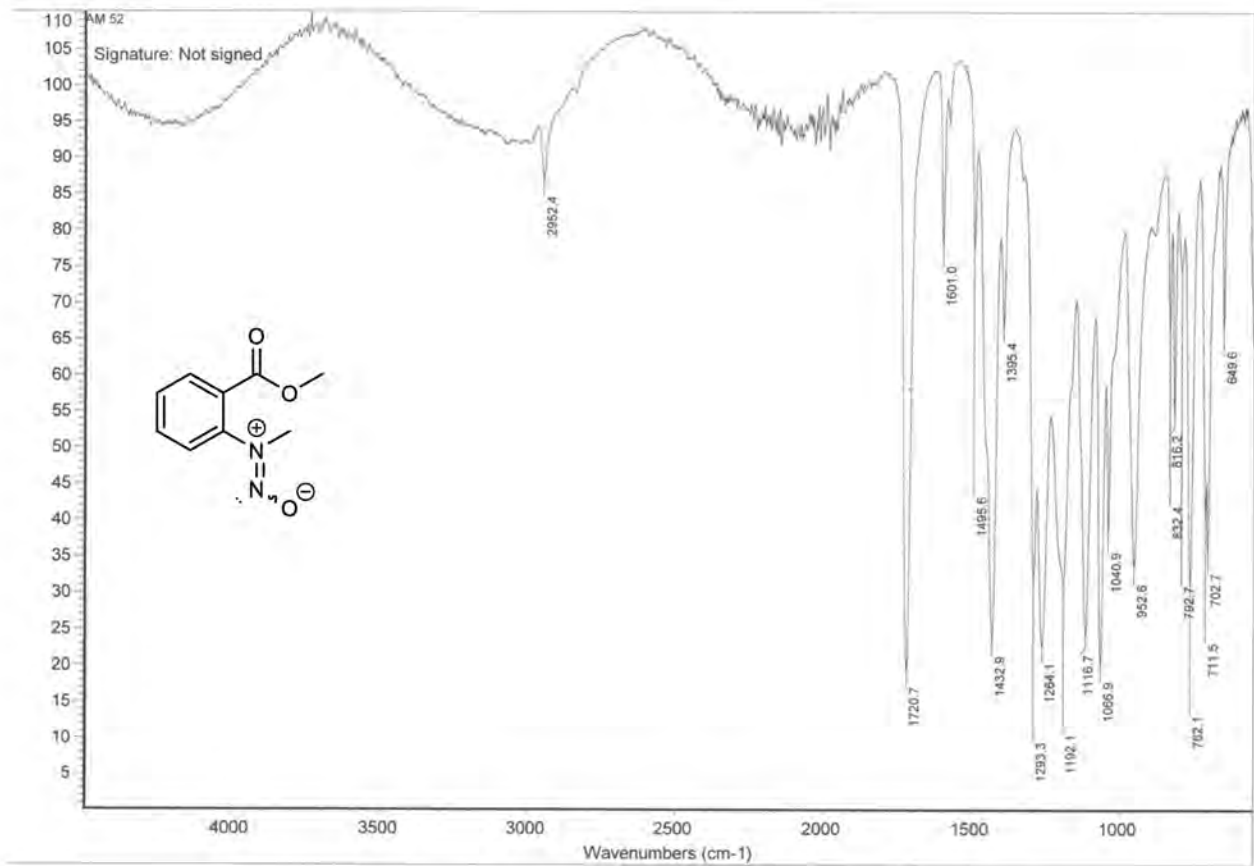


Prilog 13. IR spektar metil-*N*-metilantranilata

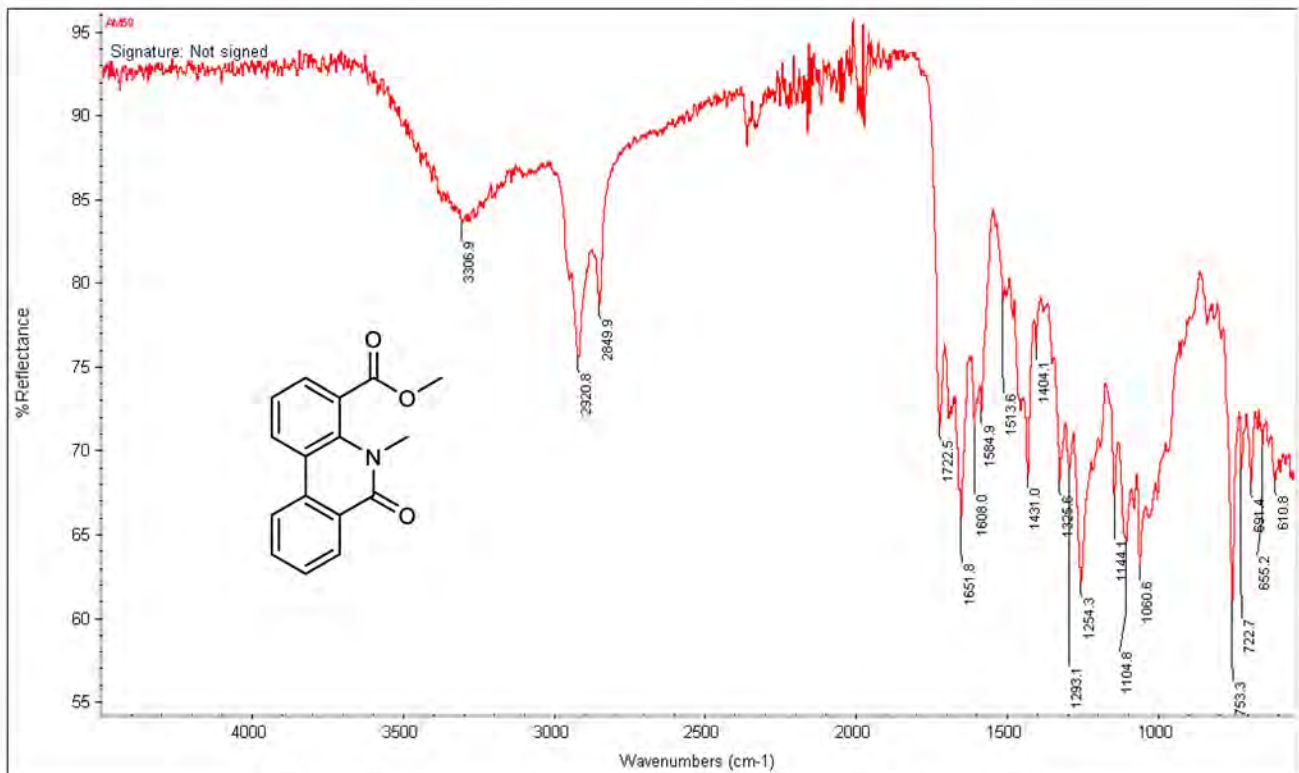


Prilog 14. IR spektar propil-*N*-metilantranilata

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

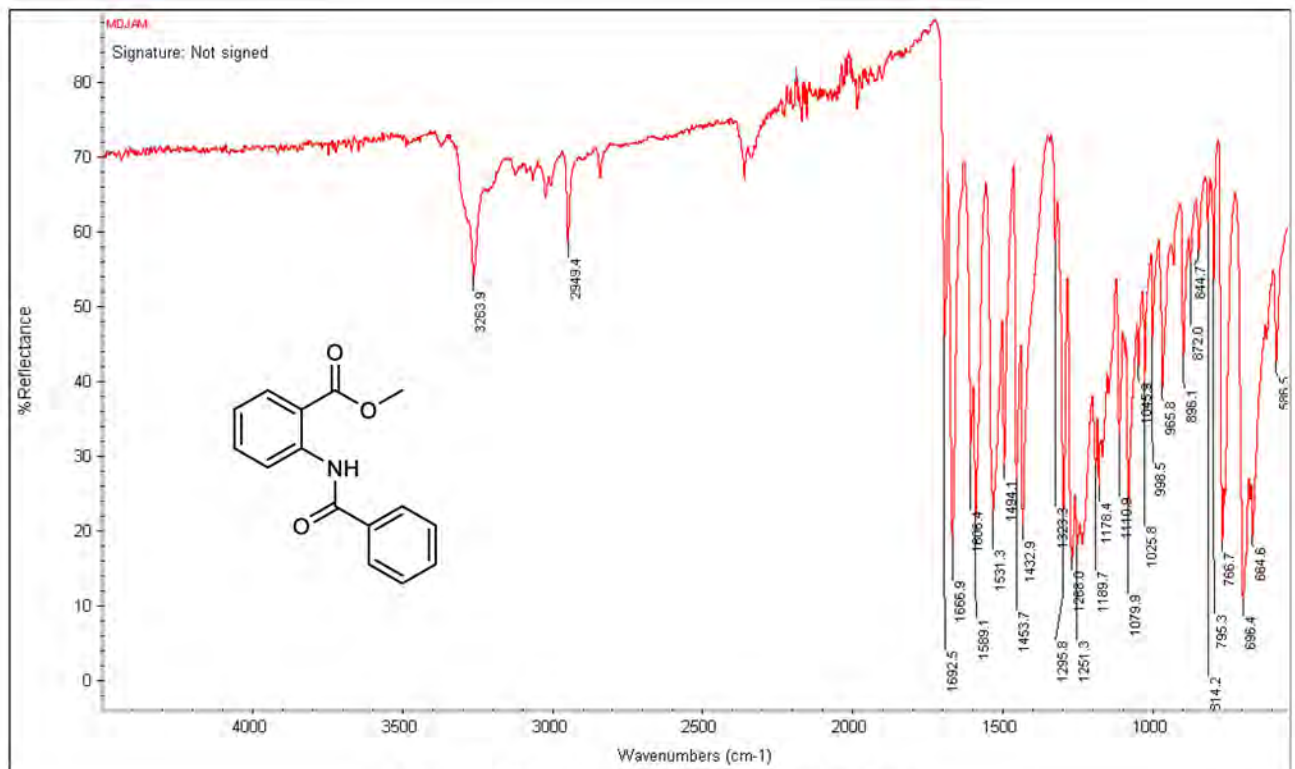


Prilog 15. IR spektar smeše (*E*)- i (*Z*)-metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata

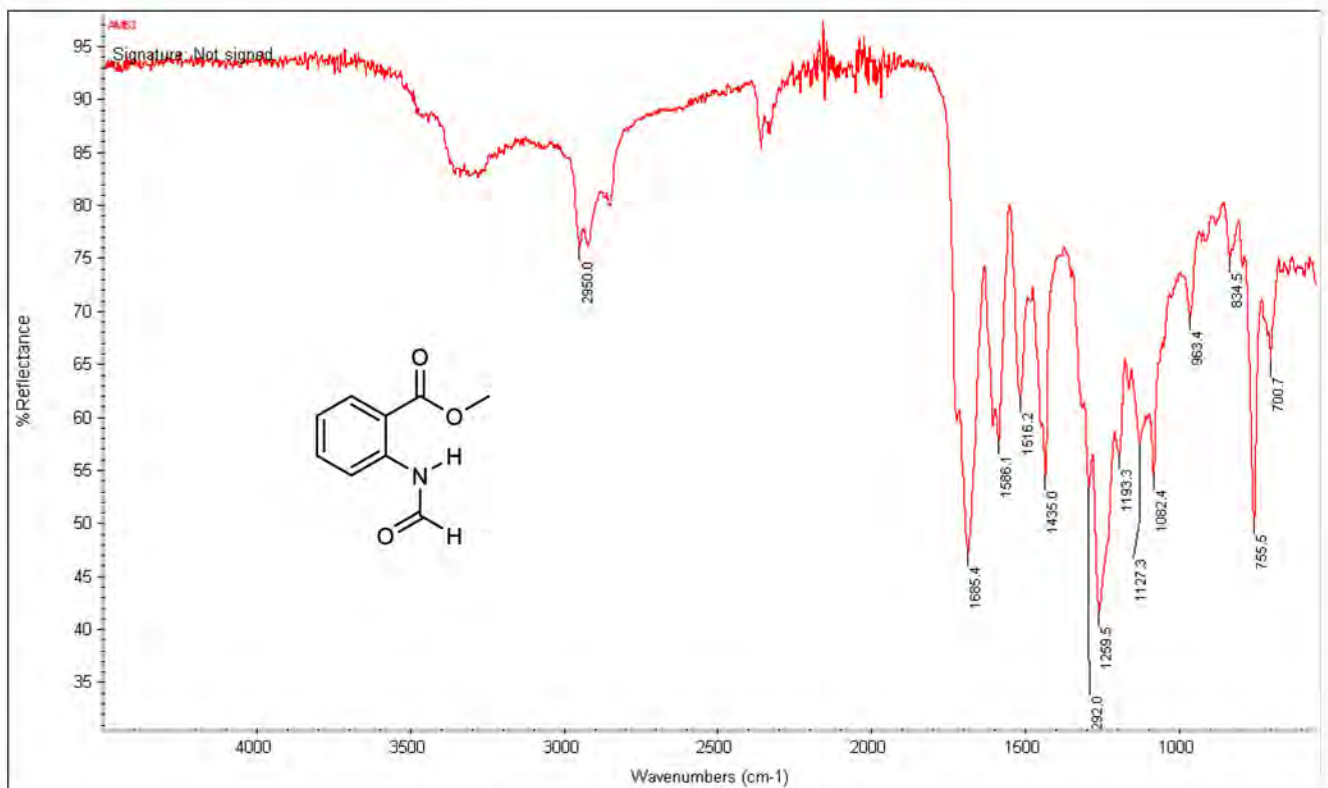


Prilog 16. IR spektar metil-5-metil-6-okso-(5*H*)-fenantridin-4-karboxilata

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

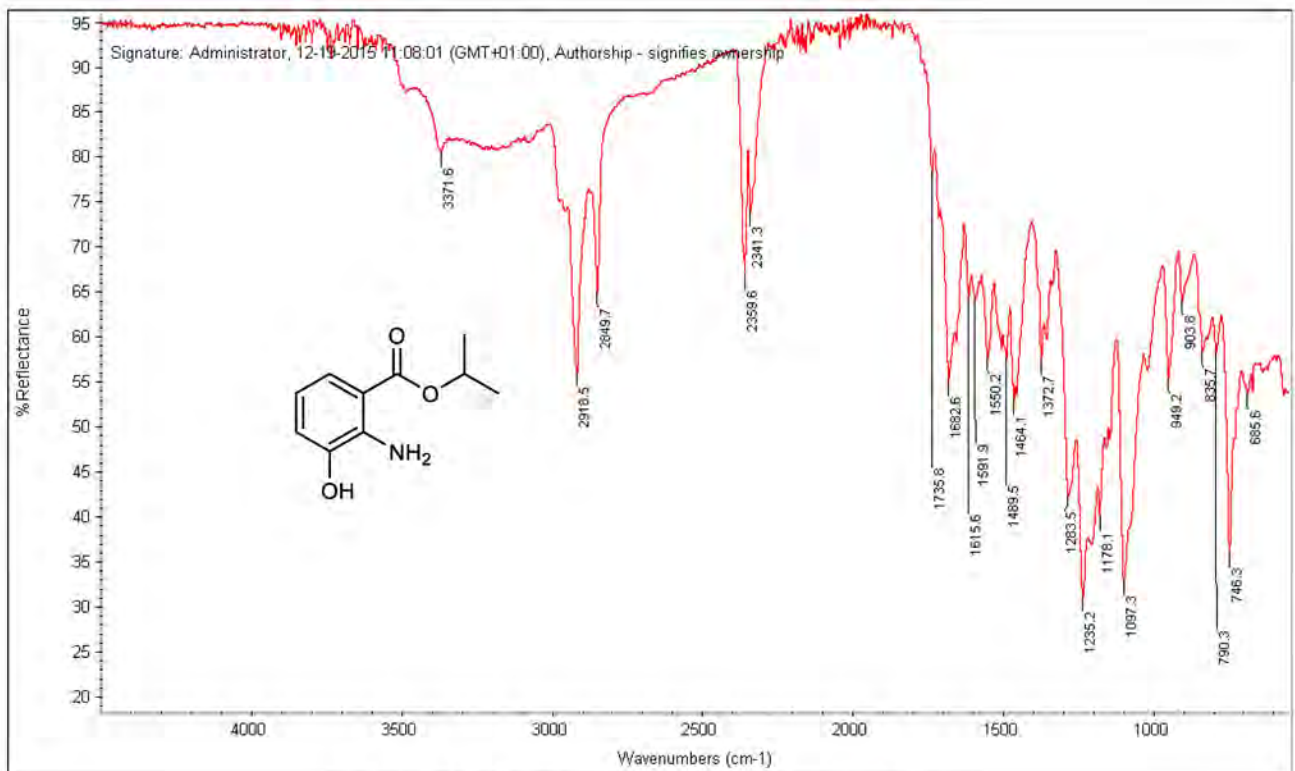


Prilog 17. IR spektar metil-*N*-benzoilanthranilata

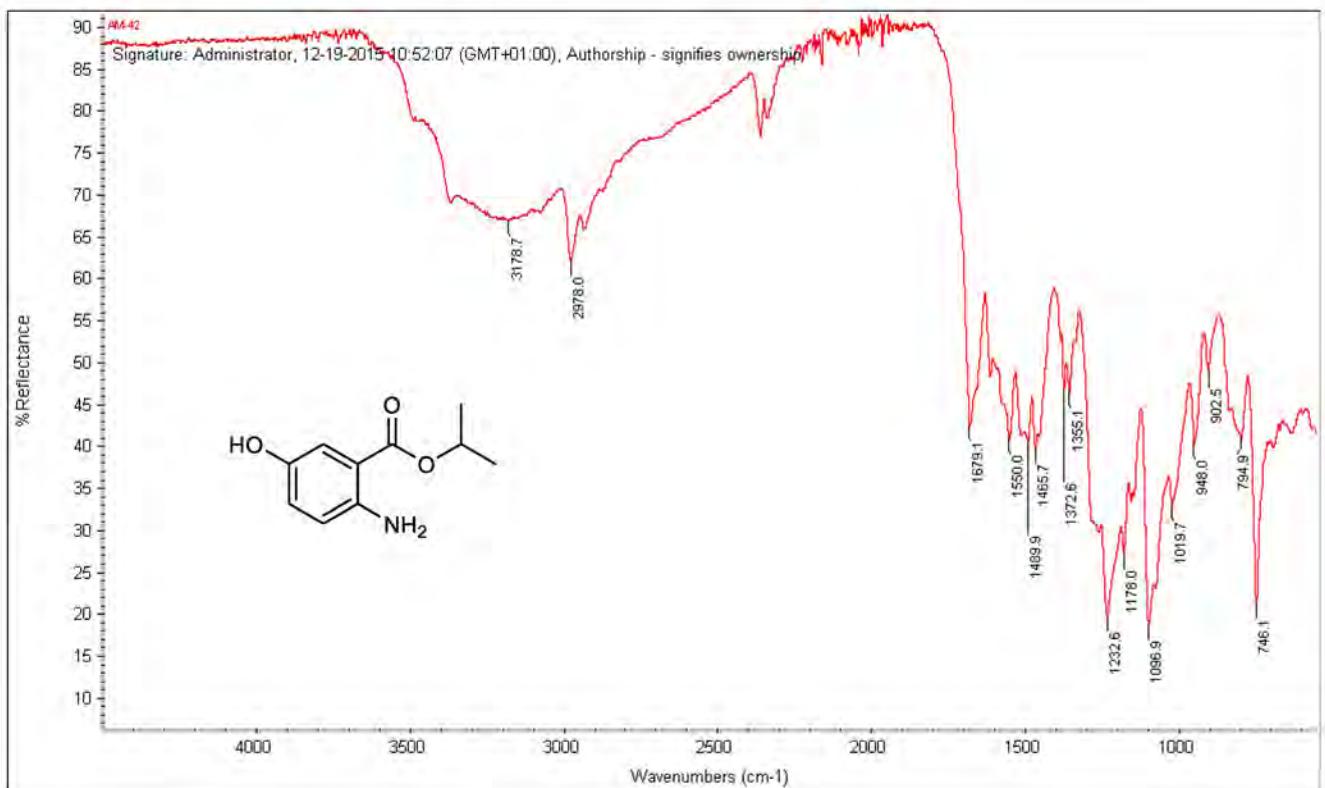


Prilog 18. IR spektar metil-*N*-formilanthranilata

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

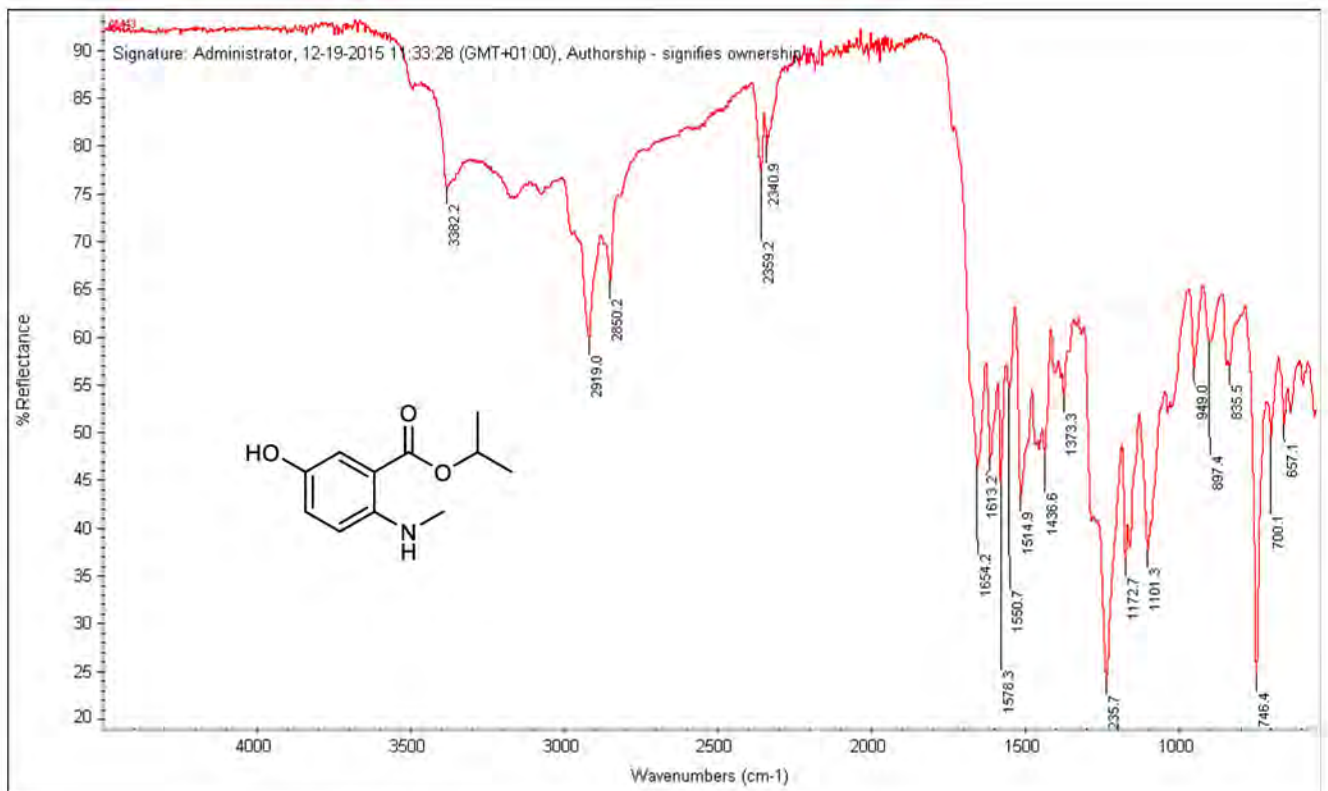


Prilog 19. IR spektar izopropil-3-hidroksiantranilata

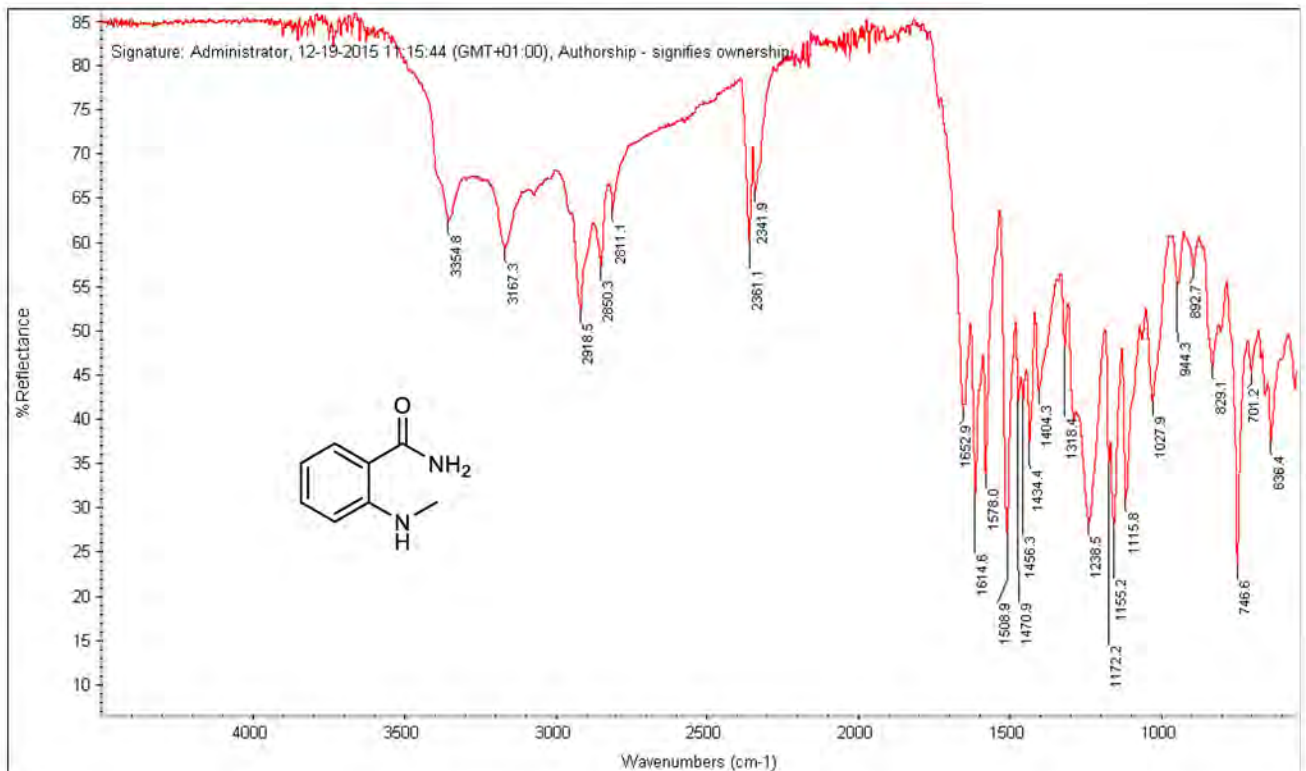


Prilog 20. IR spektar izopropil-5-hidroksiantranilata

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

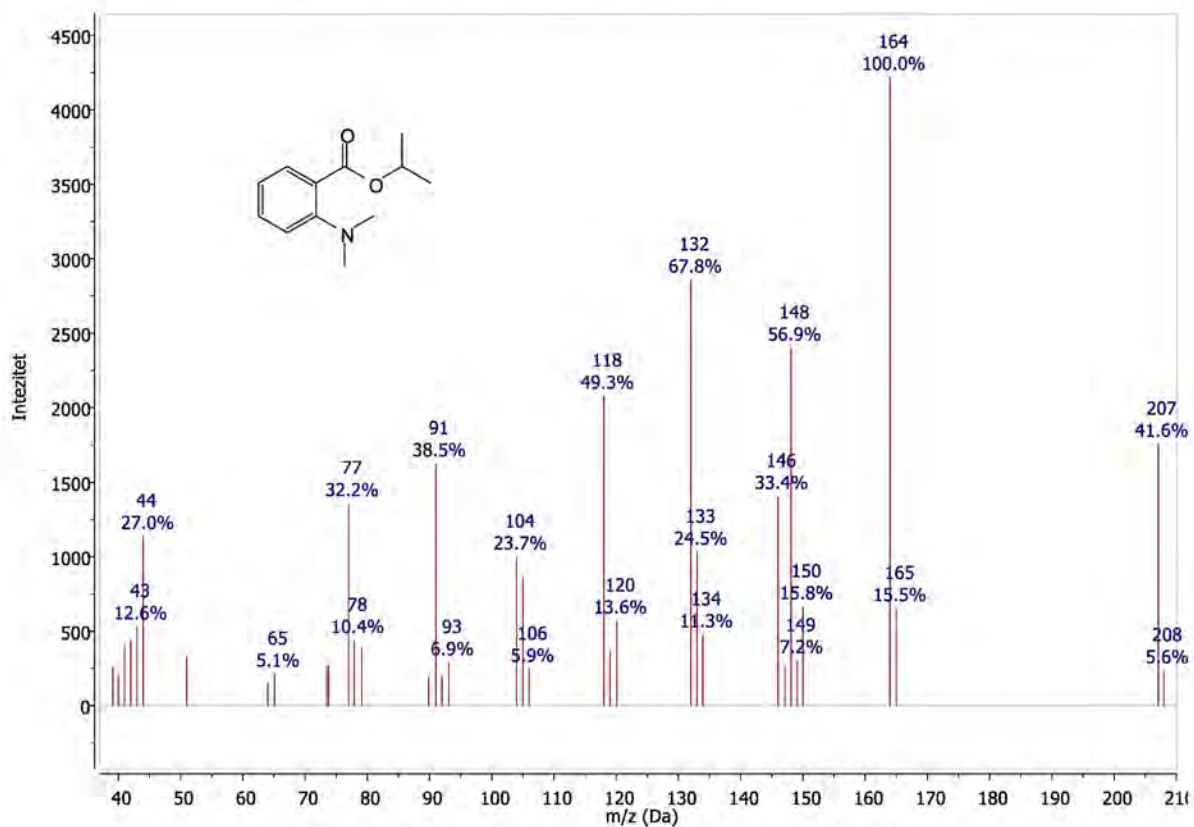
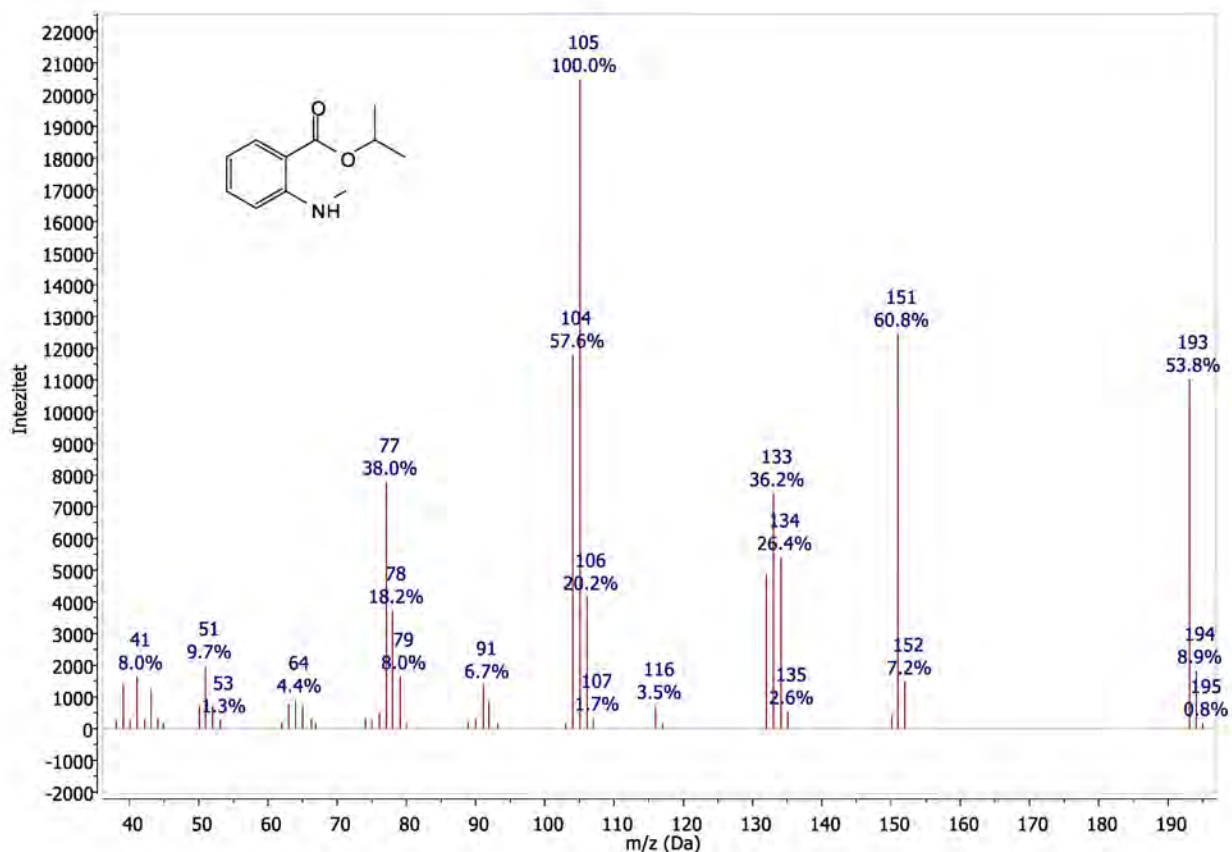


Prilog 21. IR spektar izopropil-5-hidroksi-*N*-metilantranilata

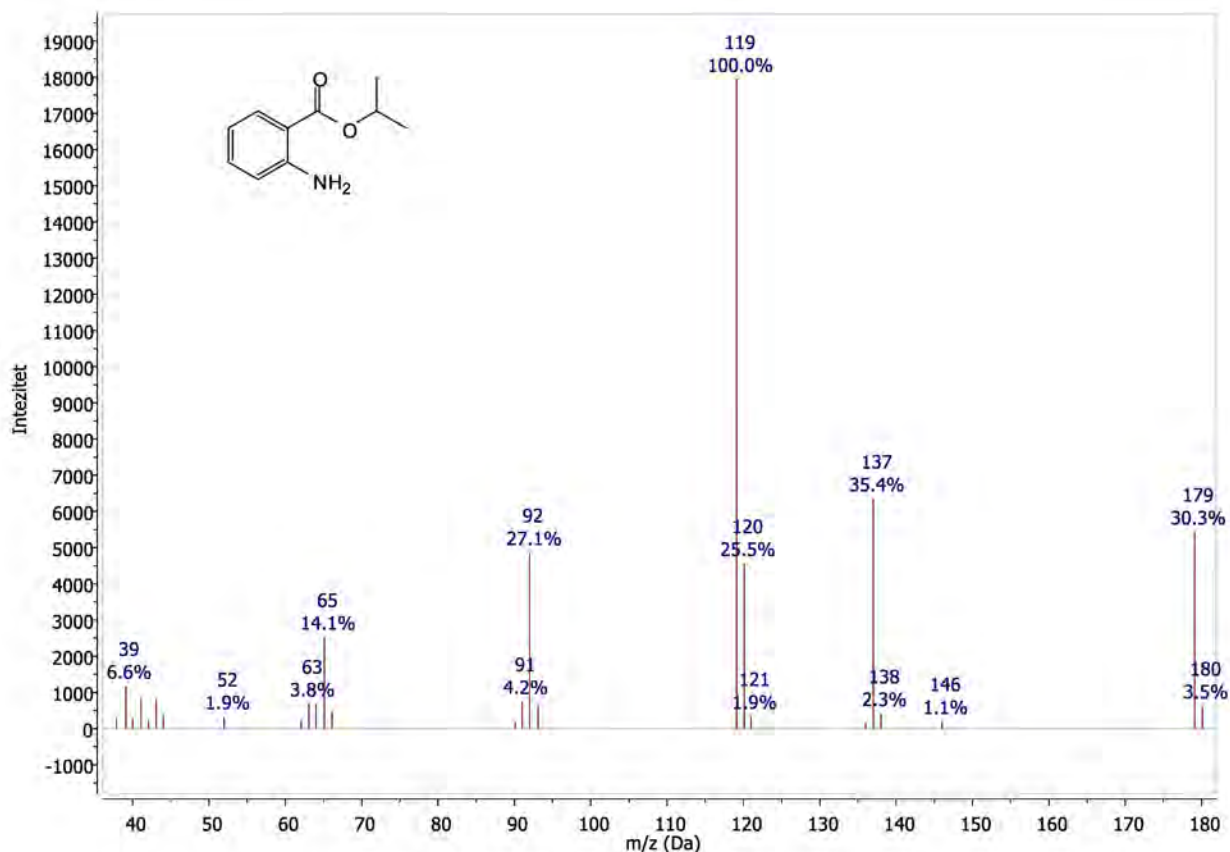


Prilog 22. IR spektar amida *N*-metilantranilne kiseline

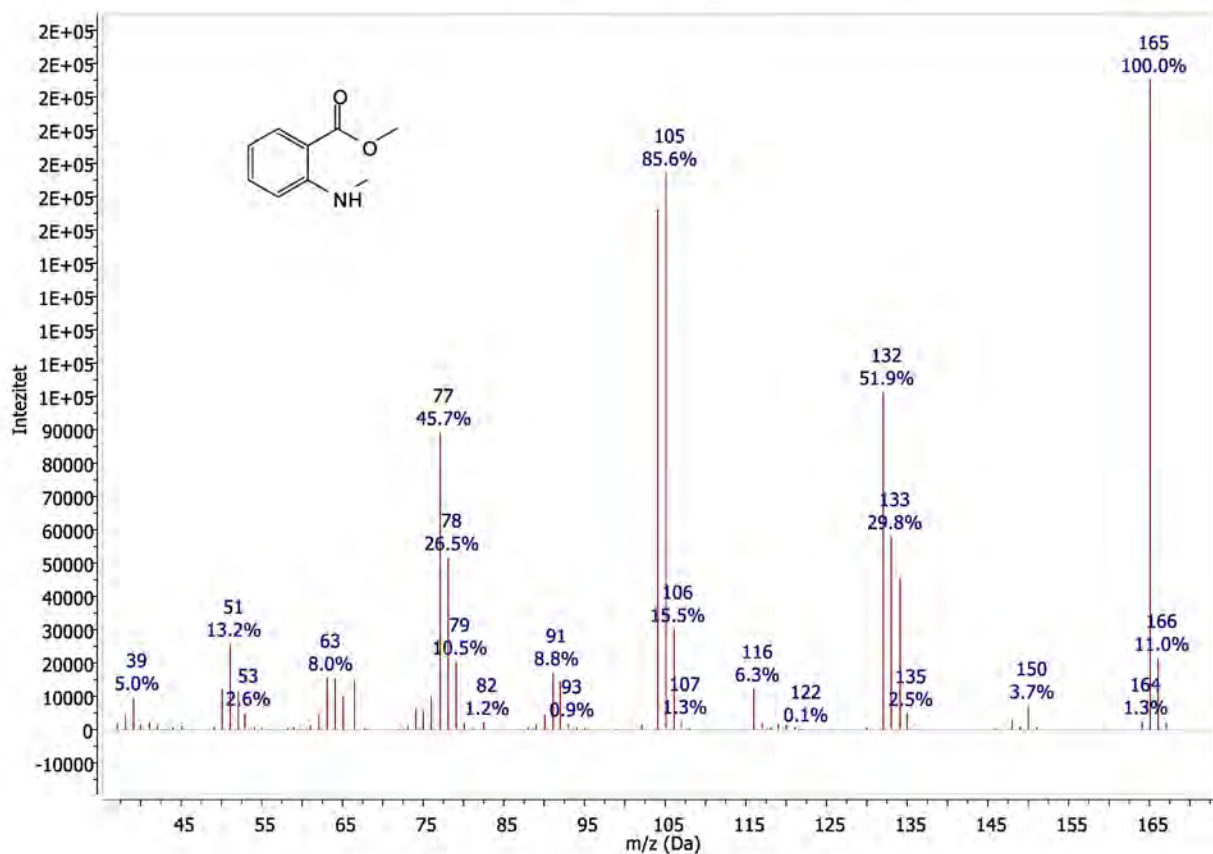
Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost



Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

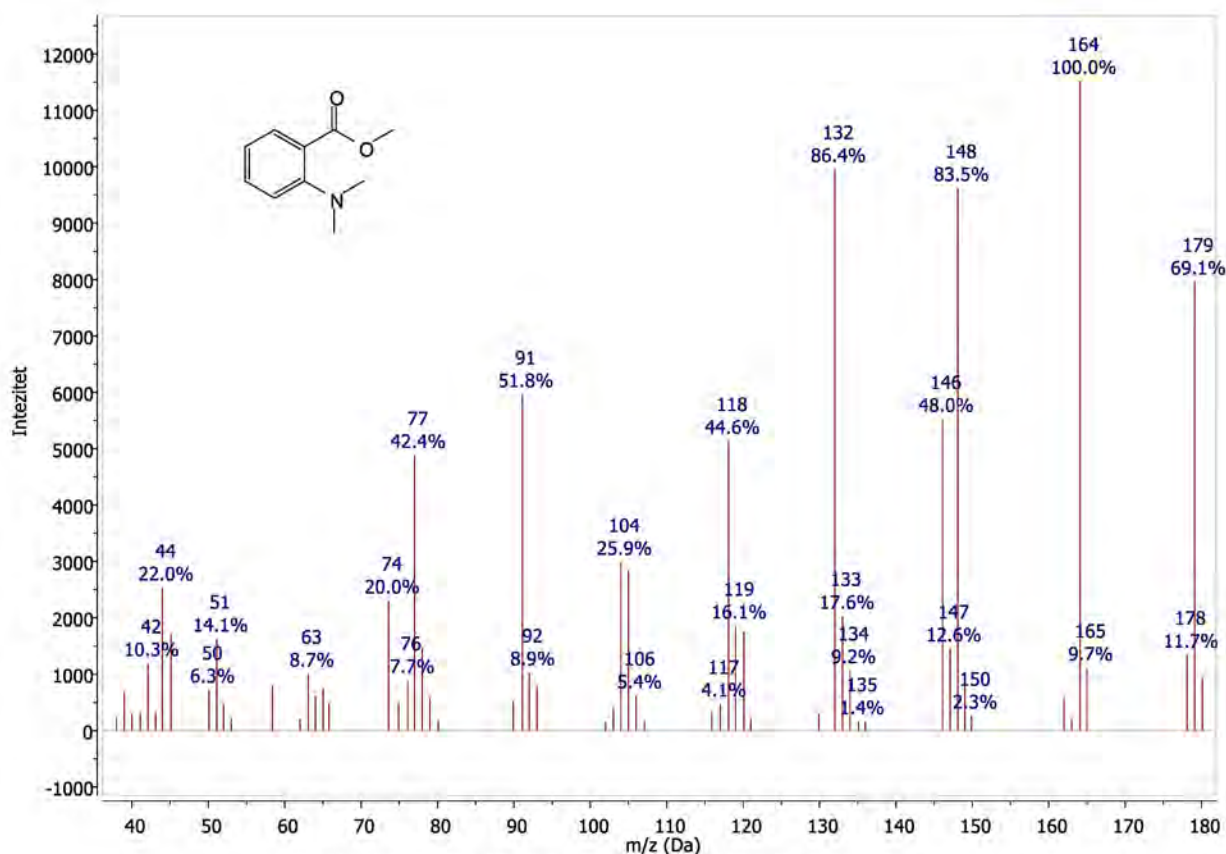


Prilog 25. (EI)MS spektar izopropil-antranilata



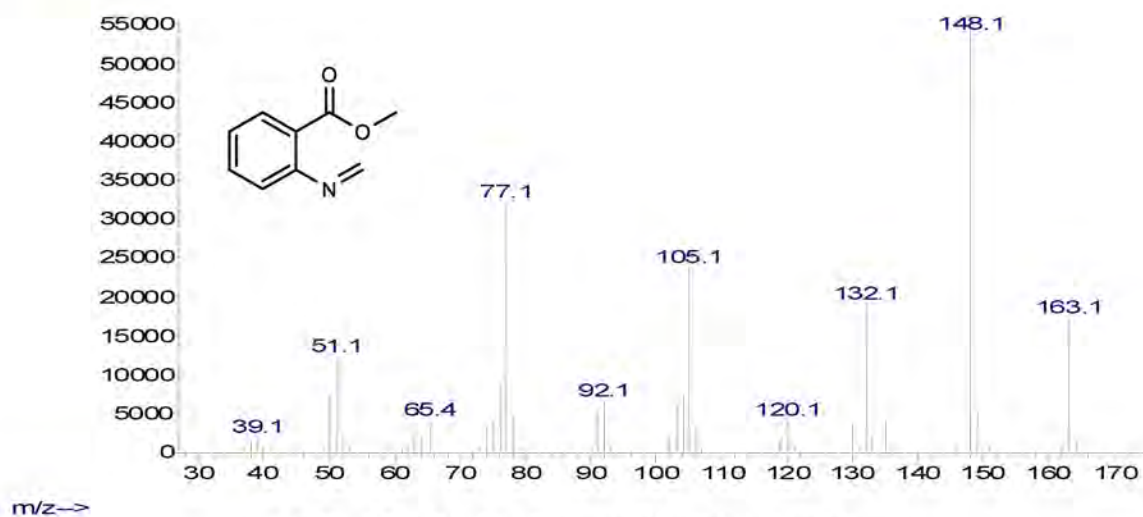
Prilog 26. (EI)MS spektar metil-N-metilantranilata

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost



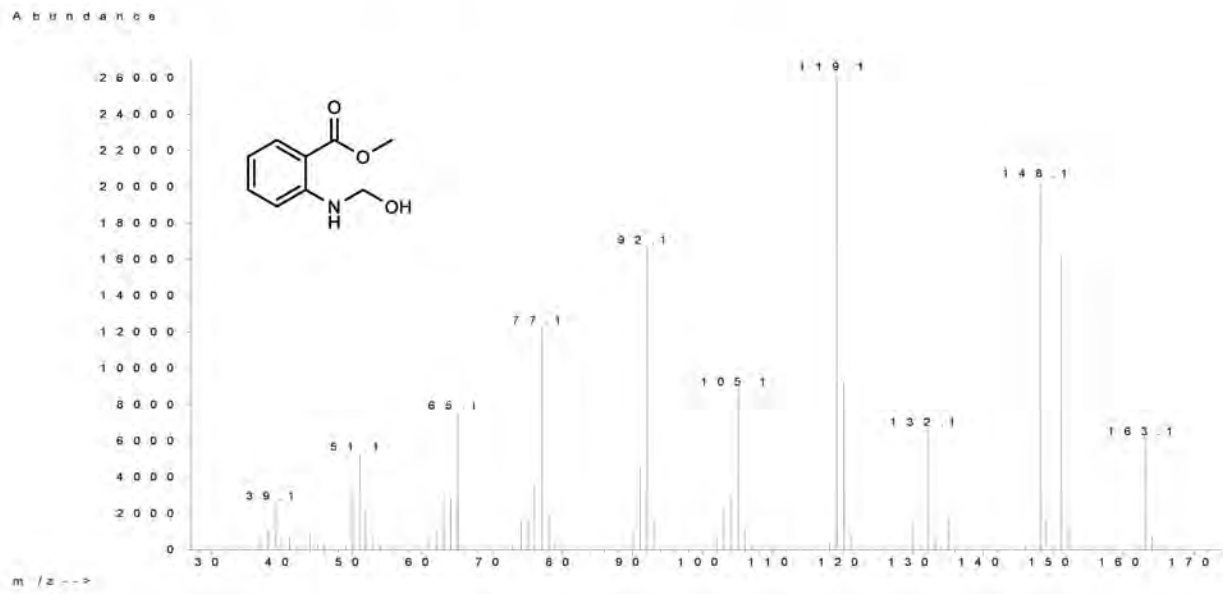
Prilog 27. (EI)MS spektar metil-*N,N*-dimetilantranilata

