

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Gordana B. Krstić

Ispitivanje hemijskog sastava sekundarnih  
metabolita odabranih biljnih vrsta roda

*Euphorbia*

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Gordana B. Krstić

Chemical analysis of secondary metabolites of  
selected plant species of the genus *Euphorbia*

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

MENTORI:

Dr Vele Tešević  
redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

Dr Milka Jadranin  
viši naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu Naučna ustanova Institut za hemiju,  
tehnologiju i metalurgiju Institut od nacionalnog značaja

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Ivana Aljančić  
naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu Naučna ustanova Institut za hemiju,  
tehnologiju i metalurgiju Institut od nacionalnog značaja

Dr Nina Todorović  
naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu Naučna ustanova Institut za hemiju,  
tehnologiju i metalurgiju Institut od nacionalnog značaja

Dr Ljubodrag Vujisić  
docent  
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

Dr Ivica Dimkić  
naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

## Zahvalnica

*Ova doktorska disertacija urađena je u laboratorijama Odeljenja za instrumentalnu analizu Hemijskog fakulteta i Centra za hemiju Naučne ustanove Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju u saradnji sa Institutom za biološka istraživanja „Siniša Stanković” i Biološkim fakultetom u Beogradu u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja republike Srbije pod nazivom “Bioaktivni prirodni proizvodi samoniklih, gajenih i jestivih biljaka: određivanje strukture i aktivnosti” (172053).*

*Mentoru, profesoru dr Veletu Teševiću redovnom profesoru Hemijskog fakulteta u Beogradu se zahvaljujem na predloženoj temi, nesebičnoj pomoći i korisnim savetima tokom izrade ove doktorske disertacije. Mentoru dr Milki Jadranin, višem naučnom saradniku NU IHTM, se zahvaljujem na nesebičnoj pomoći i znanju koje mi je prenela u radu sa ovim biljkama, kao i na strpljenju i razumevanju za sve moje ideje. Veliku zahvalnost dugujem i dr Ivani Aljančić, naučnom savetniku NU IHTM, koja je pratila moj rad od samog početka zajedno sa mentorima i davala mi korisne savete i prilikom izrade i prilikom pisanja disertacije. Posebnu zahvalnost želim da iskažem dr Nini Todorović, naučnom savetniku NU IHTM, za pomoć prilikom snimanja NMR spektara i savetima koji su doprineli da rezultati do kojih sam došla budu kvalitetno predstavljeni. Docentu dr Ljubodragu Vujisiću se zahvaljujem na savetima i pomoći prilikom pisanja disertacije. Dr Ivici Dimkiću, naučnom saradniku Biološkog fakulteta u Beogradu se zahvaljujem na pomoći u eksperimentalnom radu u vezi sa biološkim ispitivanjima i korisnim savetima prilikom pisanja istih. Posebnu zahvalnost želim da izrazim prof. dr Vlatki Vajs, naučnom savetniku NU IHTM i akademiku prof. dr Slobodanu Milosavljeviću, redovnom članu SANU, na korisnim savetima, podršci i pomoći u radu. Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Petru Marinu za pomoć prilikom identifikacije biljnih vrsta. Iskrenu zahvalnost želim da iskažem dr Milici Pešić i dr Miroslavi Stanković za svu pomoć prilikom određivanja bioloških aktivnosti izolovanih jedinjenja.*

*Dragim kolegama iz Centra za instrumentalnu analizu, dr Iris Đorđević, dr Snežani Trifunović, dr Dejanu Gođevcu, dr Miroslavu Novakoviću, dr Ivanu Vučkoviću, dr Borisu Mandiću, dr Jovani Stanković, dr Mirjani Cvetković, dr Bobanu Anđelkoviću,*



*Marini Todosijević, Dejanu Vučetiću, Ivani Sofrenić, Katarini Simić, Stefanu Ivanoviću se zahvaljujem za pomoć i prijatnu atmosferu prilikom izrade ove disertacije. Veliko hvala i svim diplomcima koji su svoje diplomske i master radove radili sa mnom.*

*Ovu priliku koristim da se zahvalim čoveku, nastavniku Kostadinu, koji me je uveo u ovaj čarobni svet i koji mi je pokazao da hemija nije teška i da nije bauk već da je ona divna i beskrajno zabavna. Hvala i dragoj Sunčici Stojanović koja mi je bila uzor u životu i od koje sam naučila da sve što u životu radim, radim sa ljubavlju.*

*Veliko hvala i Ljubici i Nini i svim našim saradnicima koji nas nisu štedeli na seminarima hemije u IS Petnica i koji su nas naučili kako da razmišljamo, da uvek postavimo pitanje "a zašto tako" i koji su nas naučili da je svaki rezultat u eksperimentu, bio on pozitivan ili negativan, jedno veliko otkriće.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Maji Šumar za iskrene i prave savete koje sam od nje dobila. Draga Majo, hvala Ti za sve!*

*Dragim kolegama sa studija Milošu, Životi, Jeleni, Daci, Verici i Dušanu hvala za divno druženje i sve lepe trenutke tokom studiranja.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojim Roditeljima koji su me uvek i u svemu podržavali. Znam da Vam nije bilo lako da nam obezbedite sve što ste nam pružili i zbog toga Vam hvala! Hvala Vam što ste verovali u mene i u ono što sam radila i što ste me bezuslovno podržavali u svemu! Hvala i Jeleni i Aleksandru koji su uvek tu za mene i koji su bili moja velika podrška! Veliku zahvalnost dugujem i Ivanu koji je imao, i ima, razumevanje za moju ljubav prema nauci i što mi je uvek podržavao i pružao mi podršku šta god da sam radila.*