Abundance

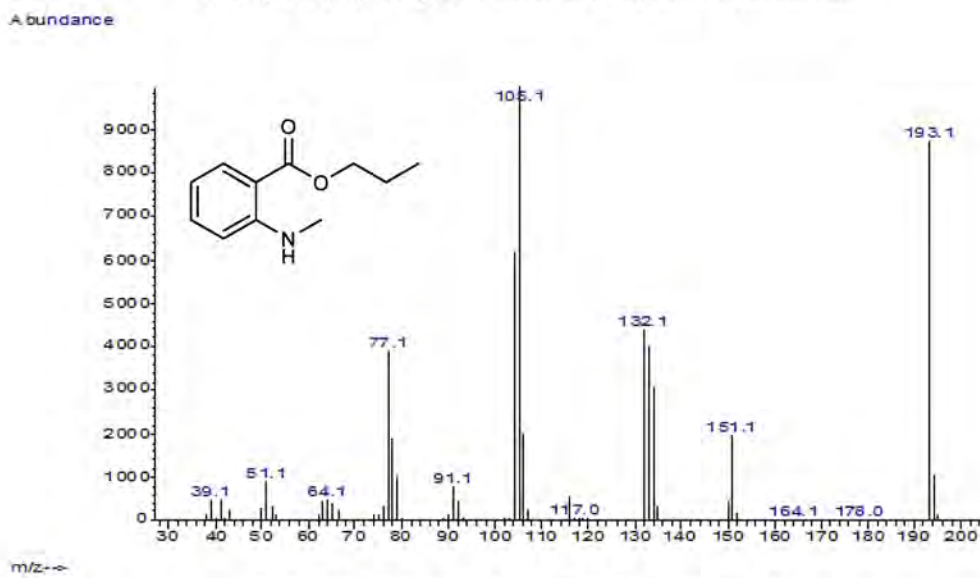


Prilog 28. (EI)MS spektar metil-*N*-metilenantranilata

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

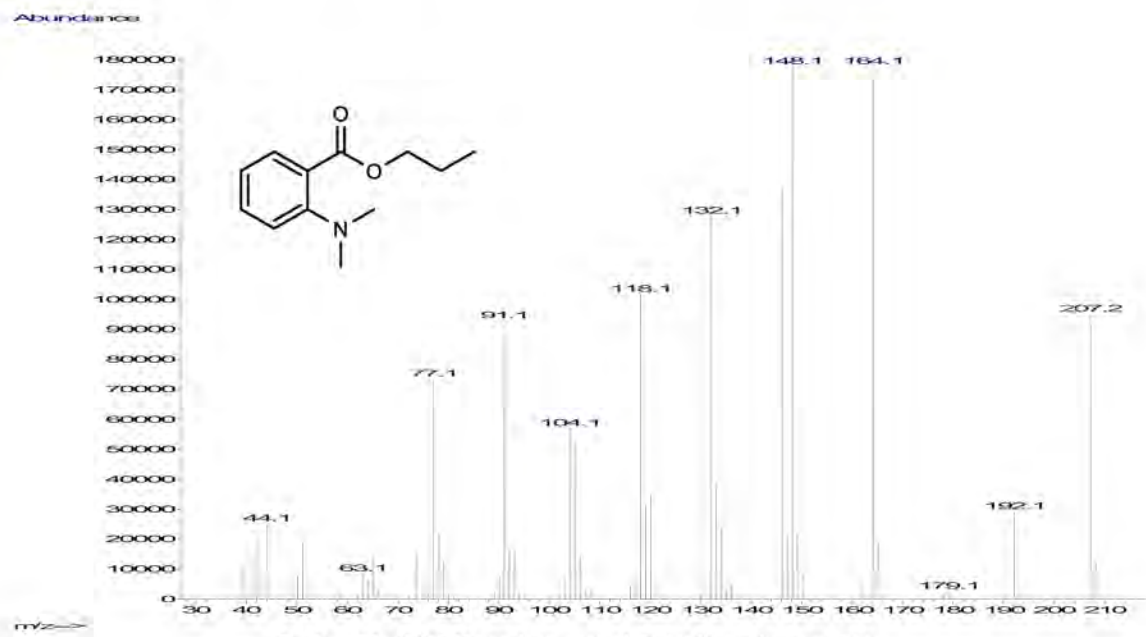


Prilog 29. (EI)MS spektar metil-*N*-(hidroksimetil)antranilata

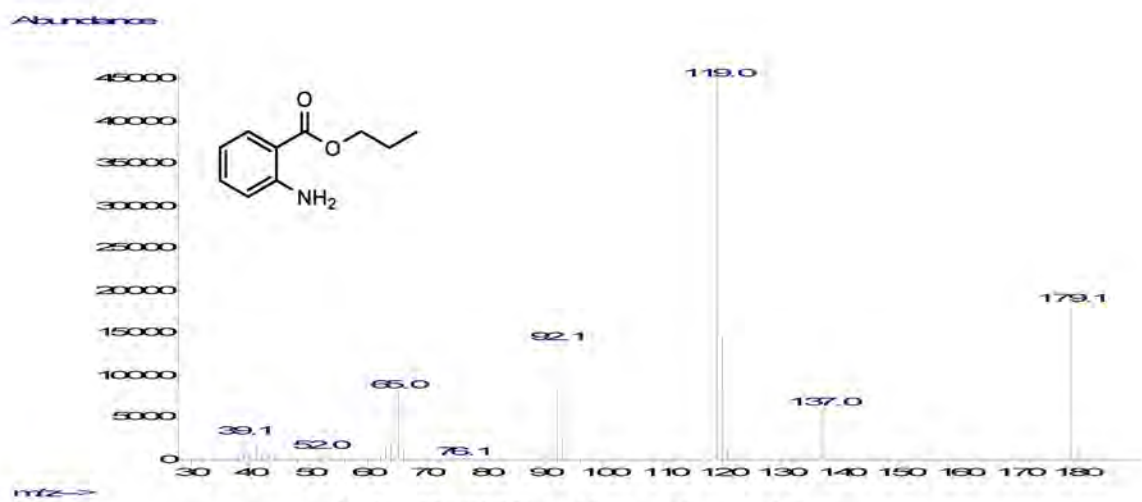


Prilog 30. (EI)MS spektar propil-*N*-metilantranilata

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

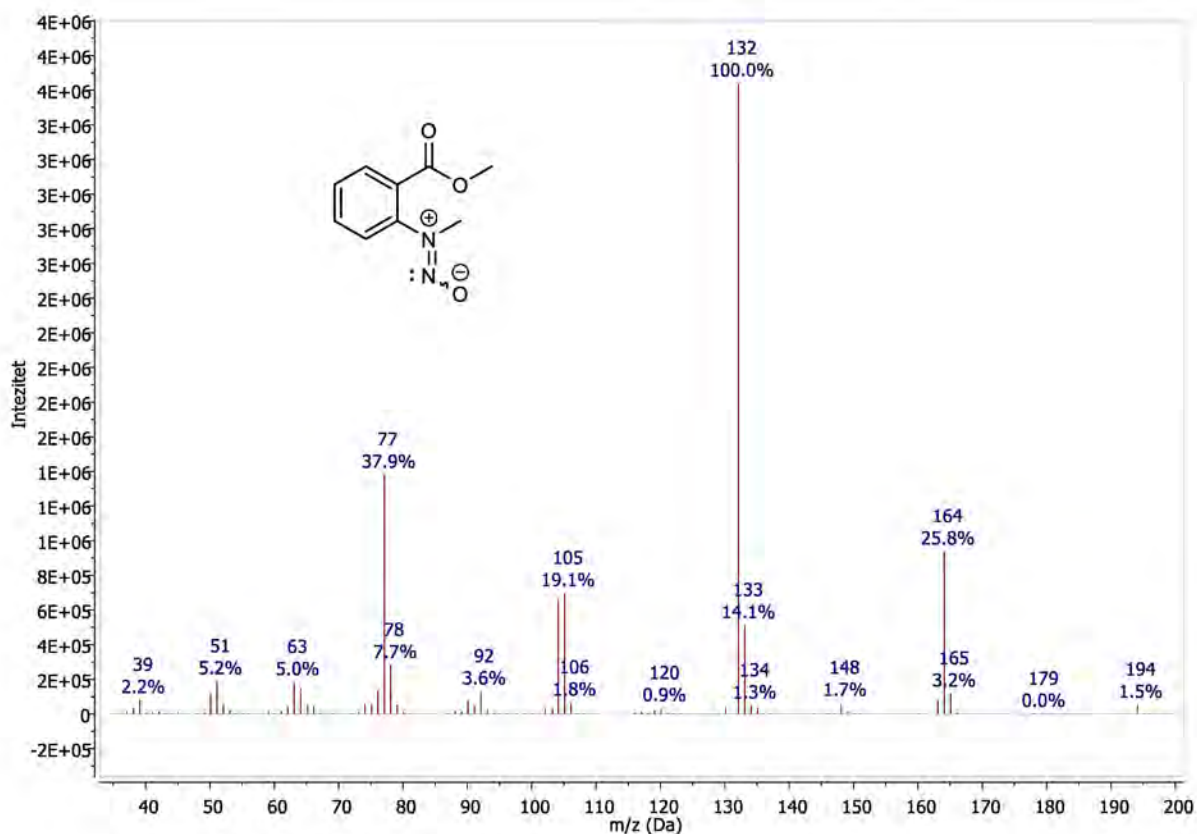


Prilog 31. (EI)MS spektar propil-*N,N*-dimetilantranilata

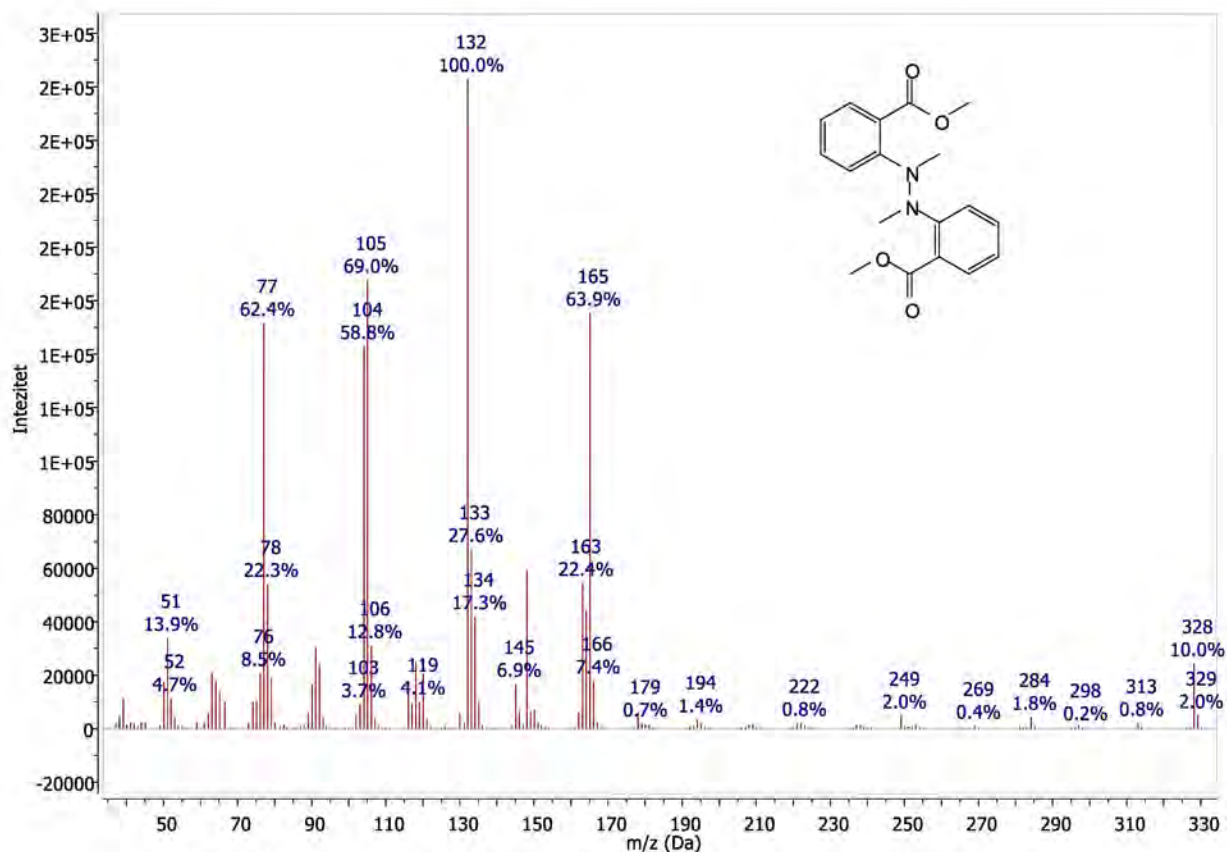


Prilog 32. (EI)MS spektar propil-antranilata

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

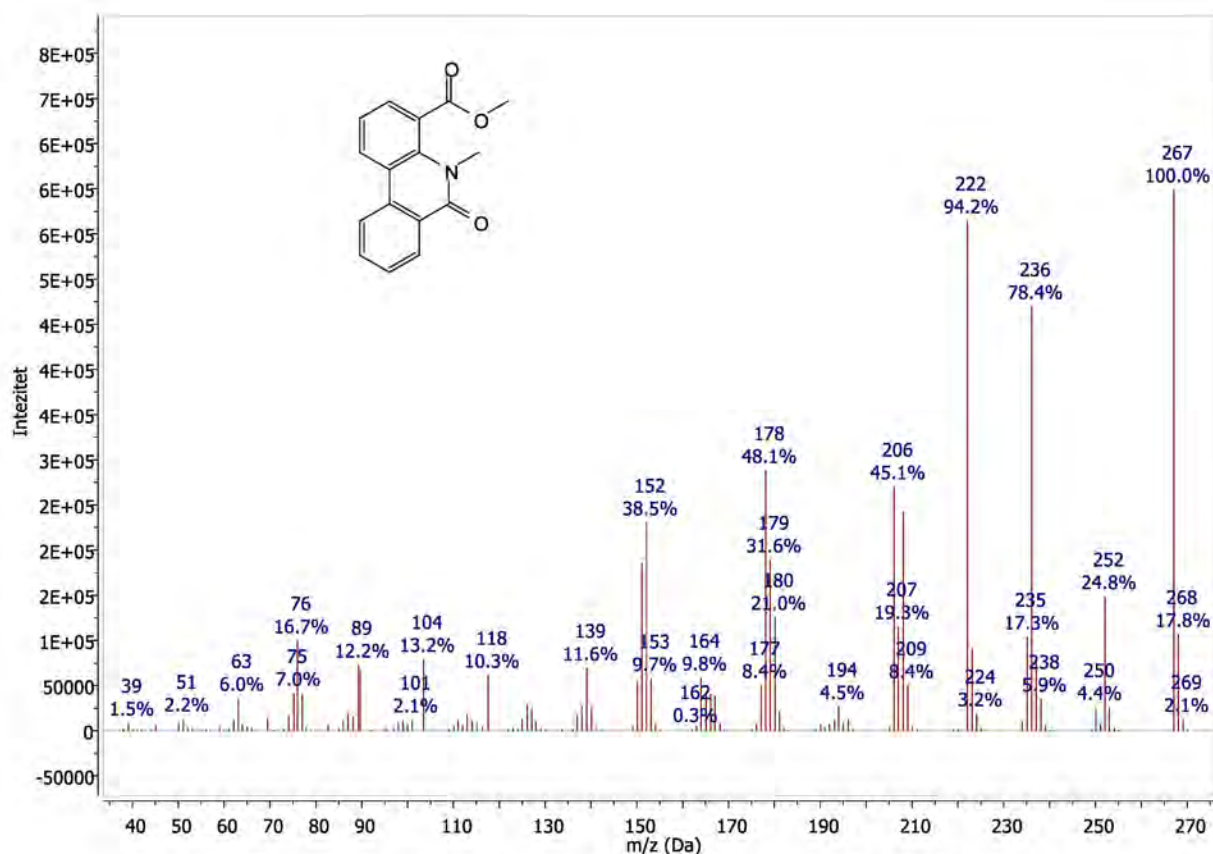


Prilog 33. (EI)MS spektar metil-*N*-metil-*N*-nitroantranilata (NO-MMA)

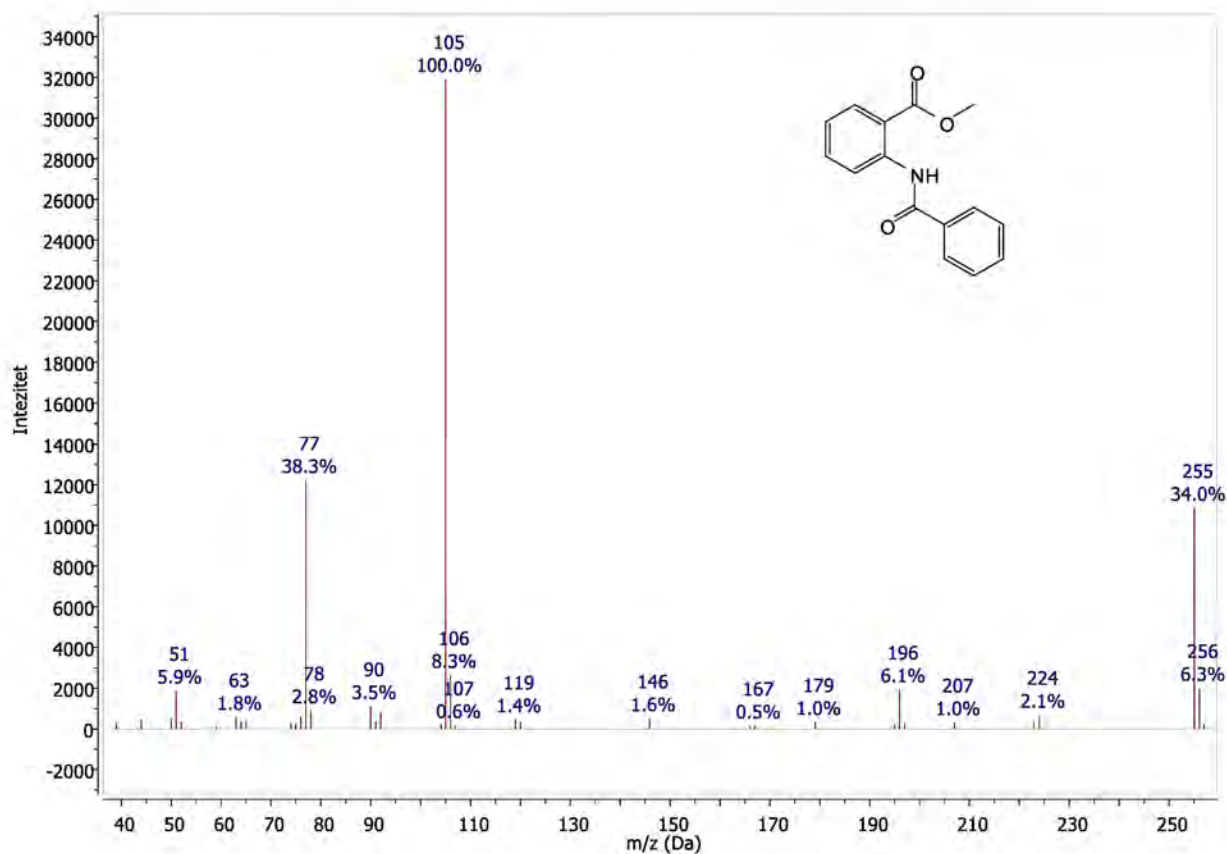


Prilog 34. (EI)MS spektar dimetil-2,2'-(1,2-dimetilhidrazin-1,2-diil)dibenzoata

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

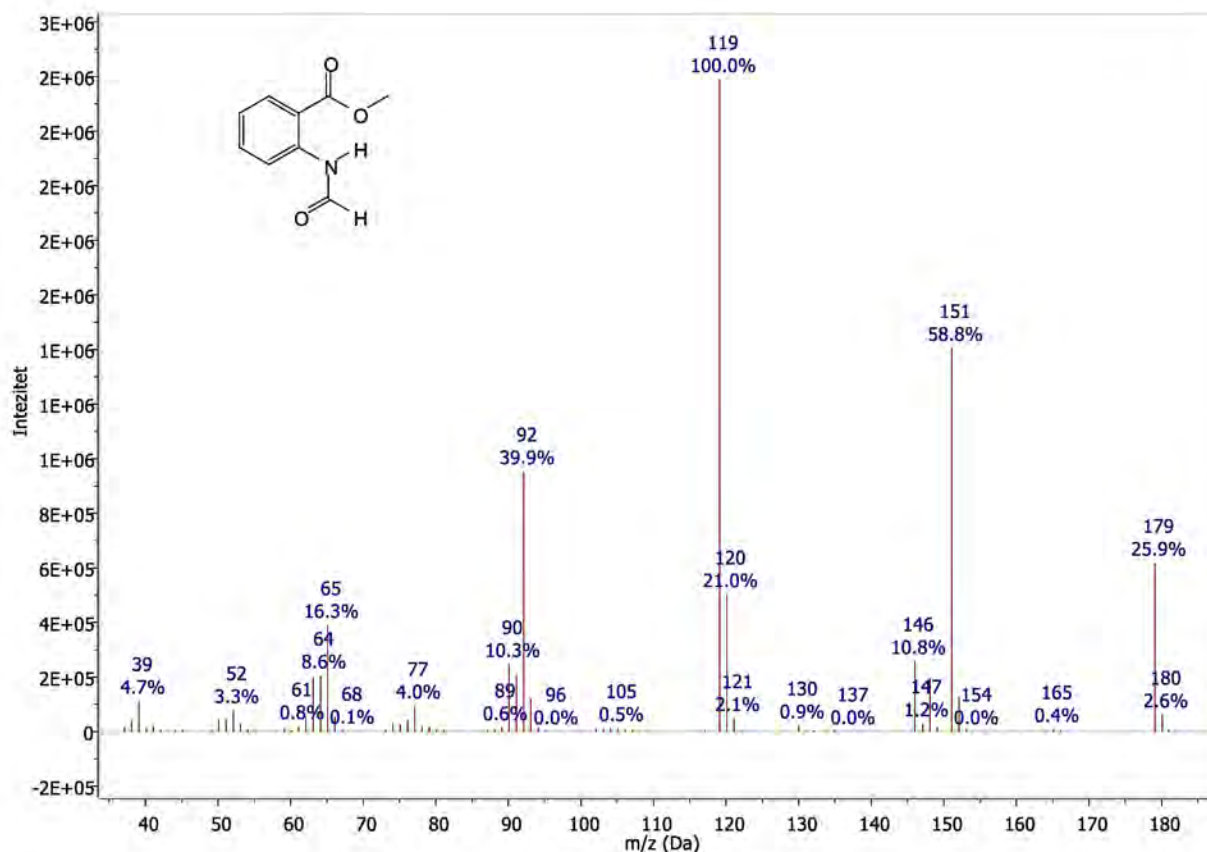


Prilog 35. (EI)MS spektar metil-5-metil-6-okso-(5H)-fenantridin-4-karboksilata

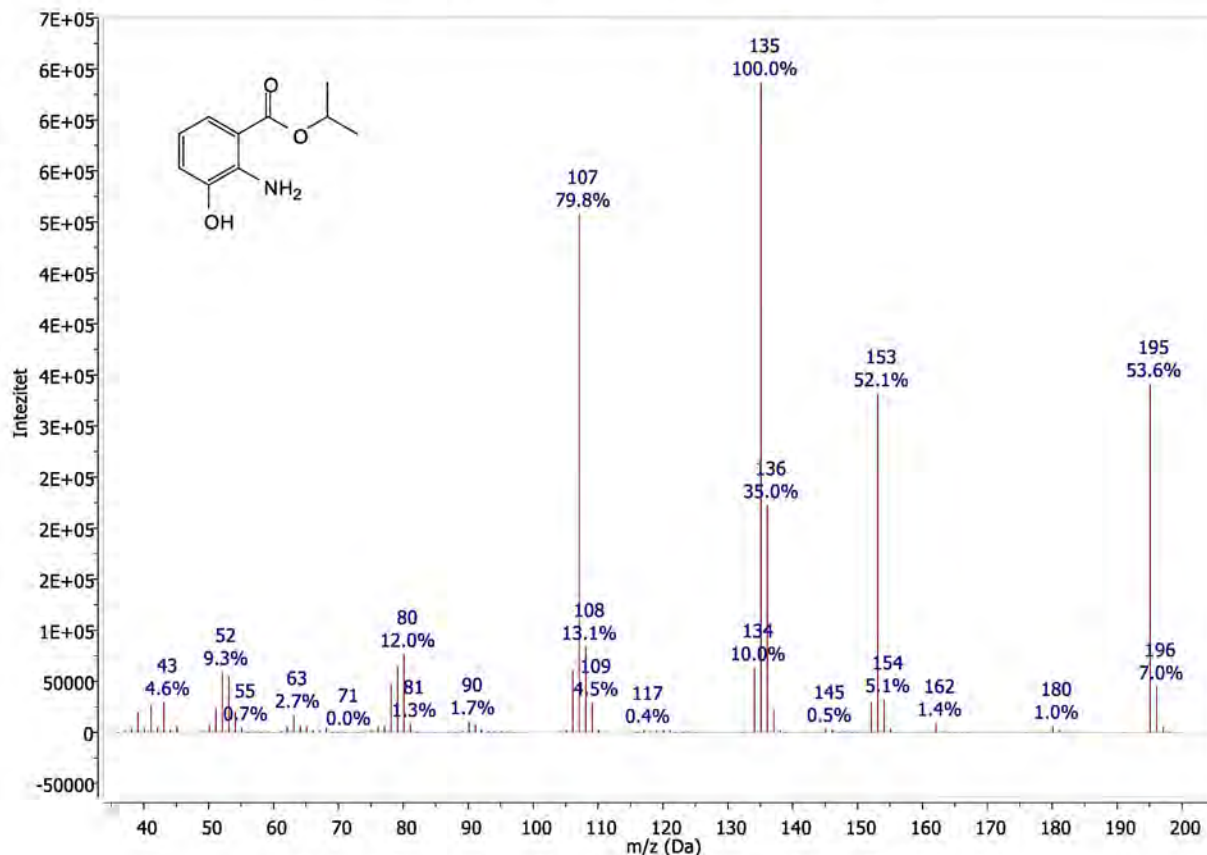


Prilog 36. (EI)MS spektar metil-N-benzoil-antranilata

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

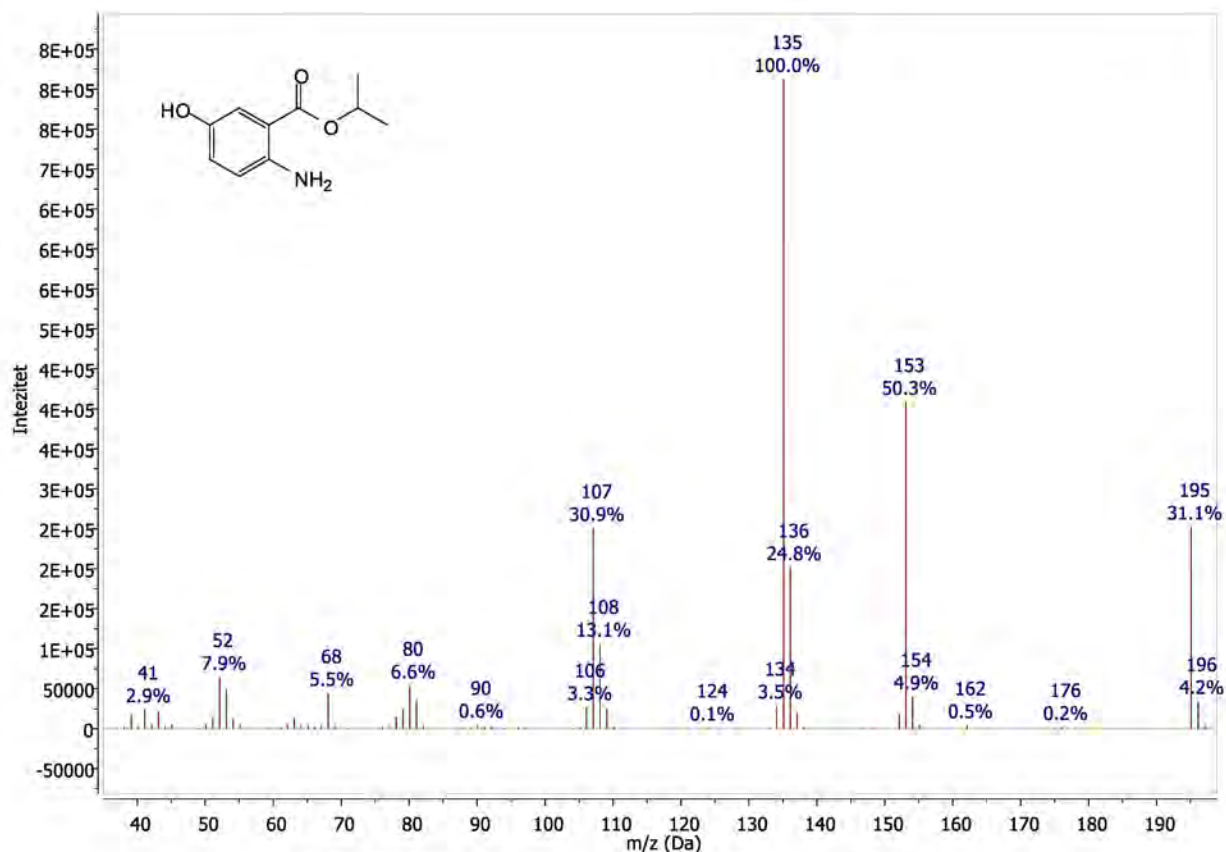


Prilog 37. (EI)MS spektar metil-N-formilantranilata

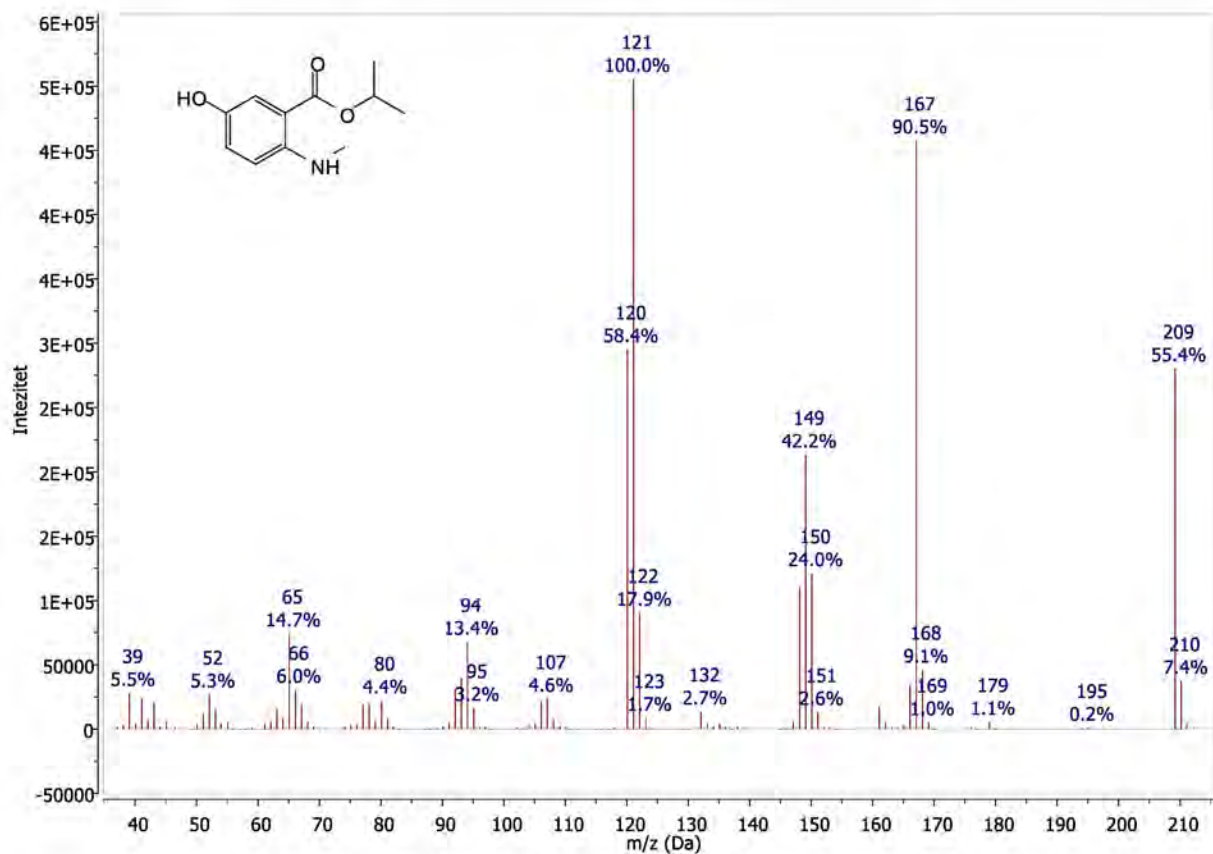


Prilog 38. (EI)MS spektar izopropil-3-hidroksiantranilata

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

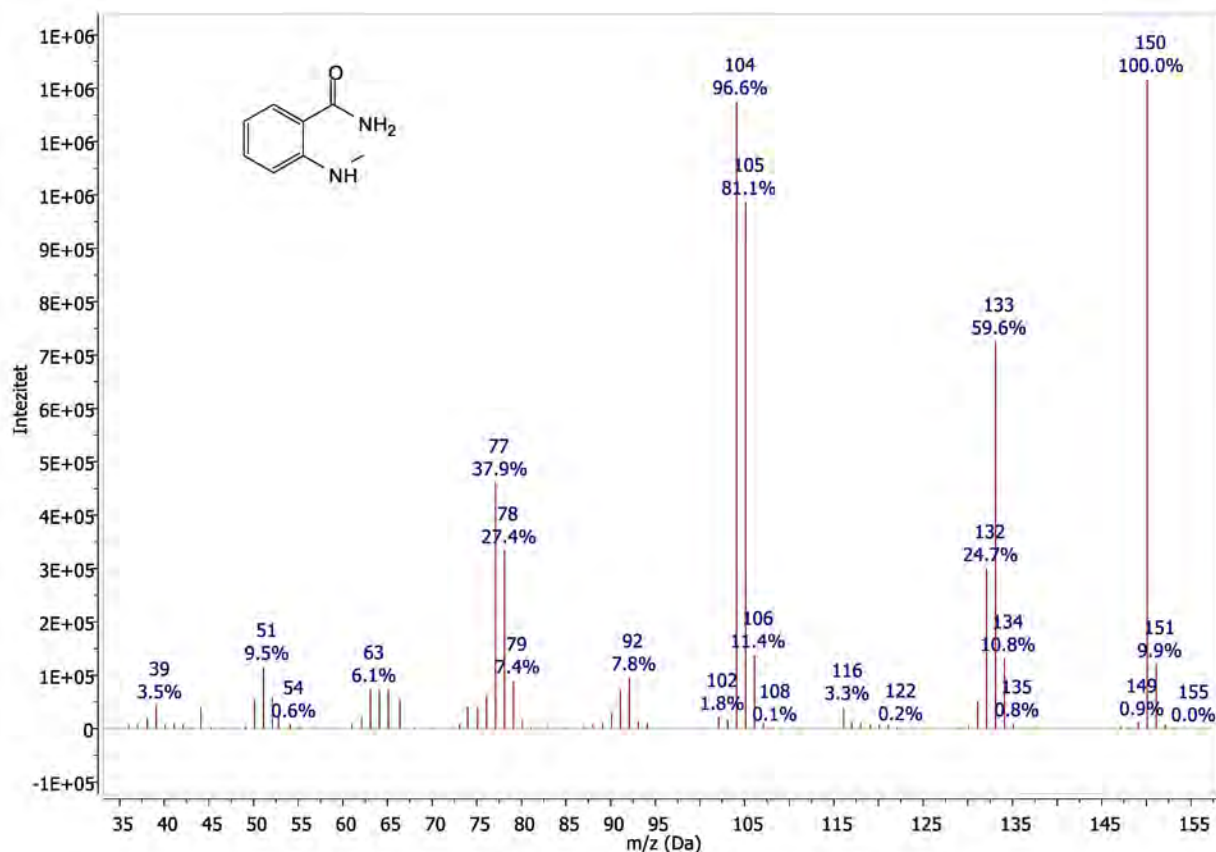


Prilog 39 (EI)MS spektar izopropil-5-hidroksiantranilata

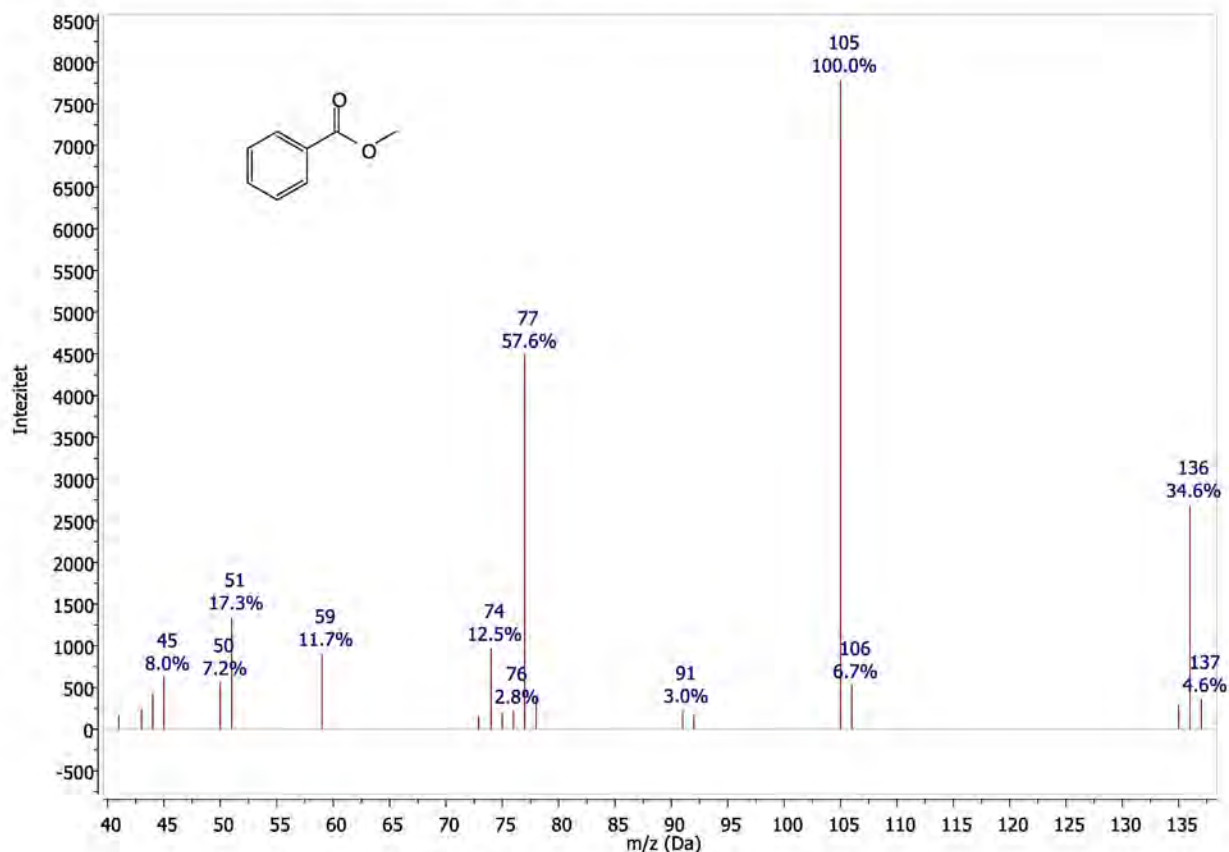


Prilog 40. (EI)MS spektar izopropil-5-hidroksi-N-metilantranilata

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

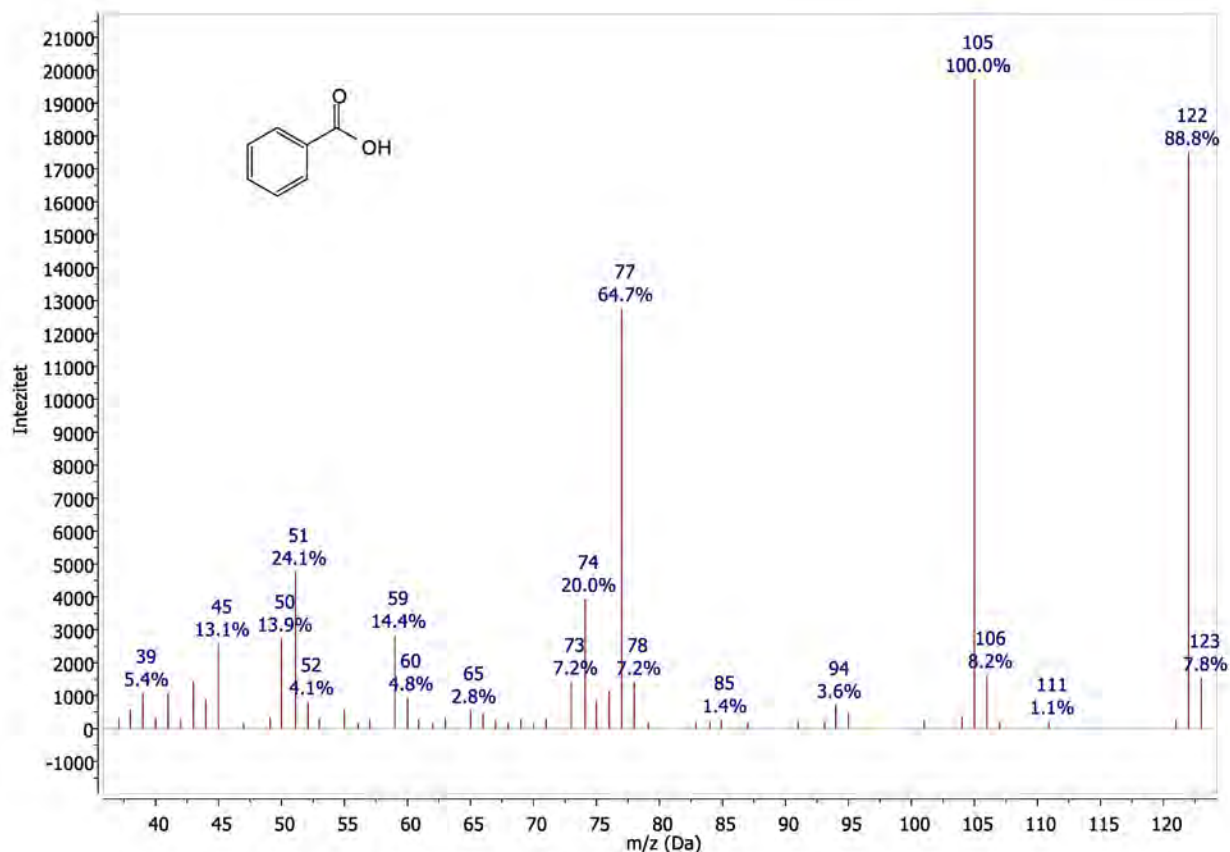


Prilog 41. (EI)MS spektar amida *N*-metilantranilne kiseline

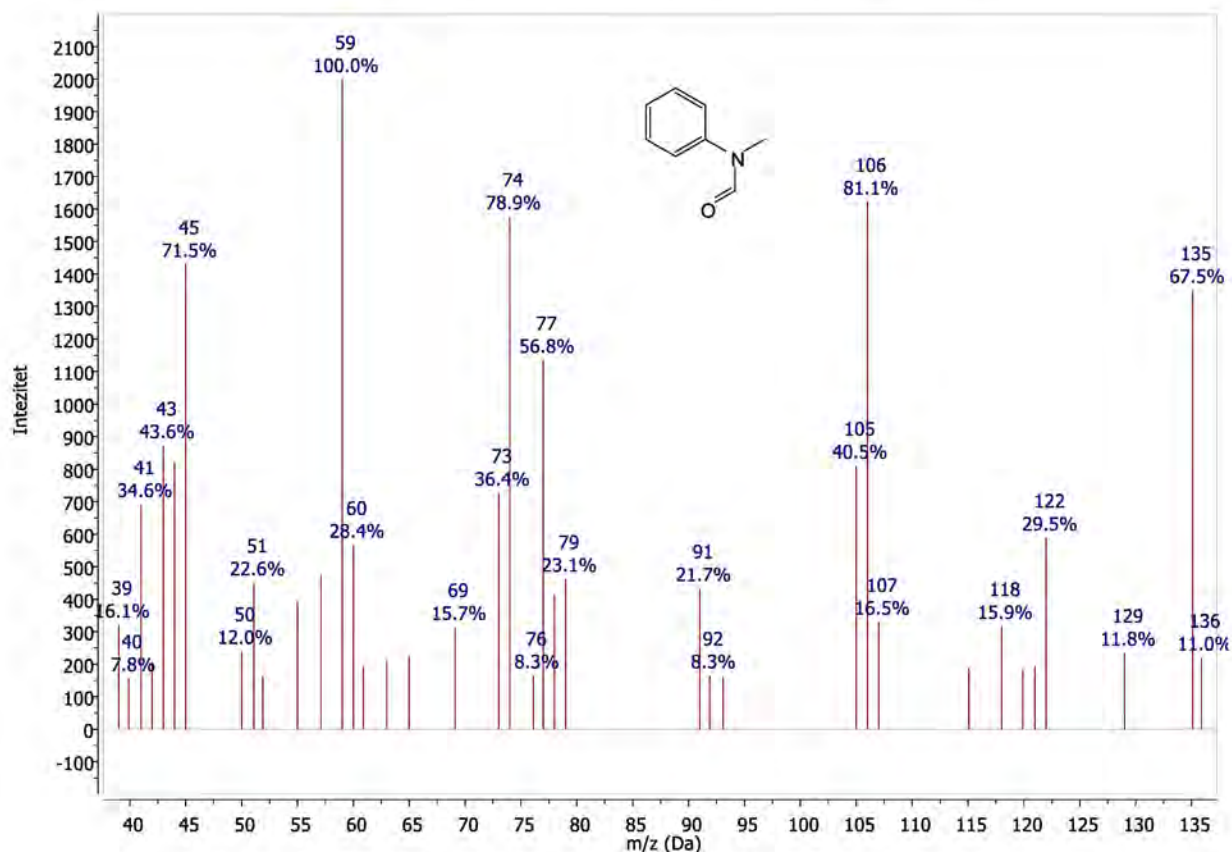


Prilog 42. (EI)MS spektar metil-benzoata (Tabela 5.11, N^o 1)

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

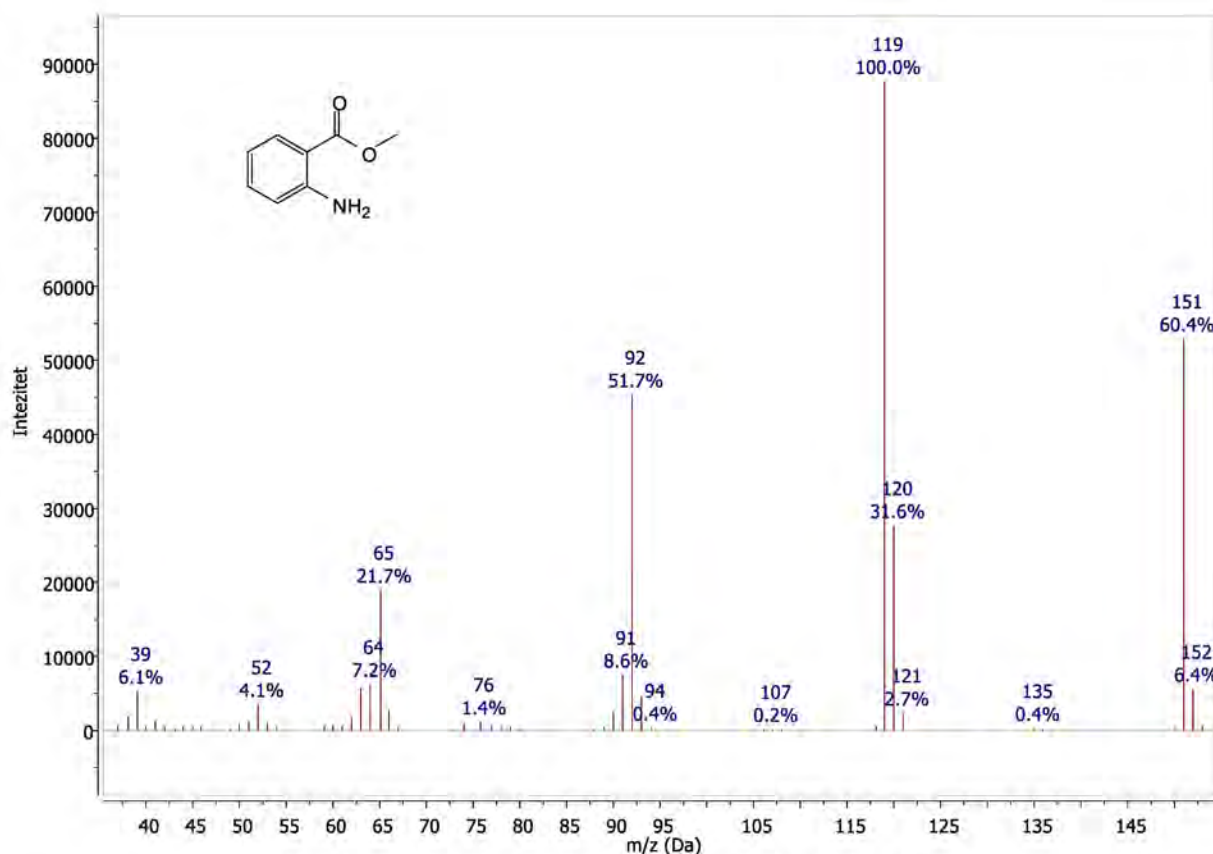


Prilog 43. (EI)MS spektar benzojeve kiseline (Tabela 5.11, N^o 2)

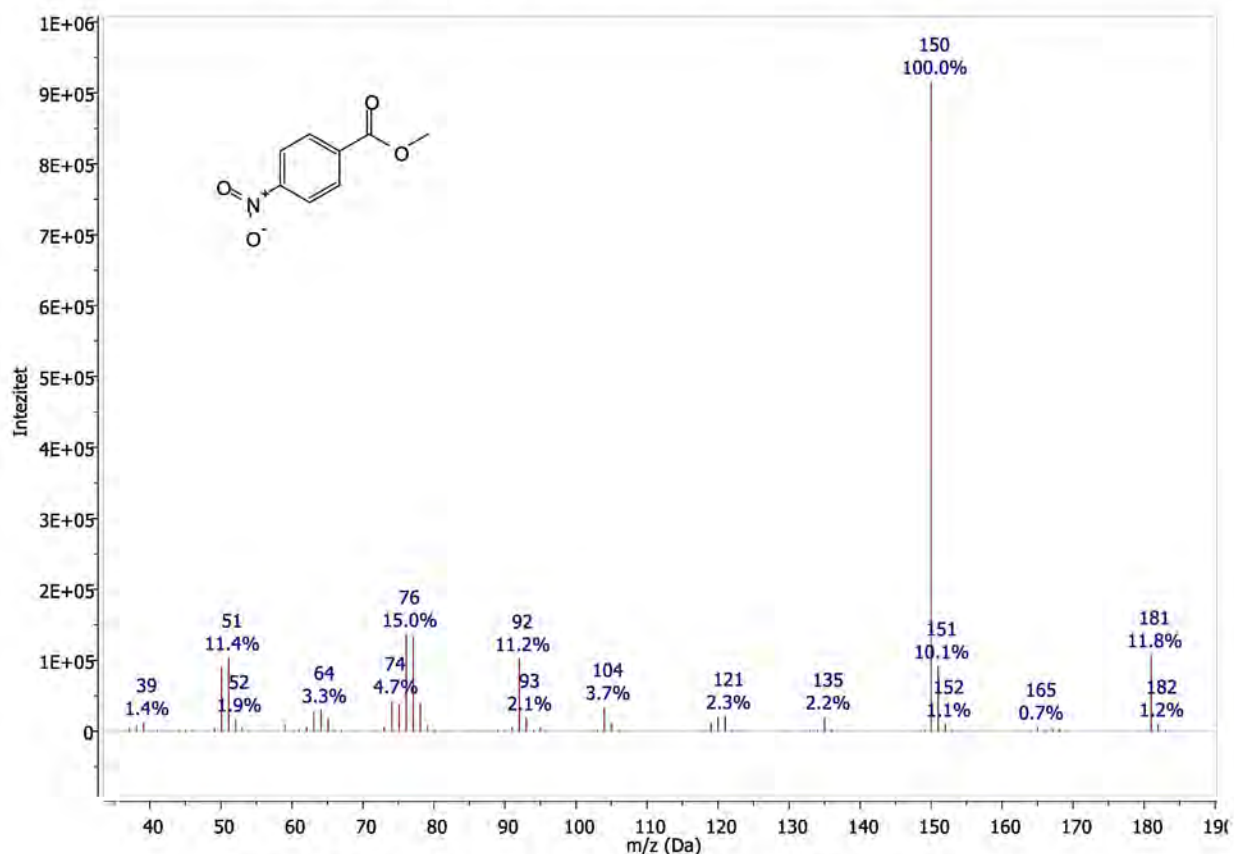


Prilog 44. (EI)MS spektar *N*-metil-*N*-fenilformamida (Tabela 5.11, N^o 3)

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

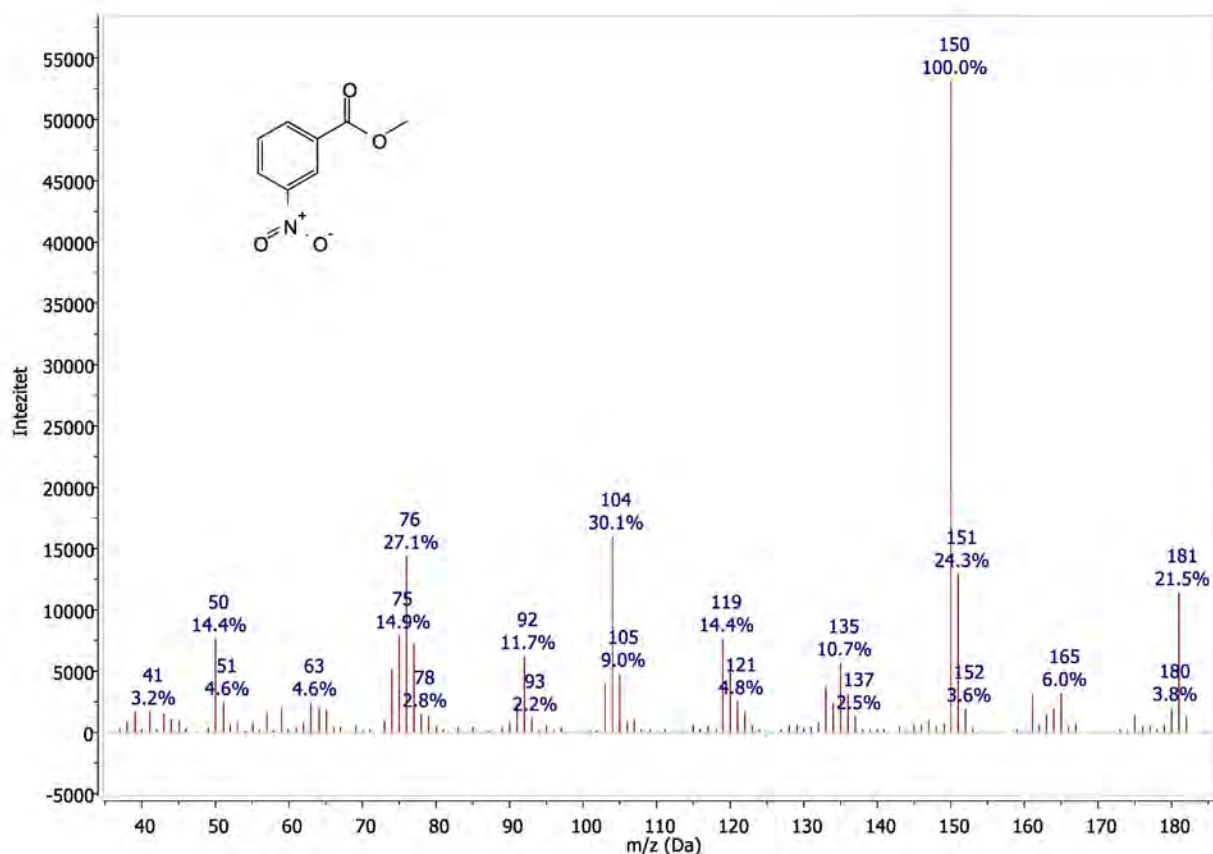


Prilog 45. (EI)MS spektar metil-antranilata (Tabela 5.11, N° 4)

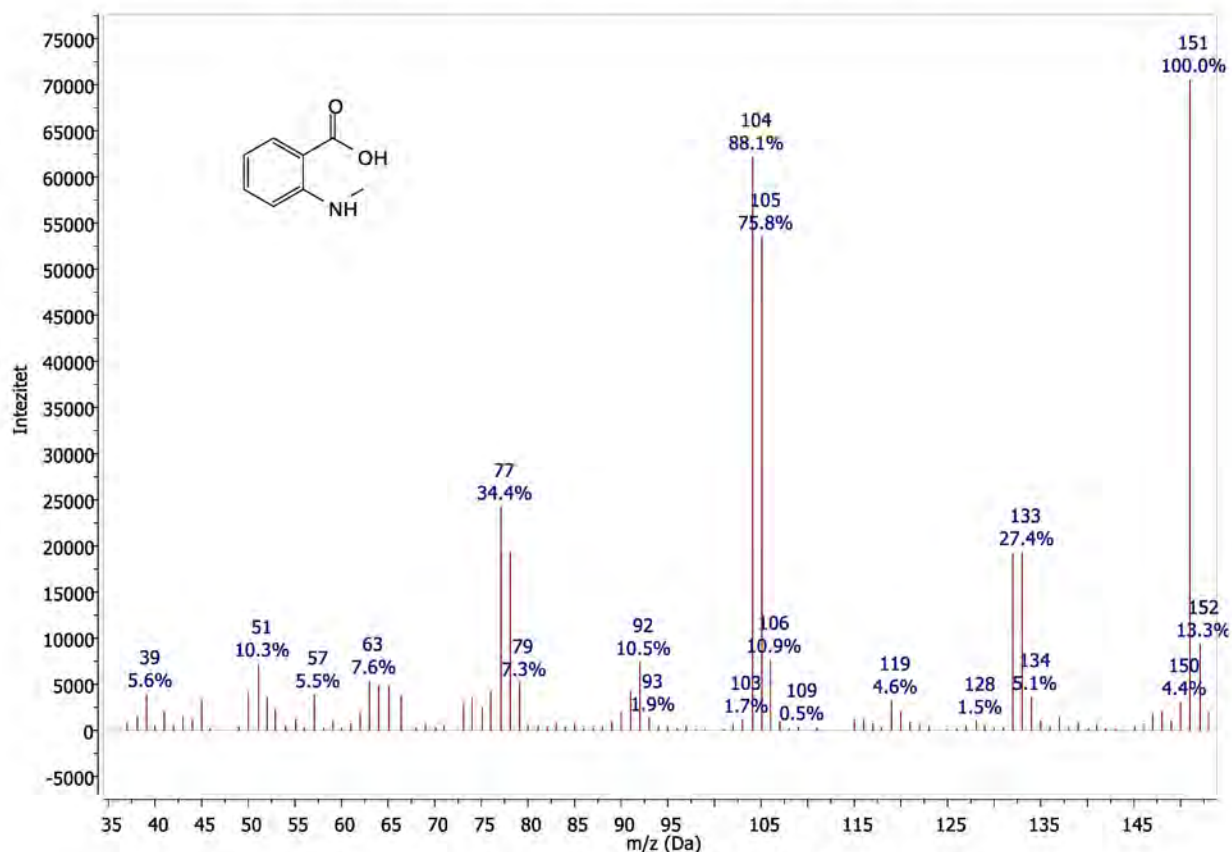


Prilog 46. (EI)MS spektar metil-4-nitrobenzoata (Tabela 5.11, N° 6)

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

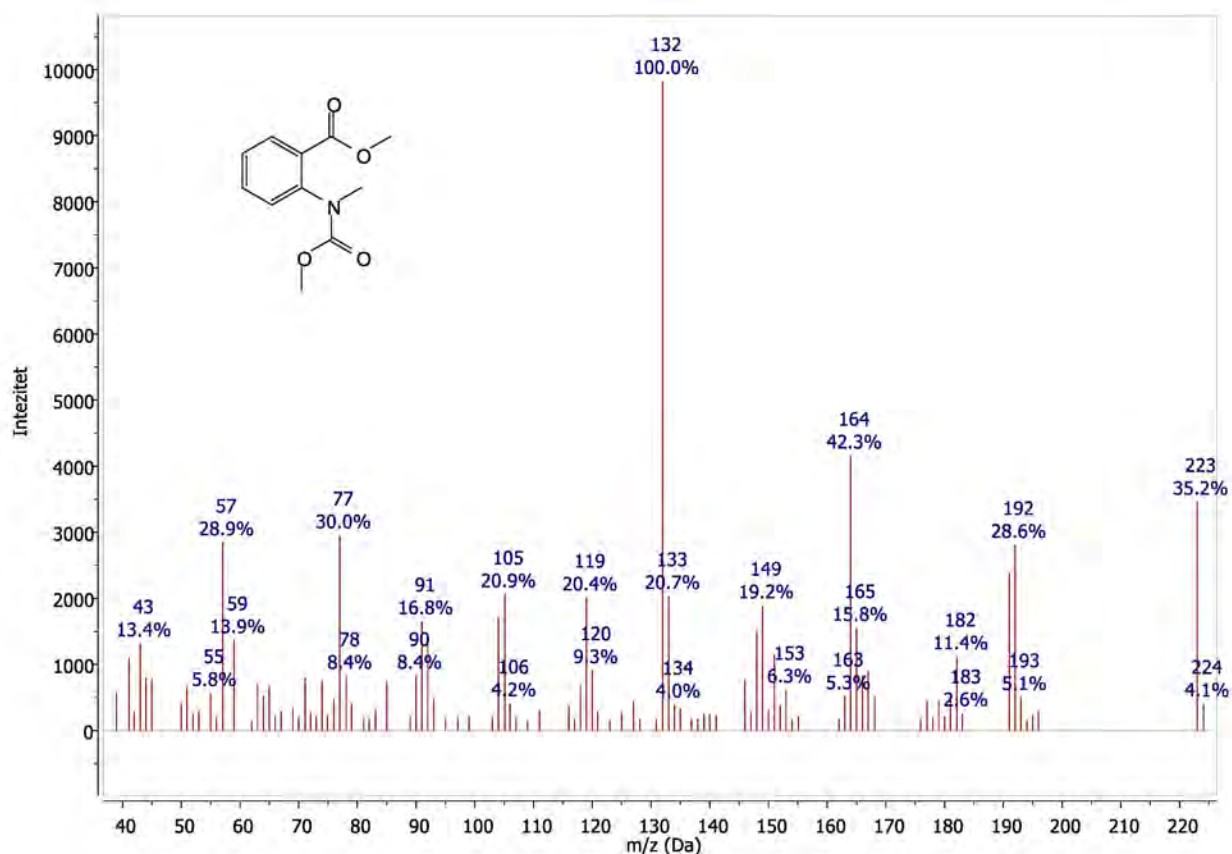


Prilog 47. (EI)MS spektar metil-3-nitrobenzoata (Tabela 5.11, N^o 7)

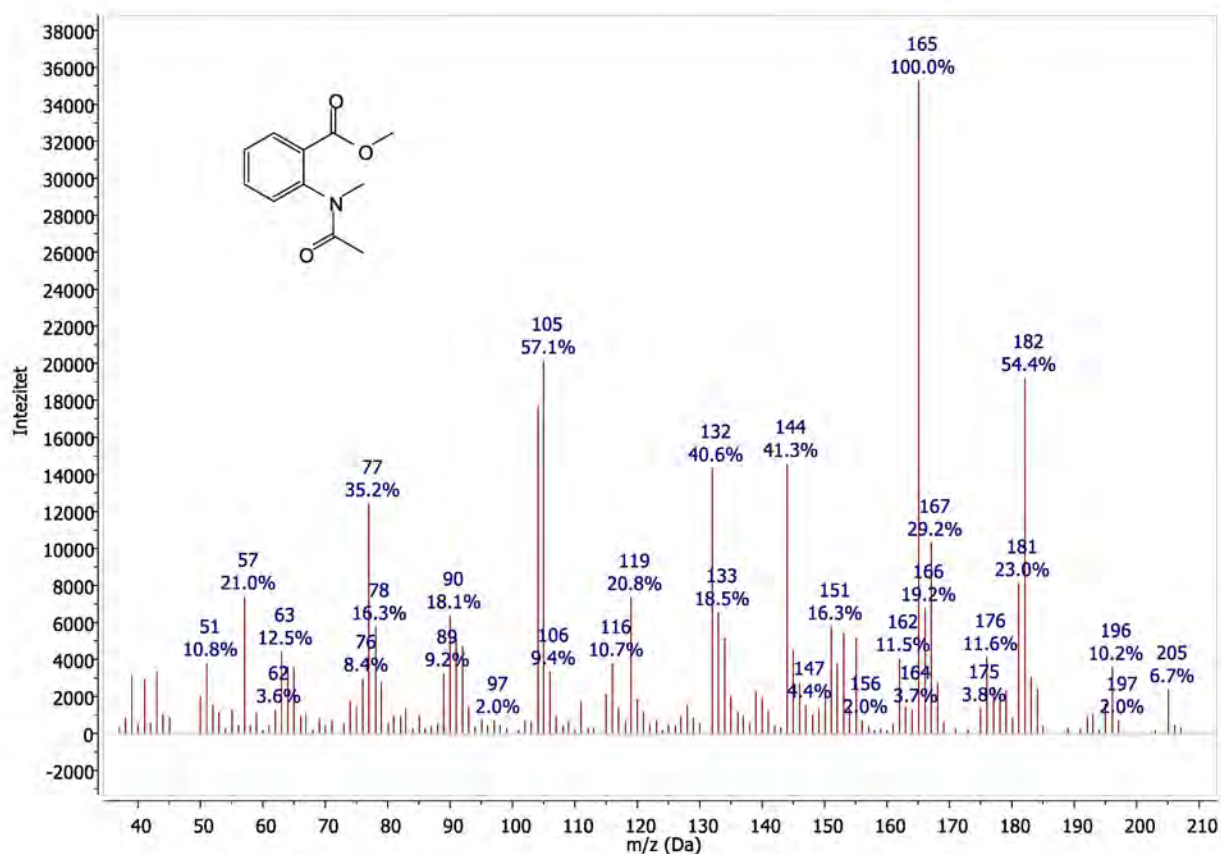


Prilog 48. (EI)MS spektar *N*-metilantraniline kiseline (Tabela 5.11, N^o 8)

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

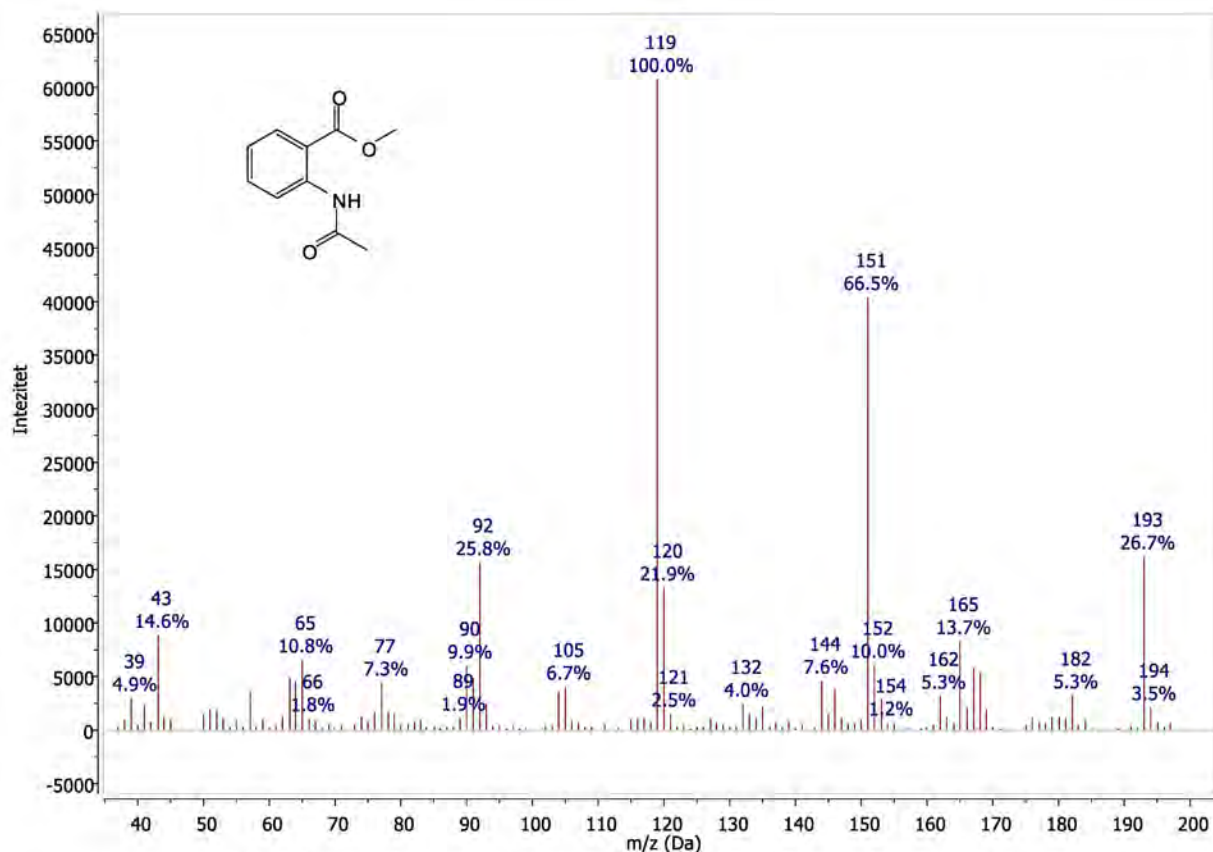


Prilog 49. (EI)MS spektar metil-N-karboximetil-N-metilantranilata (Tabela 5.11, N° 10)

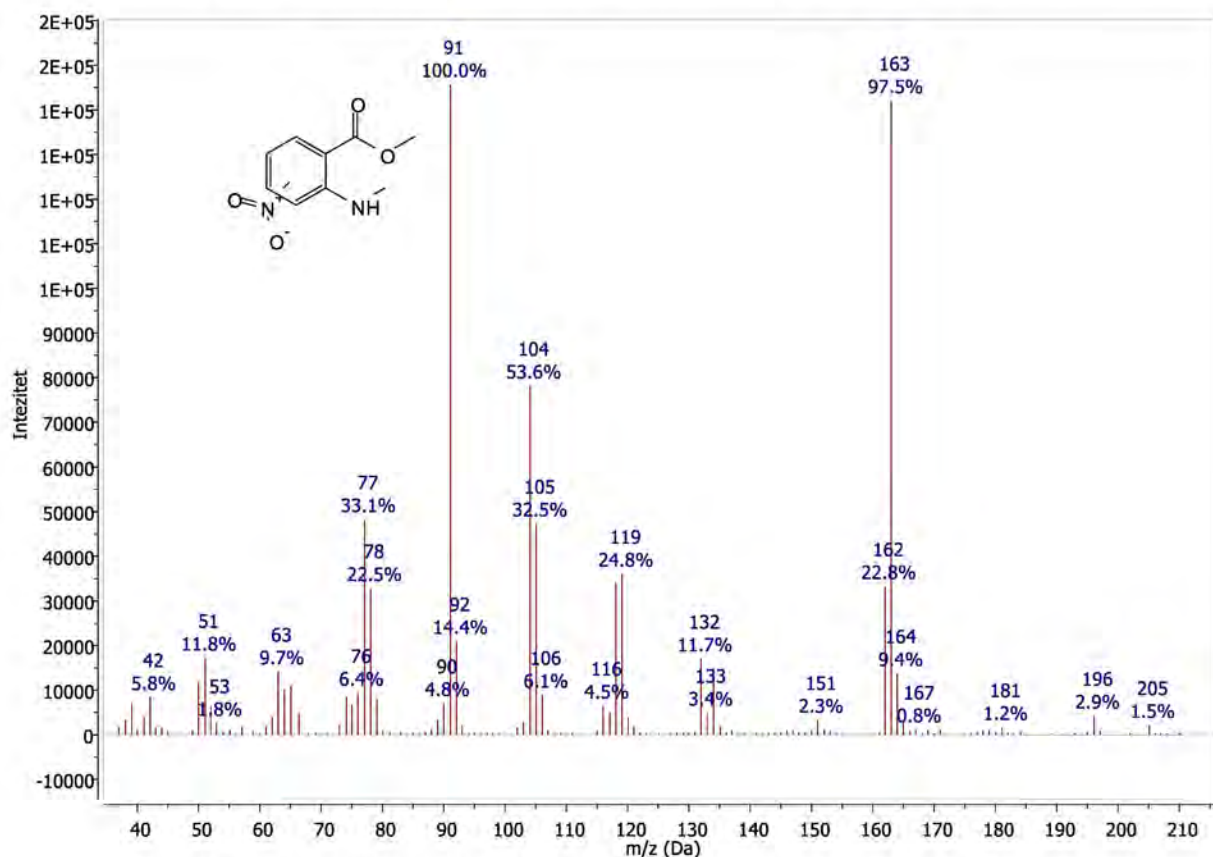


Prilog 50. (EI)MS spektar metil-N-acetil-N-metilantranilata (Tabela 5.11, N° 11)

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

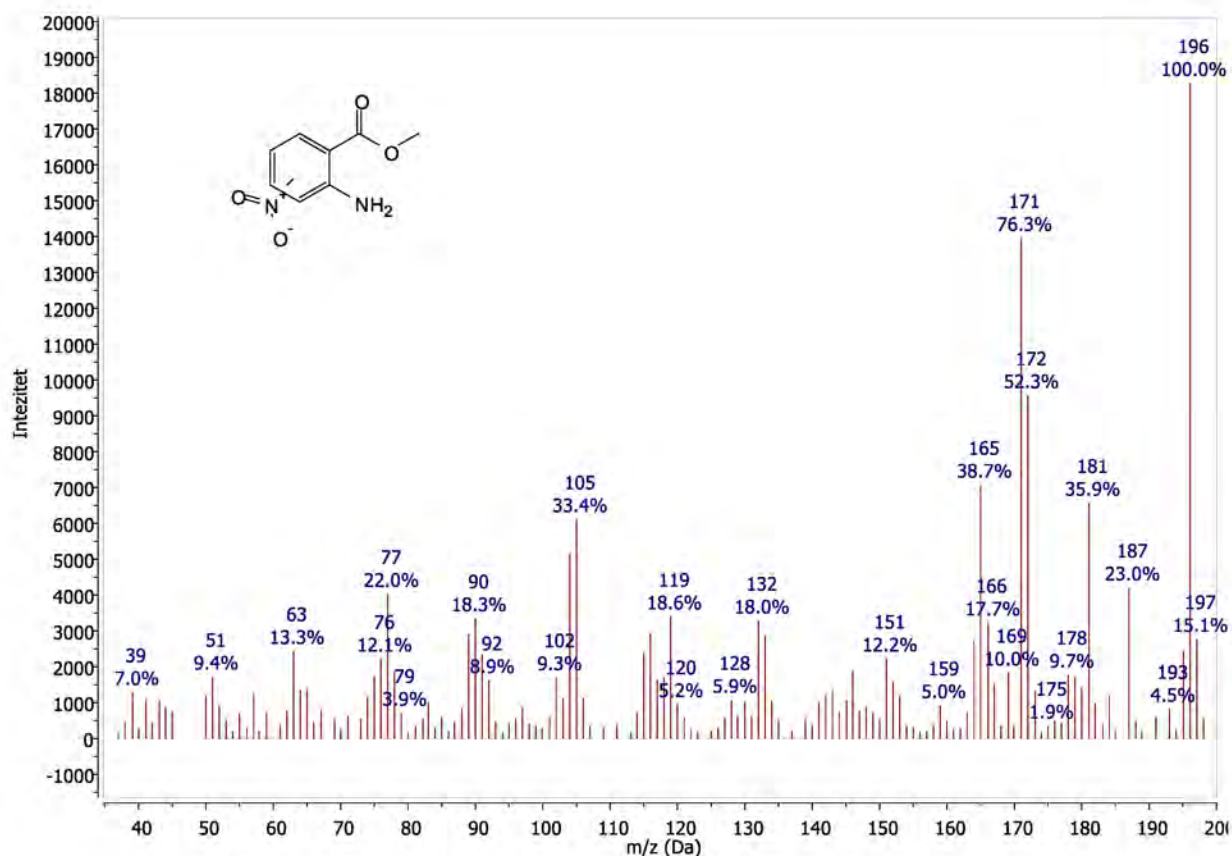


Prilog 51. (EI)MS spektar metil-*N*-acetilantranilata (Tabela 5.11, N° 12)

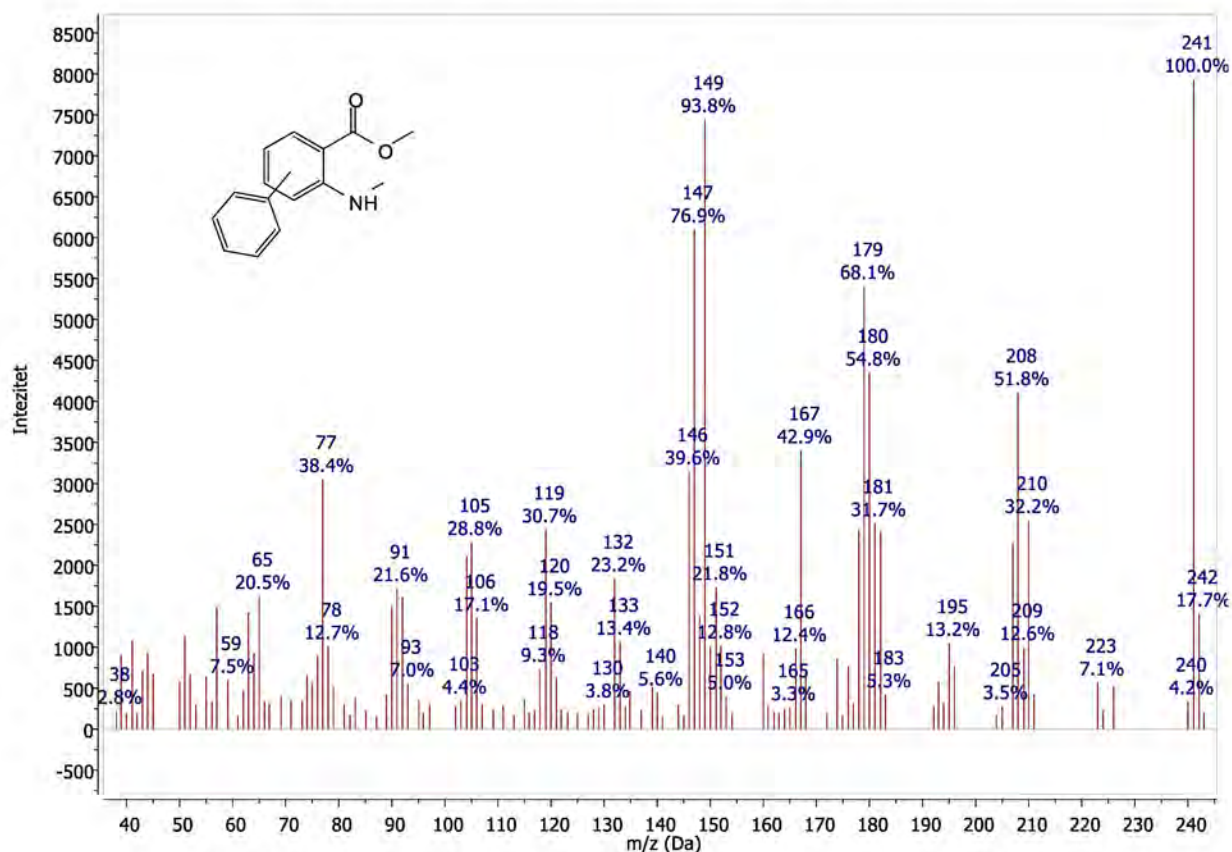


Prilog 52. (EI)MS spektar metil-*N*-metil-nitroantranilata (Tabela 5.11, N° 13)

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

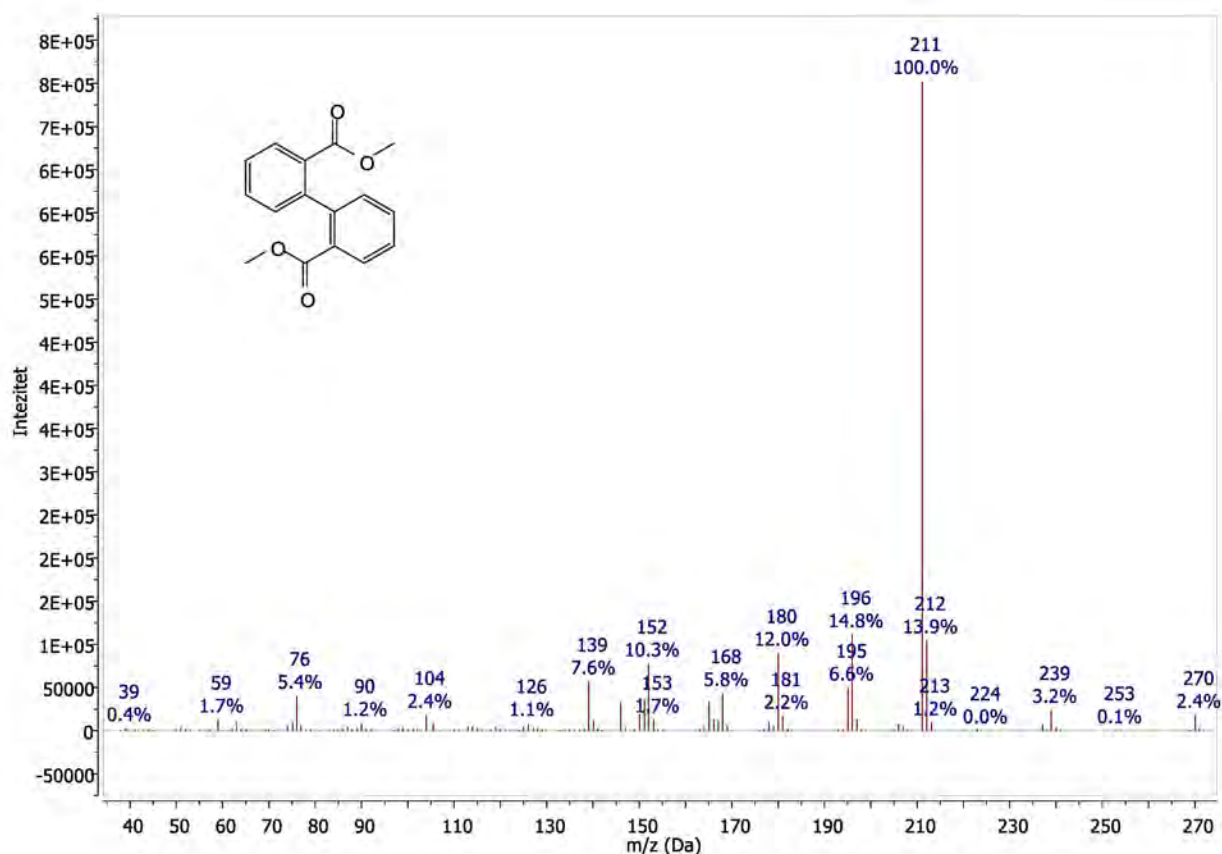


Prilog 53. (EI)MS spektar metil-nitroantranilata (Tabela 5.11, N° 14)

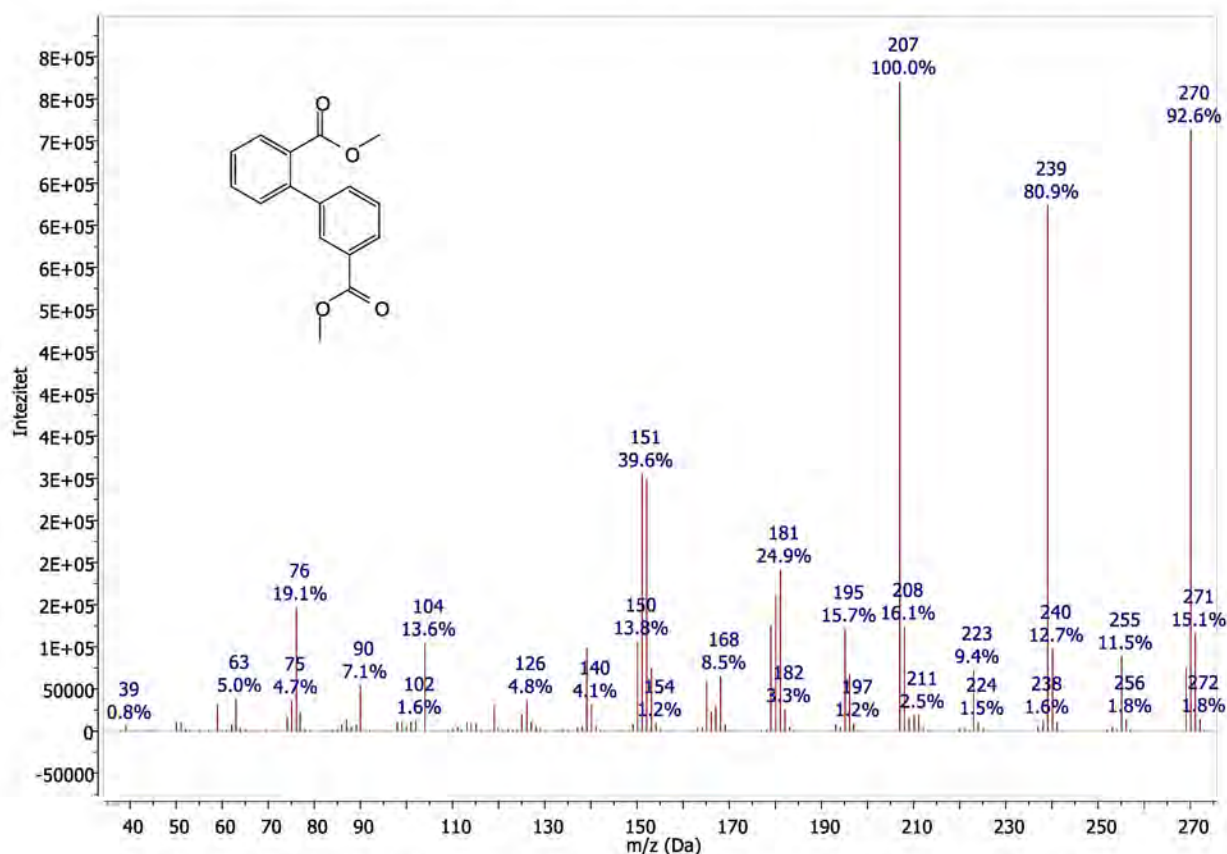


Prilog 54. (EI)MS spektar metil-N-metilfenilantranilata (Tabela 5.11, N° 15)

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

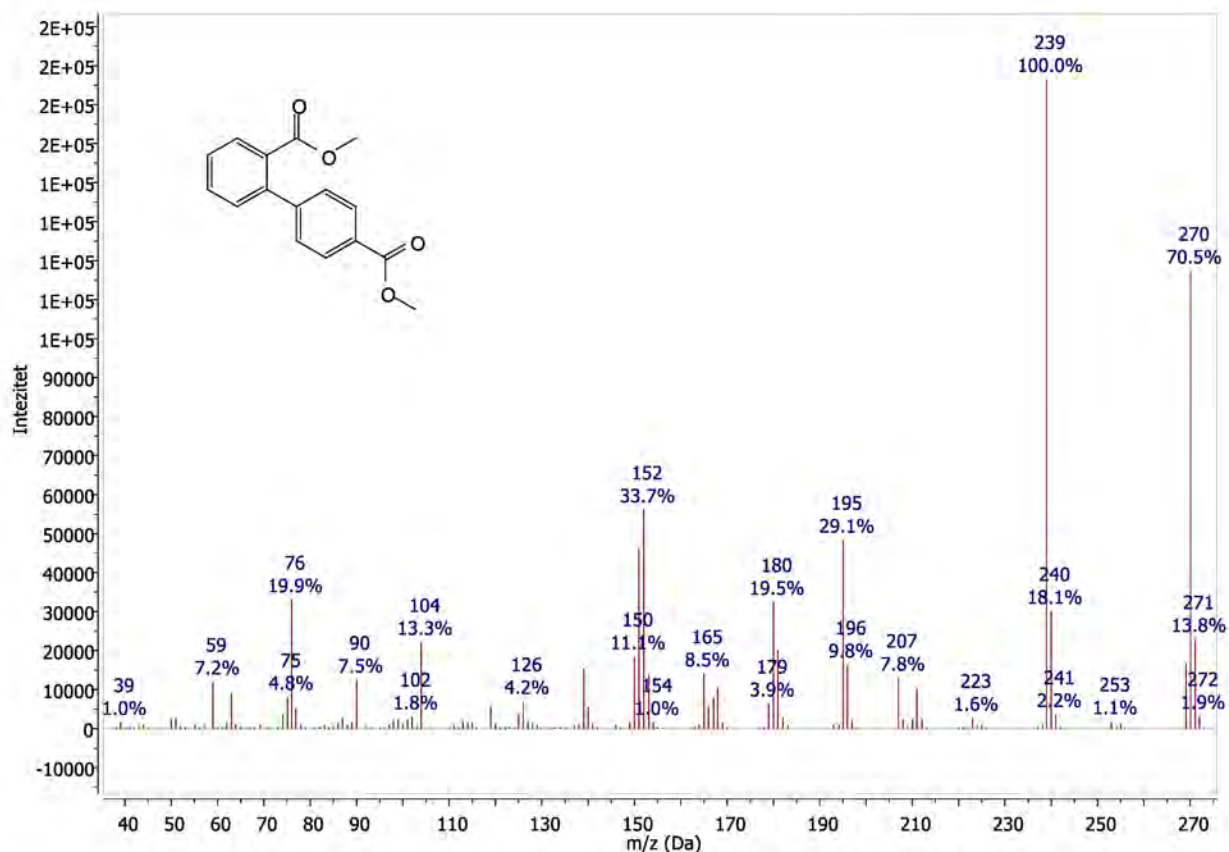


Prilog 55. (EI)MS spektar dimetil-[1,1'-bifenil]-2,2'-dikarboksilata (Tabela 5.11, N^o 16)

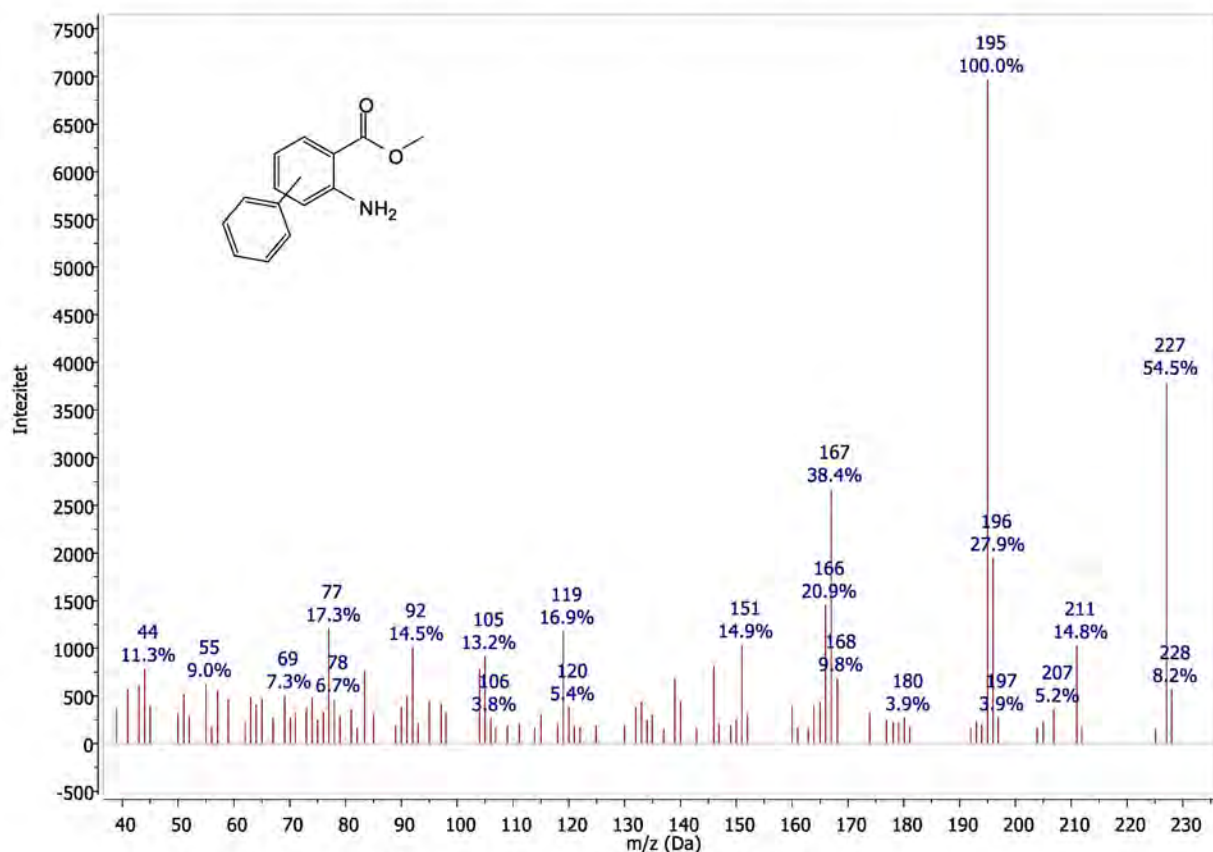


Prilog 56. (EI)MS spektar dimetil-[1,1'-bifenil]-2,3'-dikarboksilata (Tabela 5.11, N^o 17)

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

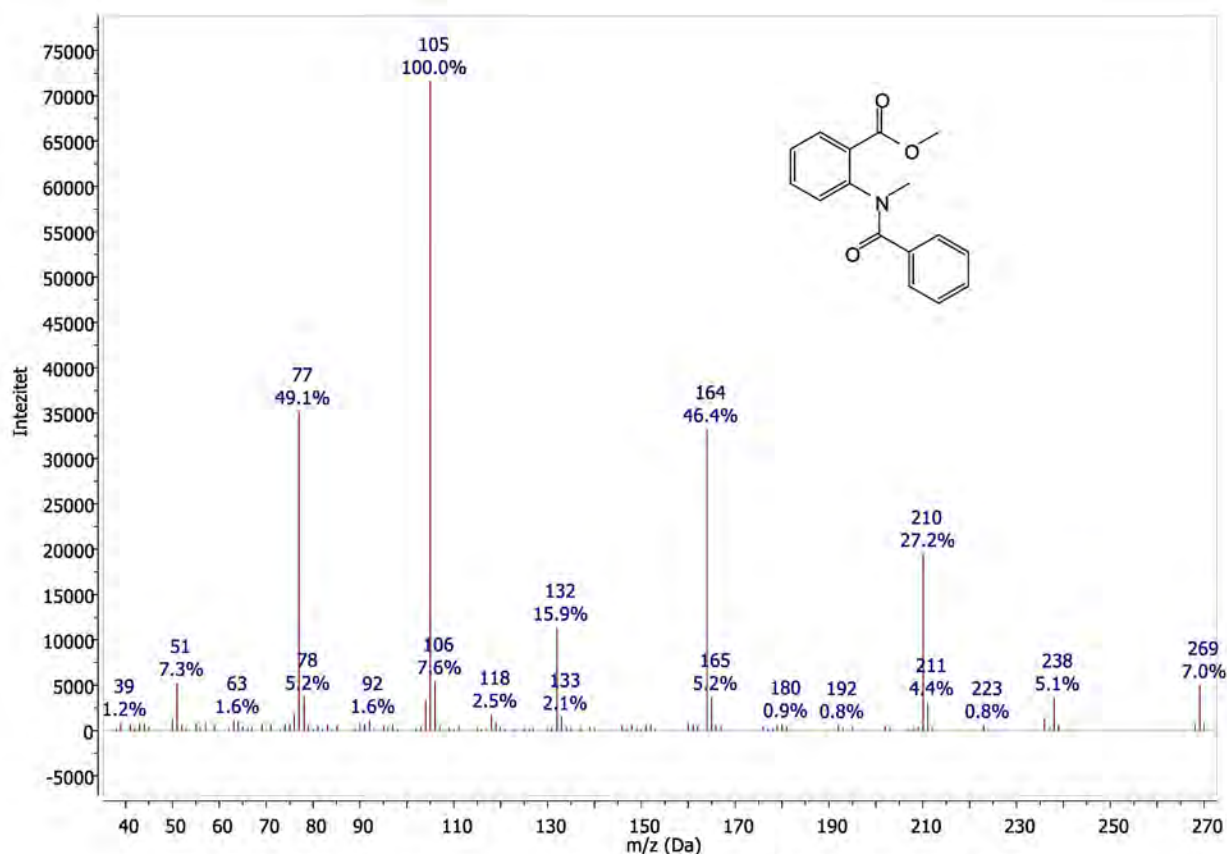


Prilog 57. (EI)MS spektar dimetil-[1,1'-bifenil]-2,4'-dikarboksilata (Tabela 5.11, N^o 18)

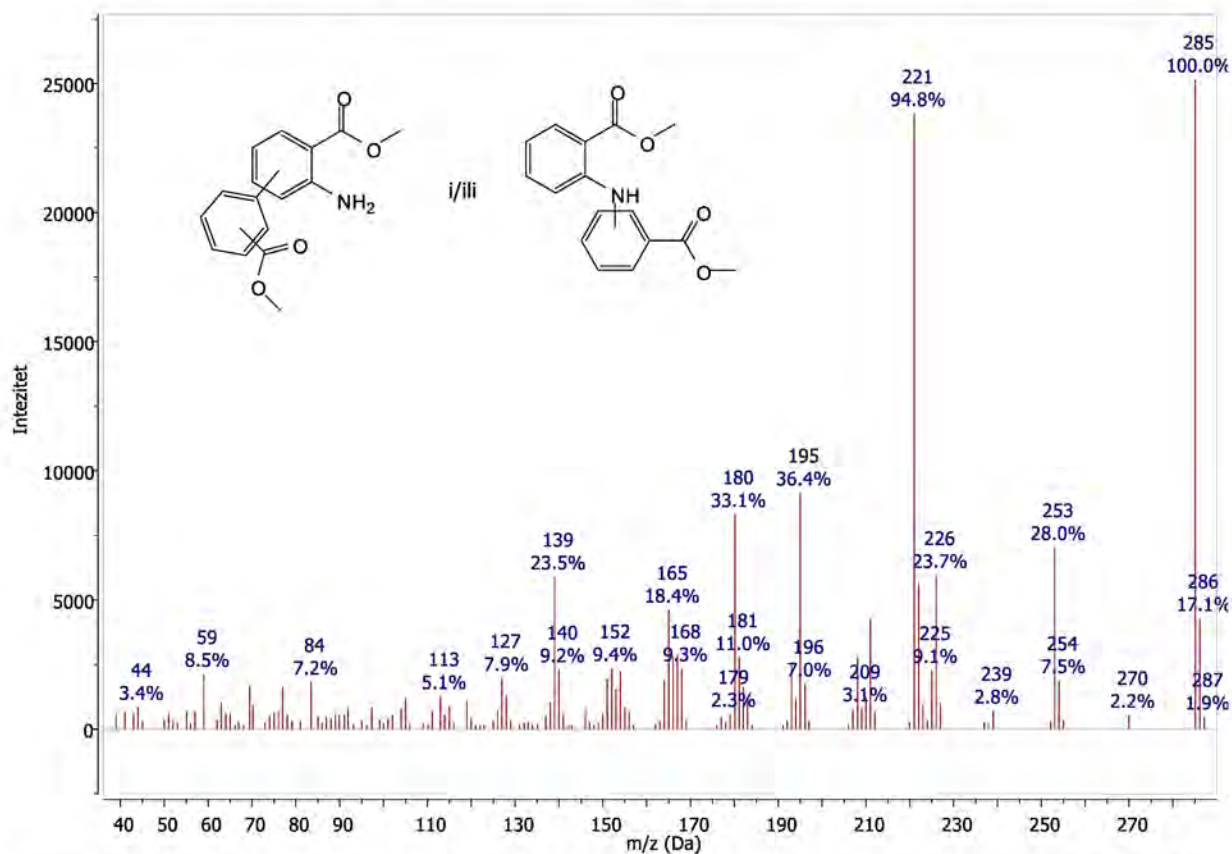


Prilog 58. (EI)MS spektar metil-fenilantranilata (Tabela 5.11, N^o 19)

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

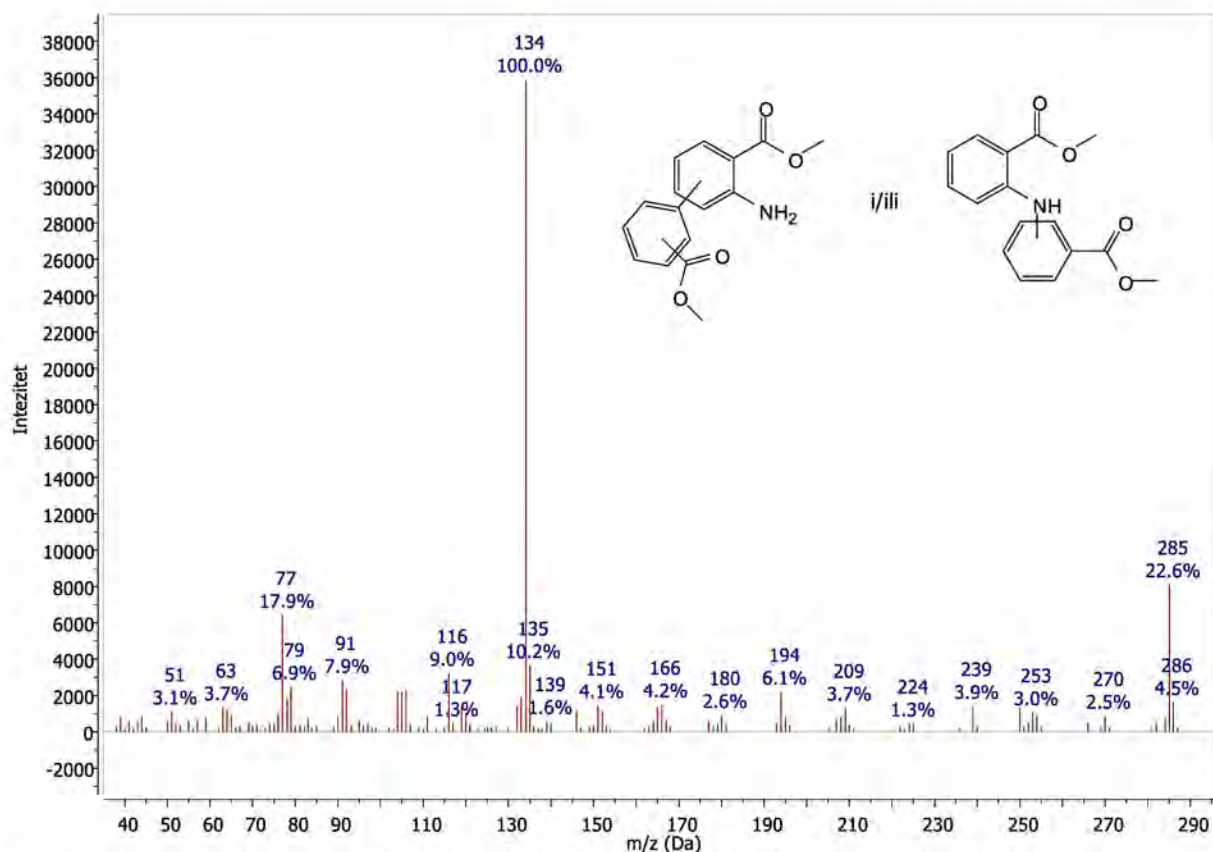
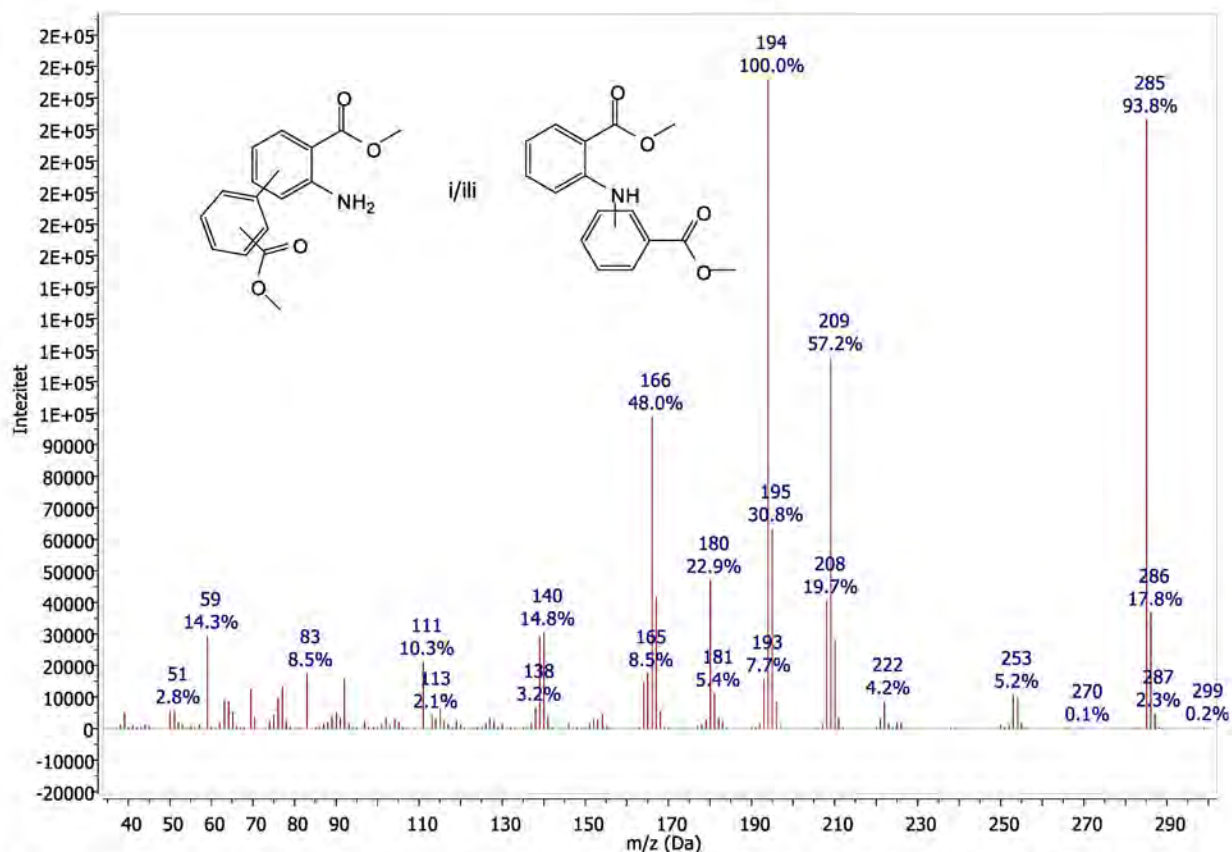