*Draga moja Ines, hvala ti za radost i sreću!*

*Autor*

# Ispitivanje hemijskog sastava sekundarnih metabolita odabranih biljnih vrsta roda *Euphorbia*

## IZVOD

Predmet ove doktorske disertacije je proučavanje sekundarnih metabolita odabranih biljnih vrsta roda *Euphorbia* koje nastanjuju naše prostore. Za ispitivanje su odabrane *Euphorbia palustris* L. (barska mlečika), *Euphorbia lucida* Waldst. & Kit. (visoka mlečika) i *Euphorbia nicaeensis* All (uskolisna mlečika). Biljne vrste roda *Euphorbia* poznate su od davnina i našle su svoju praktičnu primenu u tradicionalnoj i savremenoj medicini. Za sve predstavnike ovog roda karakteristično je postojanje biljnog soka (lateks) koji se skadišti u posebnim ćelijama koje se nalaze u stablu i listovima biljaka. Lateks predstavlja vodenu emulziju smeše terpena, fenolnih jedinjenja, cerebrozida, glicerola i drugih jedinjenja koja ima zaštitno dejstvo za biljku. Najzastupljenija jedinjenja u lateksu pripadaju klasi terpena i to diterpenima i triterpenima.

U okviru ove doktorske disertacije iz navedenih biljnih vrsta izolovano je 46 sekundarnih metabolita od kojih je 20 po prvi put okarakterisano kao prirodni proizvod. Iz *E. palustris* izolovana su dva triterpena cikloartanskog tipa (**1** i **2**), dva diterpena ingenanskog tipa (**3** i **4**) i četiri diterpena tiglijanskog tipa (**5–8**). Po prvi put izolovani su tiglijani **5**, **6** i **8**. Stablo *E. lucida* pokazalo se kao izvor triterpena cikloartanskog tipa (**1**), tri diterpena ingenanskog tipa (**3**, **14** i **15**) i jednog derivata kumarina (**16**), dok je iz lateksa ove biljne vrste izolovano pet tiglijanskih derivata (**5**, **7**, **8**, **17** i **18**). Pri tome, jedinjenje **18** je izolovano i okarakterisano prvi put, dok je jedinjenje **15** već opisano u literaturi, ali sada prvi put kao prirodni proizvod. U okviru ove doktorske disertacije ispitan je i hemijski sastav lateksa i korena *E. nicaeensis*: iz lateksa su izolovana dva triterpena lanostanskog tipa (**34** i **35**) i petnaest diterpena jatrofanskog tipa (**19–33**), a iz korena jedan triterpenski derivat (**46**), osam diterpena tiglijanskog tipa (**36–43**) i dva diterpena jatrofanskog tipa (**44** i **45**). Od ukupnog broja izolovanih jedinjenja po prvi put su opisani diterpeni **19**, **21–23**, **25**, **29**, **30** i **38–45**.

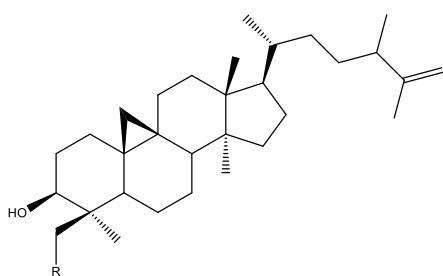
Za odabrane sekundarne metabolite ispitane su njihove biološke aktivnosti. Antitumorski efekat jedinjenja **3** i **4** ispitan je na pet humanih tumorskih ćelijskih linija: nesitnoćelijski karcinom pluća NCI-H460 i NCI-H460/R, kolorektalni karcinom – DLD1 i DLD1-TxR i melanom – 518A2. Najjaču antitumorsku aktivnost ispitivana

jedinjenja pokazala su na melanom, što je u saglasnosti sa do sada poznatim podacima o antitumorskoj aktivnosti ingenana.

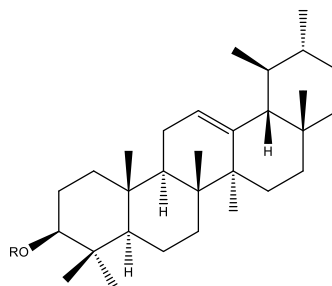
Za jedinjenja **19**, **21–23**, **25**, **29** i **30** ispitano je inhibitorno dejstvo na P-gp. Inhibicija P-gp-a ispitana je na MDR ćelijama humanog nesitnoćelijskog karcinoma pluća (NCI-H460/R) i humanog kolorektalnog karcinoma (DLD1-TxR). Najjaču inhibiciju pokazala su jedinjenja **29** i **30** i za njih je ispitan hemosenzitivajući potencijal u kombinaciji sa doksorubicinom. Dobijeni rezultati pokazali su da jedinjenje **29** (u koncentraciji od 10  $\mu$ M) zadržava inhibitorno dejstvo na P-gp i posle 72 h. Nijedno od ispitivanih jedinjenja nije pokazao citotoksičnost na osnovu čega se može zaključiti da je mehanizam delovanja ovih jedinjenja na NCI-H460/R ćelije usmeren u potpunosti na inhibiciju P-gp-a.