Prilog 59. (EI)MS spektar metil-N-benzoil-N-metilantranilata (Tabela 5.11, N° 20)

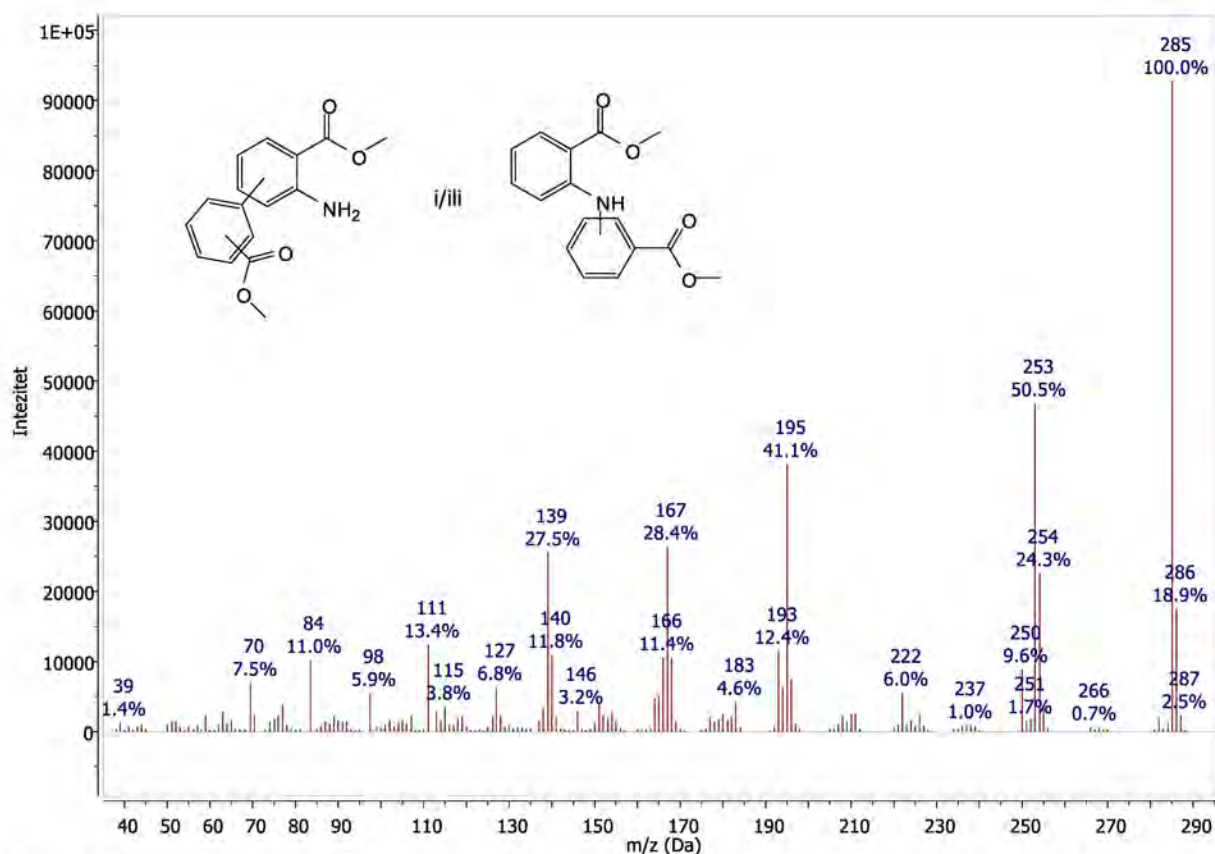


Prilog 60. (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 29,924 min i RI = 2130 (tabela 5.11, N° 21)

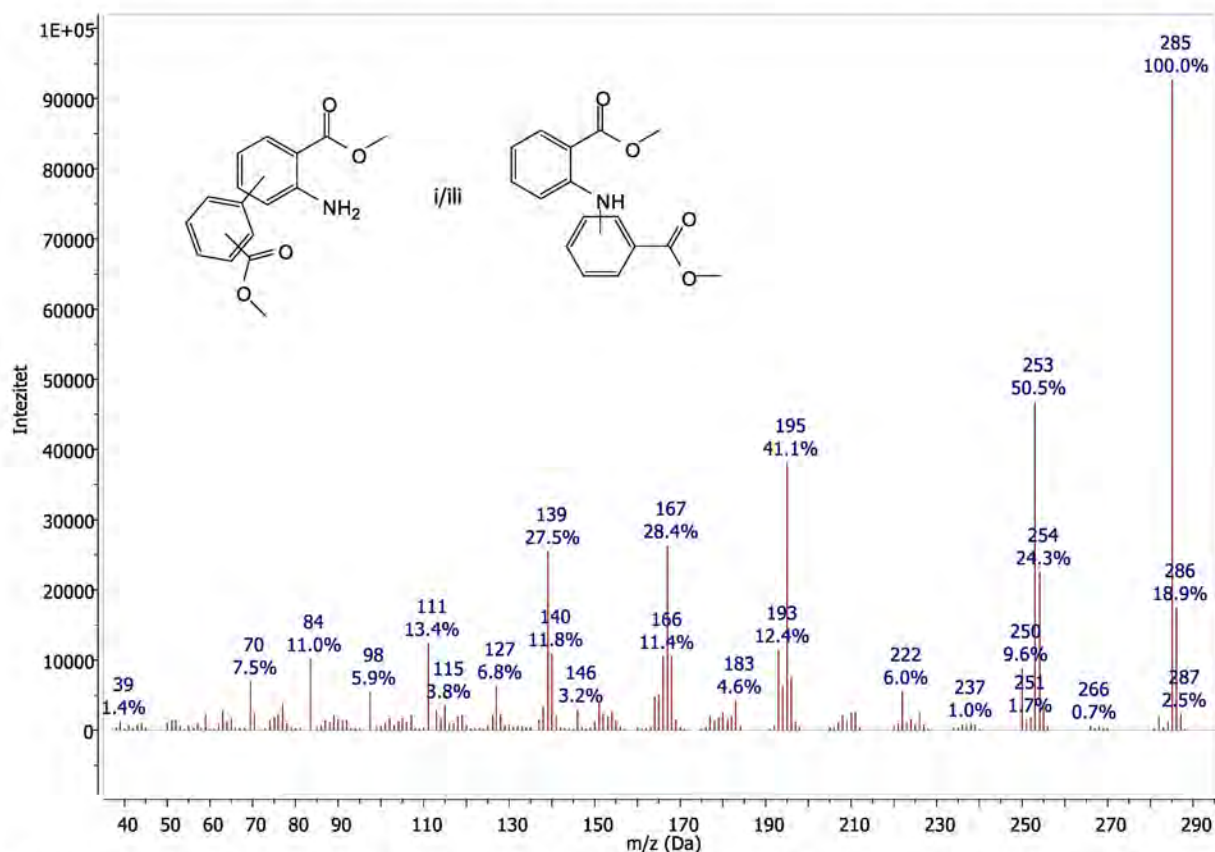
Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost



Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

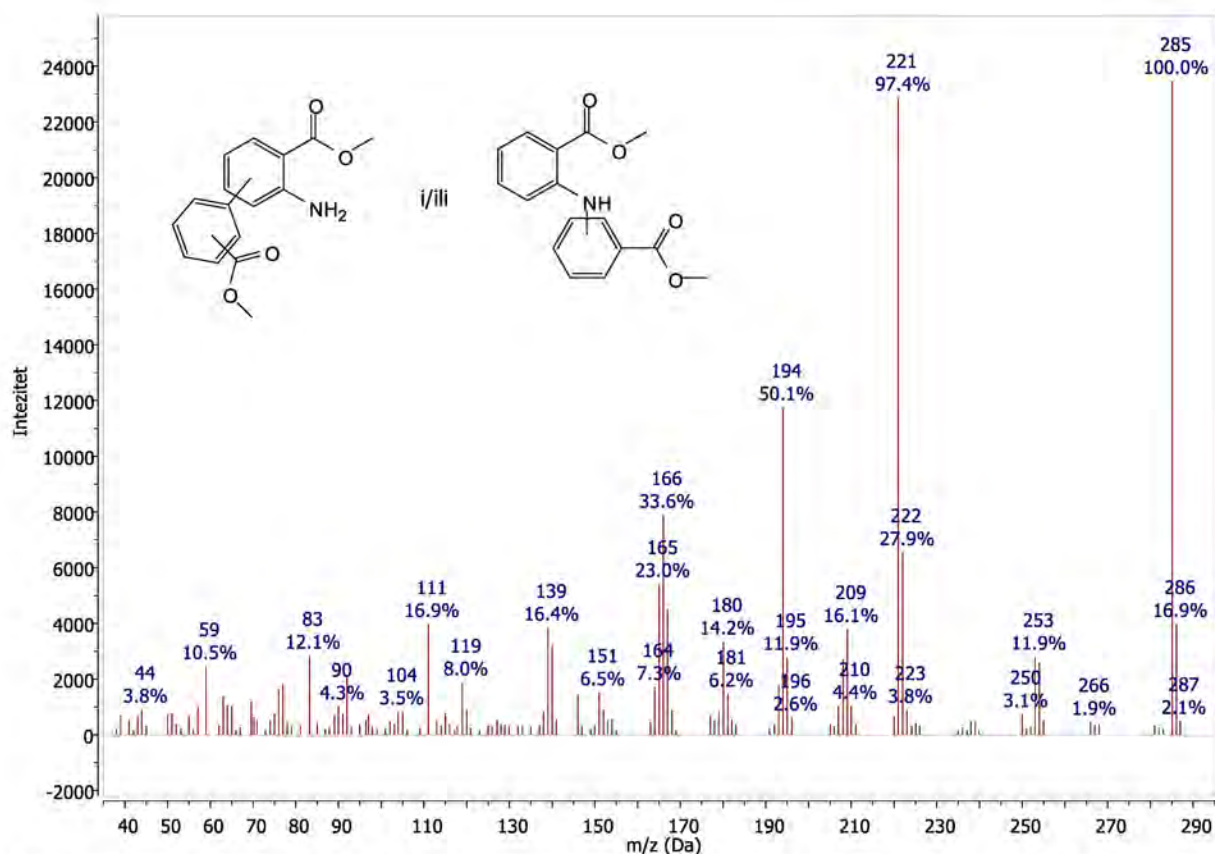


Prilog 63. (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 33,641 min i RI = 2353 (tabela 5.11, N° 24)

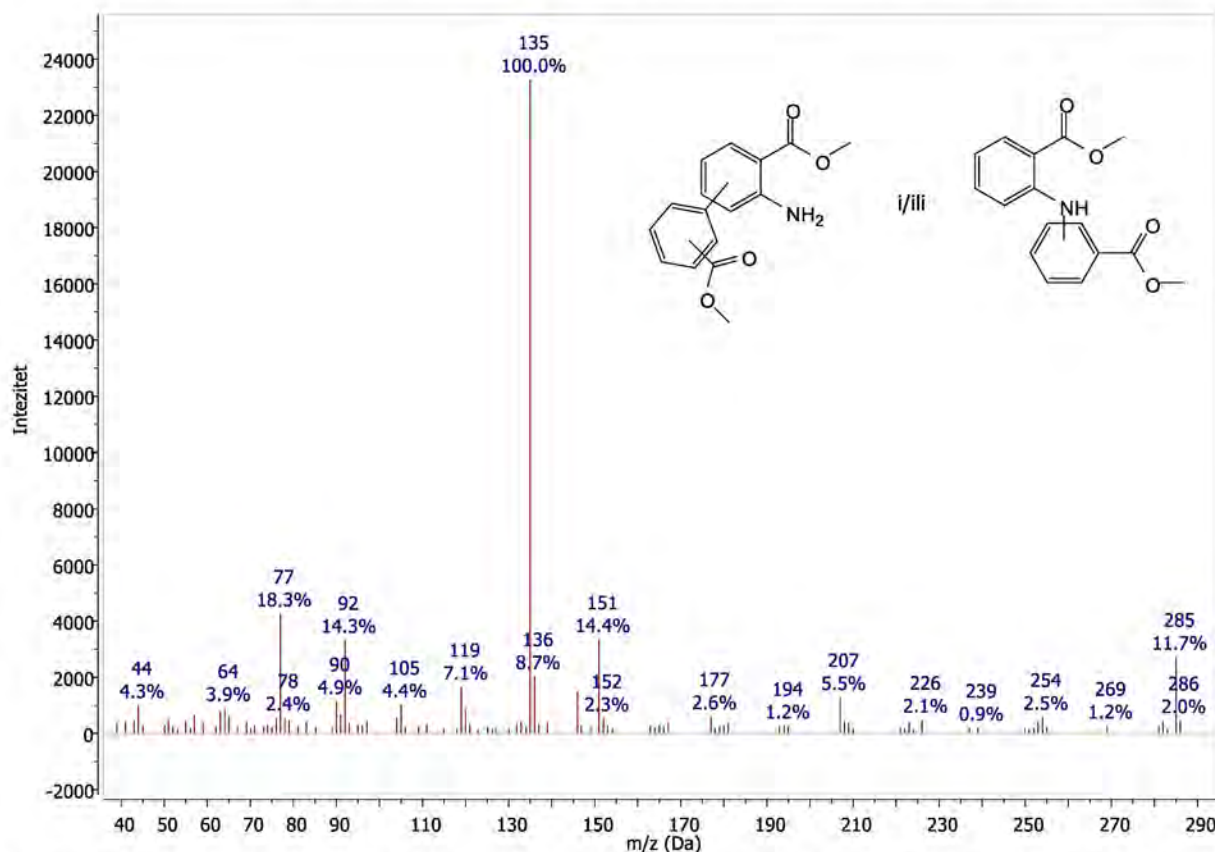


Prilog 64. (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 33,694 min i RI = 2357 (tabela 5.11, N° 25)

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

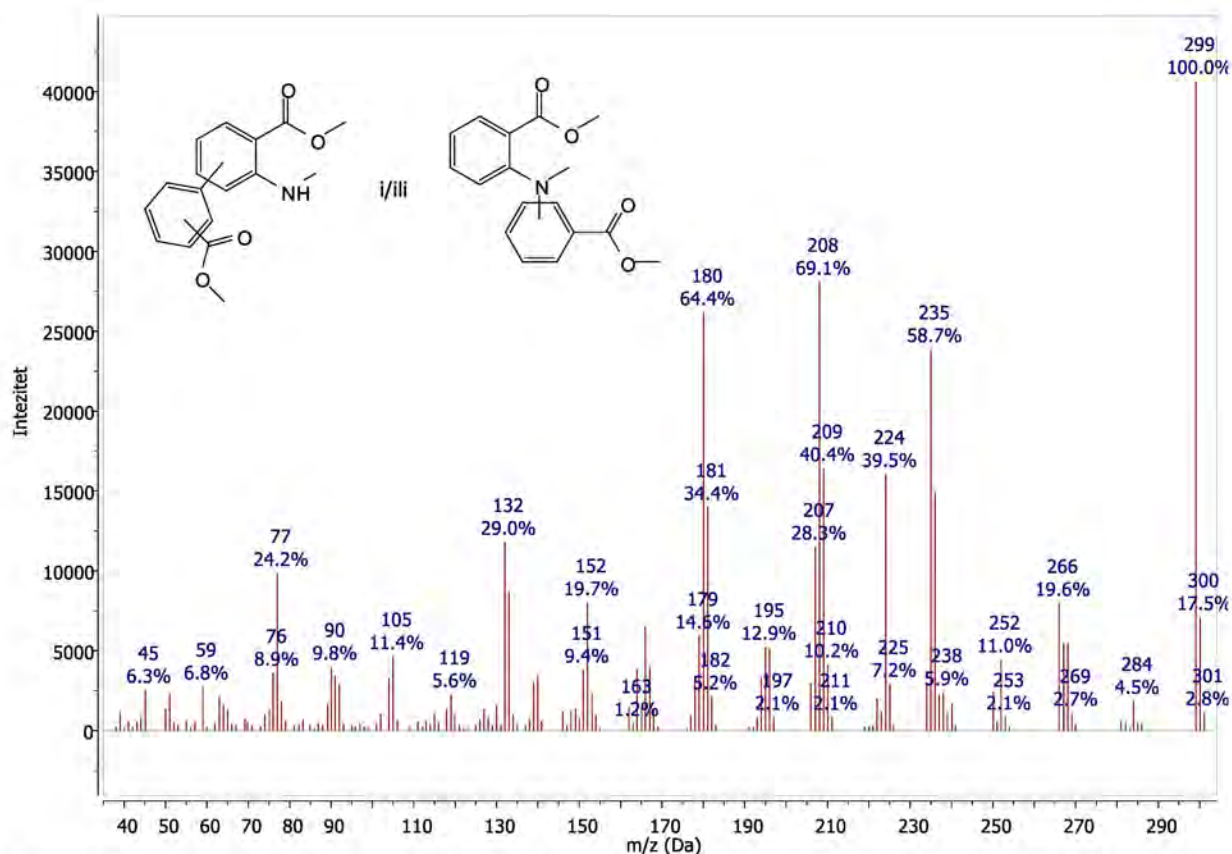


Prilog 65. (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa $R_t = 34,195$ min i $RI = 2389$ (tabela 5.11, N° 26)

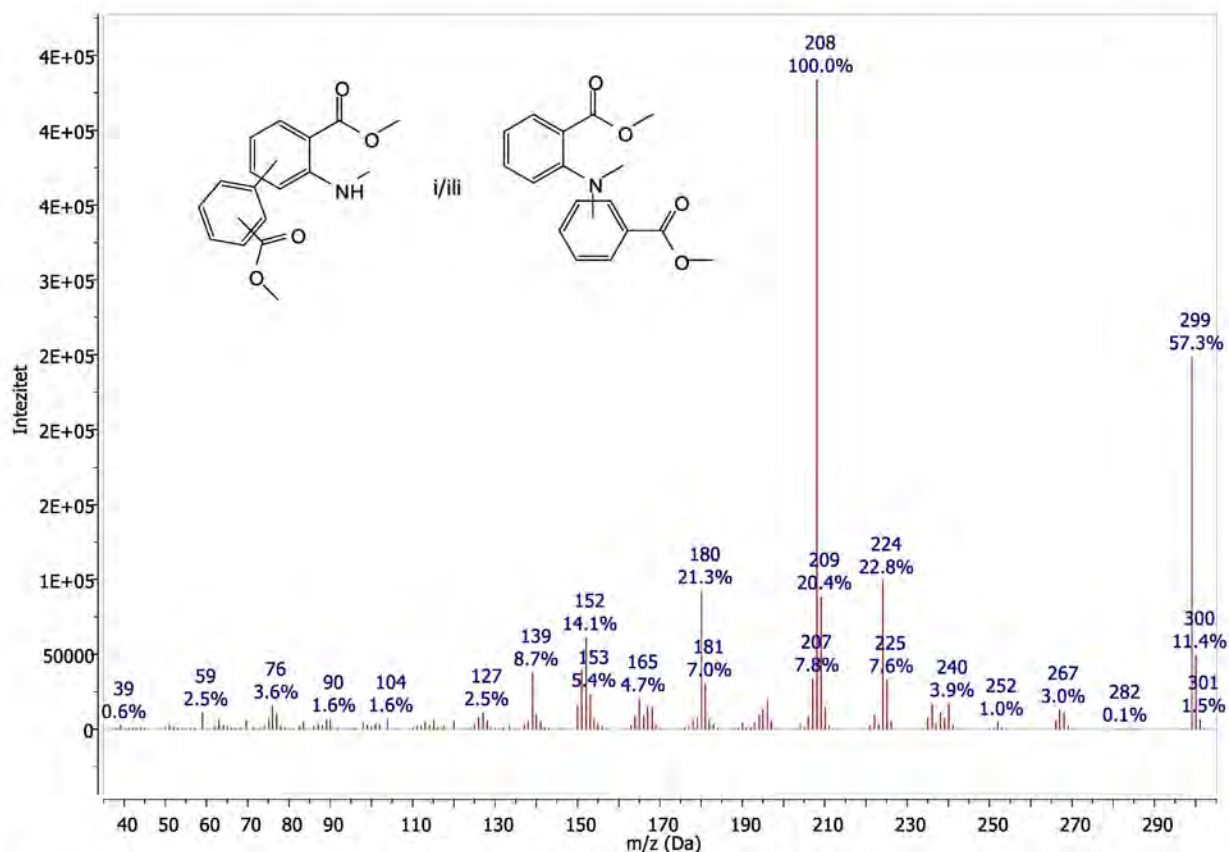


Prilog 66. (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa $R_t = 35,985$ min i $RI = 2505$ (tabela 5.11, N° 27)

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

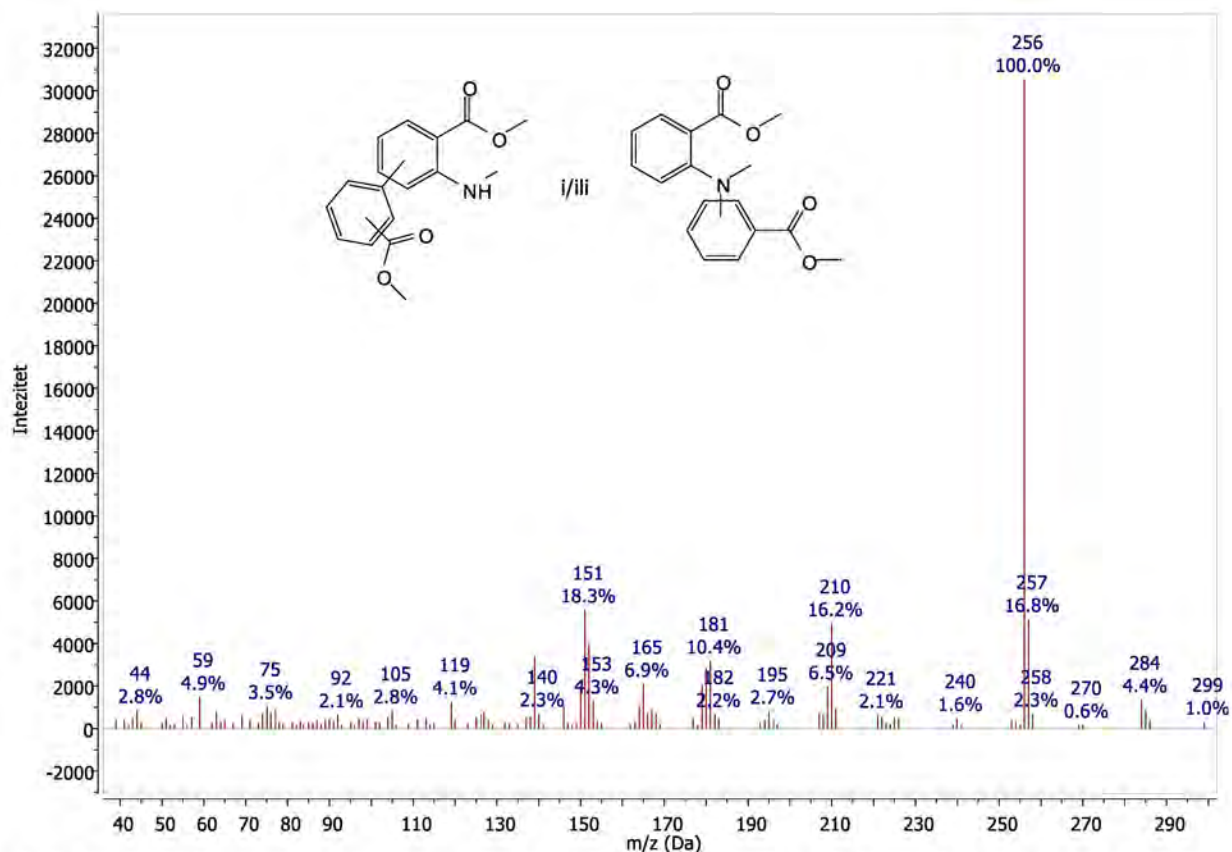


Prilog 67. (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 30,577 min i RI = 2167 (tabela 5.11, N^o 28)

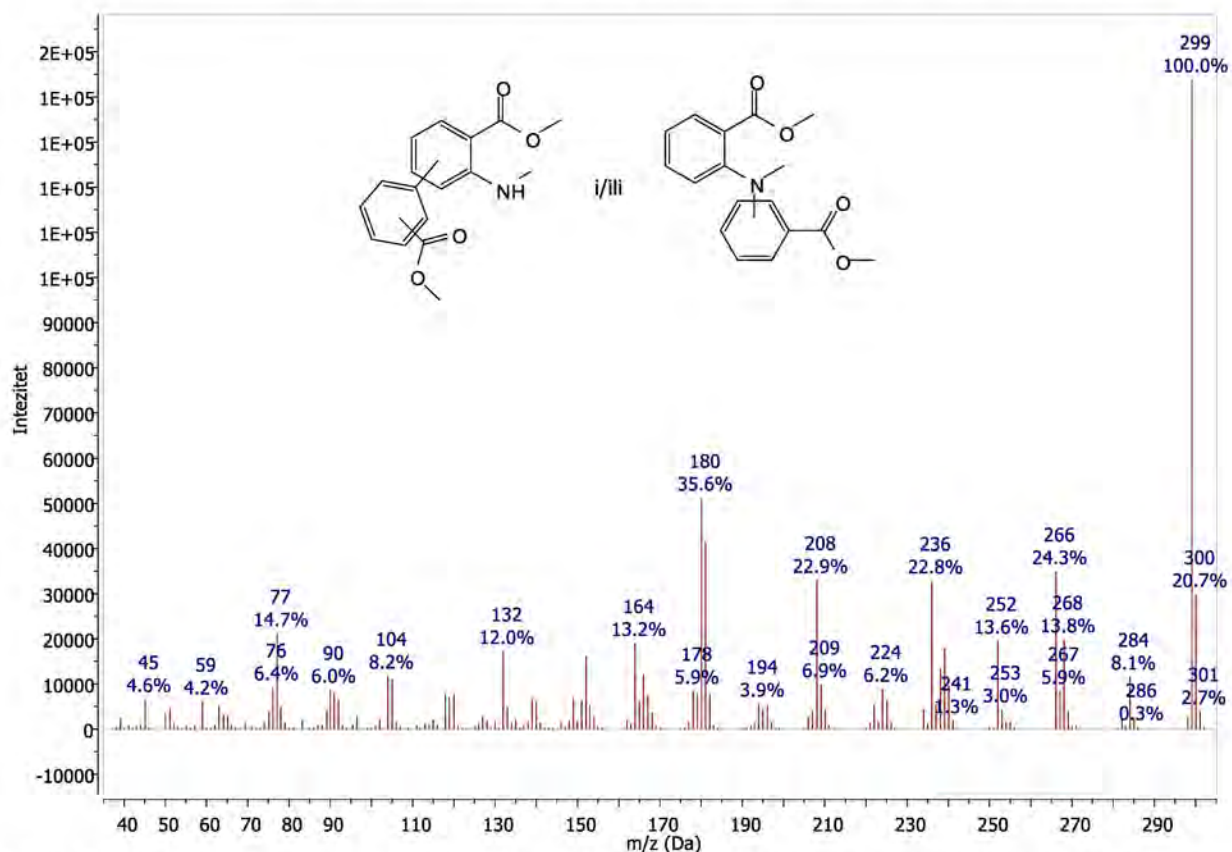


Prilog 68. (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 30,790 min i RI = 2180 (tabela 5.11, N^o 29)

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

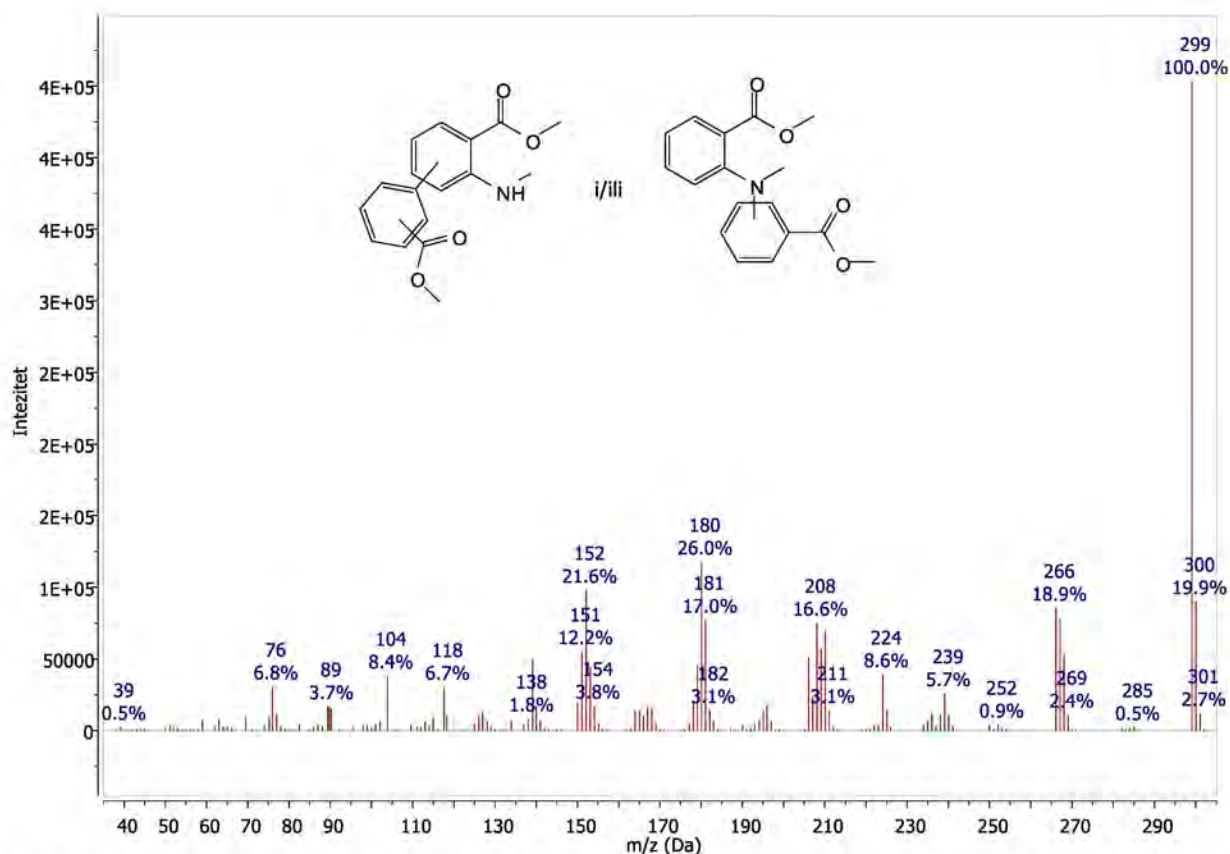


Prilog 69. (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 31,792 min i Rt = 2240 (tabela 5.11, N° 30)

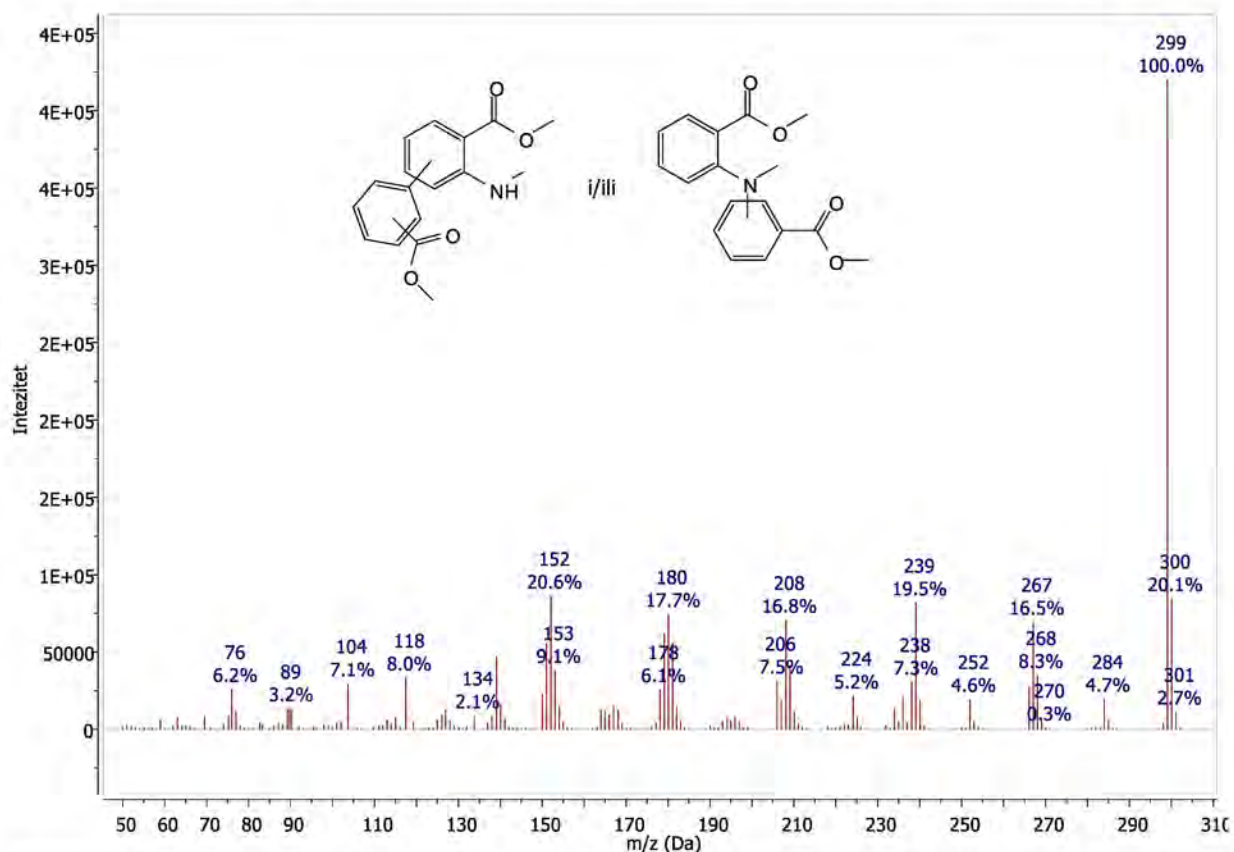


Prilog 70. (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 32,268 min i Rt = 2269 (tabela 5.11, N° 31)

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

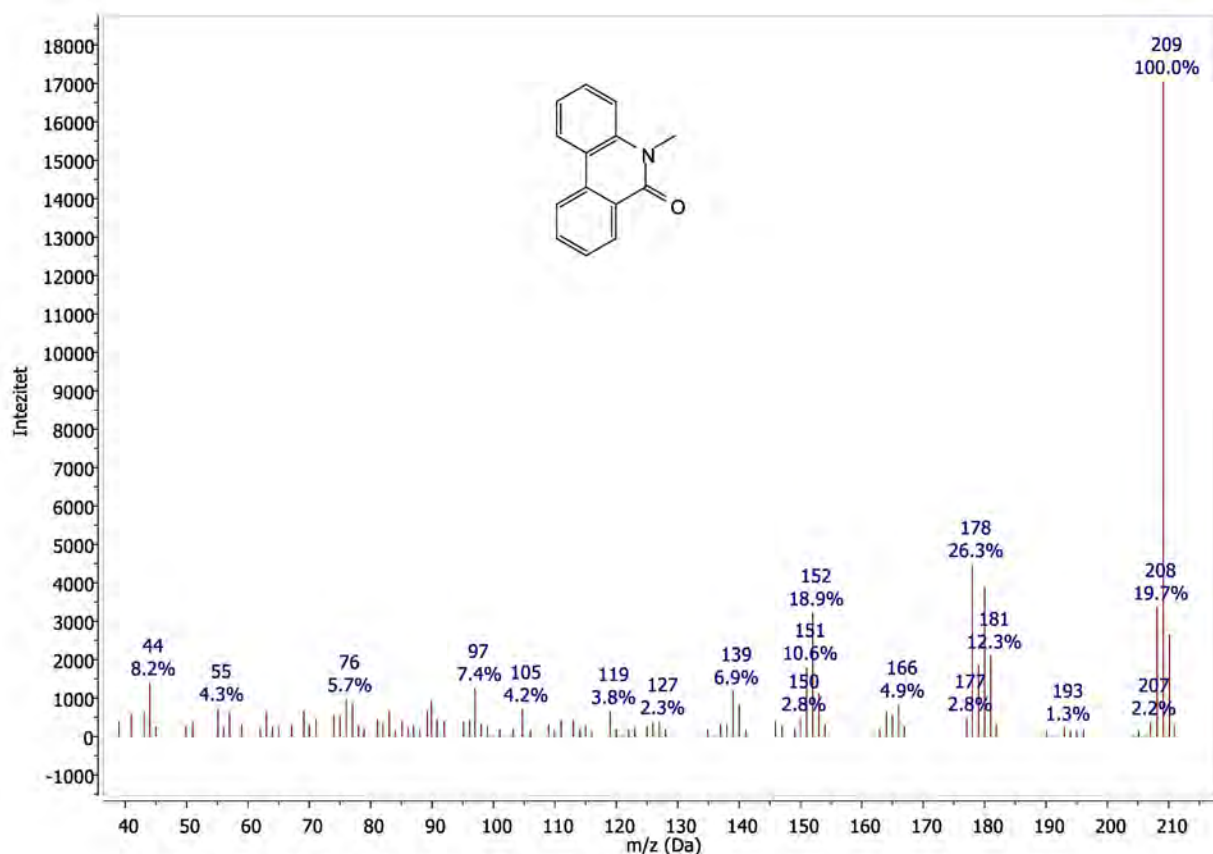


Prilog 71. (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 34,085 min i RI = 2382 (tabela 5.11, N° 32)

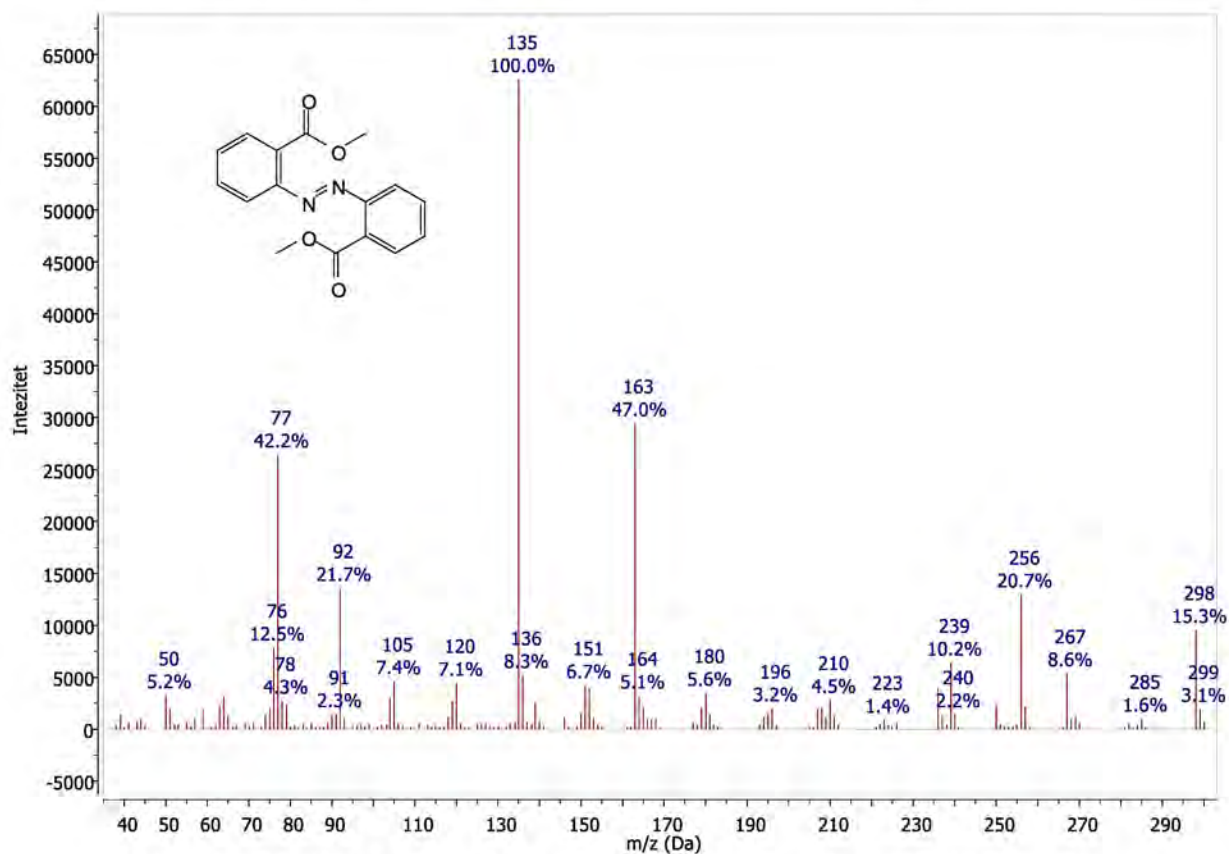


Prilog 72. (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 34,591 min i RI = 2414 (tabela 5.11, N° 33)

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

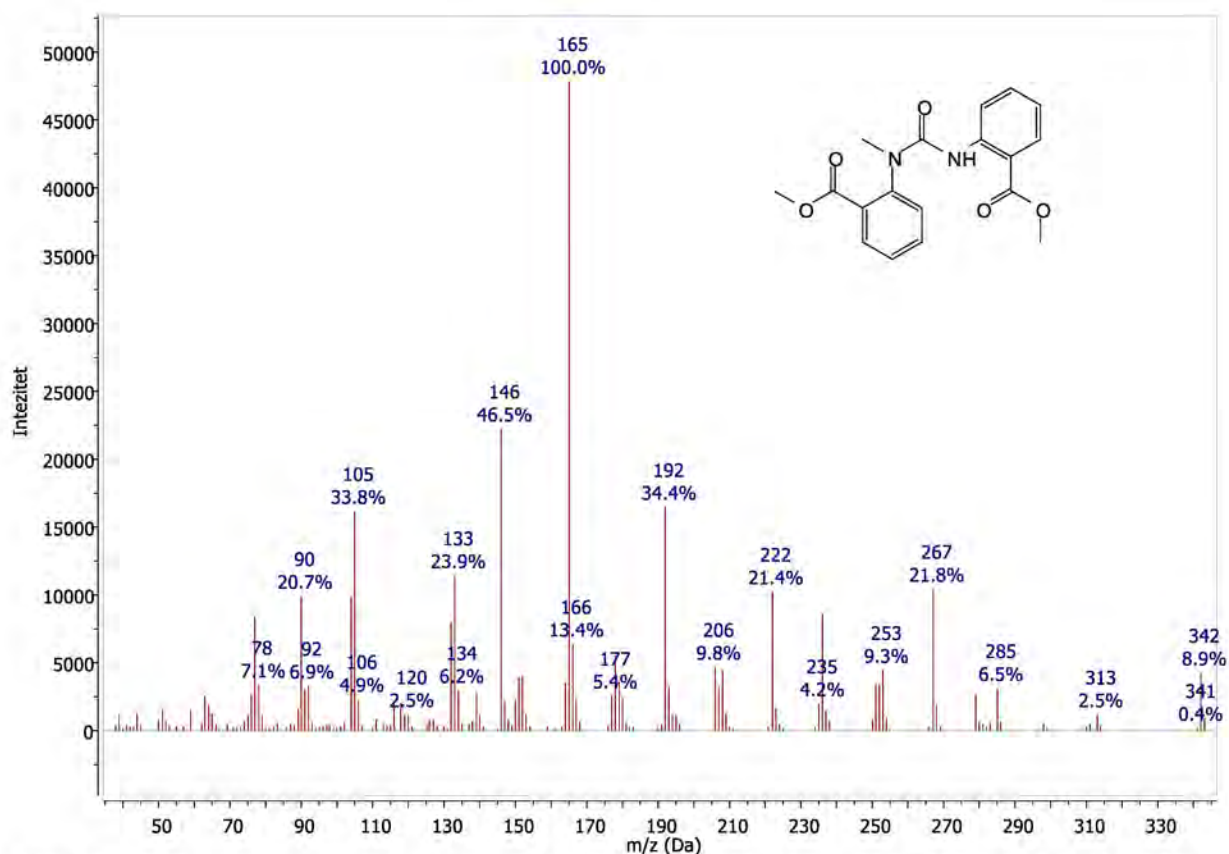


Prilog 73. (EI)MS spektar metil-5-metil-6-okso-(5H)-fenantridina (tabela 5.11, N° 34)

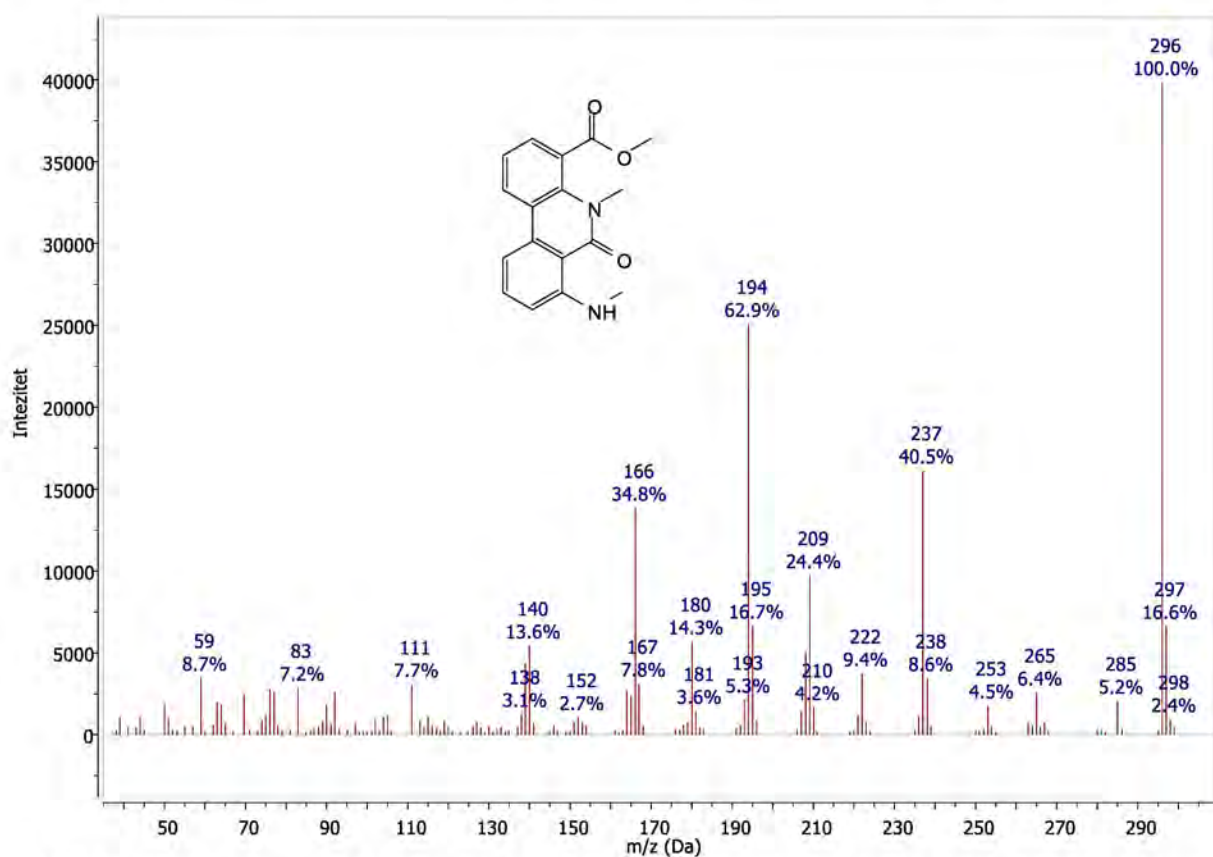


Prilog 74. (EI)MS spektar dimetil-2,2'-(diazene-1,2-diil)-dibenzoata (Tabela 5.11, N° 36)

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

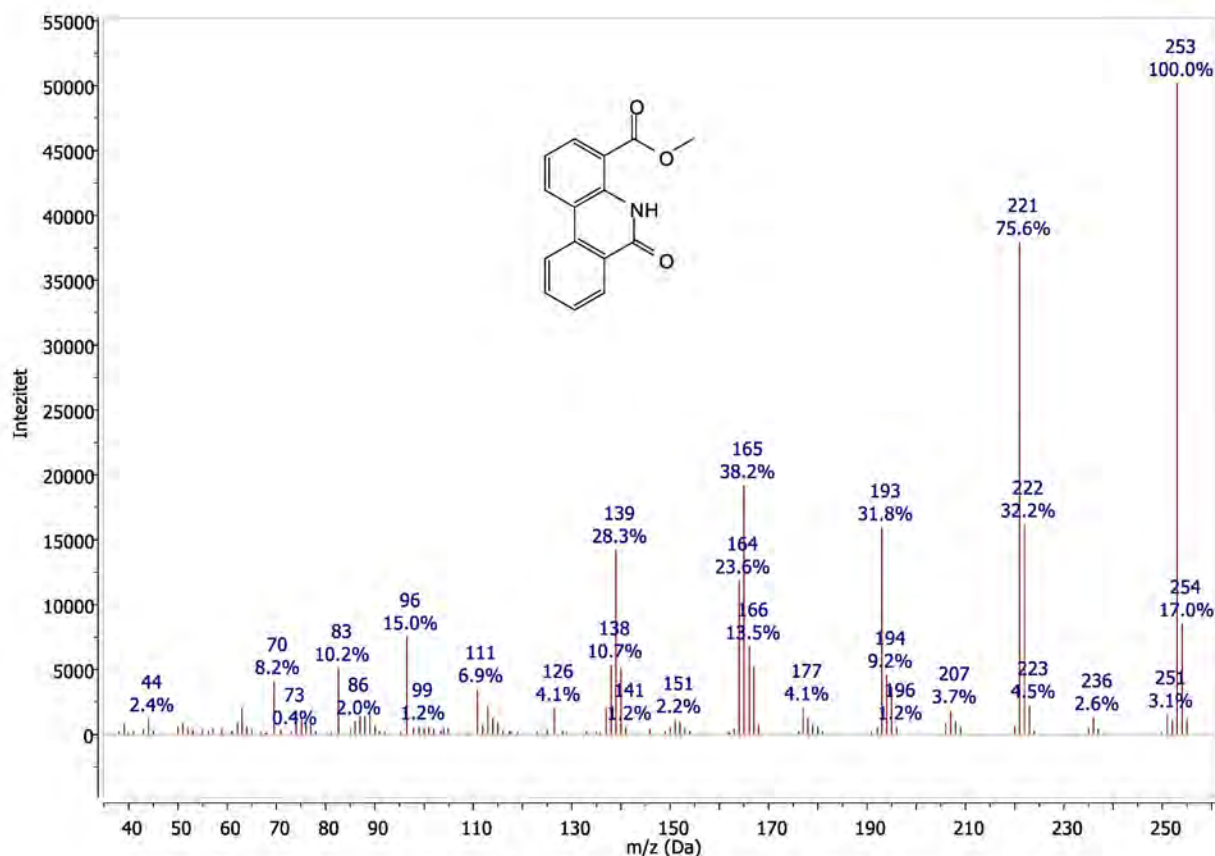


Prilog 75. (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 37,020 min i RI = 2576 (tabela 5.11, N° 38)

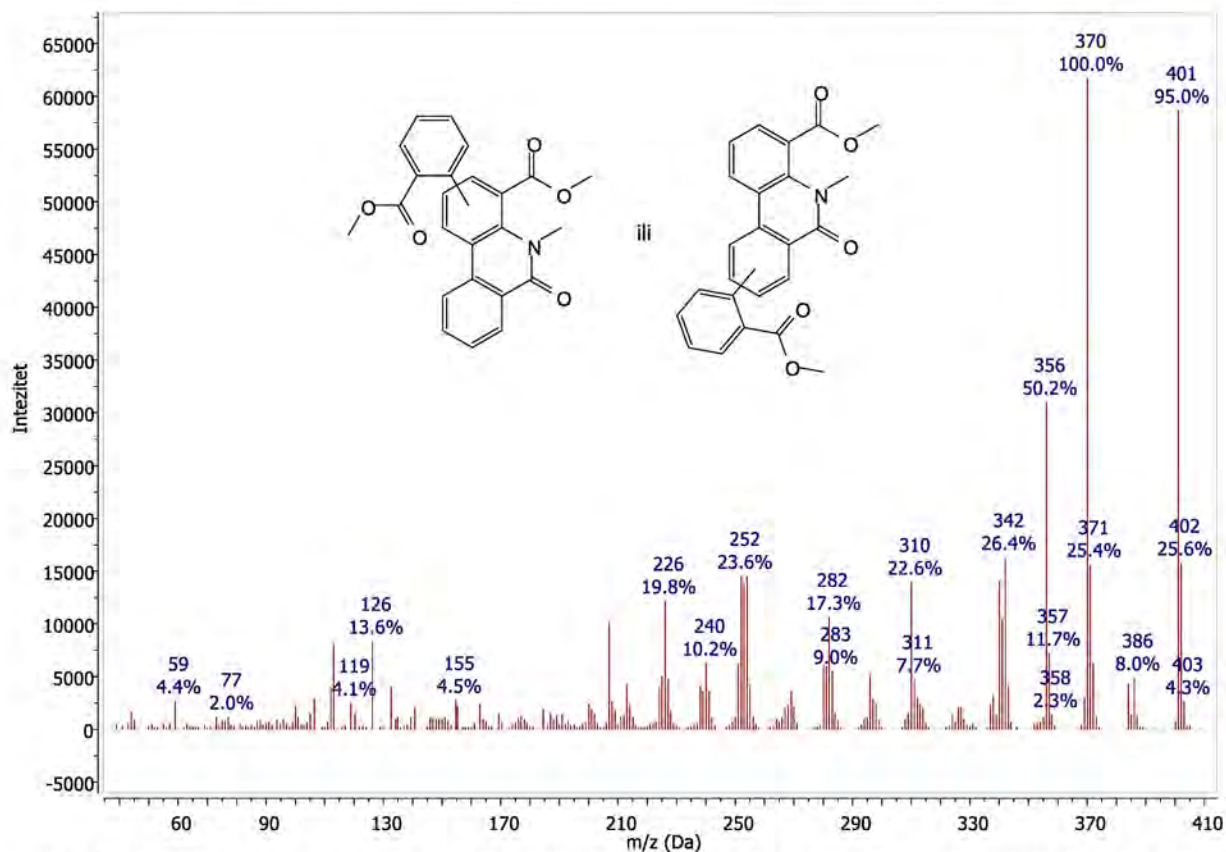


Prilog 76. (EI)MS spektar metil-7-metilamino-5-metil-6-okso-(5H)-fenantridin-4-karboksilata (tabela 5.11, N° 39)

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

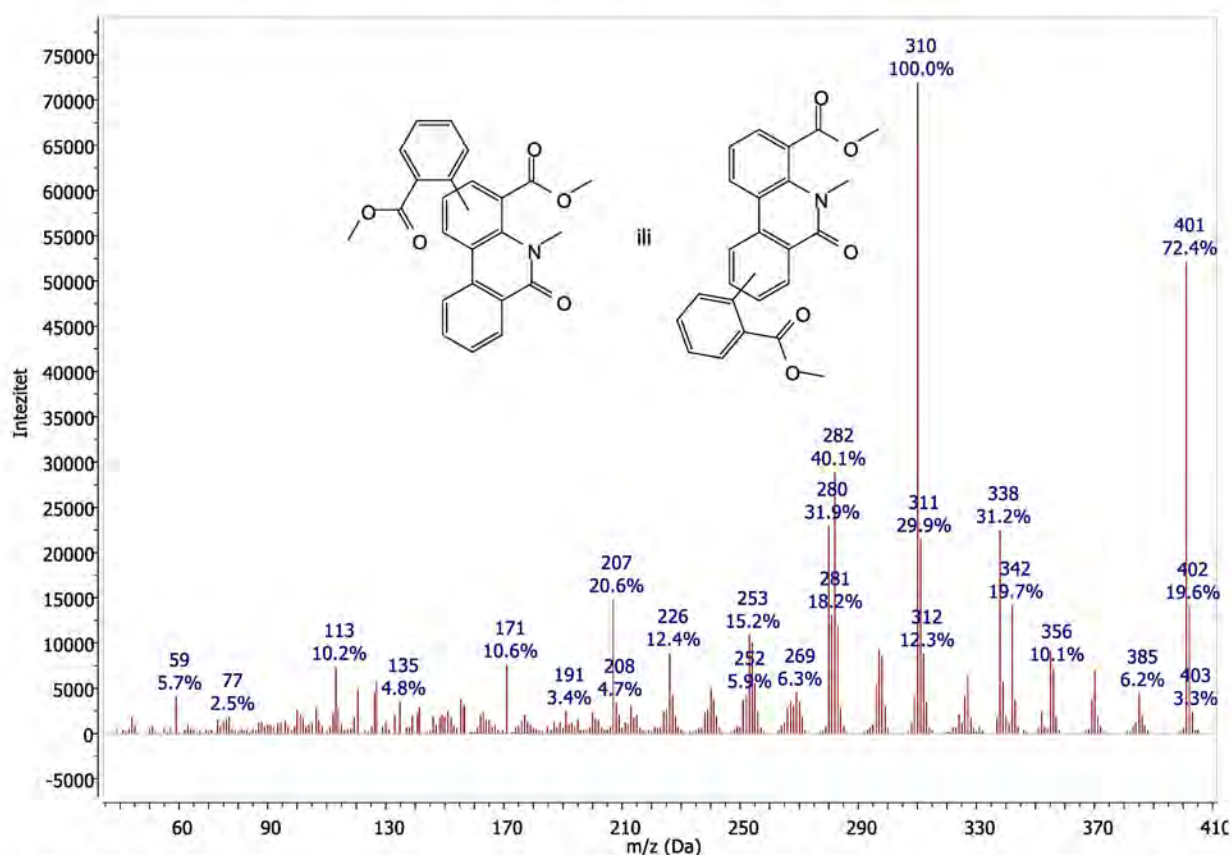
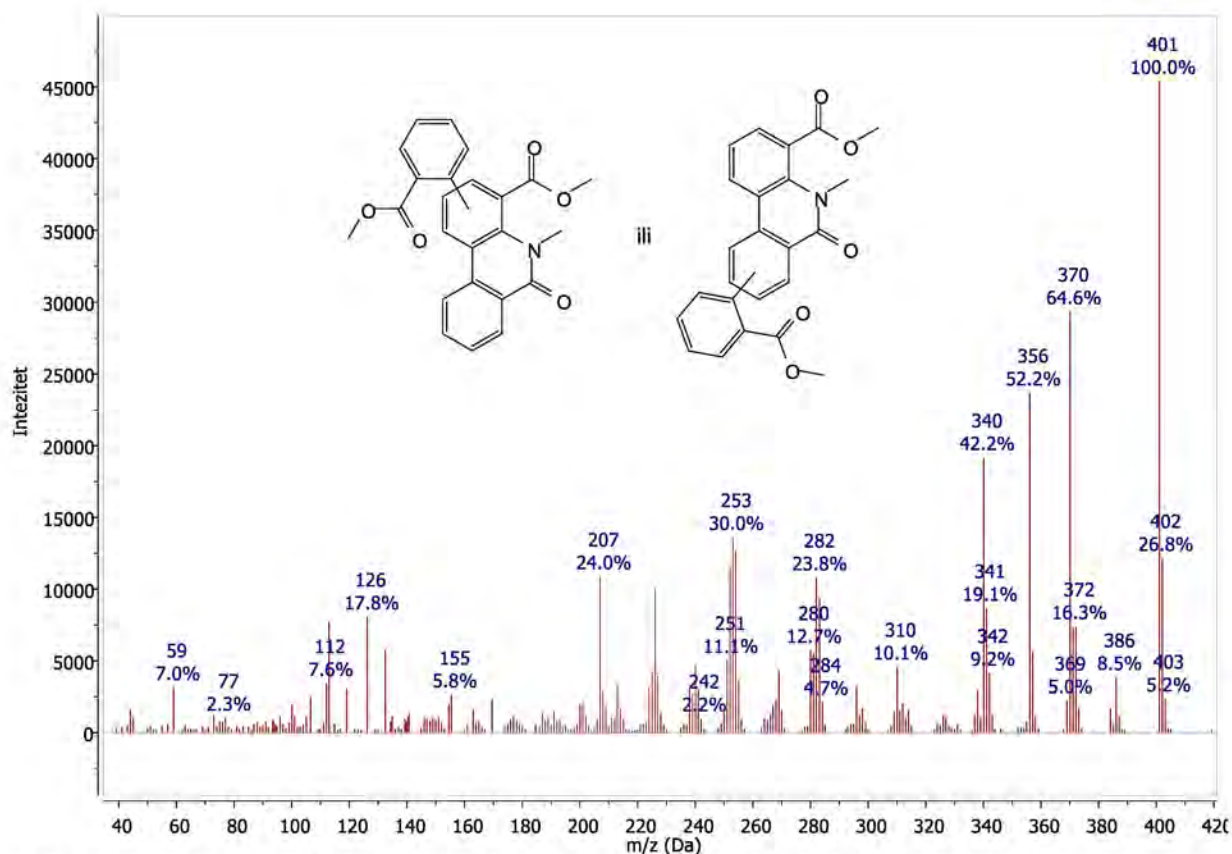


Prilog 77. (EI)MS spektar metil-6-okso-(5H)-fenantridin-4-karboksilata (tabela 5.11, N^o 40)

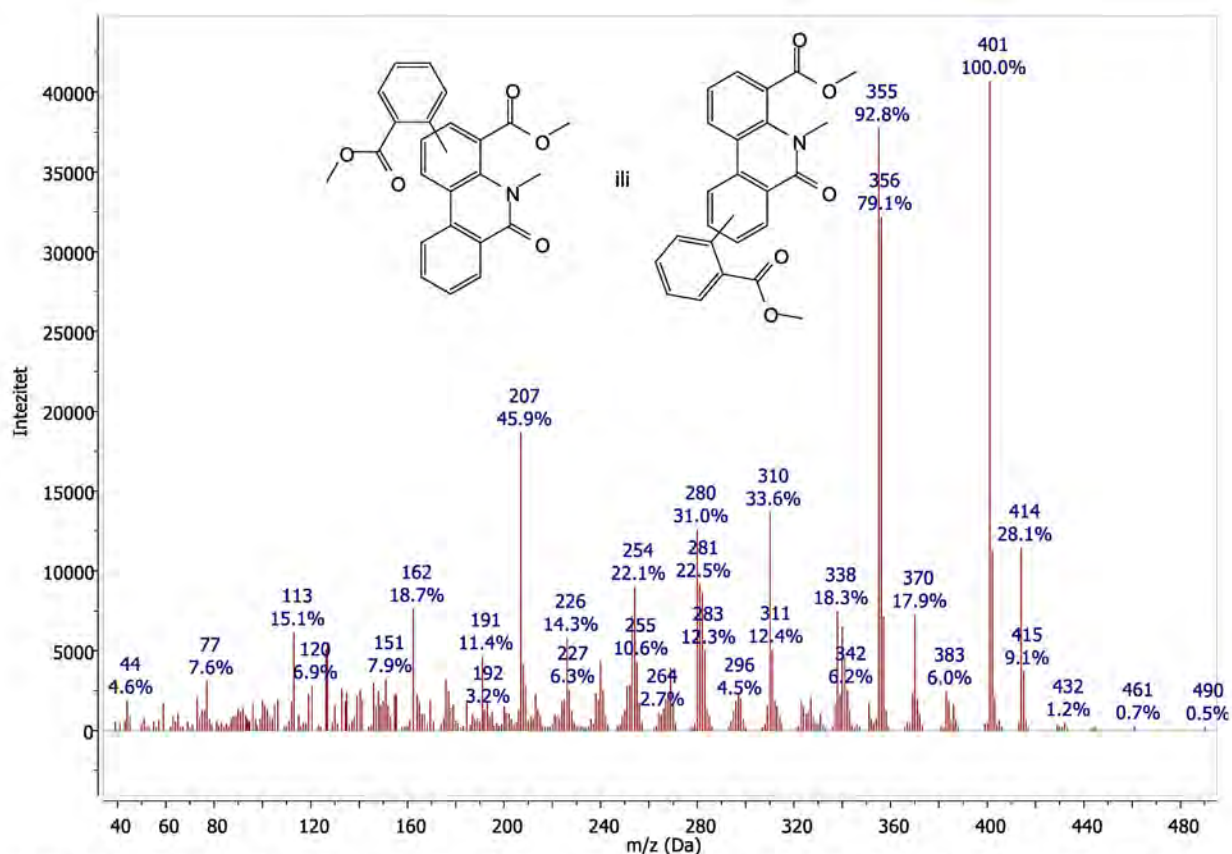


Prilog 78. (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 46,742 min, RI = 3320 (tabela 5.11, N^o 41)

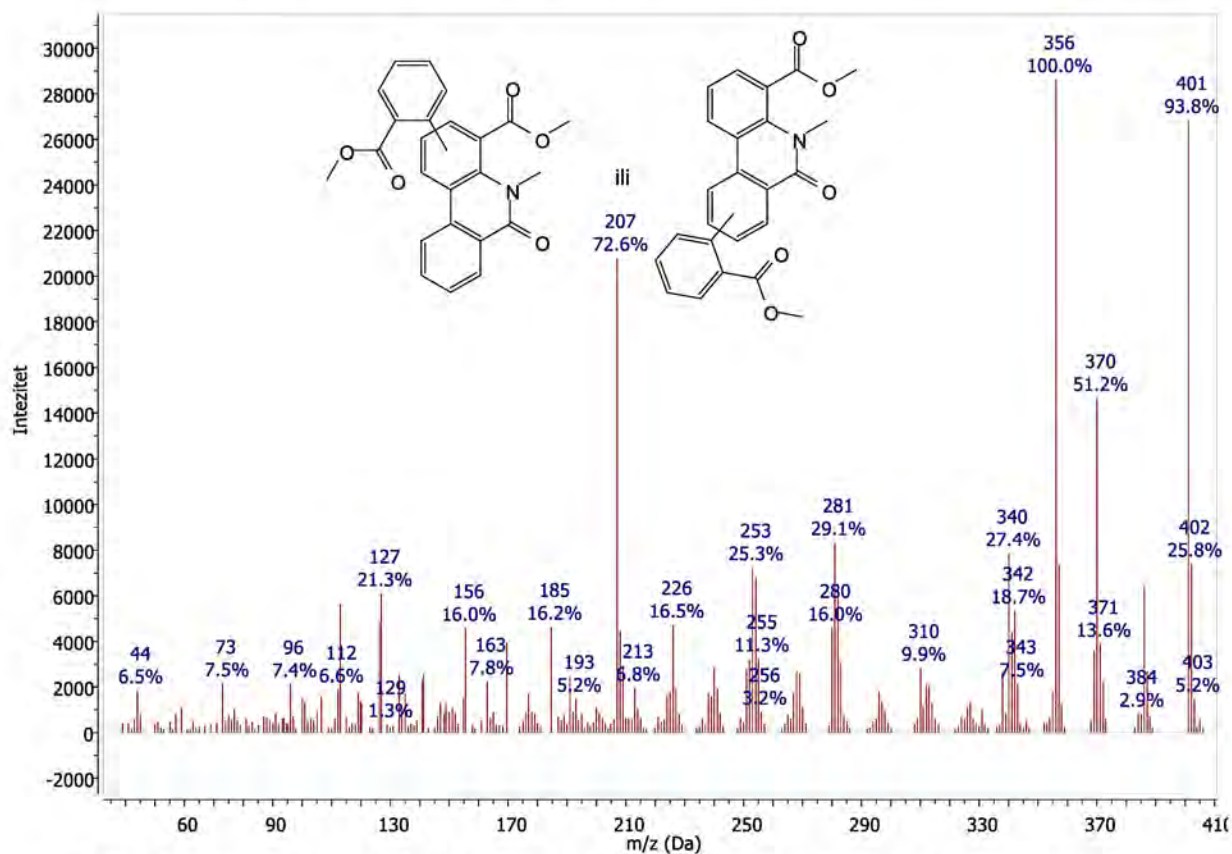
Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost



Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

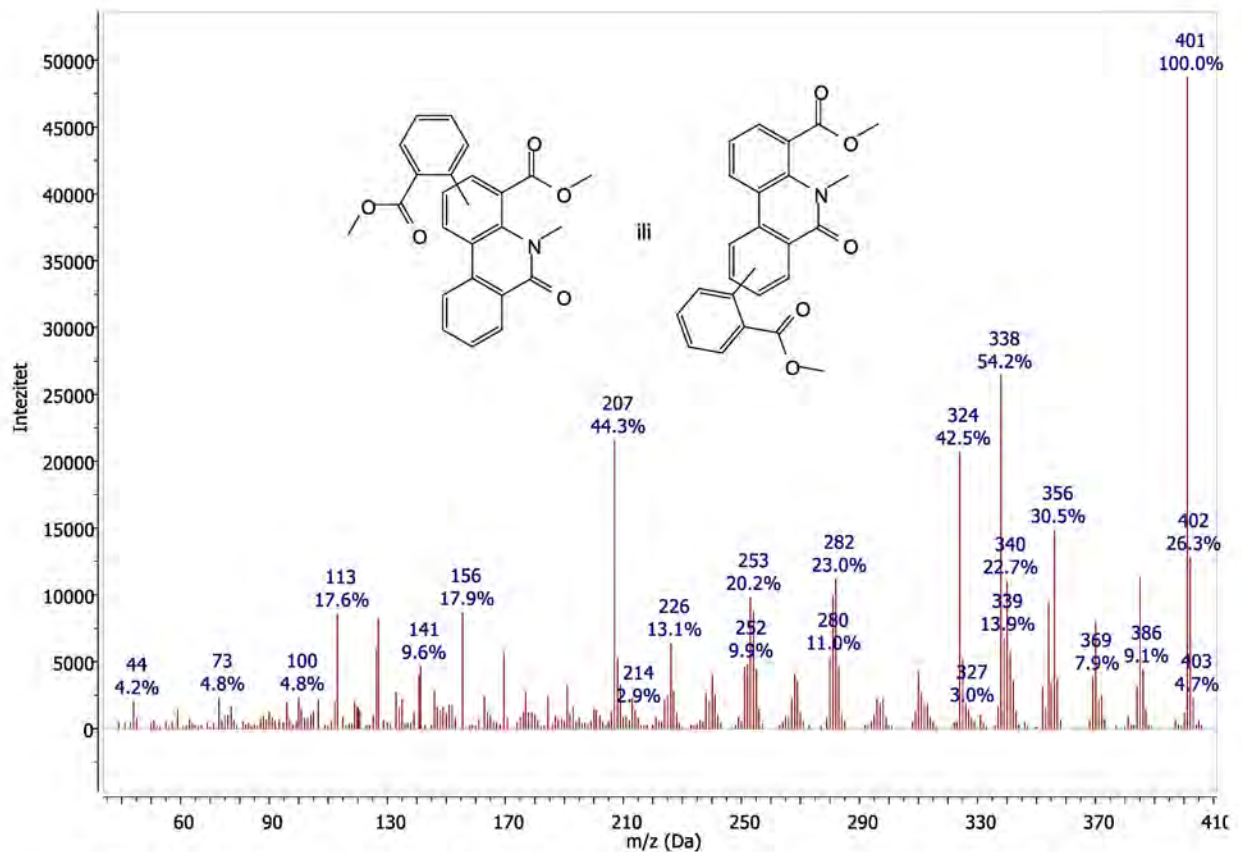


Prilog 81. (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 49,288 min, RI = 3544 (tabela 5.11, N° 44)



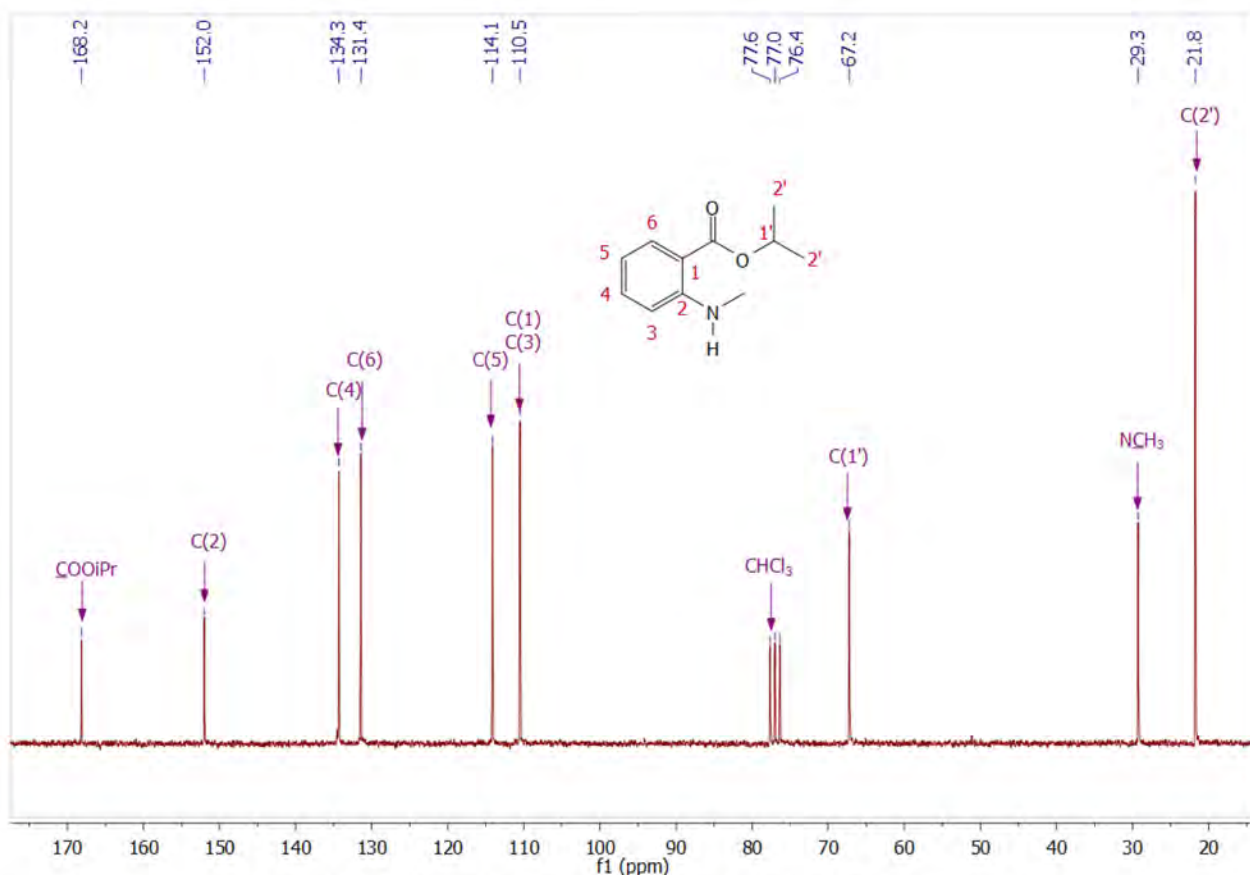
Prilog 82. (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa Rt = 50,333 min (tabela 5.11, N° 45)

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

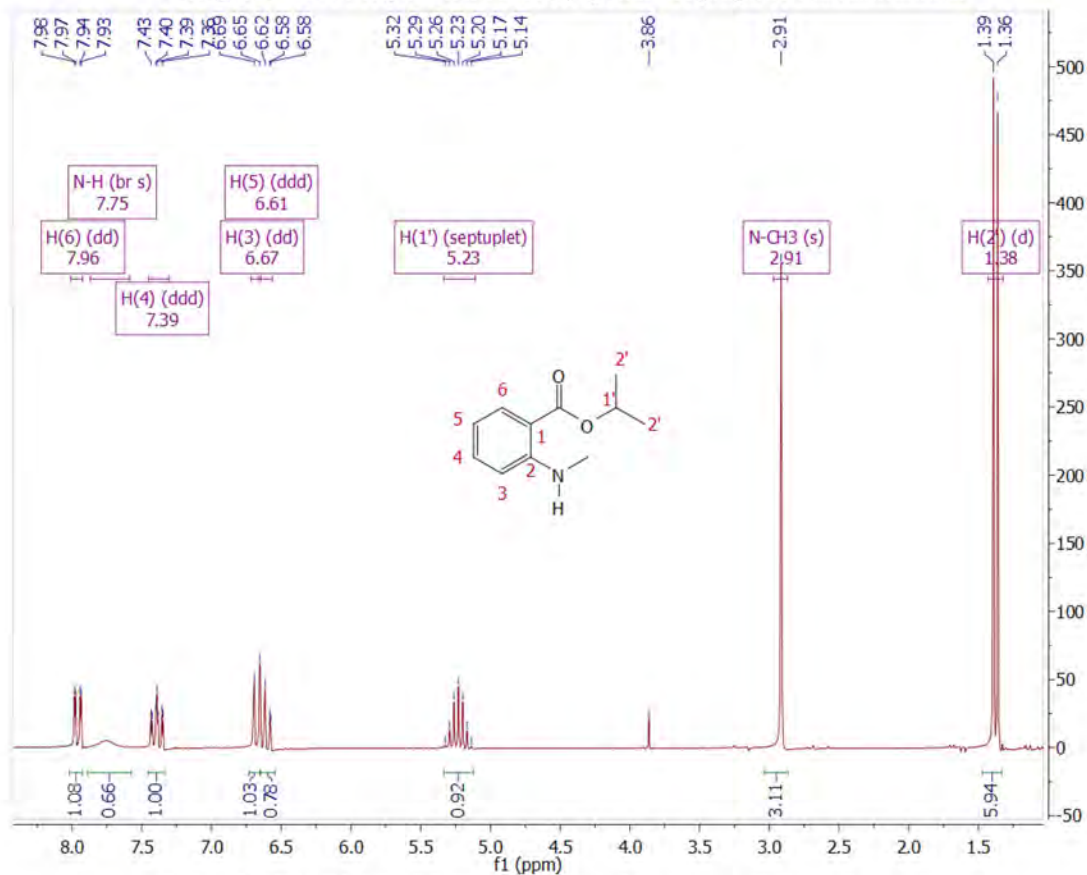


Prilog 83. (EI)MS spektar proizvoda termolize NO-MMA sa $R_t = 51,392$ min (tabela 5.11, N^o 46)

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

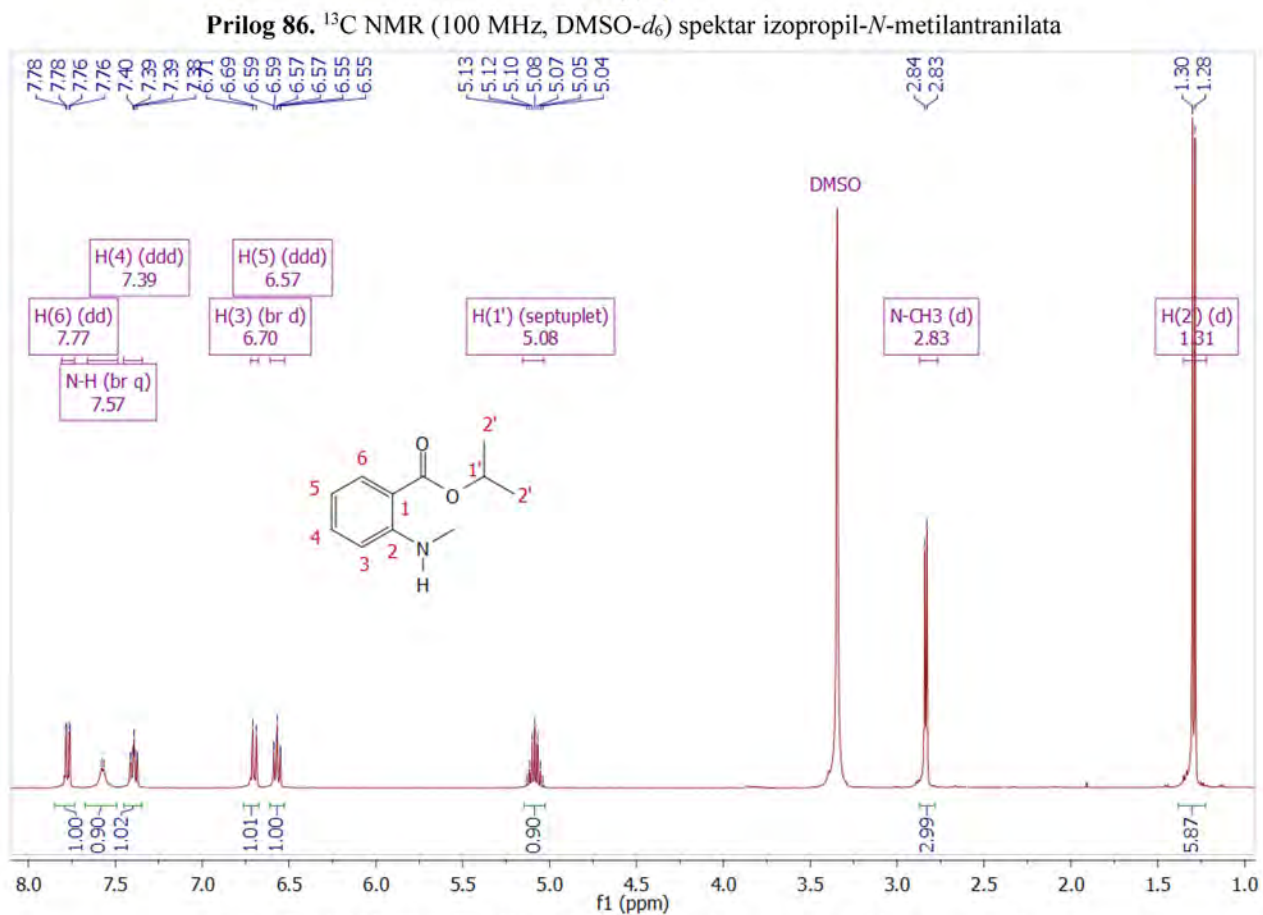
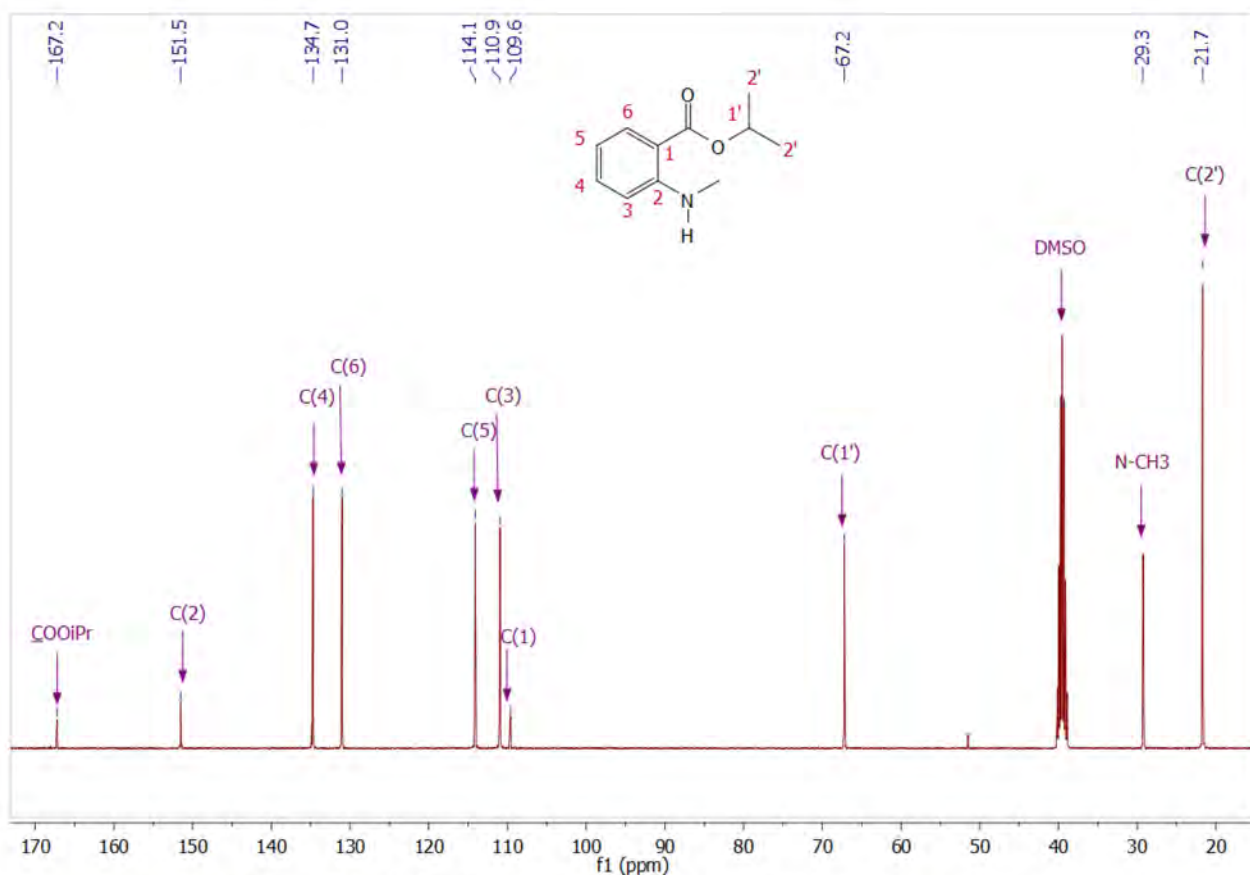


Prilog 84. ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) spektralni podaci izopropil-*N*-metilantranilata

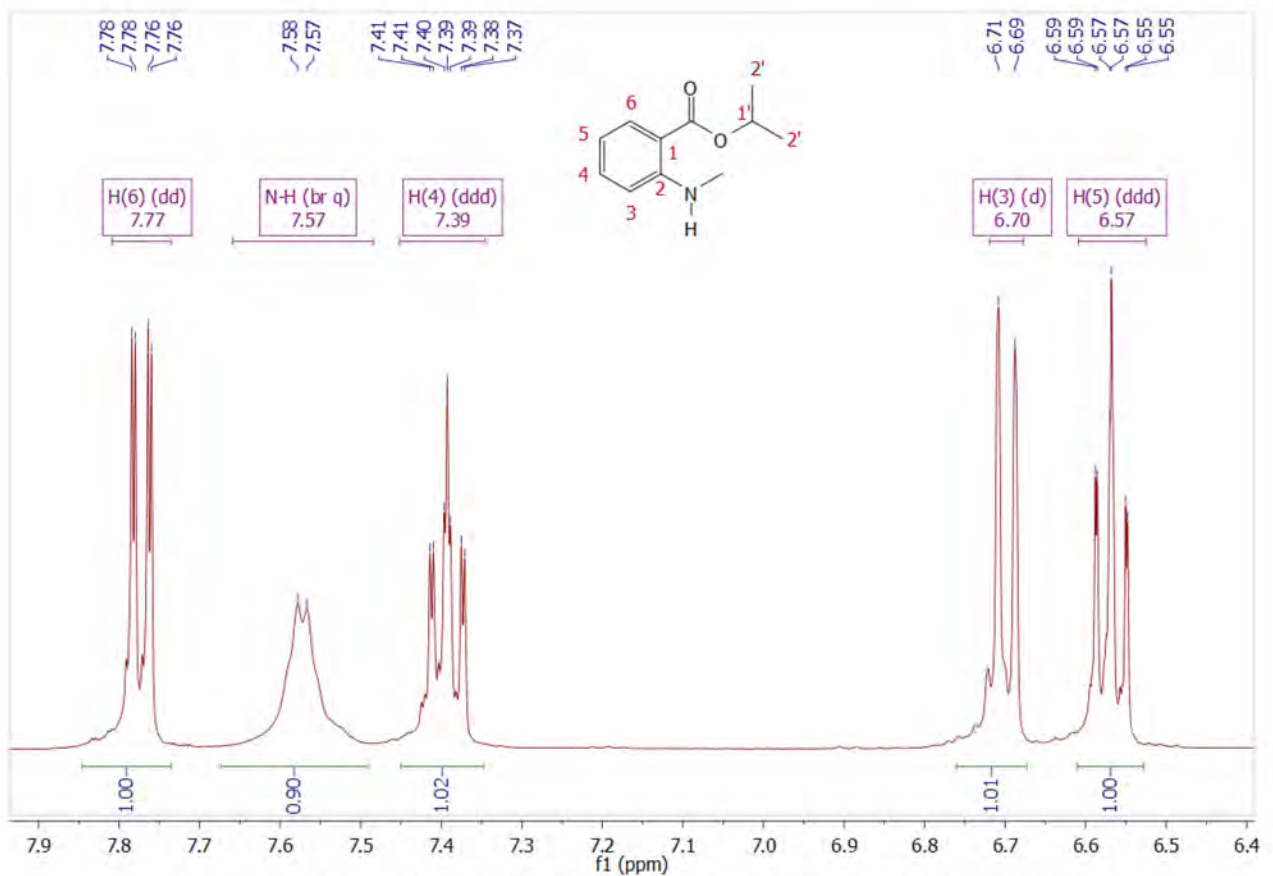


Prilog 85. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) spektralni podaci izopropil-*N*-metilantranilata

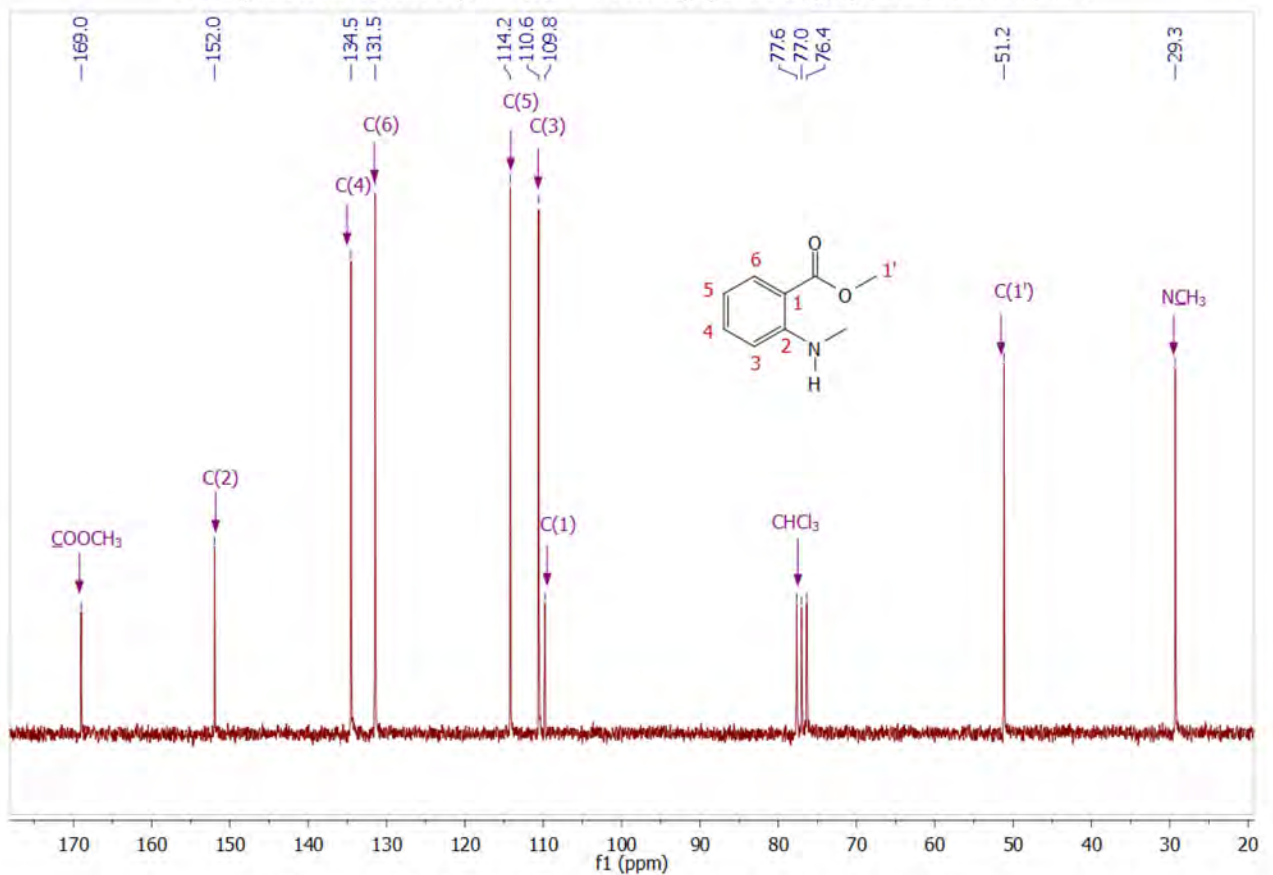
Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost



Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

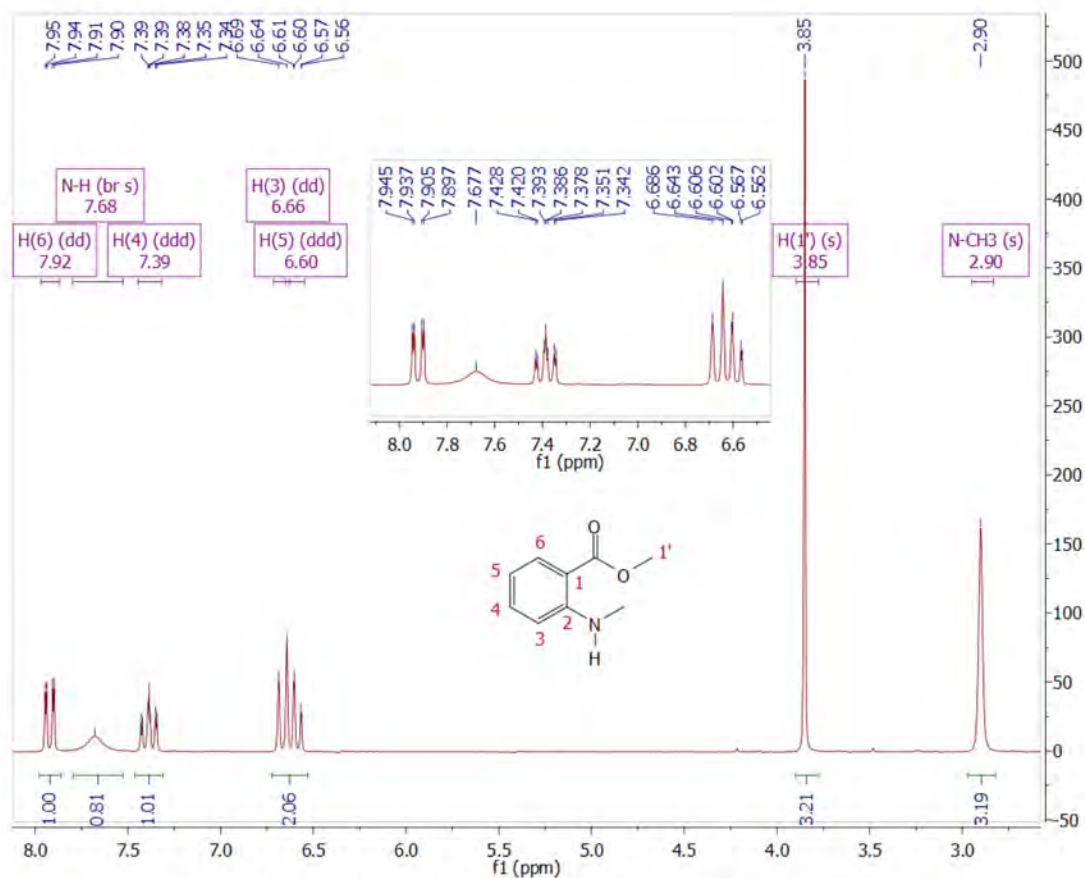


Prilog 88. Deo ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) spektra izopril-*N*-metilantranilata

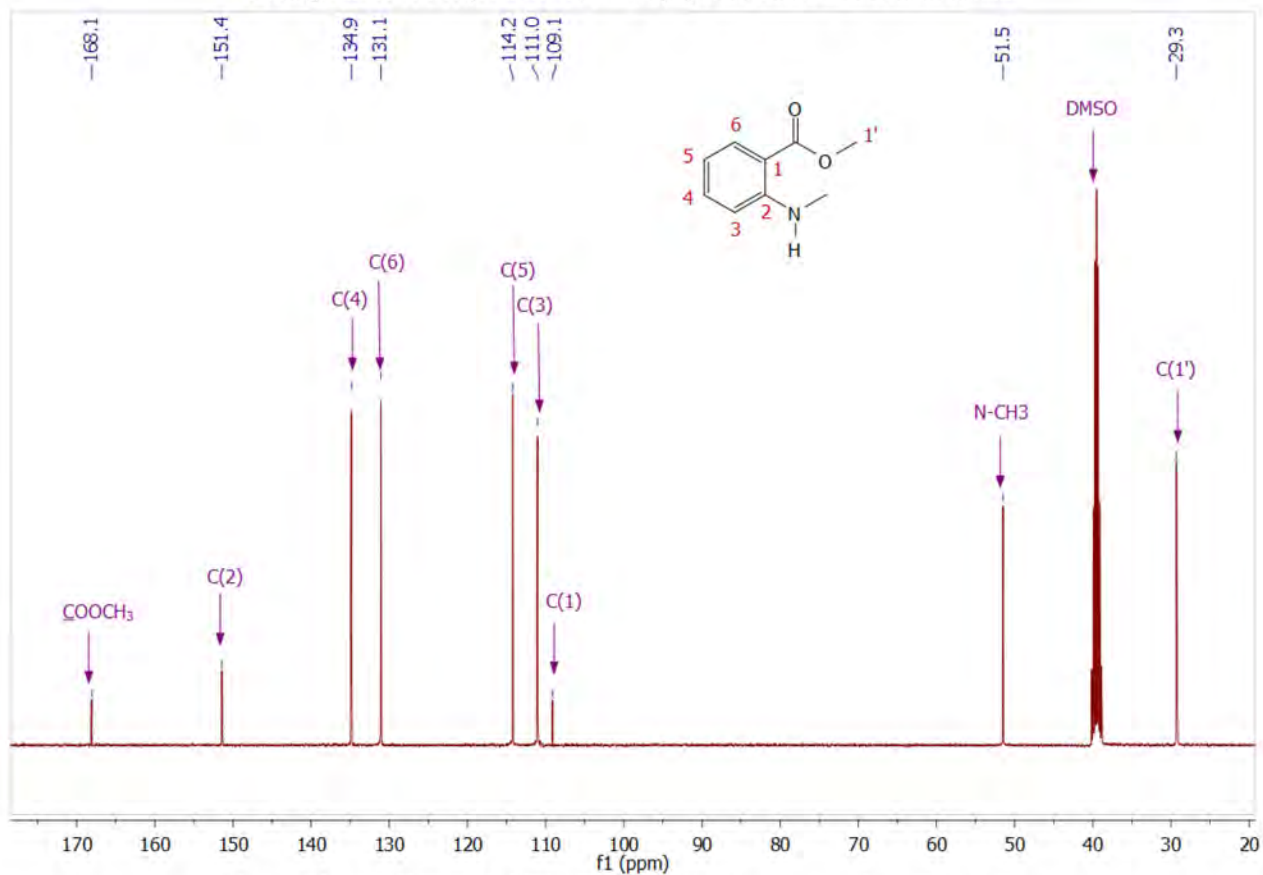


Prilog 89. ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) spektar metil-*N*-metilantranilata