Zaštitni efekat na DNK humanih limfocita ispitano je za jedinjenja **20**, **24**, **26–28** i **31–33**. Kao negativna proba u ovom ispitivanju korišćen je alkilujući agens mitomicin C, dok je kao pozitivna proba korišćen amifostin WR-2721. Dobijeni rezultati pokazali su da najjače zaštitno dejstvo na DNK humanih limfocita imaju jedinjenja **20** i **26**, dok je najslabije zaštitno dejstvo pokazalo jedinjenje **28**.

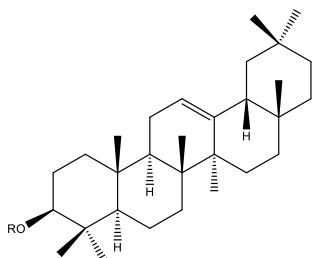
Metaboliti izolovani iz biljnih vrsta *E. palustris*, *E. lucida* i *E. naeensis*:



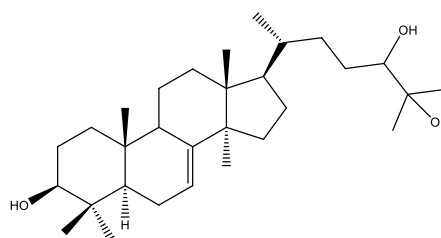
**1, 2**



**9, 10**



**11, 12**



**34**

**1:** R=H

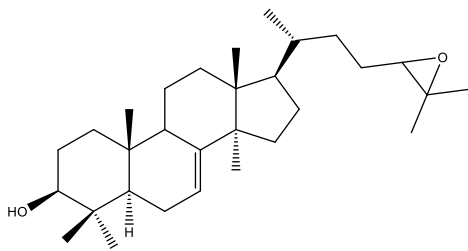
**2:** R=OH

**9:** R=*E/E* dekadienoat

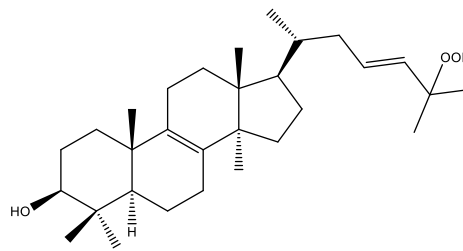
**10:** R=*E/Z* dekadienoat

**11:** R=*E/E* dekadienoat

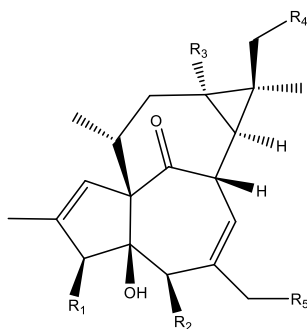
**12:** R=*E/Z* dekadienoat



35



46



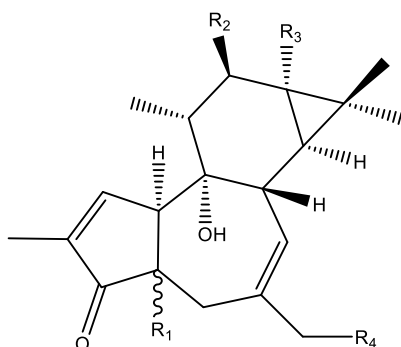
3, 4, 14, 15

3: R<sub>1</sub>=OBz, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=OPalm, R<sub>4</sub>=H, R<sub>5</sub>=OH

4: R<sub>1</sub>=OBz, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=OBz, R<sub>5</sub>=OH

14: R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OBz, R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=H

15: R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OBz, R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>5</sub>=OBz



5-8, 17-19, 36-43

5: R<sub>1</sub>=β-OH, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=OiVal, R<sub>4</sub>=OBz

6: R<sub>1</sub>=β-OH, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=OiVal, R<sub>4</sub>=OH

7: R<sub>1</sub>=β-H, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=OiVal, R<sub>4</sub>=OBz

8: R<sub>1</sub>=β-H, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=OBz

17: R<sub>1</sub>=β-H, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=OiBu, R<sub>4</sub>=OBz

18: R<sub>1</sub>=α-H, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=OiBu, R<sub>4</sub>=OBz

19: R<sub>1</sub>=β-H, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=OBz

36: R<sub>1</sub>=α-H, R<sub>2</sub>=OBz, R<sub>3</sub>=OiBu, R<sub>4</sub>=H

37: R<sub>1</sub>=α-H, R<sub>2</sub>=OAc, R<sub>3</sub>=OiBu, R<sub>4</sub>=H

38: R<sub>1</sub>=α-H, R<sub>2</sub>=OBz, R<sub>3</sub>=OiVal, R<sub>4</sub>=H

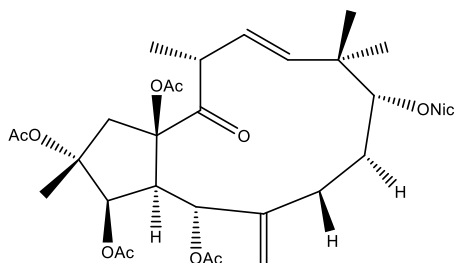
39: R<sub>1</sub>=α-H, R<sub>2</sub>=OAc, R<sub>3</sub>=OiVal, R<sub>4</sub>=H

40: R<sub>1</sub>=α-H, R<sub>2</sub>=OBz, R<sub>3</sub>=OAc, R<sub>4</sub>=H

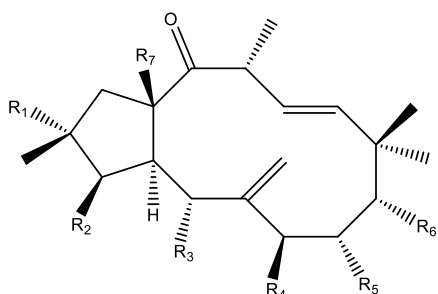
41: R<sub>1</sub>=β-H, R<sub>2</sub>=OBz, R<sub>3</sub>=OAc, R<sub>4</sub>=H

42: R<sub>1</sub>=α-H, R<sub>2</sub>=OCO(CH=CH)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>,  
R<sub>3</sub>=OAc R<sub>4</sub>=OAc

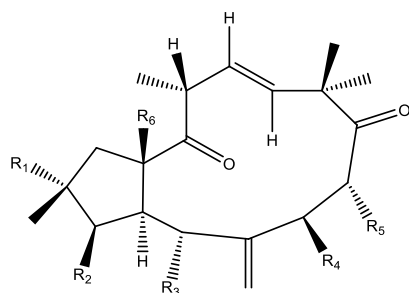
43: R<sub>1</sub>=α-H, R<sub>2</sub>=OBz, R<sub>3</sub>=OAc, R<sub>4</sub>=OAc



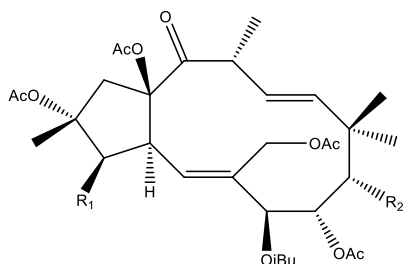
20



21–31, 44



45



32–34

21: R<sub>1</sub>=OAc, R<sub>2</sub>=OiBu, R<sub>3</sub>=OAc, R<sub>4</sub>=OiBu, R<sub>5</sub>=OAc, R<sub>6</sub>=ONic, R<sub>7</sub>=OH

22: R<sub>1</sub>=OAc, R<sub>2</sub>=Opr, R<sub>3</sub>=OAc, R<sub>4</sub>=OiBu, R<sub>5</sub>=OAc, R<sub>6</sub>=ONic, R<sub>7</sub>=OH

23: R<sub>1</sub>=ONic, R<sub>2</sub>=OiBu, R<sub>3</sub>=OAc, R<sub>4</sub>=OiBu, R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=OAc, R<sub>7</sub>=OH

24: R<sub>1</sub>=ONic, R<sub>2</sub>=Opr, R<sub>3</sub>=OAc, R<sub>4</sub>=OiBu, R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=OAc, R<sub>7</sub>=OH

25: R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OPr, R<sub>3</sub>=OAc, R<sub>4</sub>=OiBu, R<sub>5</sub>=OAc, R<sub>6</sub>=ONic, R<sub>7</sub>=OH

26: R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OPr, R<sub>3</sub>=OAc, R<sub>4</sub>=OiBu, R<sub>5</sub>=OAc, R<sub>6</sub>=ONic, R<sub>7</sub>=OH

27: R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OiBu, R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=OAc, R<sub>5</sub>=H, R<sub>6</sub>=ONic, R<sub>7</sub>=OAc

28: R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OPr, R<sub>3</sub>=OAc, R<sub>4</sub>=OiBu, R<sub>5</sub>=OAc, R<sub>6</sub>=ONic, R<sub>7</sub>=OAc

29: R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OAc, R<sub>4</sub>=OiBu, R<sub>5</sub>=OAc, R<sub>6</sub>=ONic, R<sub>7</sub>=OH

30: R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OAc, R<sub>4</sub>=OiBu, R<sub>5</sub>=OAc, R<sub>6</sub>=ONic, R<sub>7</sub>=OAc

31: R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OPr, R<sub>3</sub>=OAc, R<sub>4</sub>=OiBu, R<sub>5</sub>=ONic, R<sub>6</sub>=OAc, R<sub>7</sub>=OH

44: R<sub>1</sub>=OAc, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=Obz, R<sub>4</sub>=OAc, R<sub>5</sub>=H, R<sub>6</sub>=O, R<sub>7</sub>=OBz

45: R<sub>1</sub>=Obz, R<sub>2</sub>=OAc, R<sub>3</sub>=Obz, R<sub>4</sub>=H, R<sub>5</sub>=OAc, R<sub>6</sub>=O, R<sub>7</sub>=OAc

32: R<sub>1</sub>=OAc, R<sub>2</sub>=ONic

33: R<sub>1</sub>=OPr, R<sub>2</sub>=ONic

34: R<sub>1</sub>=OAc, R<sub>2</sub>=OBz

**Ključne reči:** *Euphorbia palustris*, *Euphorbia lucida*, *Euphorbia nicaensis*, *Euphorbia*, Ingenani, Tiglijani, Jatrofani, Metabolomika, P-glikoprotein, Višestruka reverzija na lekove (MDR)