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

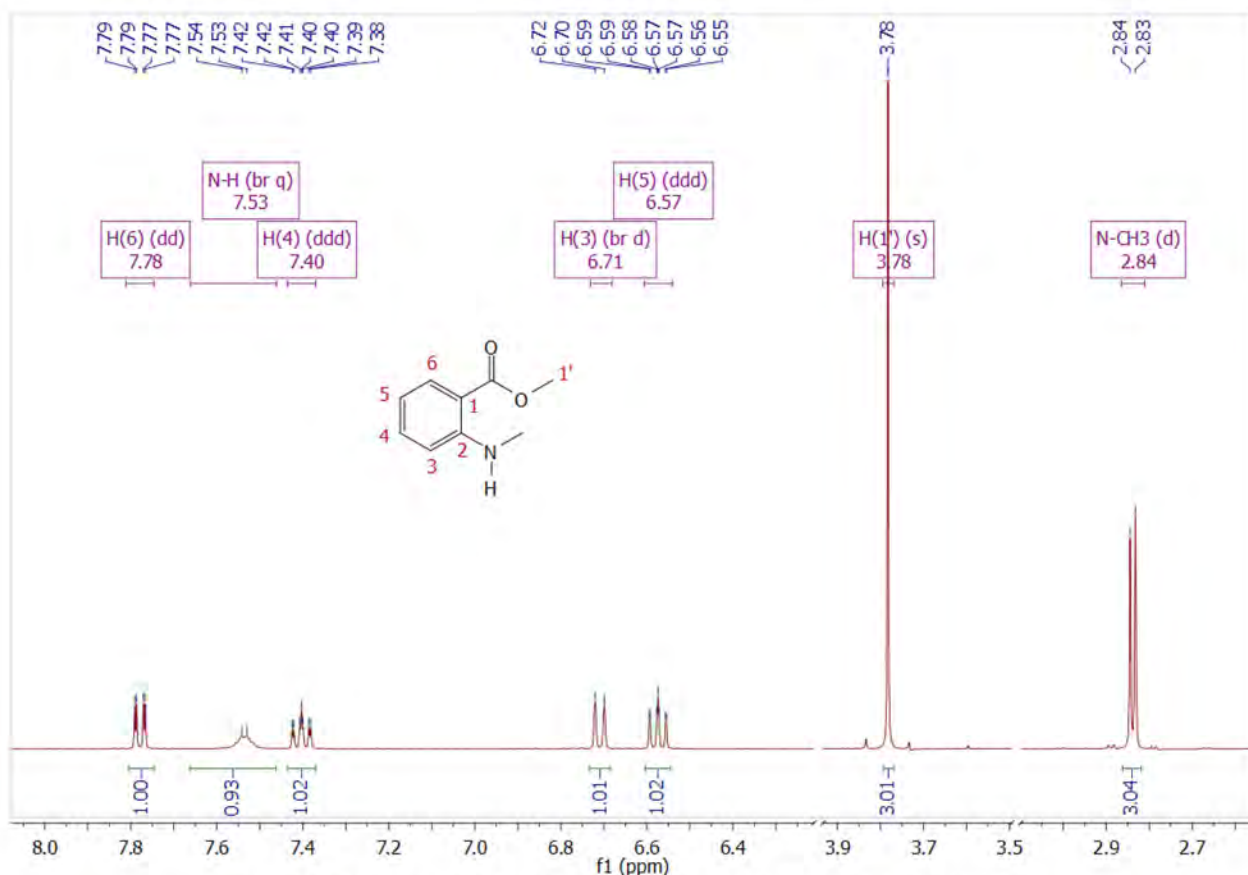


Prilog 90. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) spektar metil-*N*-metilantranilata

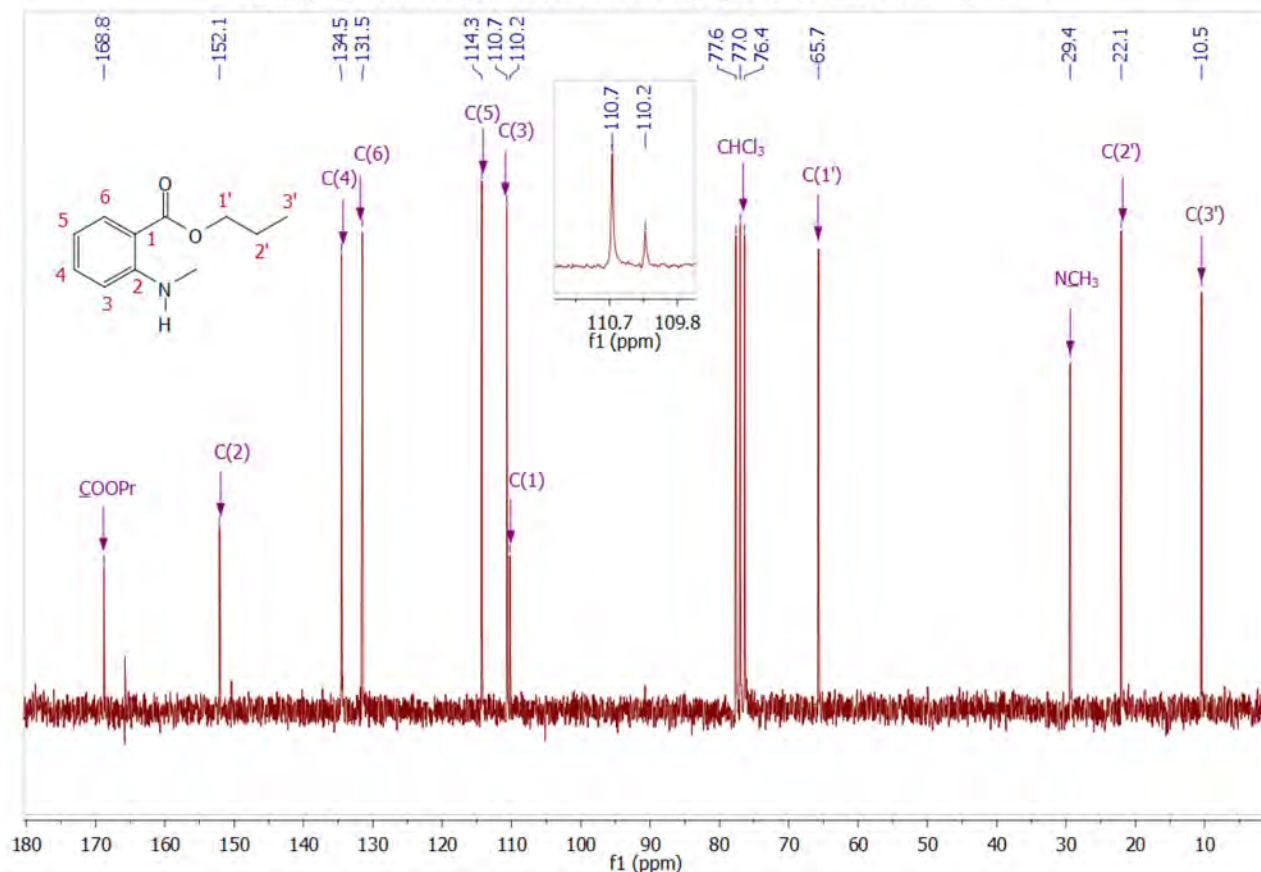


Prilog 91. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) spektar metil-*N*-metilantranilata

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

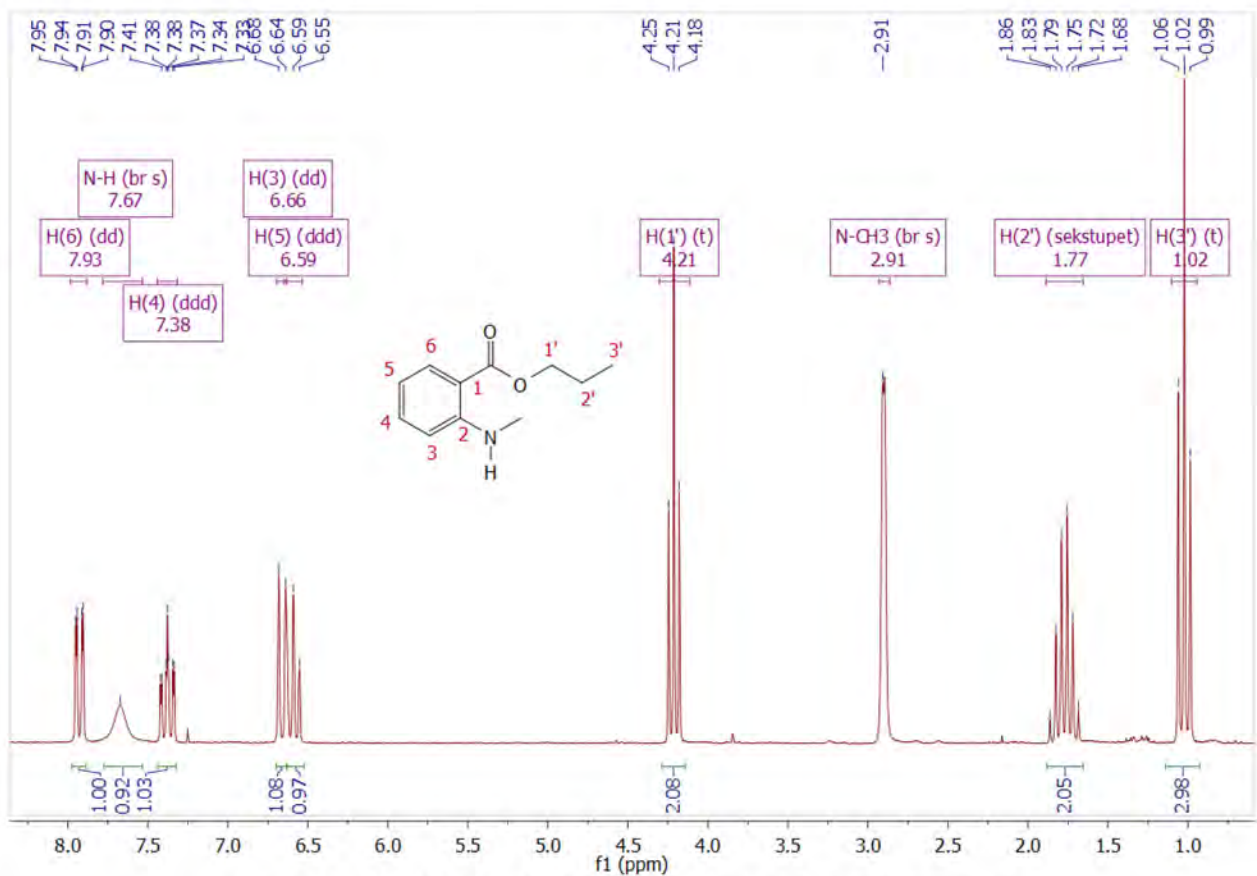


Prilog 92. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) spektar metil-*N*-metilantranilata

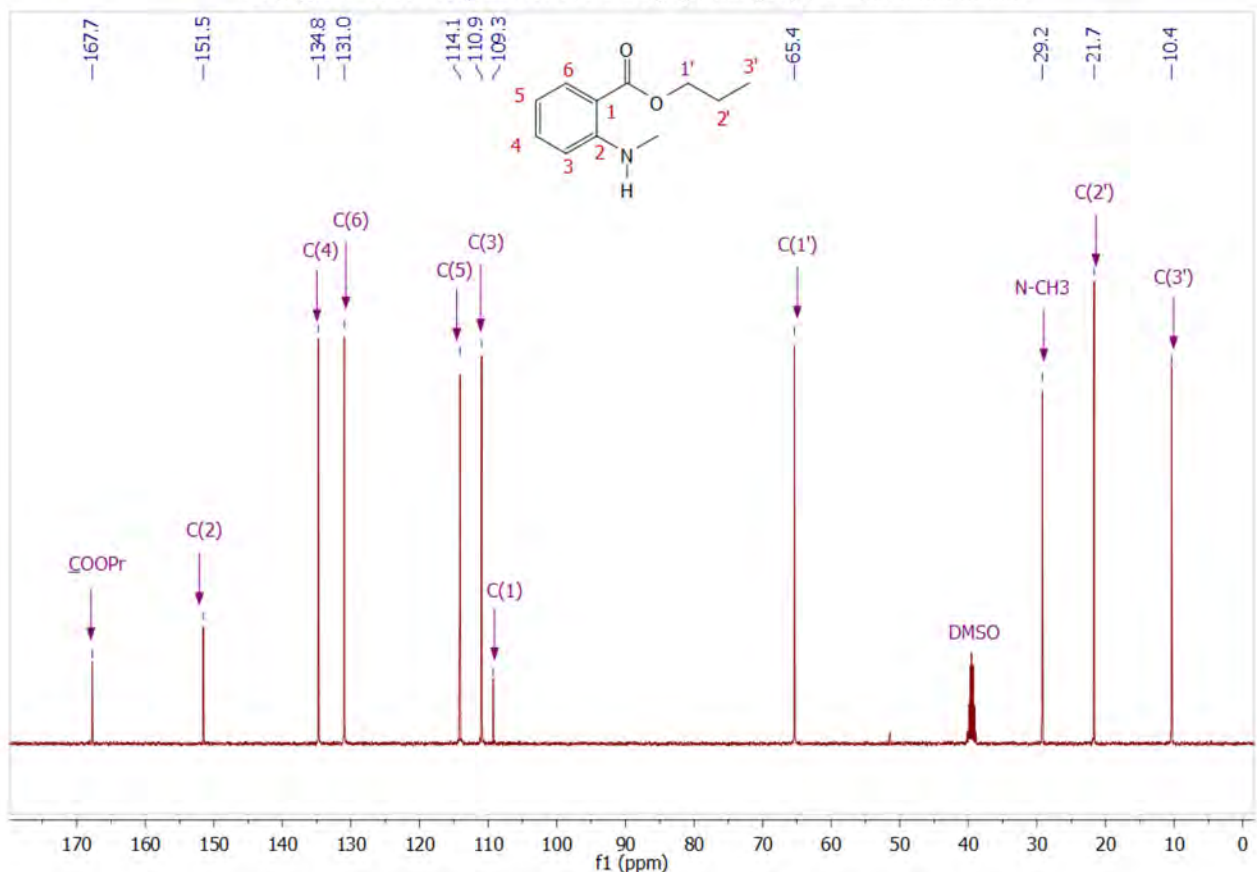


Prilog 93. ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) spektar propil-*N*-metilantranilata

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

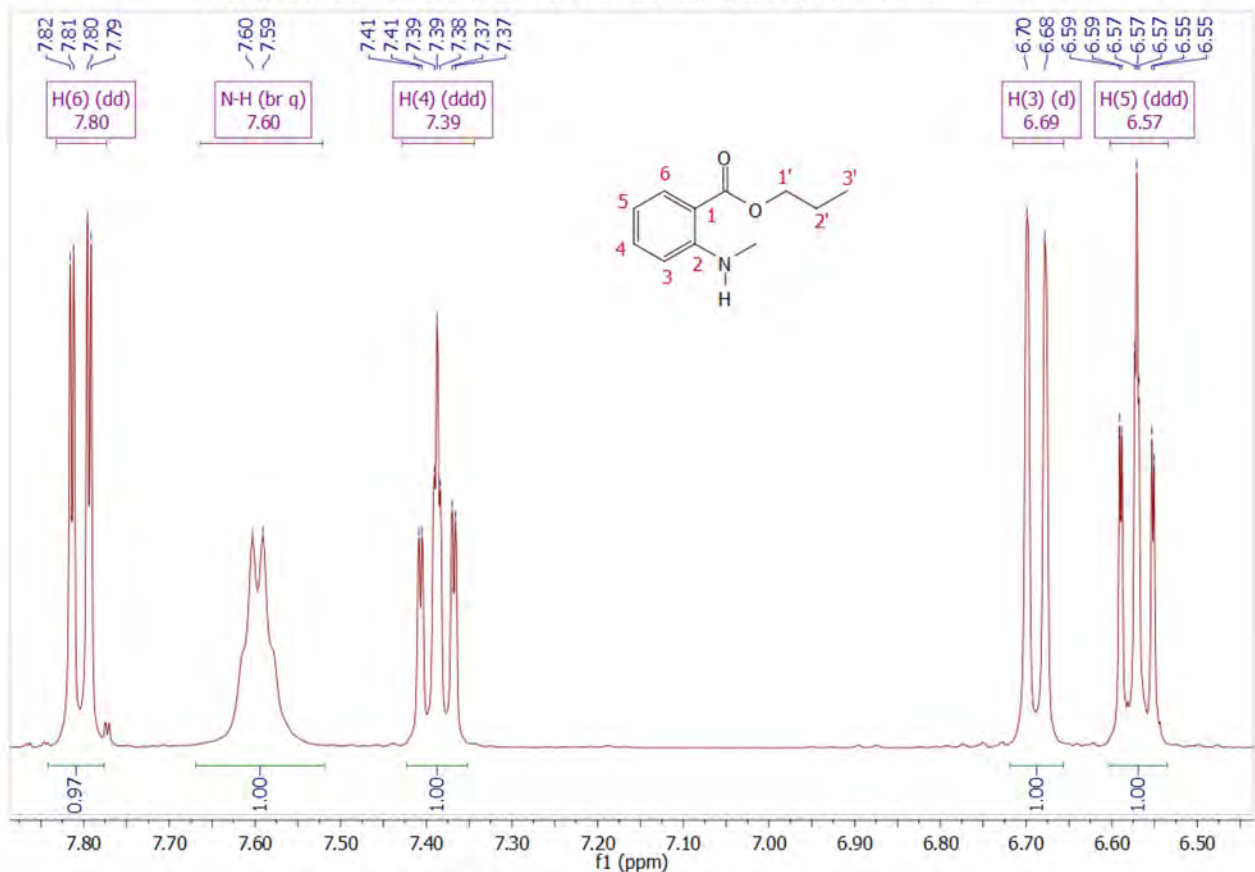
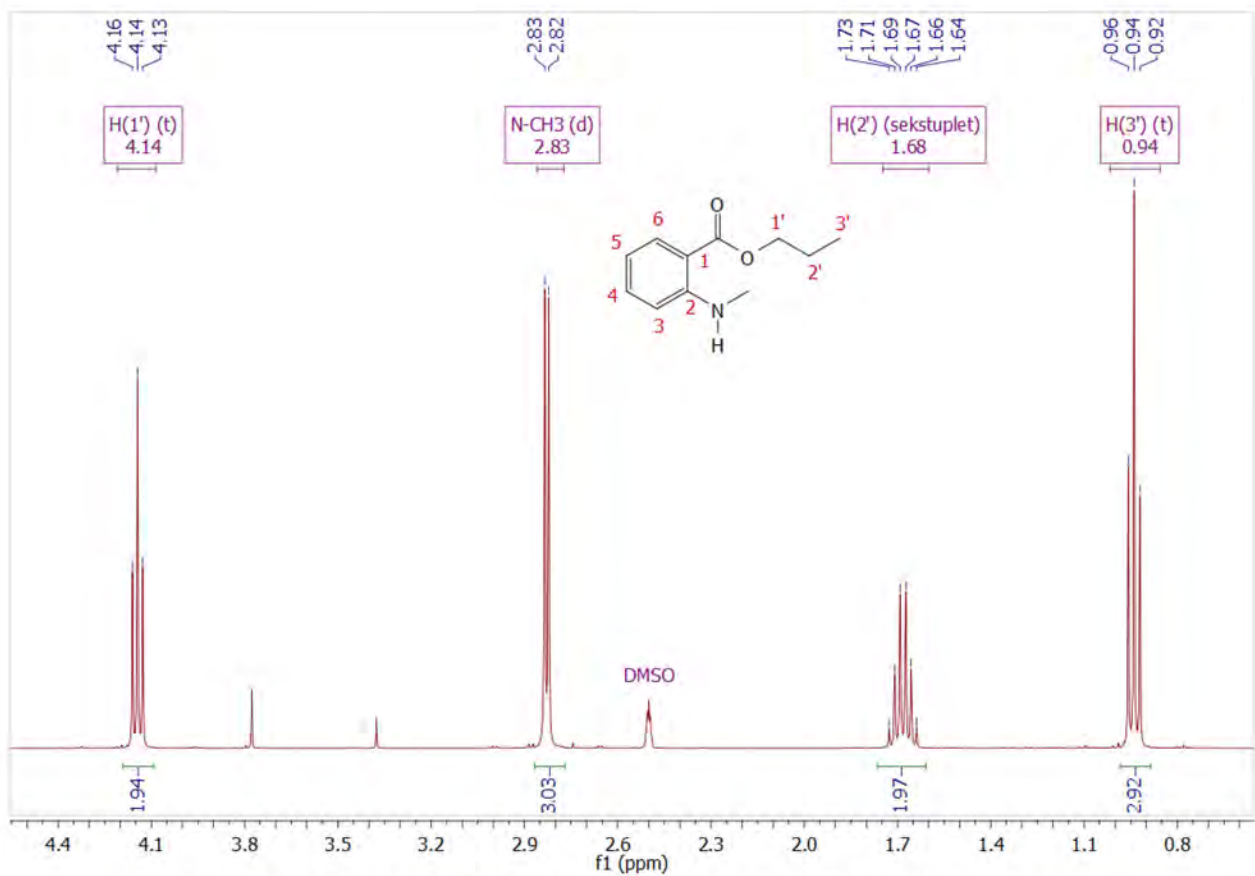


Prilog 94. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) spektr propil-N-metilntranilata

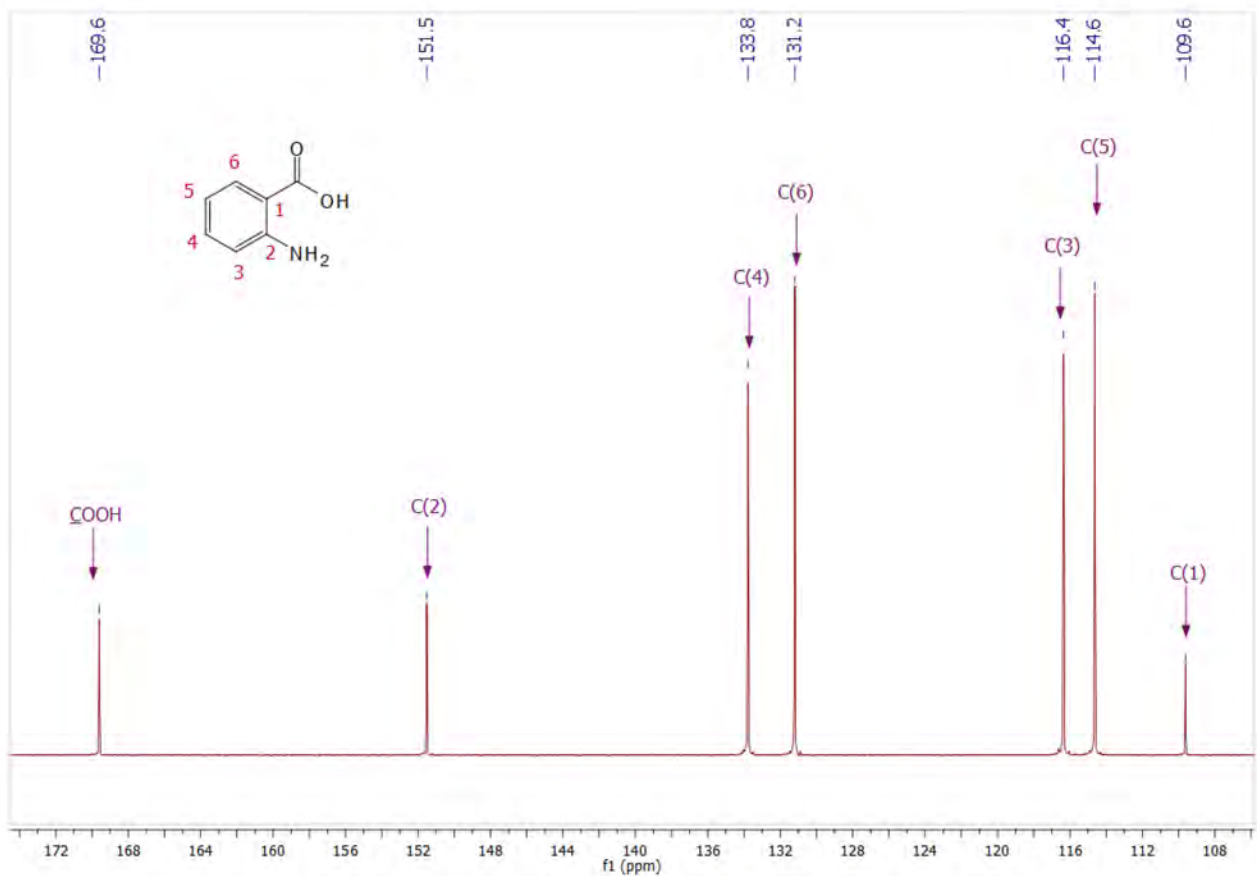


Prilog 95. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) spektr propil-N-metilntranilata

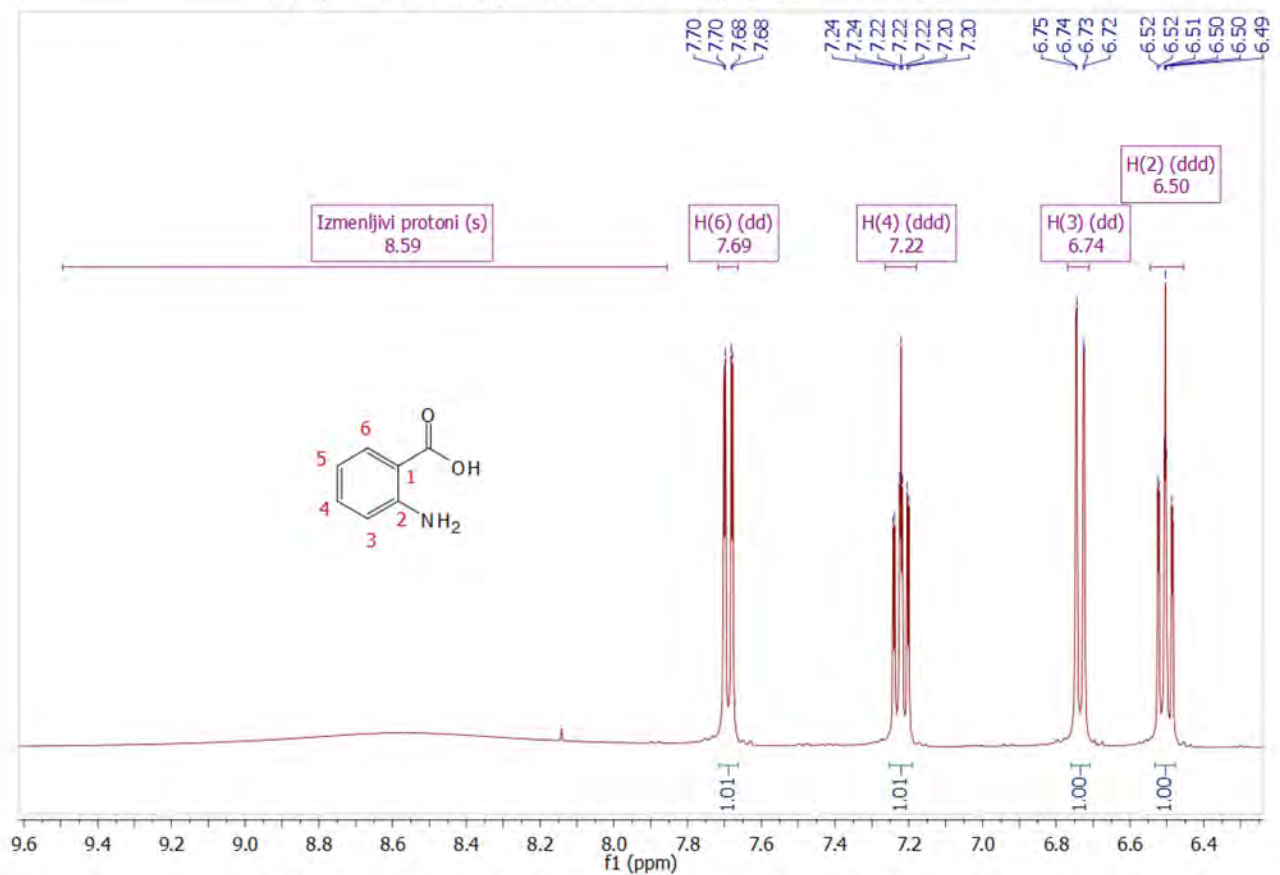
Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost



Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

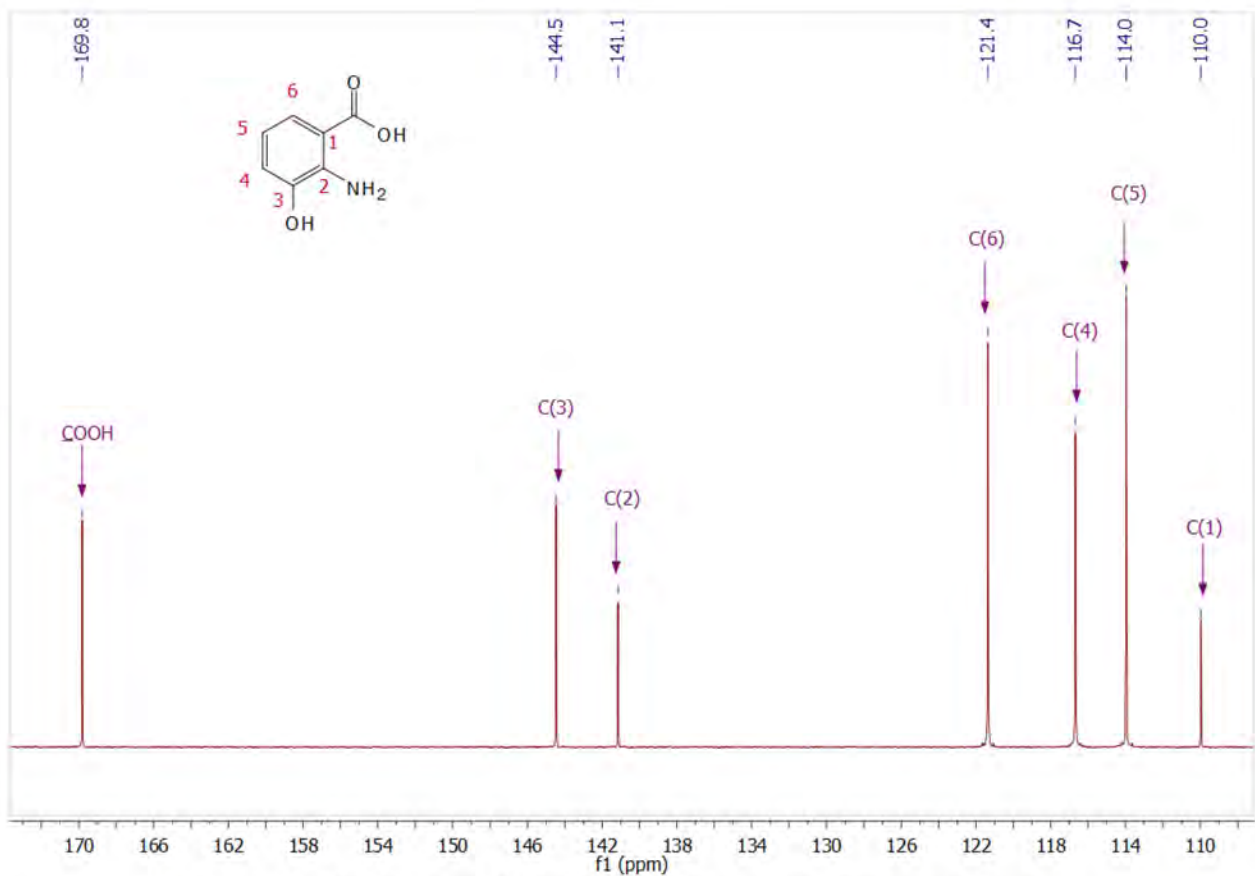


Prilog 98. ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) spektar antranilne kiseline

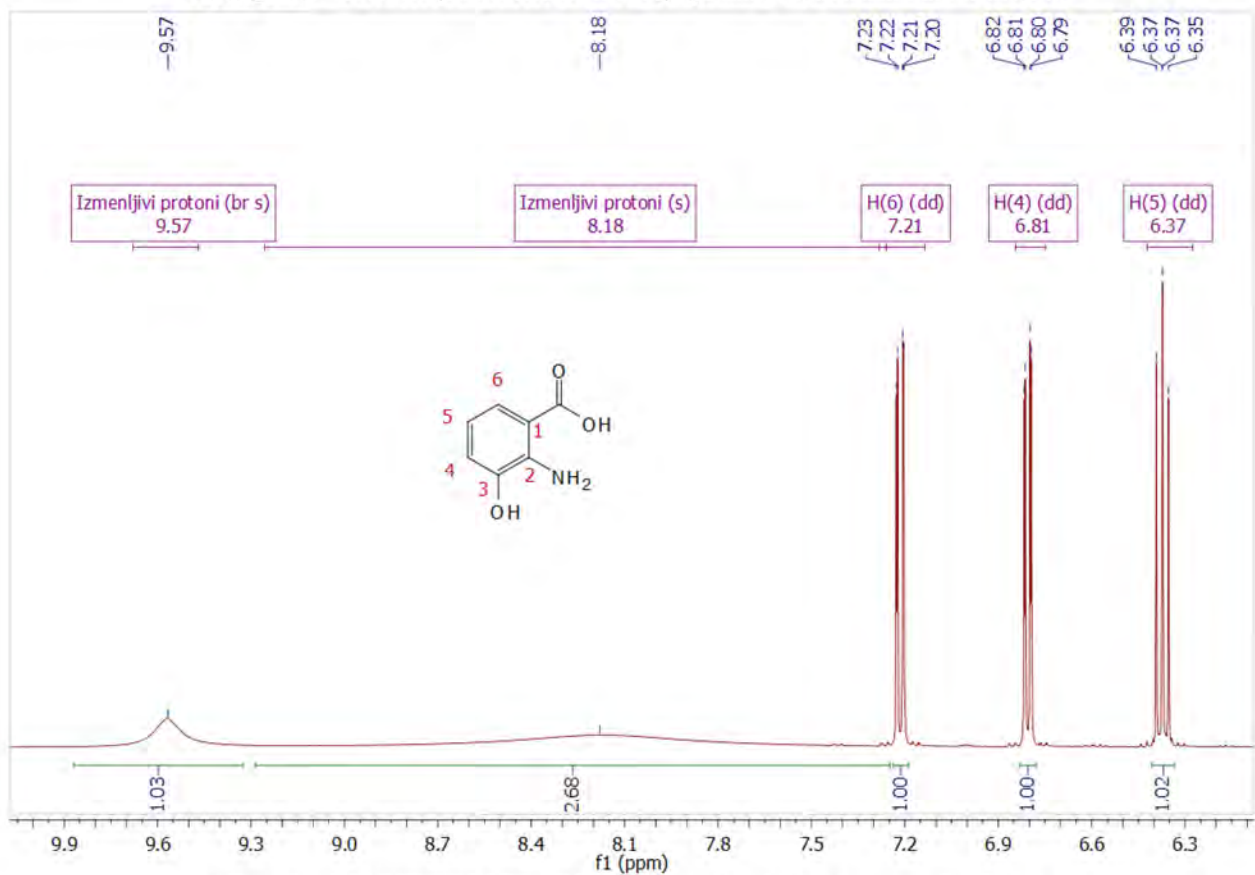


Prilog 99. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) spektar antranilne kiseline

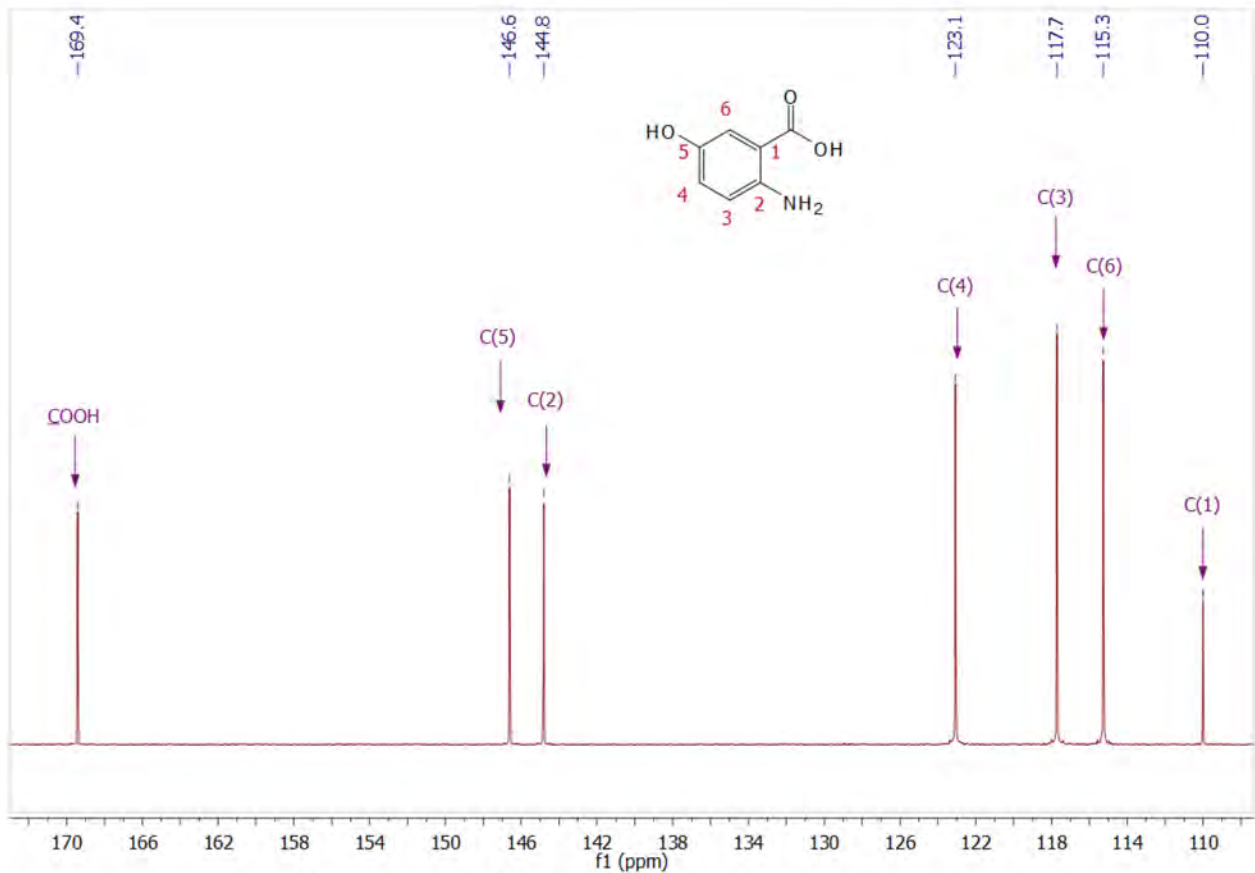
Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost



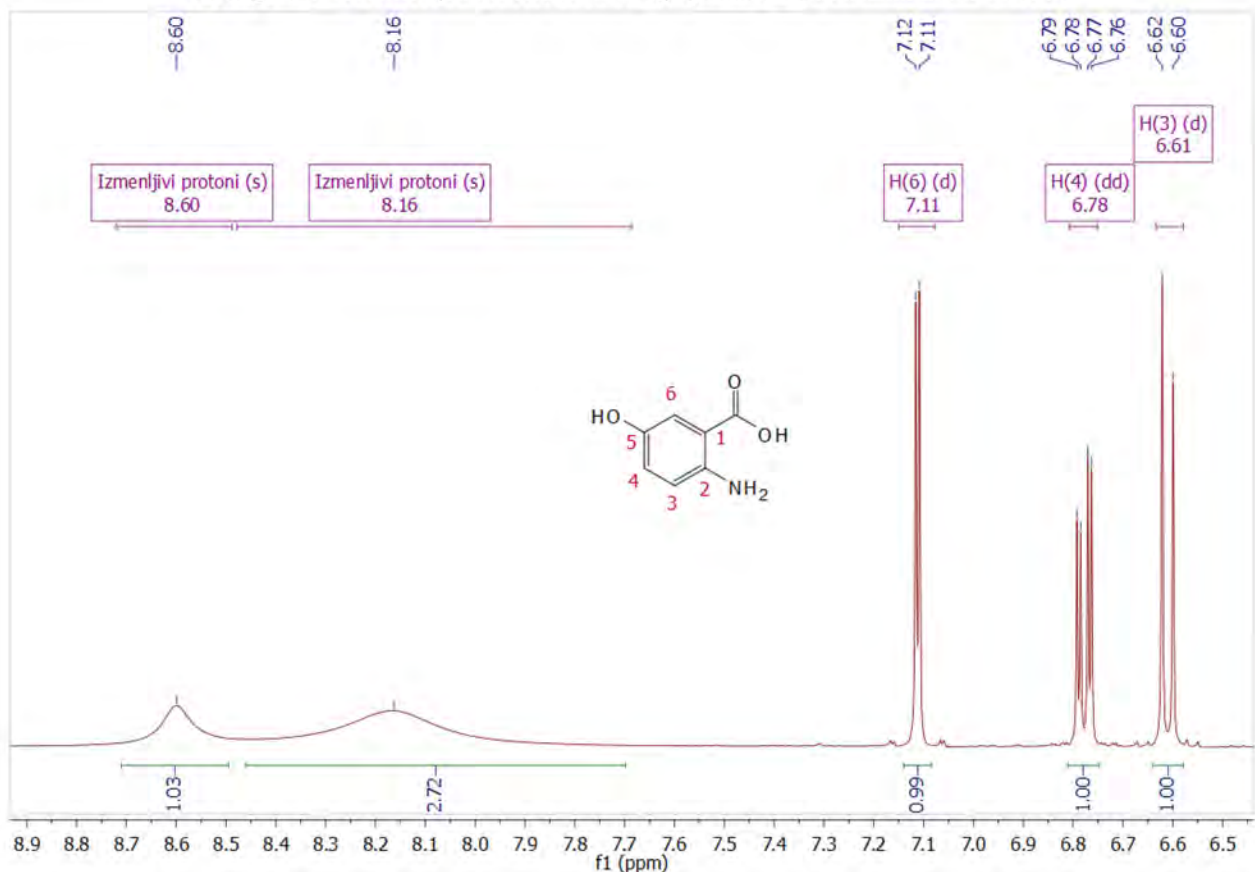
Prilog 100. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) spektar 3-hidroksiantranilne kiseline



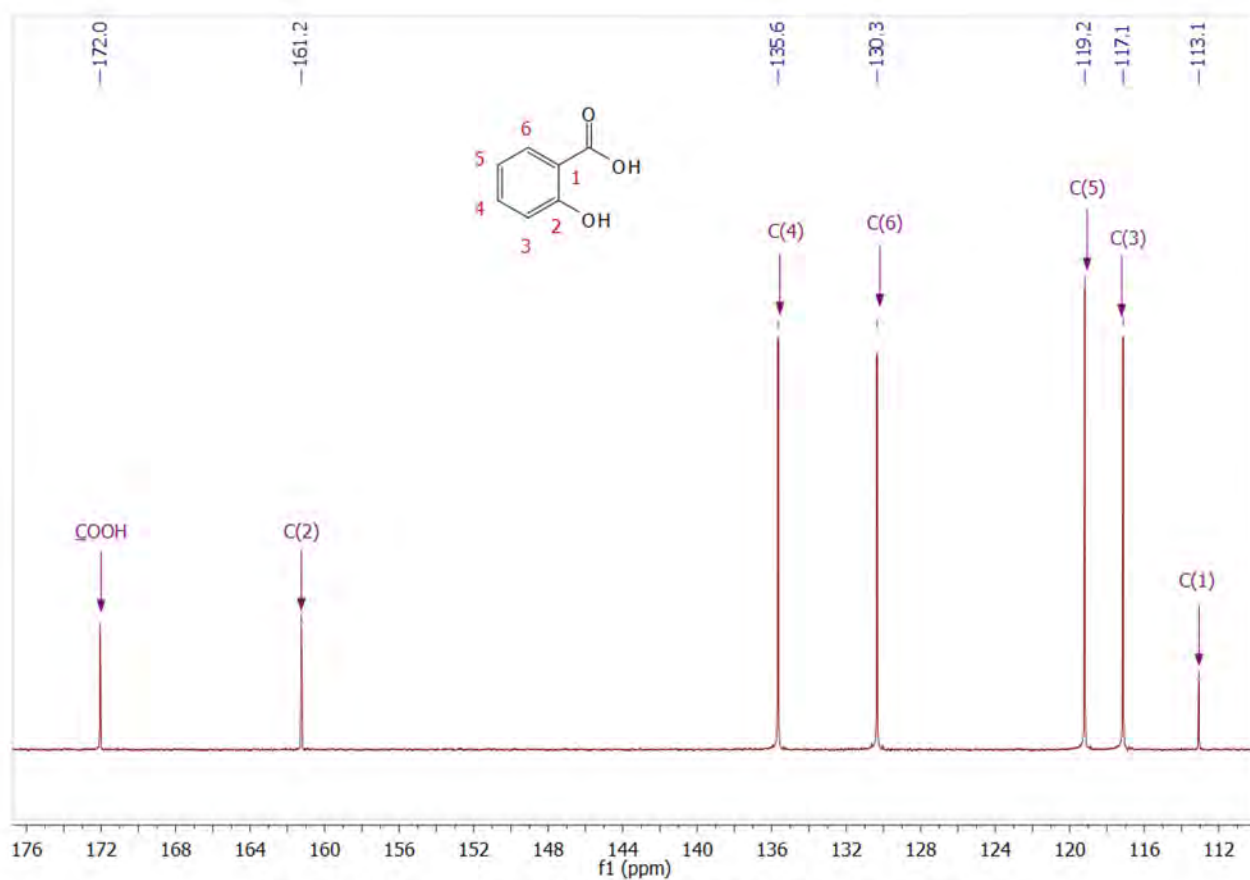
Prilog 101. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) spektar 3-hidroksiantranilne kiseline



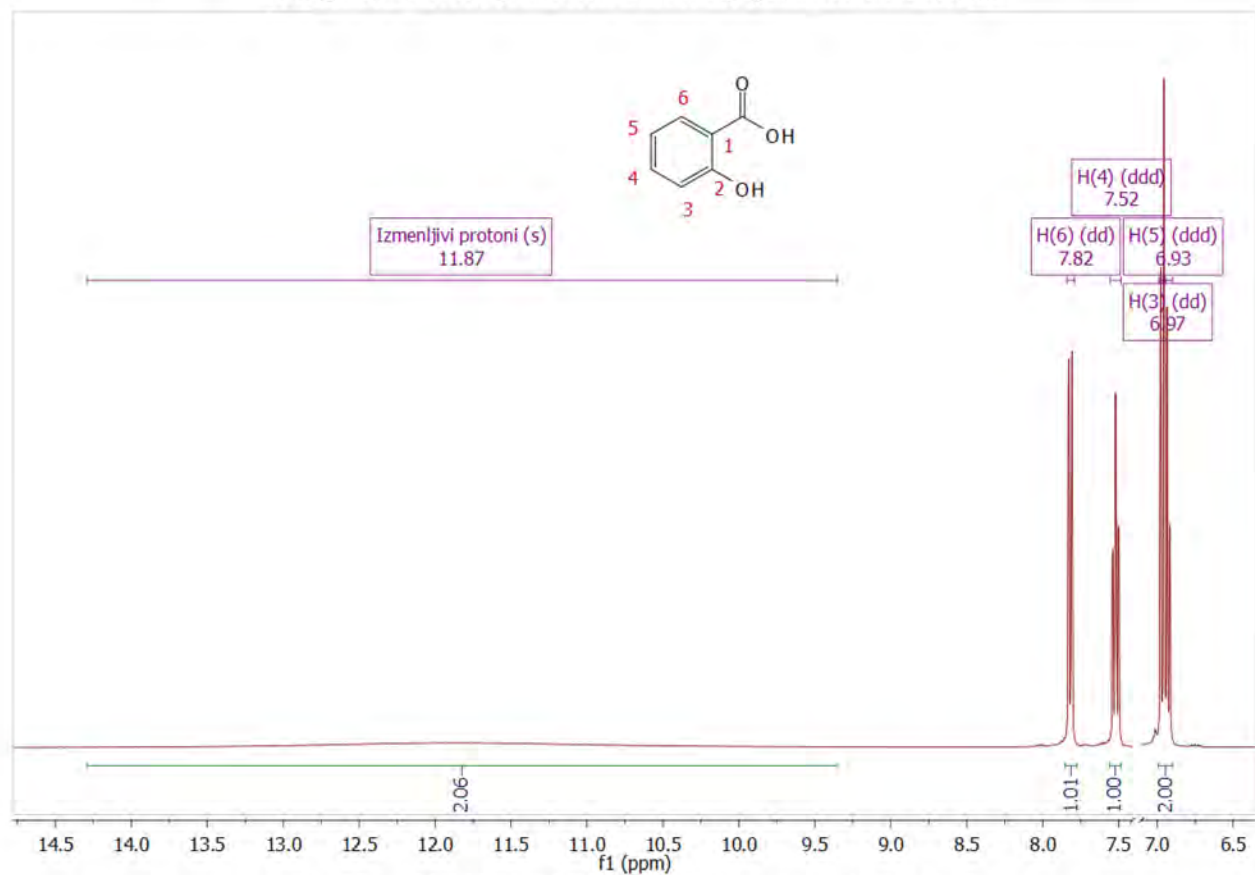
Prilog 102. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) spektar 5-hidroksiantranilne kiseline



Prilog 103. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) spektar 5-hidroksiantranilne kiseline