**Naučna oblast:** Hemija

**Uža naučna oblast:** Organska hemija

**UDK broj:** 547

# **Chemical analysis of secondary metabolites of selected plant species of the genus *Euphorbia***

## **ABSTRACT**

The subject of this doctoral dissertation is the study of secondary metabolites of selected plant species of the genus *Euphorbia* that grow in our region. *Euphorbia palustris* L. (swamp spurge), *Euphorbia lucida* Waldst. & Kit. (shining spurge) and *Euphorbia nicaeensis* All. (narrow-leaved spurge) were selected for the research. Plant species of the genus *Euphorbia* have been known since ancient times and have found practical applications in traditional and modern medicine. All the plants of this genus are characterized by the existence of a milky sap (latex) which is stored in specialized cells found in the stem and leaves of the plants. Latex is an aqueous emulsion of a mixture of terpenes, phenolic compounds, cerebrosides, glycerols and other compounds that has a protective effect on the plant. Terpenes are the major components of the latex, namely diterpenes and triterpenes.

Within this dissertation, 46 compounds, from the above mentioned plant species, were isolated and identified, 20 of which for the first time was described as natural products. Two cycloartane triterpenes (**1** and **2**), two ingenanes (**3** and **4**) and four tiglanes (**5–8**) were isolated from *E. palustris*. Compounds **5**, **6** and **8** were isolated for the first time. The stem of *E. lucida* appeared to be a source of one cycloartane triterpene (**1**), three ingenanes (**3**, **14** and **15**) and one coumarin derivative (**16**), while from the latex of this plant species five tiglanes were isolated (**5**, **7**, **8**, **17** and **18**). Compound **18** was isolated and characterized for the first time, while compound **15** was already described in the literature but now for the first time as a natural product. The chemical composition of latex and root of *E. nicaeensis* was investigated in this doctoral dissertation: two lanostane triterpenes (**34** and **35**) and fifteen jatrophanes (**19–33**) were isolated from the latex and one triterpene (**46**), eight tiglanes (**36–43**) and two jatrophanes (**44** and **45**) were isolated from the root. Diterpenes **19**, **21–23**, **25**, **29**, **30** and **38–45** were isolated and described for the first time.

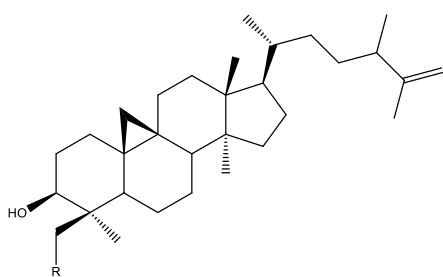
The biological activities were examined for selected secondary metabolites. The antitumor effect of compounds **3** and **4** was examined on five human cancer cell lines: non-small cell lung carcinoma NCI-H460 and NCI-H460/R, colorectal carcinoma – DLD1 and DLD1-TxR and melanoma – 518A2. The strongest antitumor activity of the

tested compounds was showed on melanoma, which is in agreement with the known antitumor activity data of ingenanes.

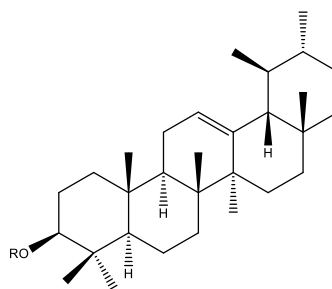
The inhibitory effect on P-gp was tested for compounds **19**, **21–23**, **25**, **29** and **30**. P-gp inhibition was tested on MDR cells of human non-small cell lung carcinoma (NCI-H460/R) and human colorectal carcinoma (DLD1-TxR). The strongest inhibition was shown by the compounds **29** and **30** and the chemosensitizing potential in combination with doxorubicin was tested for these compounds. The results showed that compound **29** (at a concentration of 10  $\mu$ M) retained its inhibitory effect on P-gp after 72 h. None of the tested compounds exhibited cytotoxicity. Based on this, it can be concluded that the mechanism of action of these compounds on NCI-H460/R cells is entirely focused on the inhibition of P-gp.

The protective effect on the DNA of human lymphocytes was examined for isolated compounds **20**, **24**, **26–28** and **31–33**. Mitomycin C alkylating agent was used as a negative control in this study and amifostine WR-2721 as a positive control. The results showed that the strongest protective effect on the DNA of human lymphocytes had compounds **20** and **26**, while the least protective effect was shown by compound **28**.

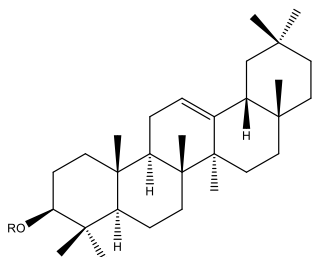
Metabolites isolated from the *E. palustris*, *E. lucida* i *E. nicaeensis*:



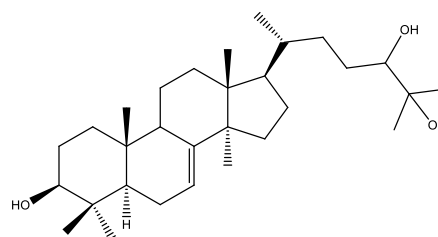
**1, 2**



**9, 10**



**11, 12**



**34**

**1:** R=H

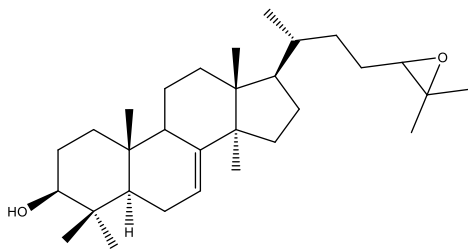
**2:** R=OH

**9:** R=*E/E* decadienoate

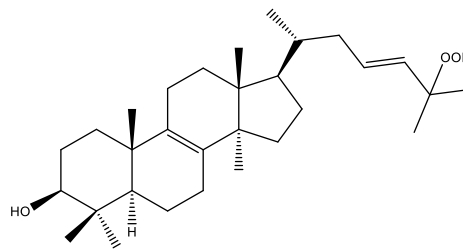
**10:** R=*E/Z* decadienoate

**11:** R=*E/E* decadienoate

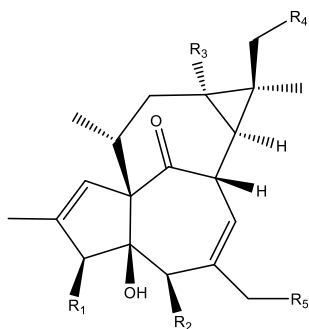
**12:** R=*E/Z* decadienoate



35



46



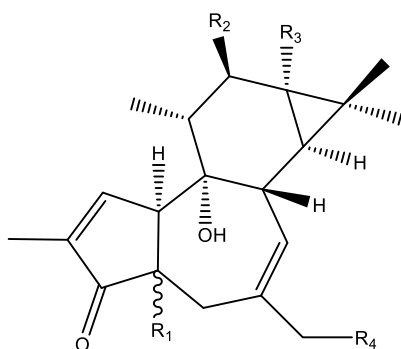
3, 4, 14, 15

3: R<sub>1</sub>=OBz, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=OPalm, R<sub>4</sub>=H, R<sub>5</sub>=OH

4: R<sub>1</sub>=OBz, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=OBz, R<sub>5</sub>=OH

14: R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OBz, R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=H

15: R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OBz, R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>5</sub>=OBz



5-8, 17-19, 36-43

5: R<sub>1</sub>=β-OH, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=OiVal, R<sub>4</sub>=OBz

6: R<sub>1</sub>=β-OH, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=OiVal, R<sub>4</sub>=OH

7: R<sub>1</sub>=β-H, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=OiVal, R<sub>4</sub>=OBz

8: R<sub>1</sub>=β-H, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=OBz

17: R<sub>1</sub>=β-H, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=OiBu, R<sub>4</sub>=OBz

18: R<sub>1</sub>=α-H, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=OiBu, R<sub>4</sub>=OBz

19: R<sub>1</sub>=β-H, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=OBz

36: R<sub>1</sub>=α-H, R<sub>2</sub>=OBz, R<sub>3</sub>=OiBu, R<sub>4</sub>=H

37: R<sub>1</sub>=α-H, R<sub>2</sub>=OAc, R<sub>3</sub>=OiBu, R<sub>4</sub>=H

38: R<sub>1</sub>=α-H, R<sub>2</sub>=OBz, R<sub>3</sub>=OiVal, R<sub>4</sub>=H

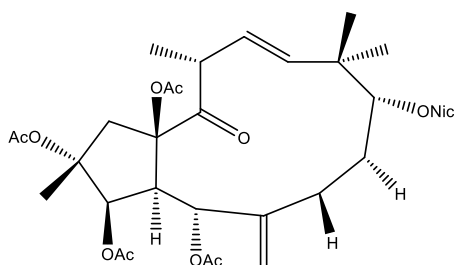
39: R<sub>1</sub>=α-H, R<sub>2</sub>=OAc, R<sub>3</sub>=OiVal, R<sub>4</sub>=H

40: R<sub>1</sub>=α-H, R<sub>2</sub>=OBz, R<sub>3</sub>=Oac, R<sub>4</sub>=H

41: R<sub>1</sub>=β-H, R<sub>2</sub>=OBz, R<sub>3</sub>=Oac, R<sub>4</sub>=H

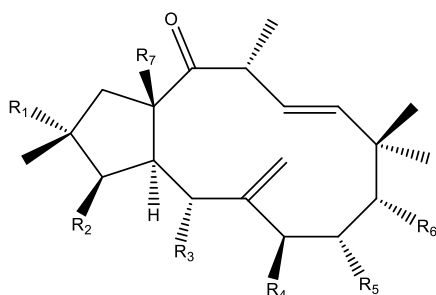
42: R<sub>1</sub>=α-H, R<sub>2</sub>=OCO(CH=CH)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>,  
R<sub>3</sub>=OAc R<sub>4</sub>=OAc

43: R<sub>1</sub>=α-H, R<sub>2</sub>=OBz, R<sub>3</sub>=OAc, R<sub>4</sub>=OAc

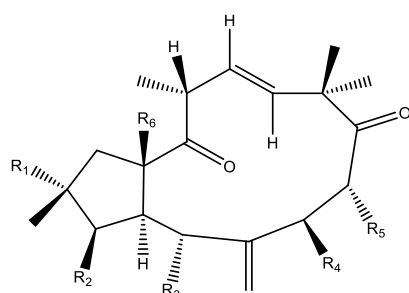


20

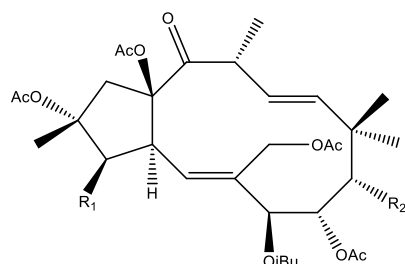




21–31, 44



45



32–34

21: R<sub>1</sub>=OAc, R<sub>2</sub>=OiBu, R<sub>3</sub>=OAc, R<sub>4</sub>=OiBu, R<sub>5</sub>=OAc, R<sub>6</sub>=ONic, R<sub>7</sub>=OH