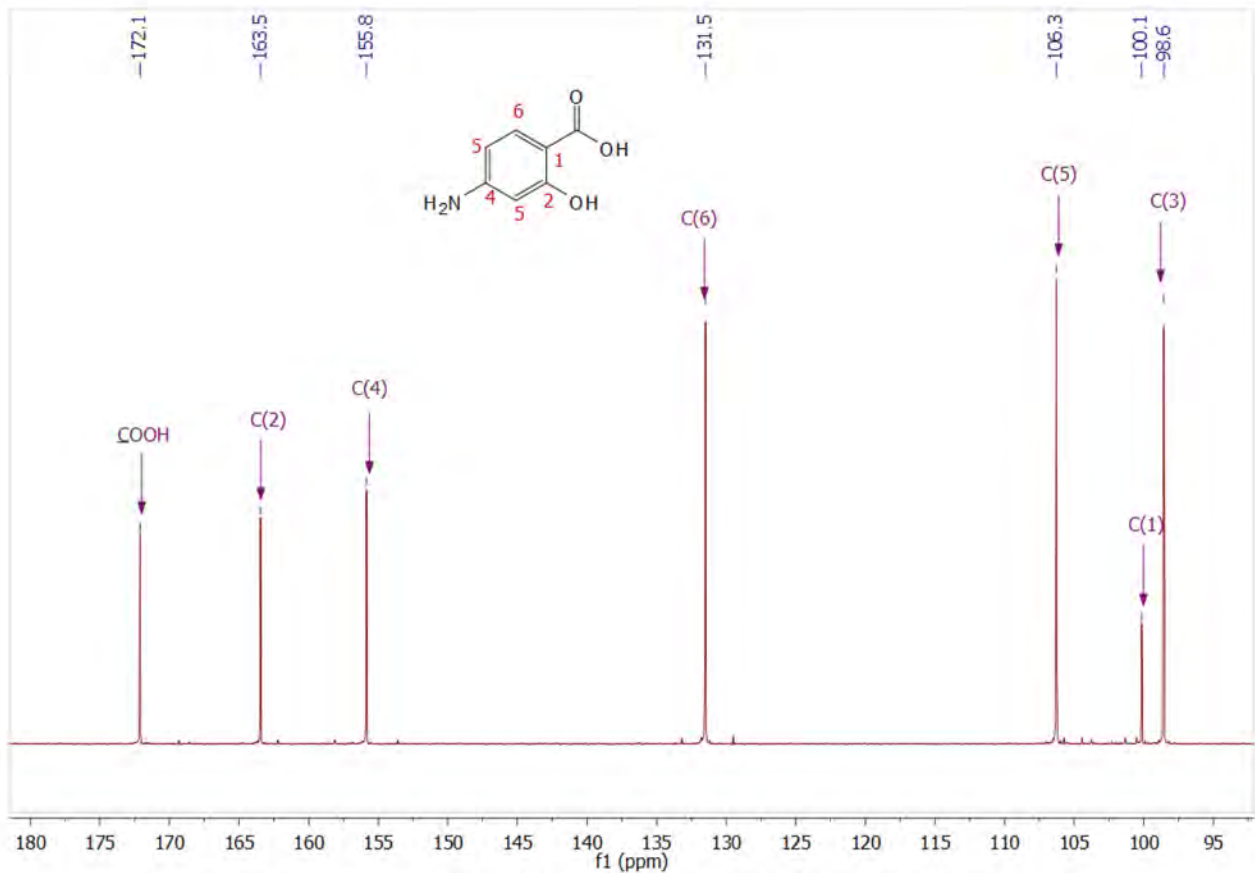


Prilog 104 ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) spektar salicilne kiseline

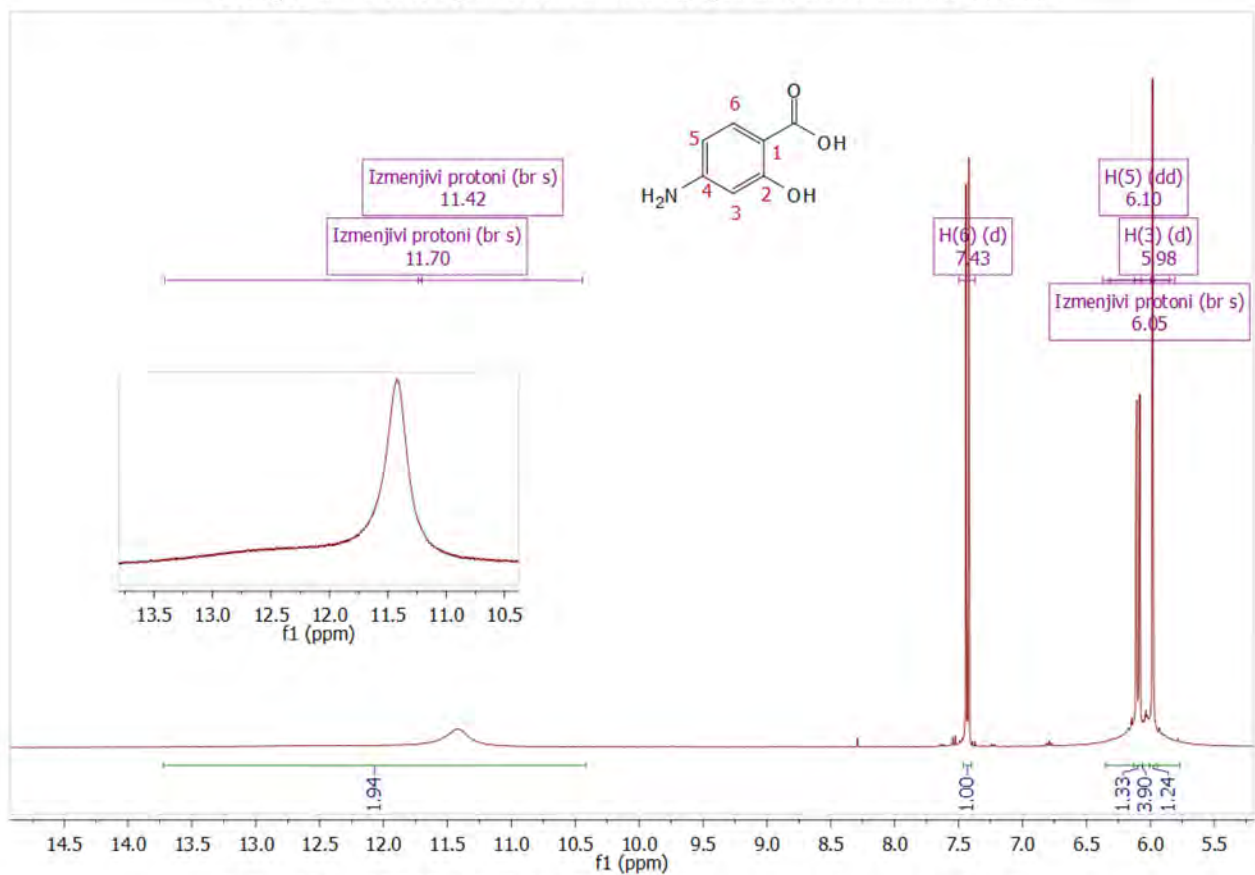


Prilog 105. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) spektar salicilne kiseline

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

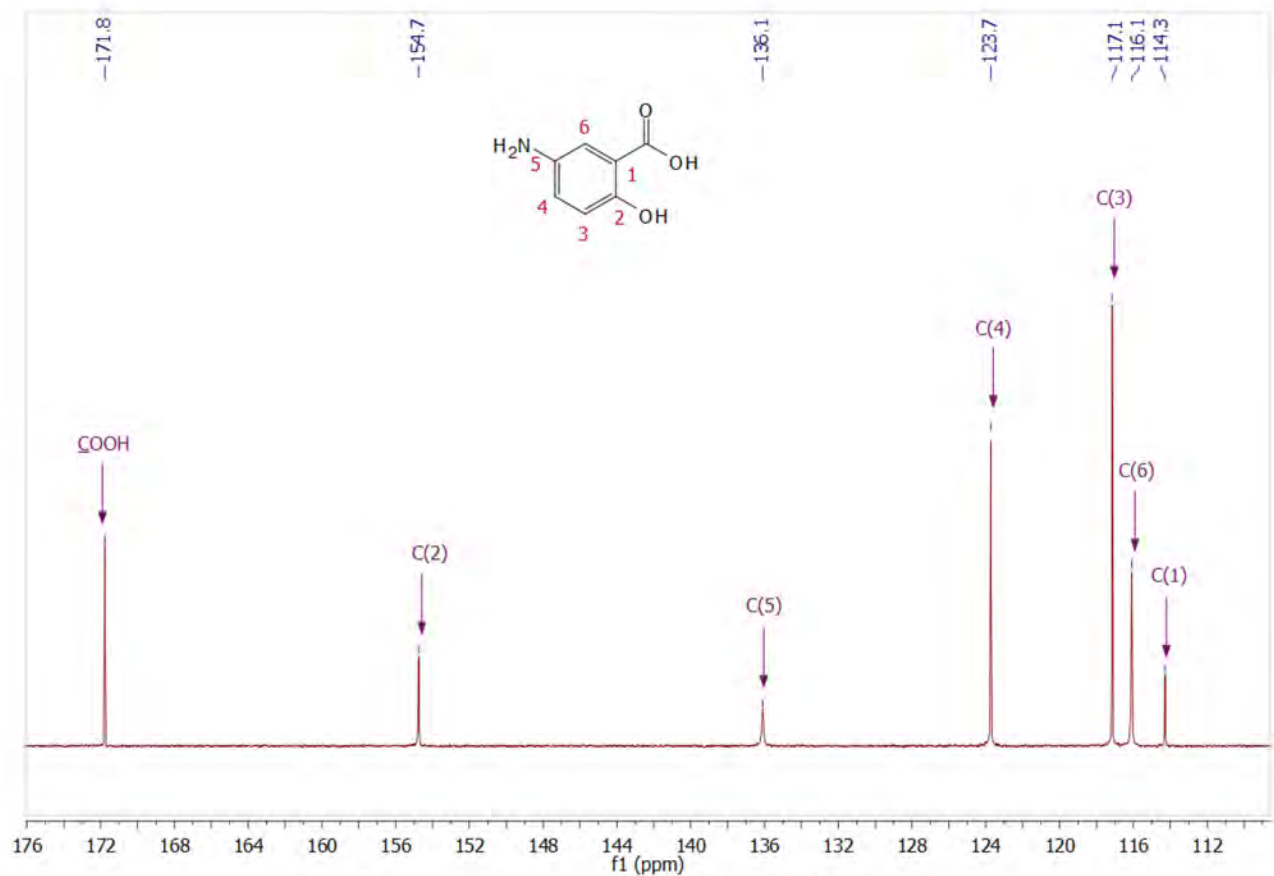


Prilog 106. ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) spektar 4-aminosalicilne kiseline

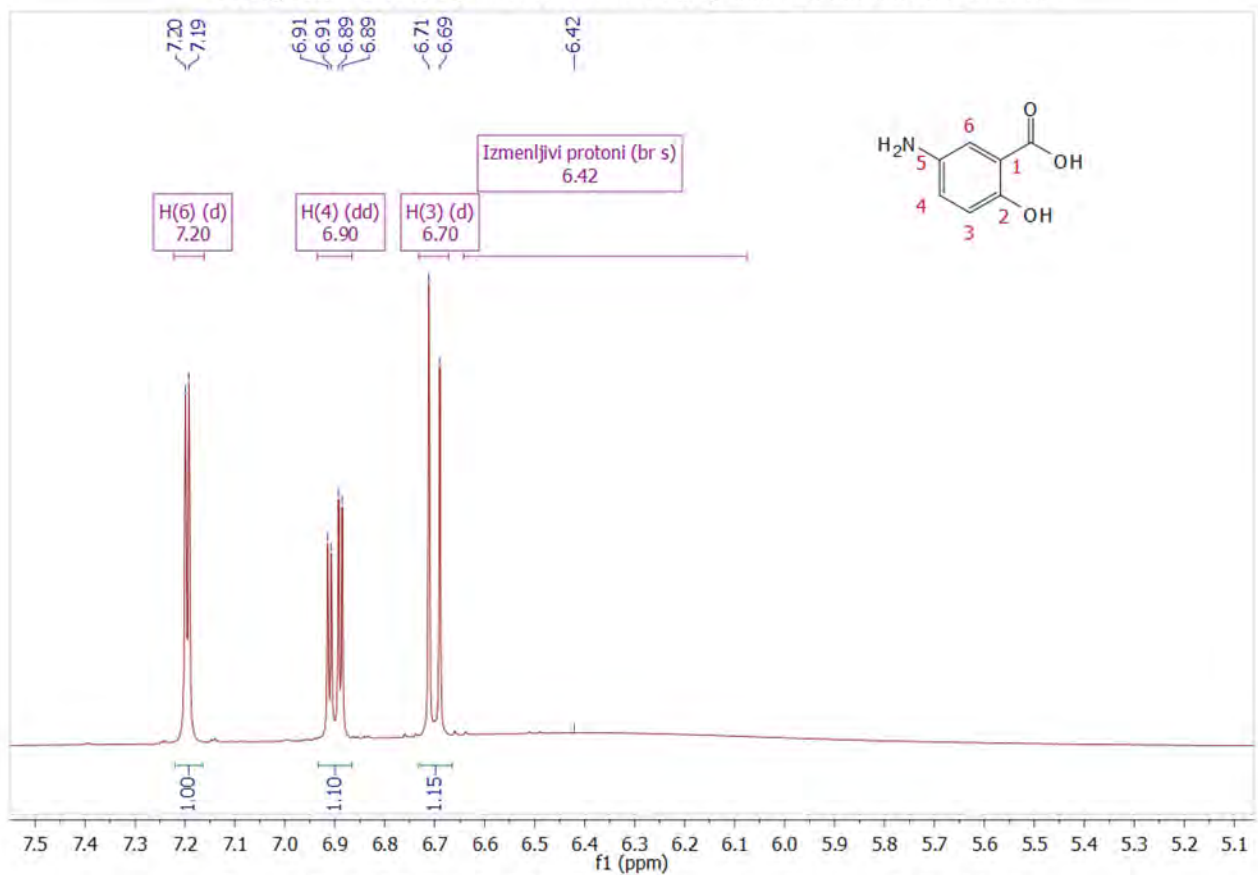


Prilog 107. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) spektar 4-aminosalicilne kiseline

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

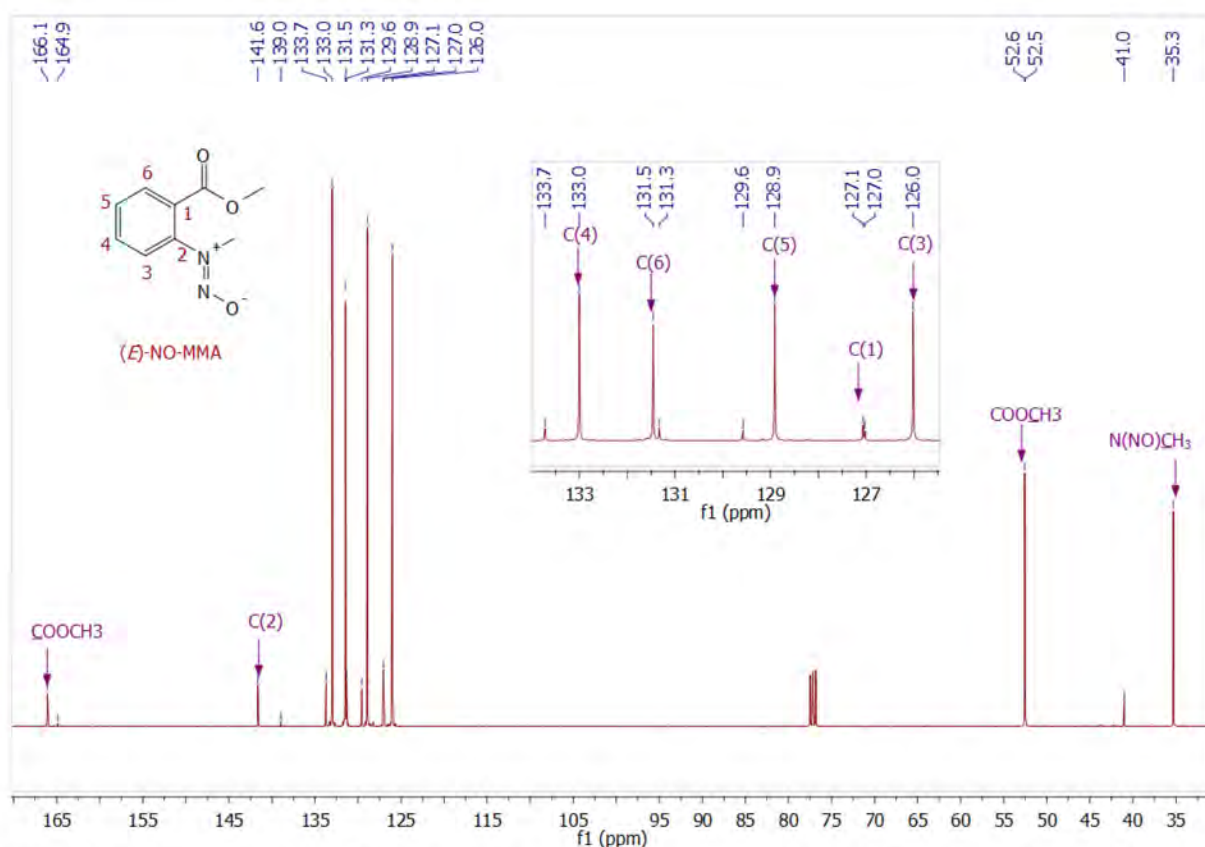


Prilog 108. ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) spektar 5-aminosalicilne kiseline

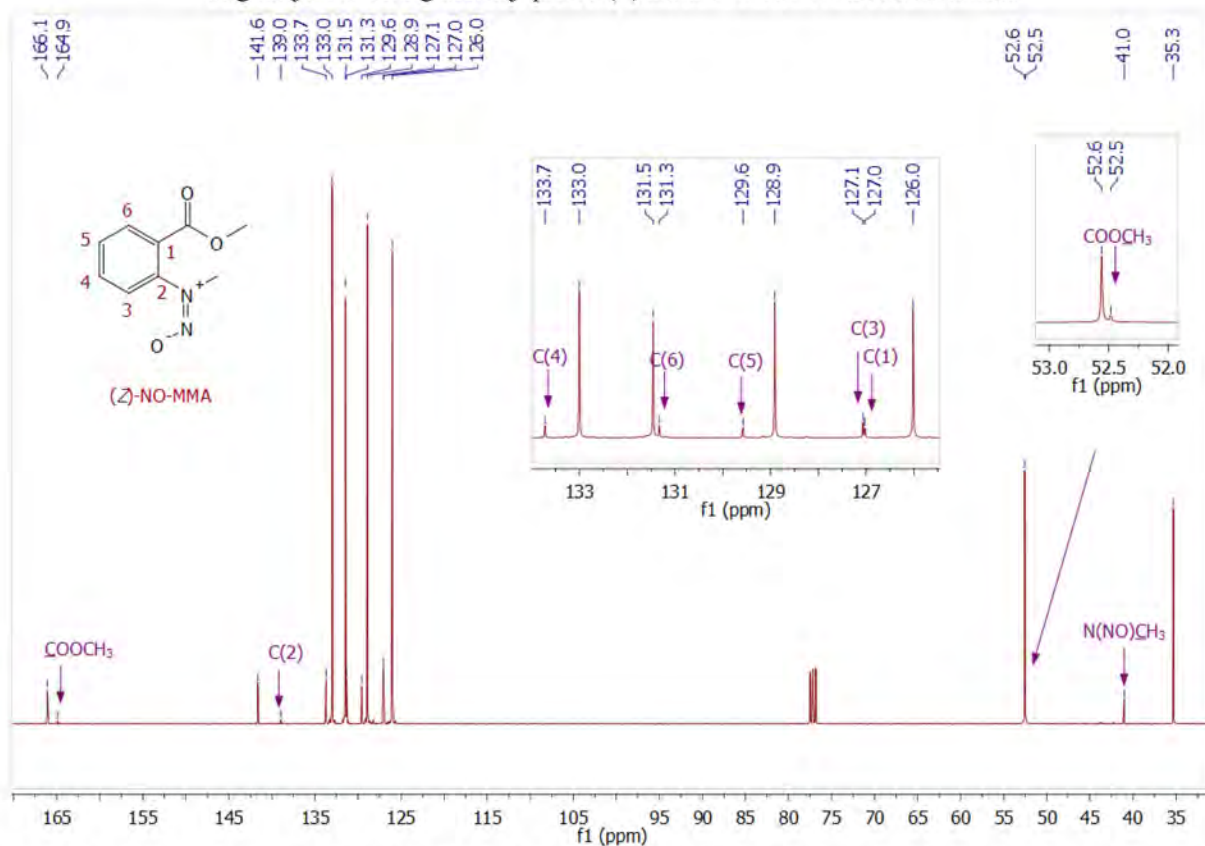


Prilog 109. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) spektar 5-aminosalicilne kiseline

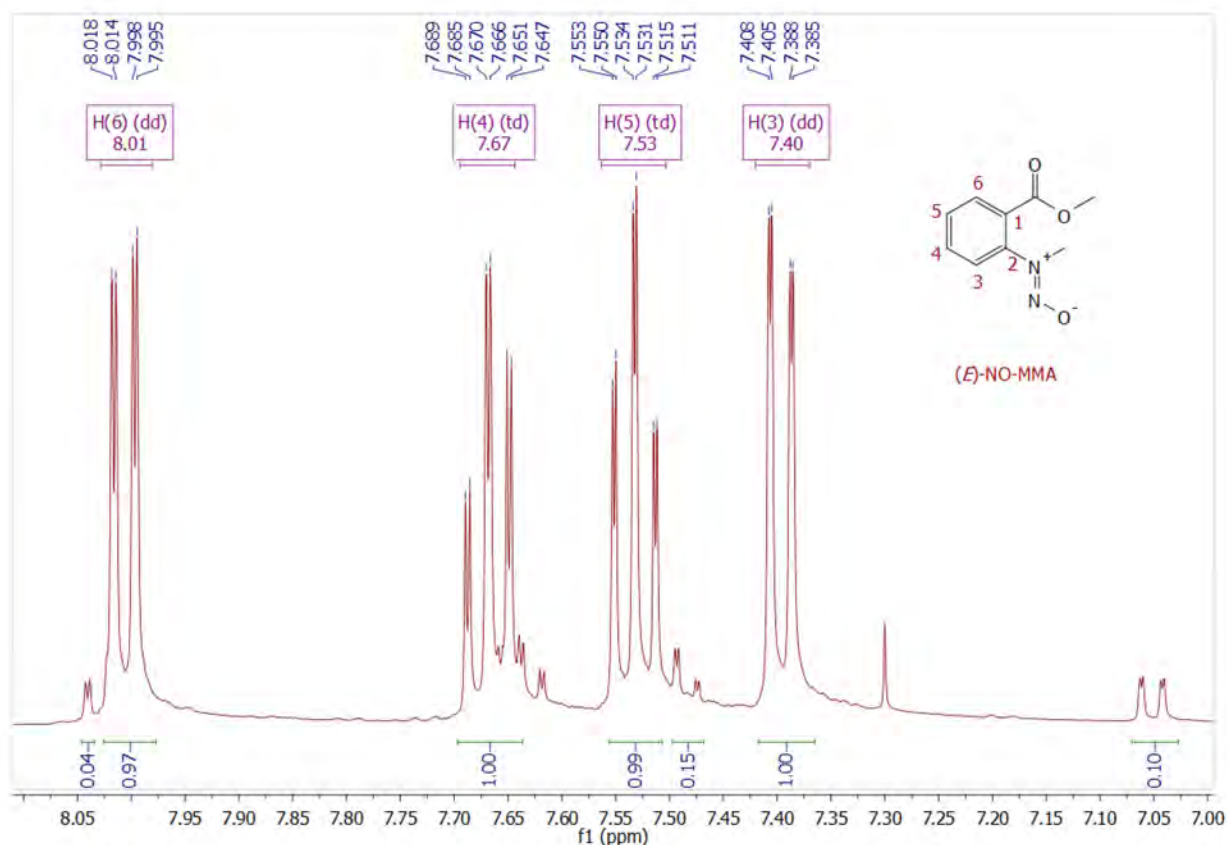
Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost



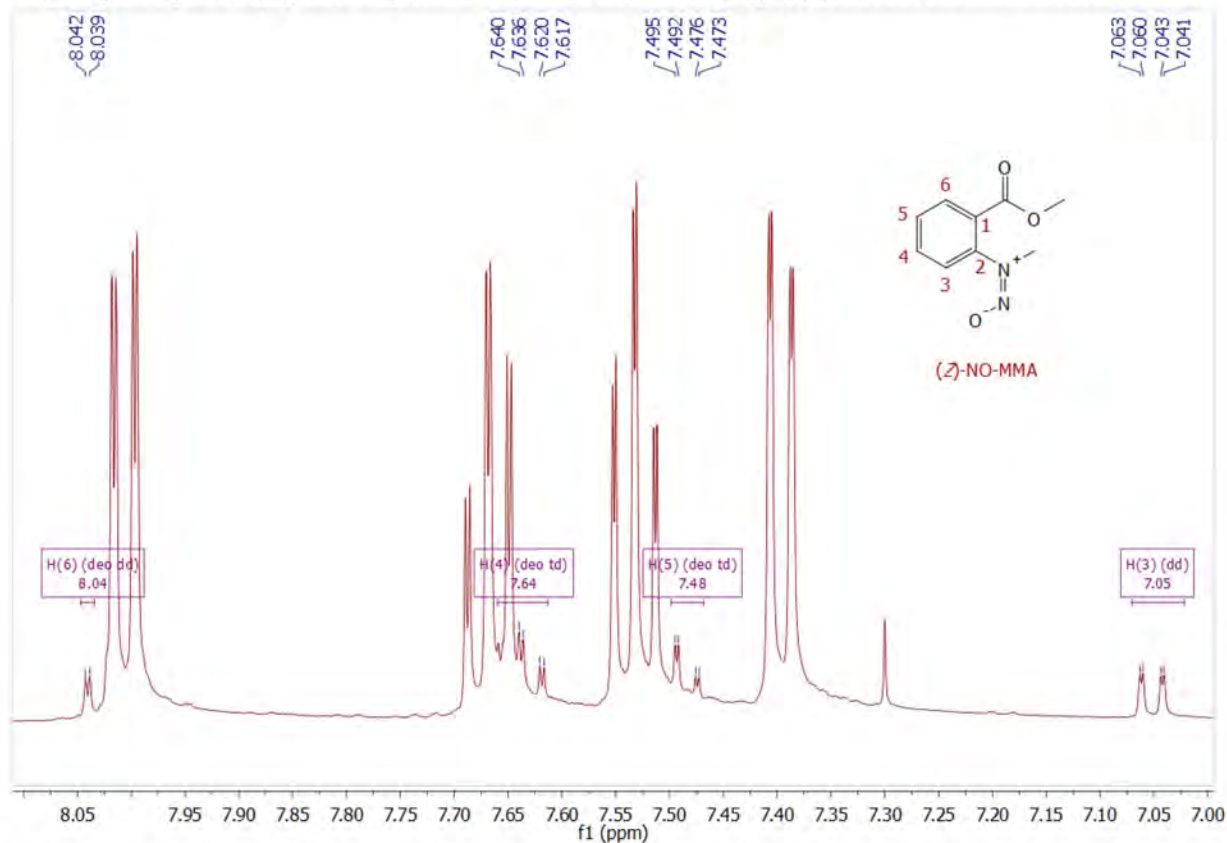
Prilog 110. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) spektar smeše (*E*)- i (*Z*)-metil-*N*-metil-*N*-nitrozantranilata (NO-MMA) sa asignacijom C-13 signala koji potiču (*E*)-metil-*N*-metil-*N*-nitrozantranilata



Prilog 111. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) spektar smeše (*E*)- i (*Z*)-metil-*N*-metil-*N*-nitrozantranilata (NO-MMA) sa asignacijom C-13 signala koji potiču od (*Z*)-metil-*N*-metil-*N*-nitrozantranilata

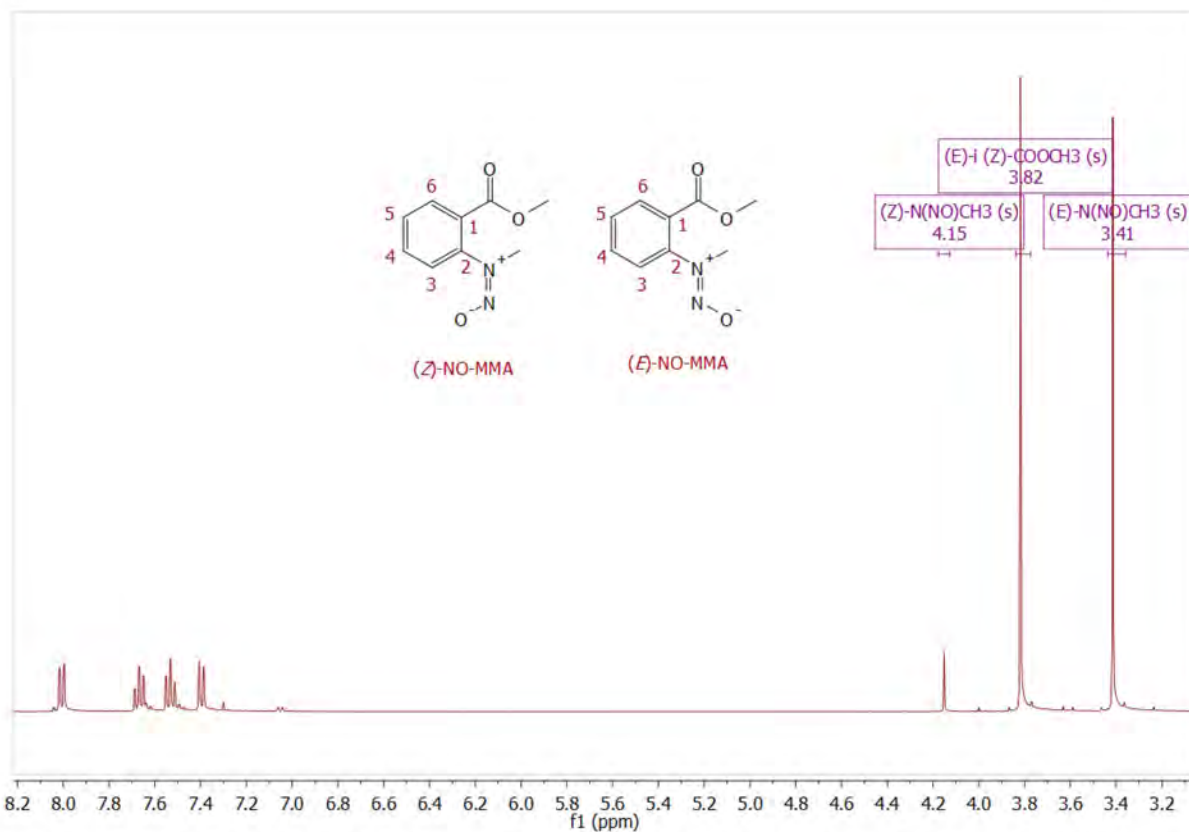


Prilog 112. Deo ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spektra smeše (*E*- i (*Z*-metil-*N*-metil-*N*-nitrozantranilata (NO-MMA) sa asignacijom signala koji potiču od protona vezanih za aromatično jezgro (*E*-metil-*N*-metil-*N*-nitrozantranilata

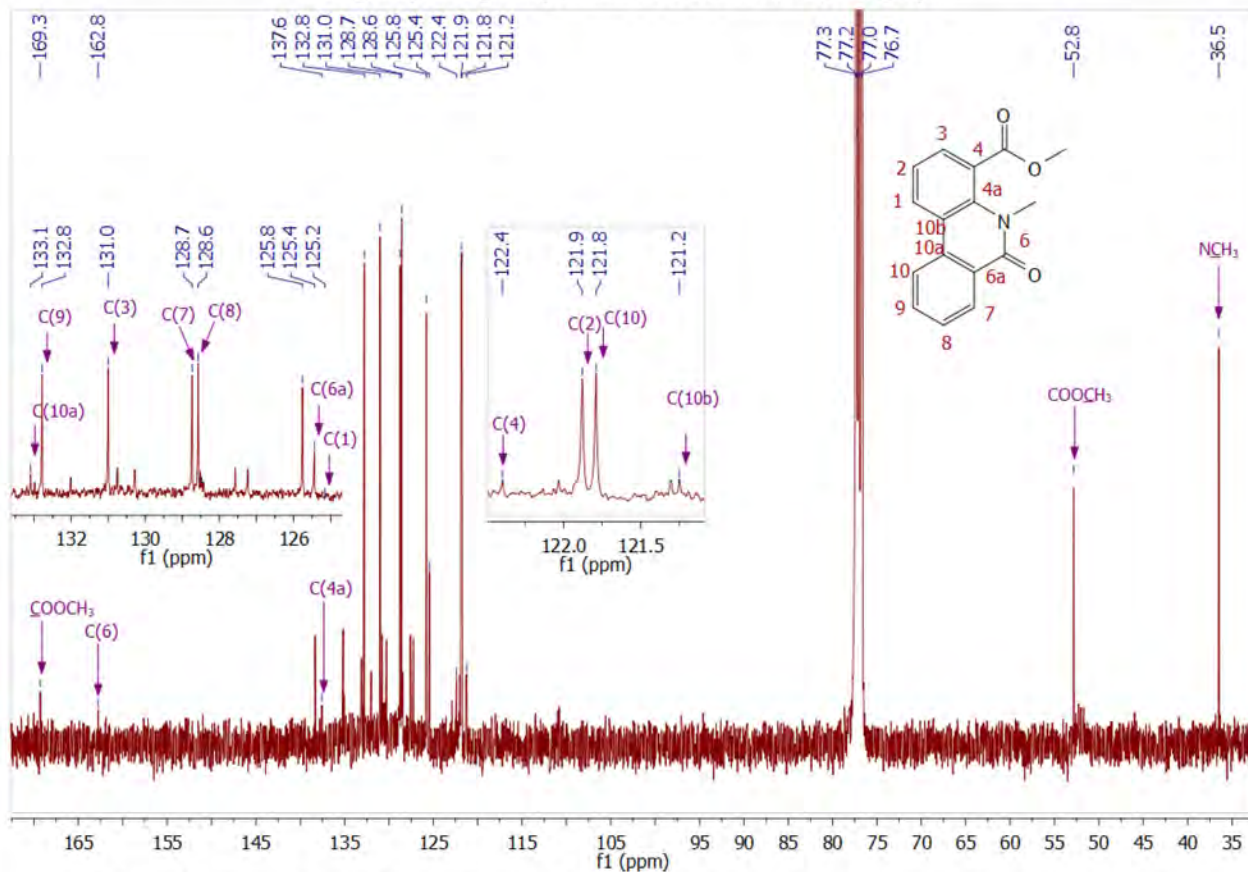


Prilog 113. Deo ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spektra smeše (*E*- i (*Z*-metil-*N*-metil-*N*-nitrozantranilata (NO-MMA) sa asignacijom signala koji potiču od protona vezanih za aromatično jezgro (*Z*-metil-*N*-metil-*N*-nitrozantranilata

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

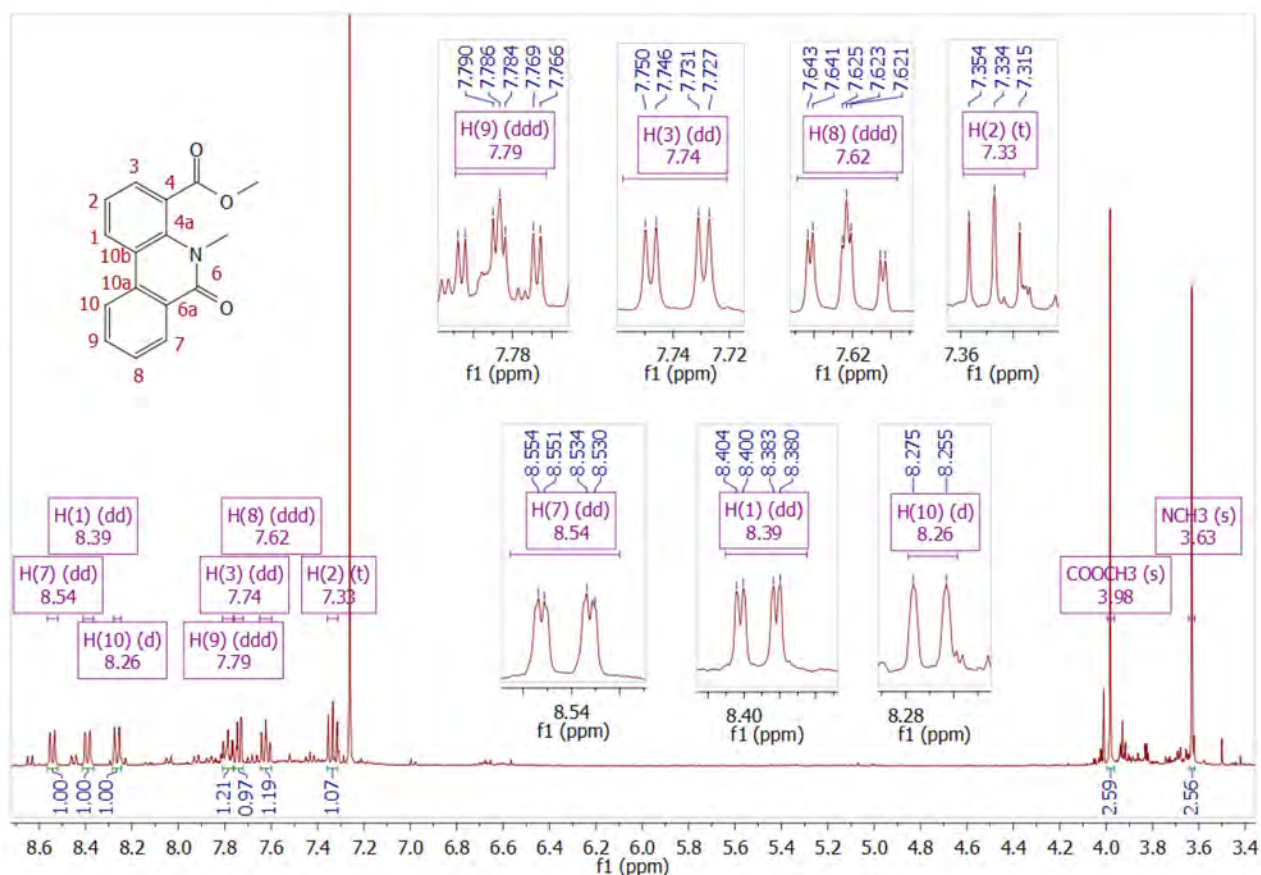


Prilog 114. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) spektar smeše (*E*)- i (*Z*)-metil-*N*-metil-*N*-nitrozoantranilata (NO-MMA) sa asignacijom signala protona COOCH₃ i N(NO)CH₃ grupa

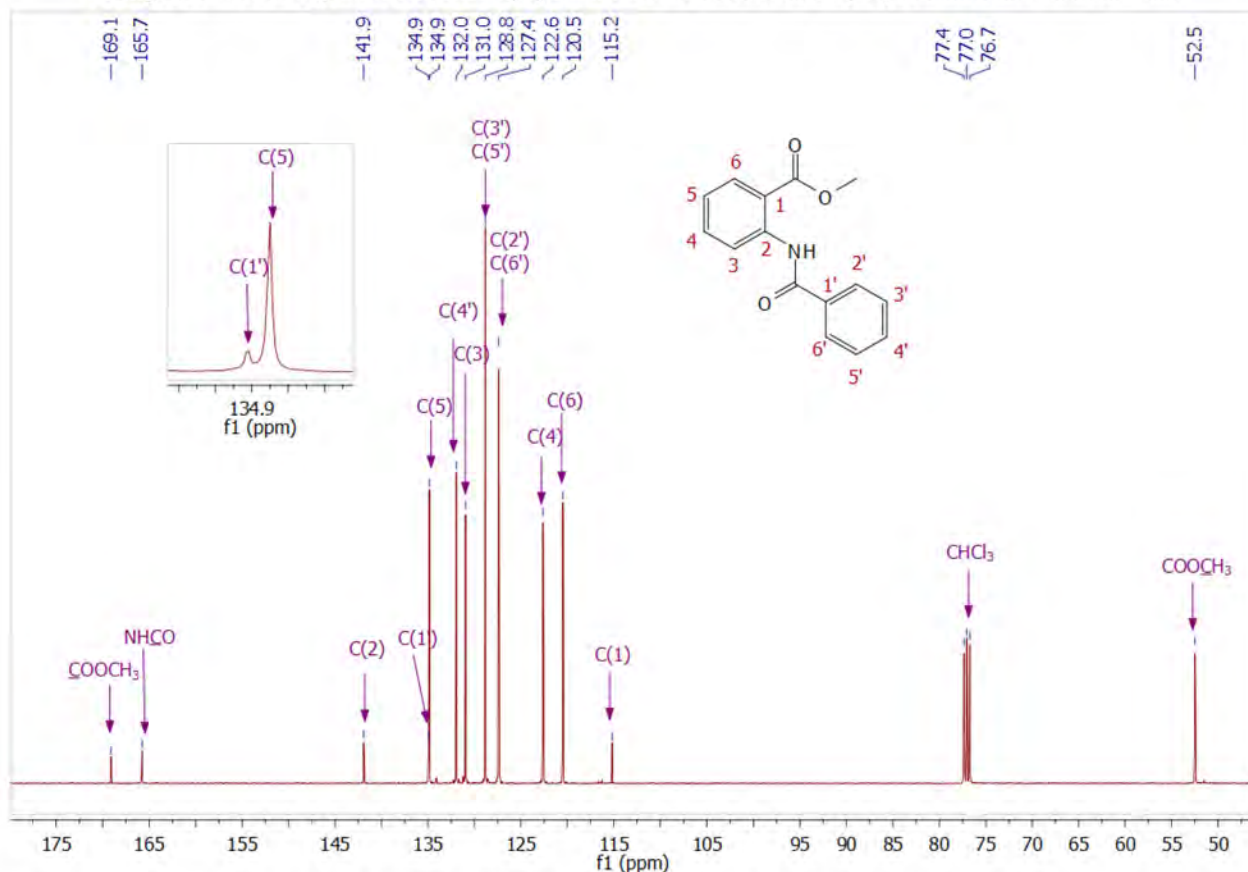


Prilog 115. $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) spektar metil-5-metil-6-okso-(5*H*)-fenantridin-4-karboxilata

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

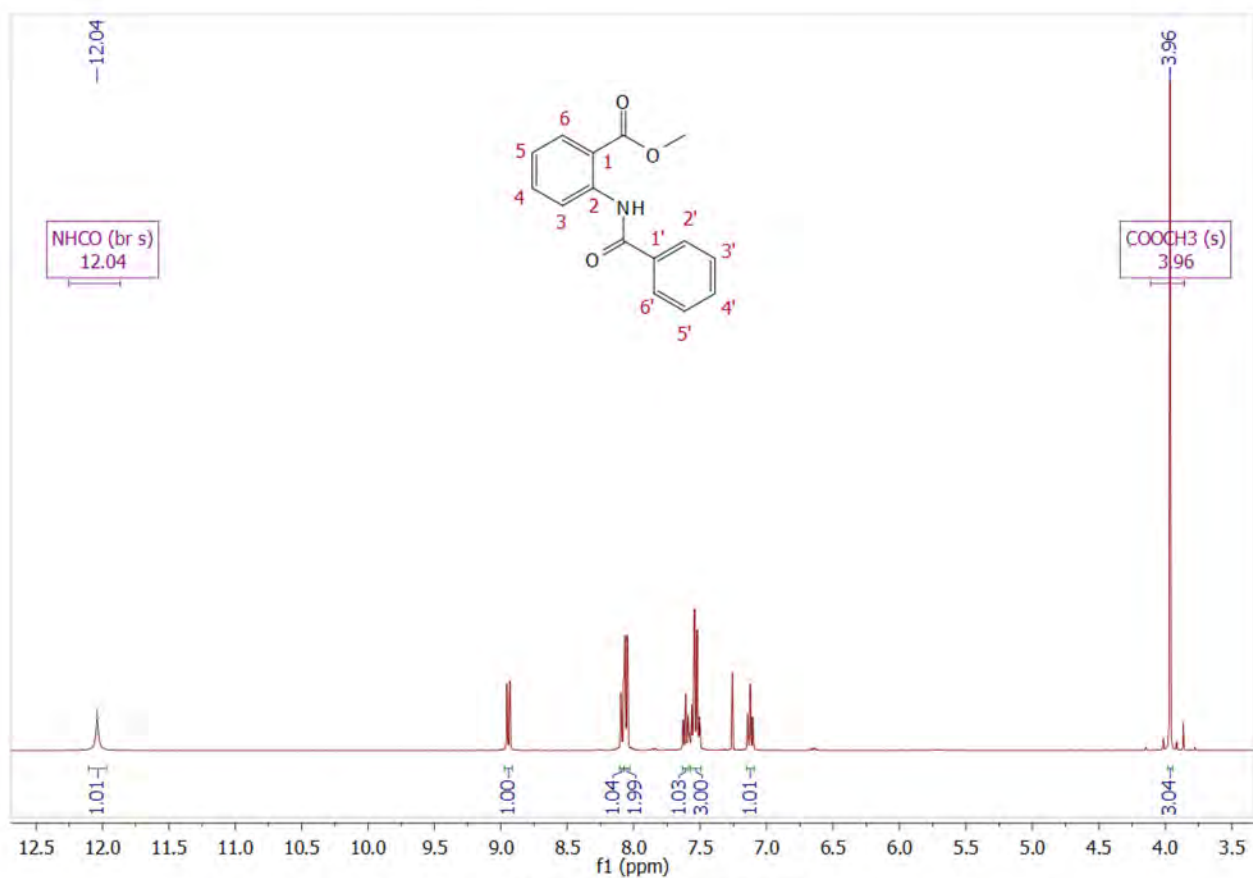


Prilog 116. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spektr metil-5-metil-6-okso-(5H)-fenantridin-4-karboksilata

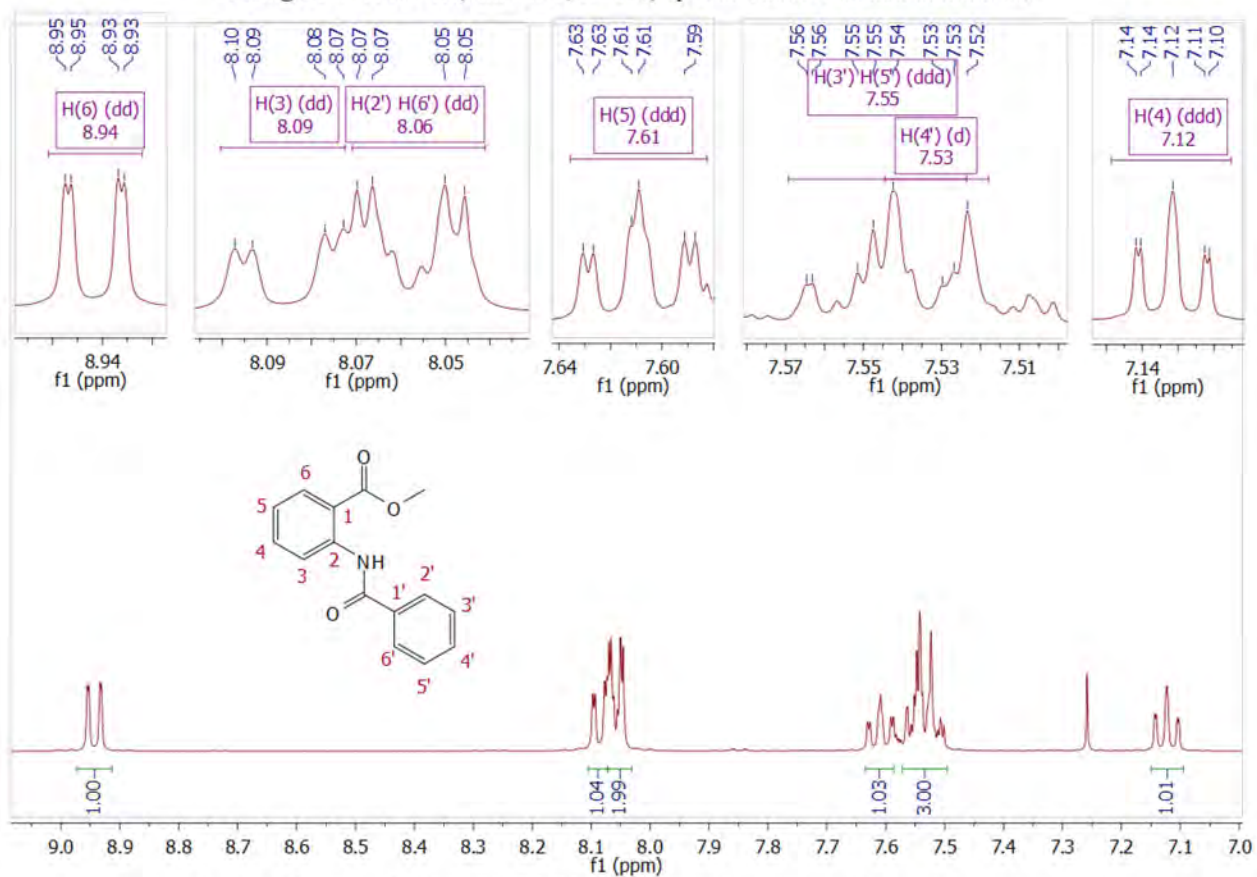


Prilog 117. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) spektr metil-N-benzoil-antranilata