22: R<sub>1</sub>=OAc, R<sub>2</sub>=Opr, R<sub>3</sub>=OAc, R<sub>4</sub>=OiBu, R<sub>5</sub>=OAc, R<sub>6</sub>=ONic, R<sub>7</sub>=OH

23: R<sub>1</sub>=ONic, R<sub>2</sub>=OiBu, R<sub>3</sub>=OAc, R<sub>4</sub>=OiBu, R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=OAc, R<sub>7</sub>=OH

24: R<sub>1</sub>=ONic, R<sub>2</sub>=Opr, R<sub>3</sub>=OAc, R<sub>4</sub>=OiBu, R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=OAc, R<sub>7</sub>=OH

25: R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=Opr, R<sub>3</sub>=OAc, R<sub>4</sub>=OiBu, R<sub>5</sub>=OAc, R<sub>6</sub>=ONic, R<sub>7</sub>=OH

26: R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=Opr, R<sub>3</sub>=OAc, R<sub>4</sub>=OiBu, R<sub>5</sub>=OAc, R<sub>6</sub>=ONic, R<sub>7</sub>=OH

27: R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OiBu, R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=OAc, R<sub>5</sub>=H, R<sub>6</sub>=ONic, R<sub>7</sub>=OAc

28: R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=Opr, R<sub>3</sub>=OAc, R<sub>4</sub>=OiBu, R<sub>5</sub>=OAc, R<sub>6</sub>=ONic, R<sub>7</sub>=OAc

29: R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OAc, R<sub>4</sub>=OiBu, R<sub>5</sub>=OAc, R<sub>6</sub>=ONic, R<sub>7</sub>=OH

30: R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OAc, R<sub>4</sub>=OiBu, R<sub>5</sub>=OAc, R<sub>6</sub>=ONic, R<sub>7</sub>=OAc

31: R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=Opr, R<sub>3</sub>=OAc, R<sub>4</sub>=OiBu, R<sub>5</sub>=ONic, R<sub>6</sub>=OAc, R<sub>7</sub>=OH

44: R<sub>1</sub>=OAc, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=Obz, R<sub>4</sub>=OAc, R<sub>5</sub>=H, R<sub>6</sub>=O, R<sub>7</sub>=OBz

45: R<sub>1</sub>=Obz, R<sub>2</sub>=OAc, R<sub>3</sub>=Obz, R<sub>4</sub>=H, R<sub>5</sub>=OAc, R<sub>6</sub>=O, R<sub>7</sub>=OAc

32: R<sub>1</sub>=OAc, R<sub>2</sub>=ONic

33: R<sub>1</sub>=Opr, R<sub>2</sub>=ONic

34: R<sub>1</sub>=OAc, R<sub>2</sub>=OBz

**Keywords:** *Euphorbia palustris*, *Euphorbia lucida*, *Euphorbia nicaeensis*, *Euphorbia*, Ingenanes, Tiglianes, Jatrophanes, Metabolomics, P-glycoprotein, Multidrug resistance (MDR).

**Academic Expertise:** Chemistry

**Field of Academic Expertise:** Organic Chemistry

**UDK number:** 547

## Lista skraćenica i termina

TLC (Thin Layer Chromatography) – tankoslojna hromatografija

UV (Ultraviolet Spectroscopy) – ultraljubičasta spektroskopija

DAD (Diode Array Detection) – detekcija pomoću niza dioda

IR (Infrared Spectroscopy) – infracrvena spektroskopija

$^1\text{H}$  NMR ( $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) – nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija protona

$^{13}\text{C}$  NMR ( $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) – nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija ugljenika-13

HSQC – Heteronuclear Single Quantum Coherence

HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Coherence

NOESY – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

COSY – Correlated Spectroscopy

GC/FID (Gas Chromatography/Flame Ionization Detector) – gasna hromatografija sa plameno-jonizacionim detektorom

GC/MS (Gas Chromatography/Mass Spectrometry) – gasna hromatografija sa masenim spektrometrom kao detektorom

EI (Electron Ionization) – elektronska jonizacija

CC (column chromatography) – gravitaciona hromatografija na koloni

RP LC (Reversed Phase Liquid Chromatography) – reverzno fazna tečna hromatografija

NP LC (Normal Phase Liquid Chromatography) – normalno fazna tečna hromatografija

HRESIMS (High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry) – elektrosprej masena spektrometrija visoke rezolucije

$[\text{M}+\text{H}]^+$  – protonovani molekularni jon

$\delta_{\text{H}}$  – hemijsko pomerenje u  $^1\text{H}$  NMR spektru

$\delta_{\text{C}}$  – hemijsko pomerenje u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru

$J_{\text{x,y}}$  – konstanta sprezanja protona X sa protonom Y (u Hz)