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

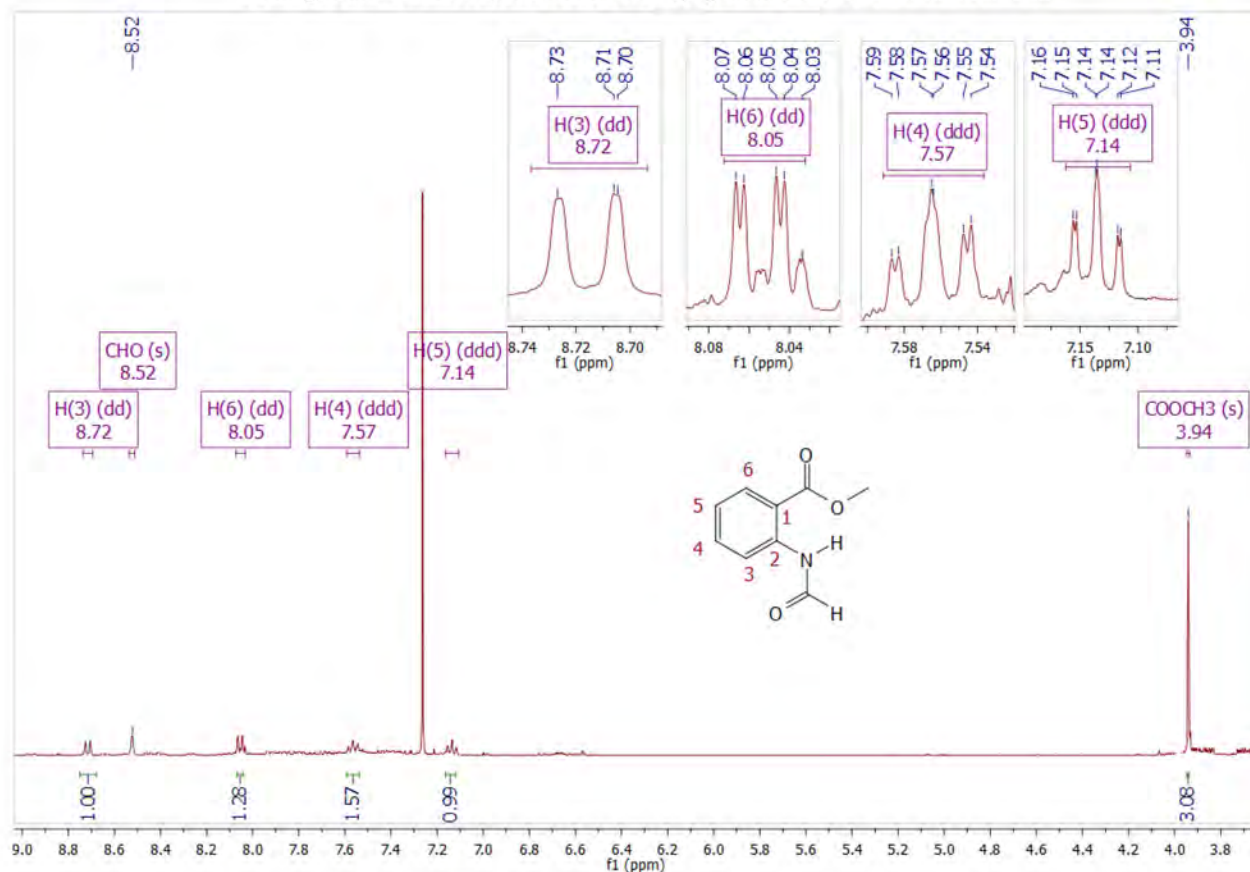
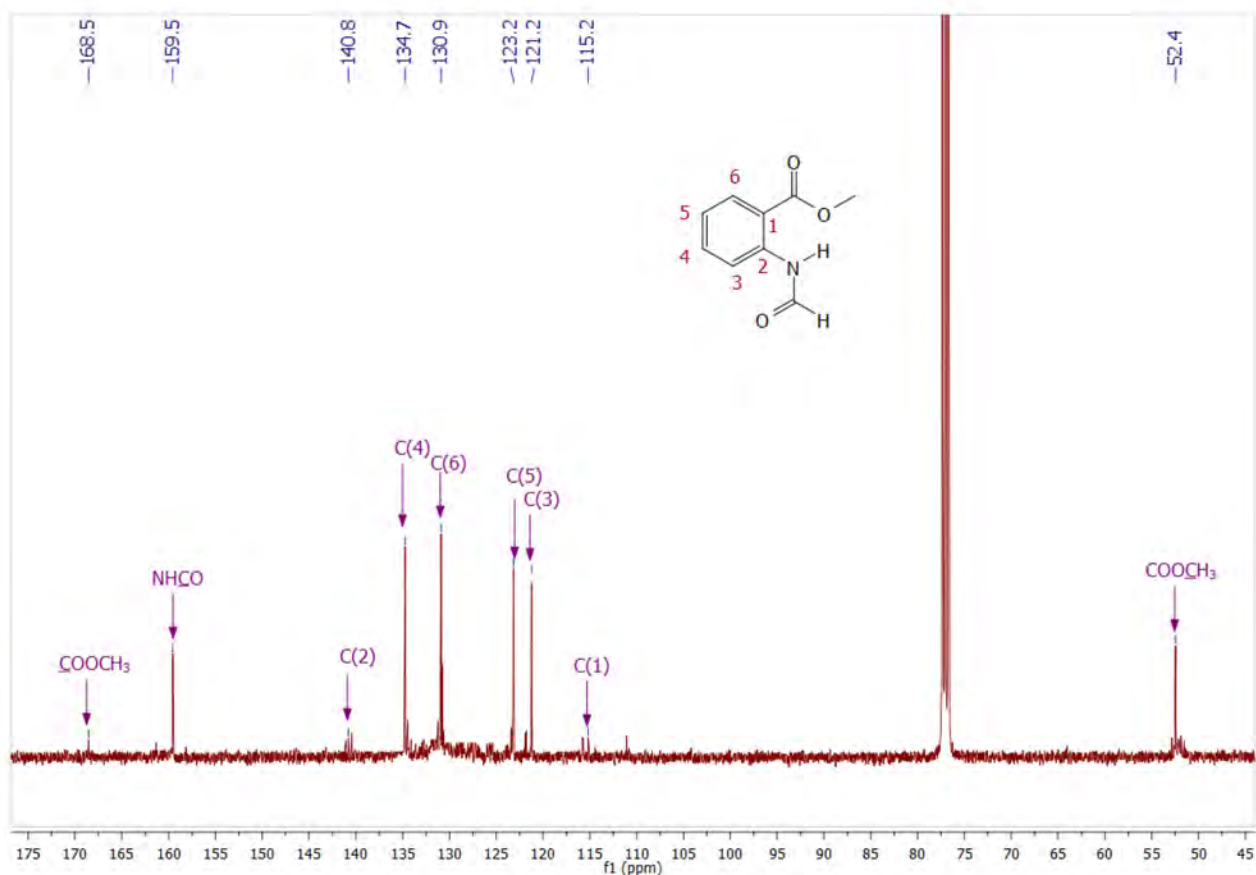


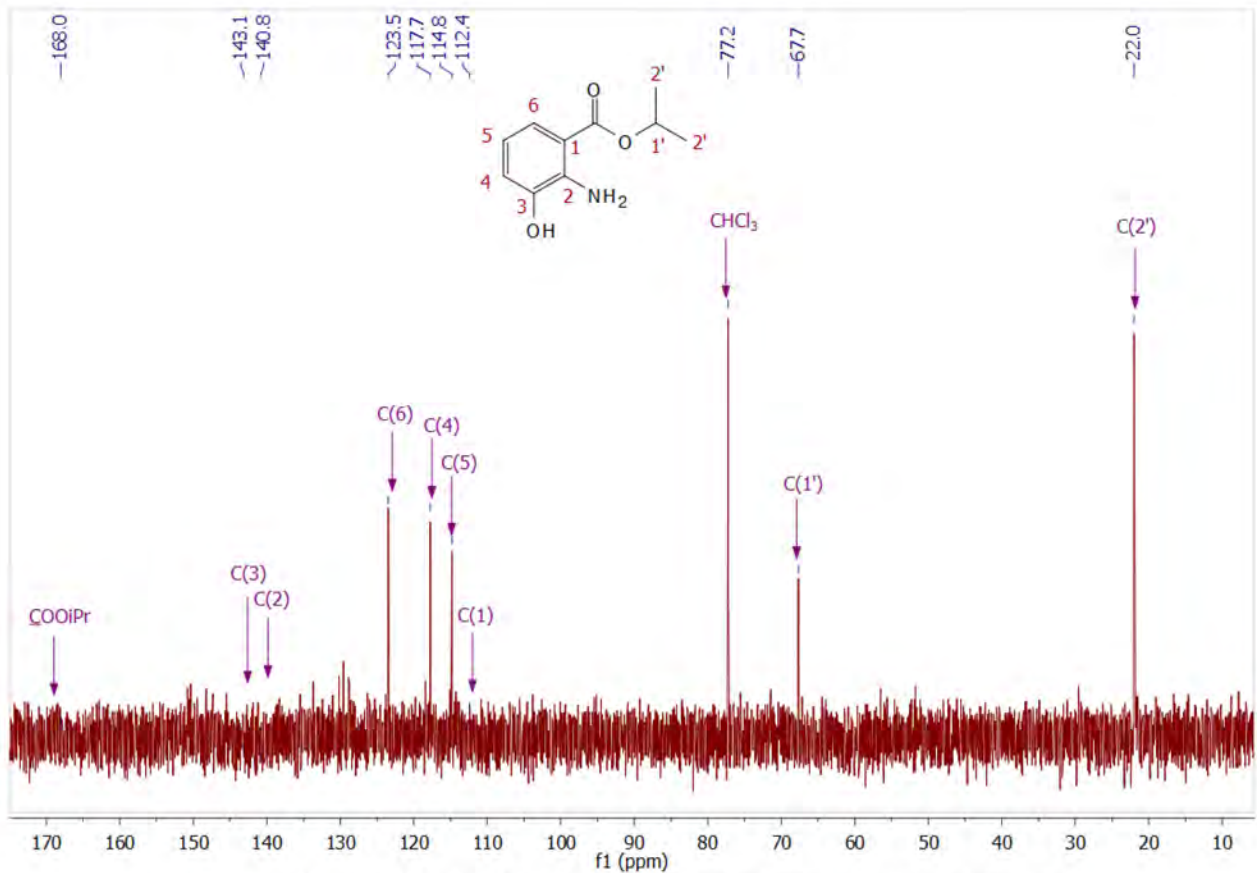
Prilog 118. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spektar metil-*N*-benzoilanthranilata



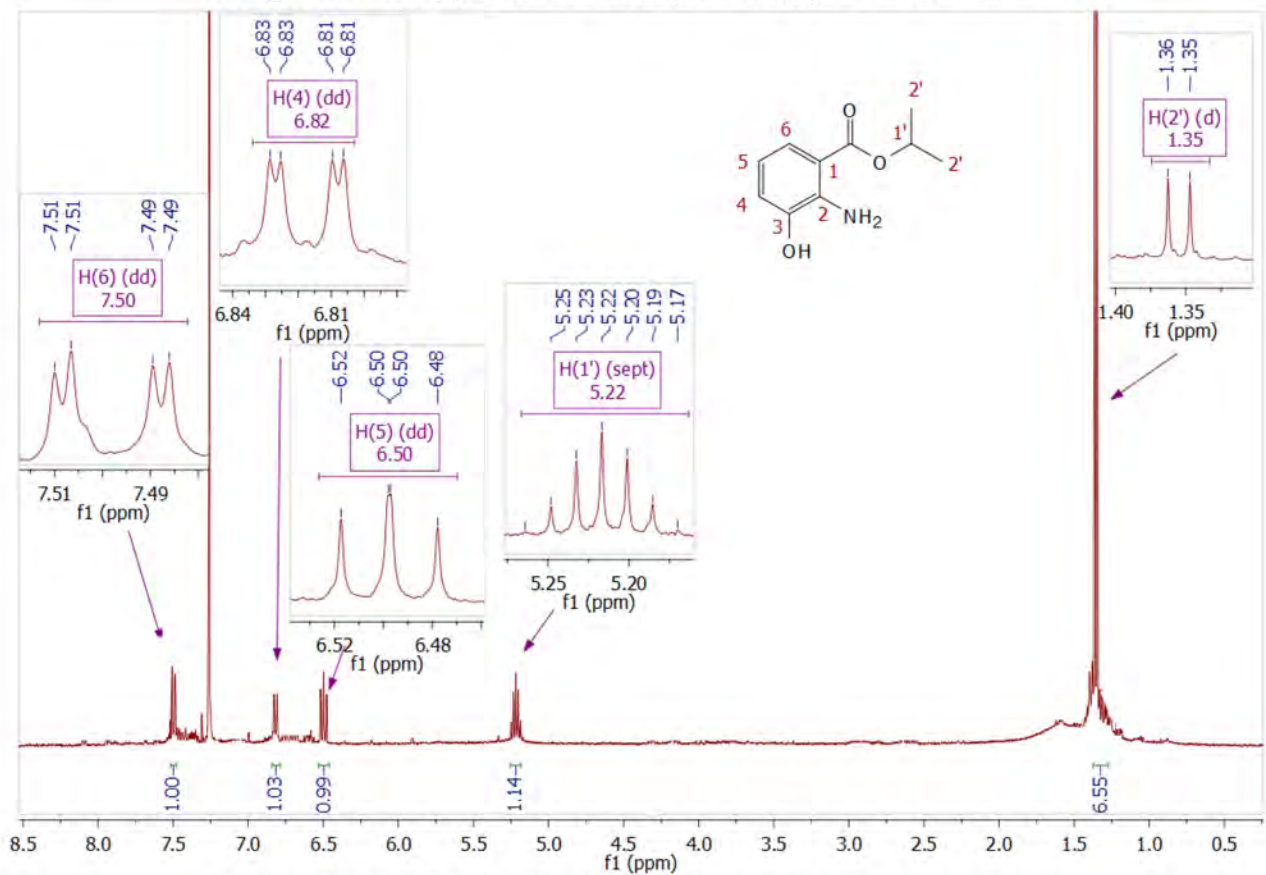
Prilog 119. Deo ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spektra metil-*N*-benzoilanthranilata

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost



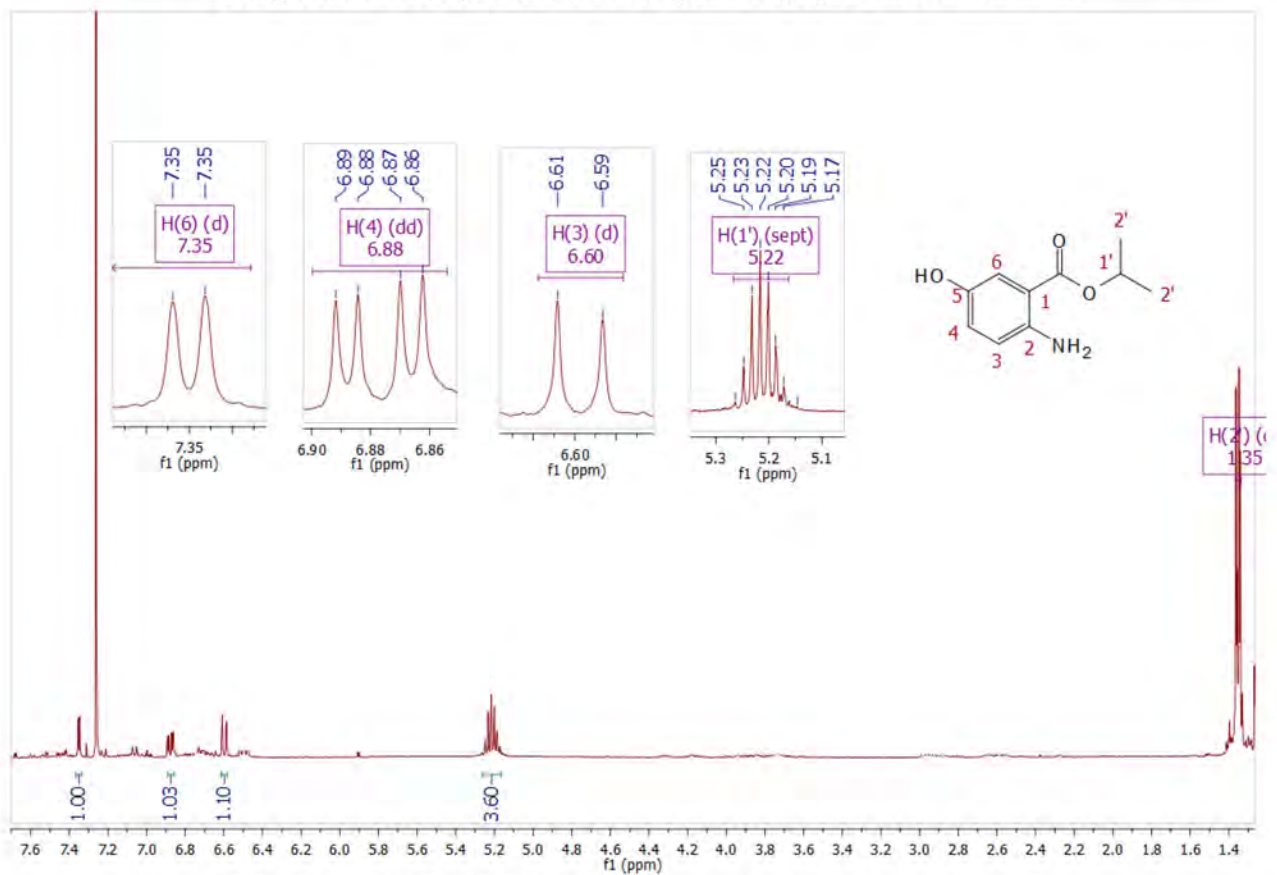
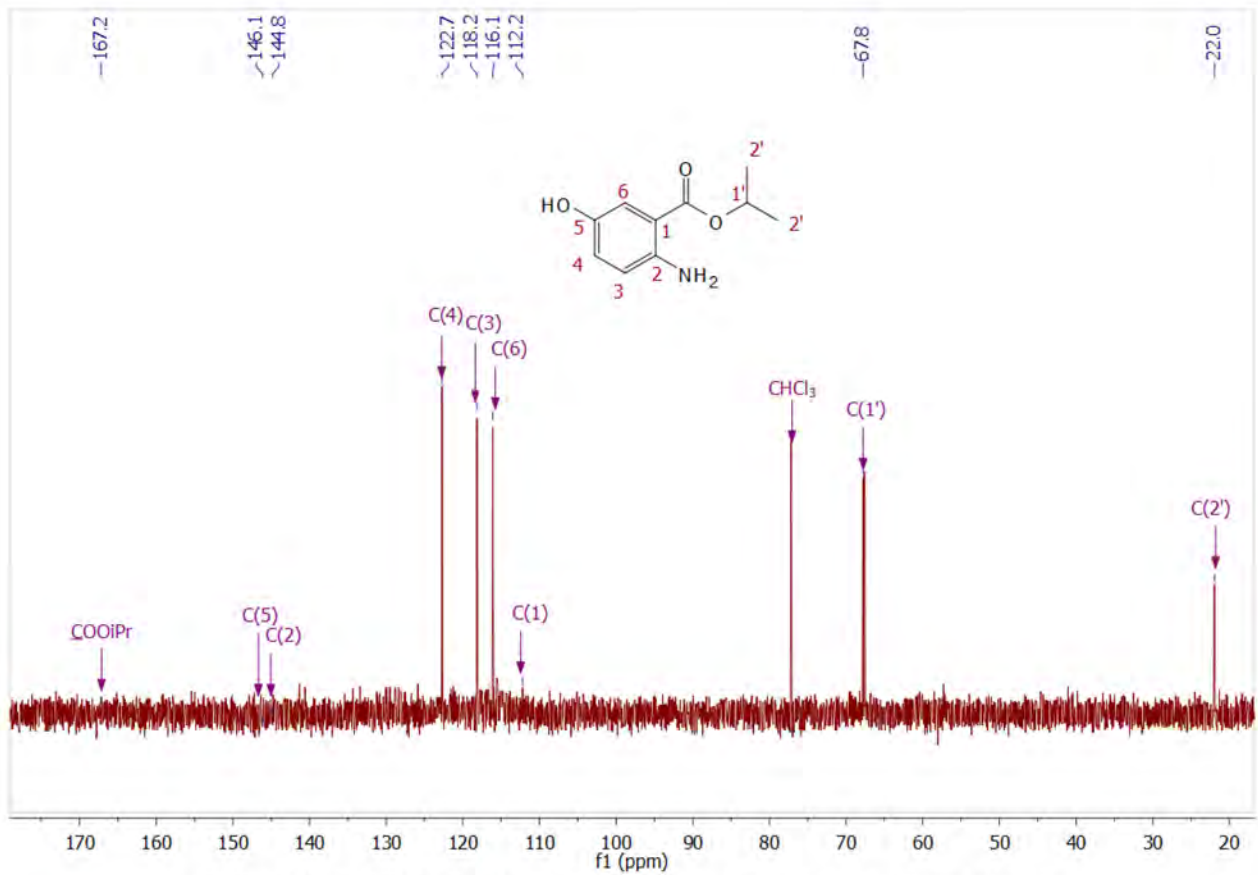


Prilog 122. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) spektar izopropil-3-hidroksiantranilata

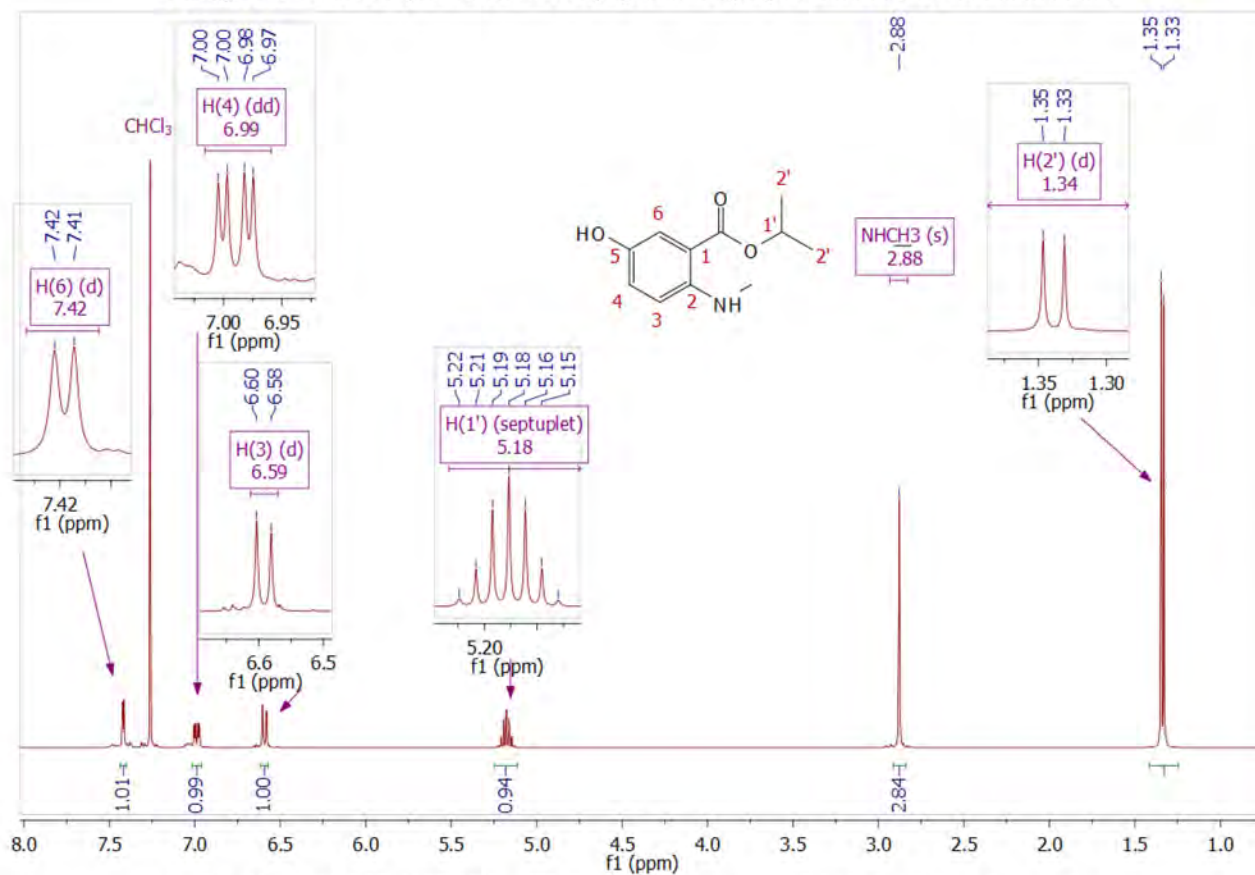
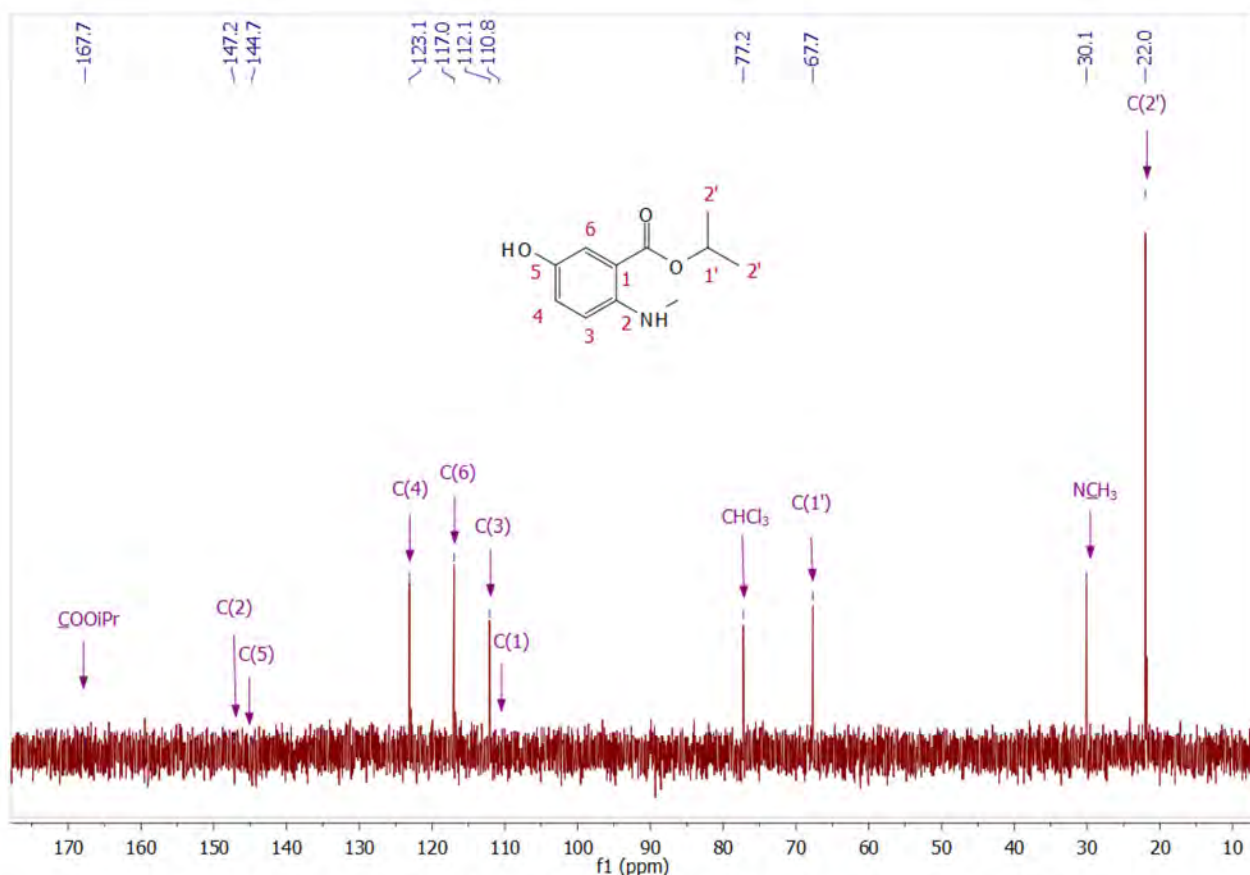


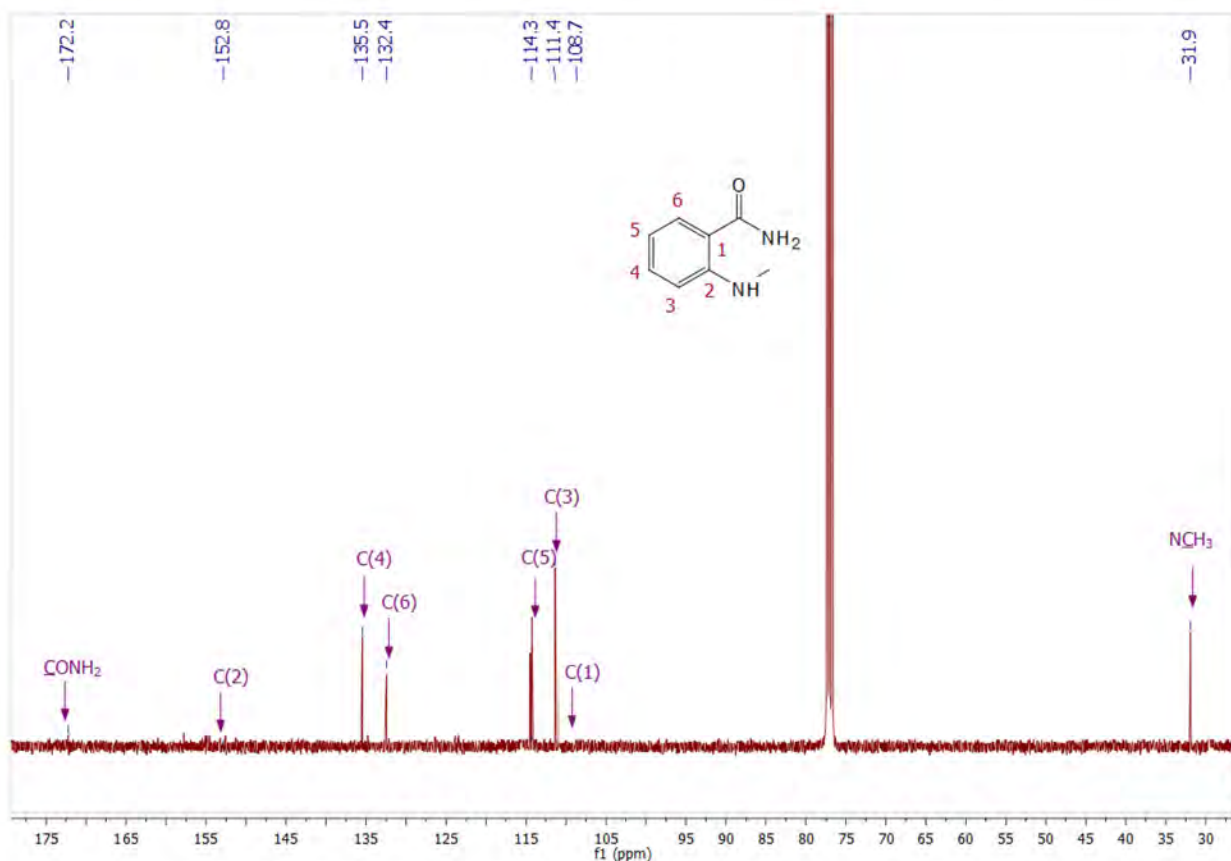
Prilog 123. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spektar izopropil-3-hidroksiantranilata

Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost

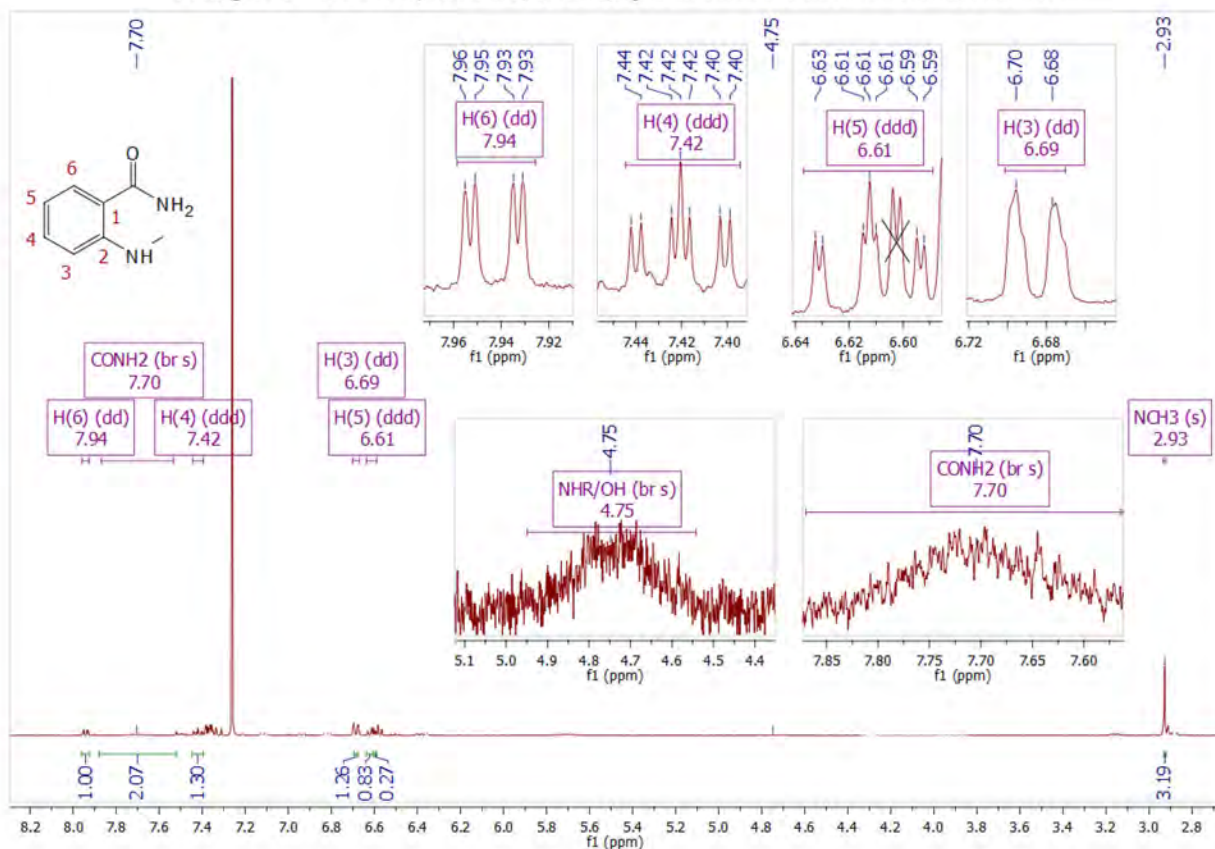


Sekundarni metaboliti biljne vrste *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
izolovanje, sinteza, spektralna karakterizacija i biološka aktivnost





Prilog 128. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spektar amida *N*-metilantranilne kiseline



Prilog 129. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spektar amida *N*-metilantranilne kiseline

10. BIOGRAFIJA

Ana B. Miltojević je rođena 19. juna 1985. godine u Nišu, gde je završila osnovnu školu Filip Filipović i gimnaziju Svetozar Marković.

Prirodno-matematički fakultet u Nišu, Odsek za hemiju, upisala je školske 2004/05. godine. Studije je završila 30.09.2009. godine, sa prosečnom ocenom 9,76 i ocenom 10 na diplomskom radu, pod nazivom: „Izopropil-*N*-metilantranilat, novi prirodni proizvod iz etarskog ulja biljne vrste *Choisya ternata* Kunth: sinteza, identifikacija i spektralna karakterizacija”. Nosilac je Specijalnog priznanja Srpskog hemijskog društva za 2010. godinu za izuzetan uspeh u toku studija. Doktorske akademske studije na Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu je upisala školske 2009/10. godine. Položila je sve ispite predviđene studijskim programom sa ocenom 10.

Decembra 2014. godine je zasnovala radni odnos na Fakultetu zaštite na radu u Nišu kao asistent za užu naučnu oblast Hemijske opasnosti u radnoj i životnoj sredini i angažovana je u izvođenju vežbi na predmetima Hemija, Hemijski parametri radne i životne sredine, Hemija životne sredine, Ekološki rizik, Toksikologija, Ekotoksikologija, Biohemijski i biotehnoški principi, Instrumentalne metode kontrole zagađenja. Od januara do decembra 2014. godine, bila je angažovana kao saradnik u nastavi na Medicinskom fakultetu u Nišu, pri čemu je učestvovala u izvođenju vežbi iz predmeta Farmaceutska hemija 2 i Osnovi opšte i analitičke hemije. U toku 2010. godine je bila angažovana kao istraživač na projektu „Sekundarni metaboliti: hemijski sastav, antimikrobna i antioksidantna aktivnost”, a od 2011. godine je angažovana na projektu „Kombinatorne biblioteke heterogenih katalizatora, prirodnih proizvoda, modifikovanih prirodnih proizvoda i njihovih analoga: put ka novim biološkim agensima” Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Objavila je 5 radova u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), 6 radova u istaknutim međunarodnim časopisima (M22), 2 rada u međunarodnim časopisima (M23) i 2 rada u nacionalnim časopisima (M52). Radovi pod rednim brojevima 1, 3, 5, 6, 7, 8, 11, 14 i 15 su deo ove doktorske disertacije. Rezultate svojih istraživanja je saopštila na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu.

11. BIBLIOGRAFIJA

RADOVI OBJAVLJENI U VRHUNSKIM MEĐUNARODNIM ČASOPISIMA (M₂₁)

1. Miltojević, A. B.; Radulović, N. S. Structural elucidation of thermolysis products of methyl *N*-methyl-*N*-nitrosoanthranilate, *RSC Advances*, **2015**, 5 (66), 53569-53585. ISSN 2046-2069. **IF: 3,840**
<http://dx.doi.org/10.1039/C5RA07612A>
2. Radulović, N. S., Miltojević, A. B., Stojković, M. B., Blagojević, P. D. New volatile sulfur-containing compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L., Liliaceae), *Food Research International*, **2015**, 78, 1–10. ISSN 0963-9969. **IF: 2,818**
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.11.019>
3. Gomes Pinheiro, M. M.; Miltojević, A. B.; Radulović, N. S.; Abdul-Wahab, I. R.; Boylan, F.; Fernandes, P. D. Anti-inflammatory activity of *Choisya ternata* Kunth essential oil, ternanthranin, and its two synthetic analogs (methyl and propyl *N*-methylantranilates), *PLoS One*, **2015**, 10 (3), e0121063. ISSN 1932-6203. **IF: 3,234**
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0121063>
4. Radulović, N. S.; Blagojević, P. D.; Miltojević, A. B. α -Linalool—a marker compound of forged/synthetic Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oils, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2013**, 93 (13), 3292–3303. ISSN 0022-5142. **IF: 1,879**
<http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.6175>
5. Radulović, N. S.; Miltojević, A. B.; McDermott, M.; Waldren, S.; Parnell, J. A.; Pinheiro, M. M. G.; Fernandes, P. D.; Menezes, F. d. S. Identification of a new antinociceptive alkaloid isopropyl *N*-methylantranilate from the essential oil of *Choisya ternata* Kunth. *Journal of Ethnopharmacology*, **2011**, 135 (3), 610-619. ISSN 0378-8741. **IF: 3,014**
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.03.035>

RADOVI OBJAVLJENI U ISTAKNUTIM MEĐUNARODNIM ČASOPISIMA (M₂₂)

6. Gomes Pinheiro, M. M.; Radulović, N. S.; Miltojević, A. B.; Boylan, F.; Fernandes, P. D. Antinociceptive esters of *N*-methylantranilic acid: Mechanism of action in heat-mediated pain. *European Journal of Pharmacology*, **2014**, 727, 106-114. ISSN 0014-2999. **IF: 2,532**
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.12.042>
7. Radulović, N. S.; Randjelović, P. J.; Stojanović, N. M.; Ilić, I. R.; Miltojević, A. B.; Stojković, M. B.; Ilić, M. Effect of two esters of *N*-methylantranilic acid from Rutaceae species on impaired kidney morphology and function in rats caused by CCl₄, *Life Sciences*, **2015**, 135, 110-117. ISSN 0024-3205. **IF: 2,702**
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2015.05.022>
8. Radulović, N. S.; Jovanović, I.; Ilić, I. R.; Randjelović, P. J.; Stojanović, N. M.; Miltojević, A. B. Methyl and isopropyl *N*-methylantranilates attenuate diclofenac- and ethanol-induced gastric lesions in rats, *Life Sciences*, **2013**, 93 (22), 840-846. ISSN 0024-3205. **IF: 2,296**
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2013.10.002>
9. Radulović, N. S.; Miltojević, A. B.; Vukićević, R. D. Simple and efficient one-pot solvent-free synthesis of *N*-methyl imines of aromatic aldehydes, *Comptes Rendus Chimie*, **2013**, 16 (3), 257-270. ISSN 1631-0748. **IF: 1,483**
<http://dx.doi.org/10.1016/j.crci.2013.01.010>
10. Stojanović-Radić, Z.; Čomić, L.; Radulović, N.; Blagojević, P.; Denić, M.; Miltojević, A.; Rajković, J.; Mihajilov-Krstev, T. Antistaphylococcal activity of *Imula helenium* L. root essential oil: eudesmane sesquiterpene lactones induce cell membrane damage. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **2012**, 31 (6), 1015-1025. ISSN 0934-9723. **IF: 3,024**
<http://dx.doi.org/10.1007/s10096-011-1400-1>

11. Radulović, N. S.; Miltojević, A. B.; Randjelović, P. J.; Stojanović, N. M.; Boylan, F. Effects of methyl and isopropyl *N*-methylantranilates from *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae) on experimental anxiety and depression in mice, *Phytotherapy Research*, **2013**, 27 (9), 1334–1338. ISSN 0951-418X. **IF: 2,397**
<http://dx.doi.org/10.1002/ptr.4877>

RADOVI OBJAVLJENI U MEĐUNARODNIM ČASOPISIMA (M₂₃)

12. Radulović, N.; Miltojević, A. Alkanes of *Jurinea mollis*, a Pannonian subendemic species. *Chemistry of Natural Compounds*, **2012**, 47 (6), 963-965. ISSN 0009-3130. **IF: 0,599**
<http://dx.doi.org/10.1007/s10600-012-0114-7>
13. Miltojević, A.; Radulović, N.; Vukićević, R. D.; Trifunović, S.; Borrmann, H. Crystal structure of 3-cyclohexyl-1,3-oxazinan-2-one, C₁₀H₁₇NO₂. *Zeitschrift für Kristallographie - New Crystal Structures*, **2011**, 226 (4), 651-652. ISSN 1433-7266. **IF: 0,278**
<http://dx.doi.org/10.1524/ncrs.2011.0292>

RADOVI OBJAVLJENI U NACIONALNIM ČASOPISIMA (M₅₂)

14. Radulović, N. S.; Randjelović, P. J.; Stojanović, N. M.; Ilić, I. R.; Miltojević, A. B. Influence of methyl and isopropyl *N*-methyl antranilates on carbon tetrachloride-induced changes in rat liver morphology and function. *Facta Universitatis, Series: Physics, Chemistry and Technology*, **2013**, 11 (1), 67-73.
<http://dx.doi.org/10.2298/FUPCT1301067R>
15. Miltojević, A. B.; Radulović, N. S. Complete assignment of ¹H- and ¹³C-NMR spectra of anthranilic acid and its hydroxy derivatives and salicylic acid and its amino derivatives. *Facta Universitatis, Series: Physics, Chemistry and Technology* (**accepted manuscript**).

RADOVI SAOPŠTENI NA MEĐUNARODNIM NAUČNIM SKUPOVIMA OBJAVLJENI U IZVODU (M34)

1. Stojanović, N. M.; Radulović, N. S.; Randjelović, P. J.; Ilić, I. R.; Miltojević, A. B.; Mitić, K. V.; Krstić, V.; Blagojević, P. D. Effects of methyl and isopropyl *N*-methylantranilates from *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae) in rat models of different diseases. *2nd International Conference on Natural Products Utilization, From Plants to Pharmacy Shelf*, 14-17.10.2015, Plovdiv (Bulgaria). In: *Book of abstracts*, pp. 293.
2. Radulović, N. S.; Stojanović, N. M.; Blagojević, P. D.; Randelović, P. J.; Mitić, K. V.; Miltojević, A. B. Polypharmacological properties of *Choisya ternata* Kunth essential oil constituents. Esters of *N*-methylantranilic acid - a new panacea? *45th International Symposium on Essential Oils, ISEO2014*, 07-10.09.2014, Istanbul (Turkey). In: *Natural Volatiles and Essential Oils (NVEO)*, **2014**, 1 (Special Issue 2014), pp. 203.
3. Radulović, N. S.; Miltojević, A. B. Identification of methyl 2-hydroxy-3-methylhexanoate - a new headspace constituent of *Galanthus nivalis* L. (Amaryllidaceae). *43rd International Symposium on Essential Oils, ISEO2012*, 05-08.09.2012, Lisboa (Portugal). In: *Programme, Book of Abstracts and Participants List of the 43rd International Symposium on Essential Oils*, pp. 90.
4. Radulović, N. S.; Miltojević, A. B., Randjelović, P. J.; Stojanović N. M., Boylan, F. Effects of methyl and isopropyl *N*-methylantranilates from the essential oil of *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae) on experimental anxiety and depression in mice. *43rd International Symposium on Essential Oils, ISEO2012*, 05-08.09.2012, Lisboa (Portugal). In: *Programme, Book of Abstracts and Participants List of the 43rd International Symposium on Essential Oils*, pp. 82.
5. Aleksić, S. B; Radulović, N.; Stojanović, N.; Randelović, P.; Miltojević, A.; Blagojević, P.; Milenković, I. Hepatoprotective/-toxic properties of flavoring agents: the case of the naturally occurring methyl and isopropyl *N*-methylantranilates. *18th WONCA Europe Conference*, 04-07.07.2012, Vienna (Austria). In: *Programme and Book of Abstracts of the 18th WONCA Europe Conference*, pp. 256.

6. Milošević, V.; Stojanović, S.; Najman, S.; Miltojević, A.; Randelović, J.; Najdanović, J. Effects of *Chelidonium majus* ethanolic extracts on viability and proliferation of different cell types in vitro. *6th Young European Scientist Meeting, YES meeting*, 16-18.09. 2011, Porto (Portugal). In: *6th Young European Scientist Meeting Guide*, pp. 72.
7. Radulović, N.; Blagojević, P.; Miltojević, A. α -Linalool as a constituent of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil: the first report. *41th International Symposium on Essential Oils, ISEO 2010*, 5-8.09.2010, Wroclaw (Poland). In: *Programme, Book of Abstracts and Participants List of the 41th International Symposium on Essential Oils*, pp. 123.
8. McDermott, M.; Waldren, S.; Sales Alviano, D.; Sales Alviano, C.; Miltojević, A.; Radulović, N.; de Sousa Menezes, F. Chemical constituents and antibacterial activity of *Choisya ternata* Kunth essential oil. *40th International Symposium on Essential Oils, ISEO 2009*, 6-09.09.2009, Savigliano (Italy). In: *Programme, Book of Abstracts and Participants List of the 40th International Symposium on Essential Oils*, pp. 120.

RADOVI SAOPŠTENI NA NACIONALNIM NAUČNIM SKUPOVIMA OBJAVLJENI U IZVODU (M₆₄)

9. Miltojević, A. B.; Radulović, N. S. Unexpected second-order effects in proton-coupled ¹³C NMR spectra of 3-aminosalicylic acid. *3rd Conference of Young Chemists of Serbia*, 24.10.2015, Belgrade (Serbia). In: *Book of Abstracts of the 3rd Conference of Young Chemists of Serbia*, pp. 15.
10. Miltojević, A. B.; Radulović, N. S; Vukićević, R. D.; Živković, M. Z. Simple and efficient one-pot solvent-free synthesis of *N*-methyl imines of aromatic aldehydes. *51st Meeting of the Serbian Chemical Society and 2nd Conference of the Young Chemists of Serbia*, 05-07.06.2014, Niš (Serbia). In: *Programme and Book of Abstracts of the 51st Meeting of the Serbian Chemical Society and 2nd Conference of the Young Chemists of Serbia*, pp. 94.

11. Blagojević, P. D.; Veljković, D.; Dekić, V. S.; Dekić, B. R.; Miltojević, A. B.; Zarić, S.; Borrmann, H.; Radulović, N. S. Thiazole-coumarin hybrids: crystal packing determines tautomeric form. *51st Meeting of the Serbian Chemical Society and 2nd Conference of the Young Chemists of Serbia*, 05-07.06.2014, Niš (Serbia). In: *Programme and Book of Abstracts of the 51st Meeting of the Serbian Chemical Society and 2nd Conference of the Young Chemists of Serbia*, pp. 88.
12. Radulović, N.; Miltojević, A. Alkanes of *Jurinea mollis* L., a pannonian subendemic species. *11th Symposium on the Flora of Southerneastern Serbia and Neighboring Regions*, 13-15.06.2013, Vlasina (Serbia). In: *Book of abstracts of the 11th Symposium on the Flora of Southerneastern Serbia and Neighboring Regions*, pp. 88.
13. Radulović, N. S.; Miltojević, A. B. Identification of methyl esters of 2-hydroxy-3-methylcarboxylic acids – headspace constituents of intact *Galanthus nivalis* L. (Amaryllidaceae) flowers. *1st Conference of Young Chemists of Serbia*, 19-20.10.2012, Belgrade (Serbia). In: *Programme and Book of Abstracts of the 1st Conference of Young Chemists of Serbia*, pp. 26.
14. Radulović, N. S.; Borrmann, H.; Miltojević, A. B.; Dekić, B. R.; Dekić, V. S.; Blagojević, P. D. An unexpected product of the condensation reaction between 4-chloro-3-nitrocoumarin and 4-methylbenzenesulfonamide in the presence of triethylamine. *50th Meeting of the Serbian Chemical Society*, 14-15.06.2012, Belgrade (Serbia). In: *Programme and Book of Abstracts of the 50th Meeting of the Serbian Chemical Society*, pp. 161.
15. Radulović, N. S.; Miltojević, A. B.; McDermott, M.; Waldren, S.; Adrian Parnell, J.; Gomes Pinheiro, M. M.; Dias Fernandes, P.; de Sousa Menezes, F. Identification of a new antinociceptive alkaloid isopropyl *N*-methylantranilate from the essential oil of *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae). *49th Meeting of the Serbian Chemical Society*, 13-14.05.2011, Kragujevac (Serbia). In: *Programme and Book of Abstracts of the 49th Meeting of the Serbian Chemical Society*, pp. 87.
16. Miltojević, A.; Denić, M. Nitrates from fertilizers – Environmental and health effects. *1th Congress of Students of Environmental Protection of South Eastern Europe, COSEP*, 23-28.04.2008, Kopaonik (Serbia). In: *Book of Abstracts of the 1st Congress of Students of Environmental Protection of South Eastern Europe*, pp. III-6.



Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

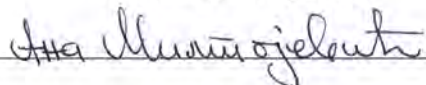
Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом
Секундарни метаболити биљне врсте *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):
изоловање, синтеза, спектрална карактеризација и биолошка активност

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

У Нишу, _____ 17.02.2016.

Аутор дисертације:
Ана Б. Милтојевић

Потпис докторанда:





Прилог 2.

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Име и презиме аутора:

Ана Б. Милтојевић

Студијски програм:

Хемија

Наслов рада:

Секундарни метаболити биљне врсте *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae): изоловање, синтеза, спектрална карактеризација и биолошка активност

Ментор:

др Нико С. Радуловић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 17.02.2016.

Аутор дисертације:

Ана Б. Милтојевић

Потпис докторанда:

Ана Милтојевић



Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:
Секундарни метаболити биљне врсте *Choisya ternata* Kunth (Rutaceae):

изоловање, синтеза, спектрална карактеризација и биолошка активност
која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

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

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу, 17.02.2016.

Аутор дисертације:
Ана Б. Милтојевић

Потпис докторанда:

Ана Милтојевић

ТИПОВИ ЛИЦЕНЦИ

1. Ауторство. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци (CC BY 3.0).

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела (CC BY-NC 3.0).

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе вашег дела у делима других аутора, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела (CC BY-NC-ND 3.0).

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прераде (CC BY-NC-SA 3.0).

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе вашег дела у делима других аутора, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела (CC BY-ND 3.0).

6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода (CC BY-SA 3.0).