$[\alpha]_D^{20}$  – specifična rotacija

$\Delta$  – položaj dvostruke veze

$\text{CD}_3\text{OD}$  – deuterisani metanol

$\text{CDCl}_3$  – deuterisani hloroform

TMS – tetrametilsilan

BN – binuklearne ćelije

MN – mikronukleus

CBPI (Cytokinesis Block Proliferation Index) – proliferacioni indeks blokirane citokineze

MMC – mitomicin C

DLD-1 – ćelijska linija adenokarcinoma debelog creva

DLD1-TxR – rezistentna varijanta ćelijske linije adenokarcinoma debelog creva

NCI-H460 – ćelijska linija nesitnoćelijskog karcinoma pluća

NCI-H460/R – rezistentna varijanta ćelijske linije nesitnoćelijskog karcinoma pluća

518A2 – ćelijska linija melanoma

HaCaT – normalni humani keratinociti

MIC – minimalna inhibitorna koncentracija

MFK – minimalna fungicidna koncentracija

## SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPŠTI DEO .....	2
1.1. Familija Euphorbiaceae .....	3
1.2. Morfološke karakteristike roda <i>Euphorbia</i> L. ....	3
1.3. Metaboliti izolovani iz lateksa roda <i>Euphorbia</i> L. ....	6
1.4. Medicinski značaj i primena biljnih vrsta roda <i>Euphorbia</i> L. ....	23
1.5. Biljna vrsta <i>Euphorbia palustris</i> L. ....	26
1.6. Biljna vrsta <i>Euphorbia lucida</i> Waldst. & Kit. ....	28
1.7. Biljna vrsta <i>Euphorbia nicaeensis</i> All. ....	29
2. NAŠI RADOVI .....	31
2.1. Sekundarni metaboliti izolovani iz biljne vrste <i>Euphorbia palustris</i> L. ....	32
2.1.1. 24-Metilencikloartan-3-ol (1) .....	35
2.1.2. 24-Metilencikloartan-3,28-diol (2) .....	37
2.1.3. 3 $\beta$ -Benzoiloksi-13 $\alpha$ -dodekanoiloksiingenol (3) .....	39
2.1.4. 3 $\beta$ ,13 $\alpha$ ,17-Tribenzoiloksiingenol (4) .....	39
2.1.5. 20-Benzoiloksi-13 $\alpha$ -izovaleriloksi-12-deoksiforbol (5) .....	43
2.1.6. 20-Acetiloksi-13 $\alpha$ -izovaleriloksi-12-deoksiforbol (6) .....	49
2.1.7. 20-Benzoiloksi-13 $\alpha$ -izovaleriloksi-4,12-dideoksiforbol (7) .....	50
2.1.8. 13 $\alpha$ ,20-Dibenzoiloksi-4,12-dideoksiforbol (8) .....	52
2.2. Metabolomička studija zdravih i zaraženih jedinki <i>Euphorbia palustris</i> L. ....	56
2.3. Sekundarni metaboliti izolovani iz biljne vrste <i>Euphorbia lucida</i> Waldst. & Kit. .	65
2.3.1. 3 $\beta$ ,5 $\beta$ -Dibenzoiloksi-20-deoksiingenol (14) .....	67

2.3.2. $3\beta,5\beta,20$ -Tribenzoiloksiingenol ( <b>15</b> ).....	69
2.3.3. Skoparon ( <b>16</b> ).....	72
2.3.4. 20-Benzoiloksi-13 $\alpha$ -izobutanoiloksi-4,12-dideoksiforbol ( <b>17</b> ).....	73
2.3.5. 20-Benzoiloksi-13 $\alpha$ -izobutanoiloksi-4- <i>epi</i> -4,12-dideoksiforbol ( <b>18</b> ).....	74
2.4. Sekundarni metaboliti izolovani iz biljne vrste <i>Euphorbia nicaeensis</i> All. ....	78
2.4.1. $3\beta,5\alpha,15\beta$ -Triacetiloksi-2 $\alpha$ -hidroksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksijatrofa-6(17),11 <i>E</i> -dien-14-on ( <b>19</b> ).....	84
2.4.2. 2 $\alpha,5\alpha,8\alpha$ -Triacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-3 $\beta,7\beta$ -diizobutanoiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksijatrofa-6(17),11 <i>E</i> -dien-14-on ( <b>20</b> ).....	91
2.4.3. 2 $\alpha,5\alpha,8\alpha$ -Triacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksi-3 $\beta$ -propanoiloksijatrofa-6(17),11 <i>E</i> -dien-14-on ( <b>21</b> ).....	91
2.4.4. 5 $\alpha,8\alpha,9\alpha$ -Triacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-3 $\beta,7\beta$ -diizobutanoiloksi-2 $\alpha$ -nikotinoiloksijatrofa-6(17),11 <i>E</i> -dien-14-on ( <b>22</b> ).....	95
2.4.5. 5 $\alpha,8\alpha,9\alpha$ -Triacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-2 $\alpha$ -nikotinoiloksi-3 $\beta$ -propanoiloksijatrofa-6(17),11 <i>E</i> -dien-14-on ( <b>23</b> ).....	99
2.4.6. 5 $\alpha,8\alpha$ -Diacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksi-3 $\beta$ -propanoiloksijatrofa-6(17),11 <i>E</i> -dien-14-on ( <b>24</b> ).....	102
2.4.7. 5 $\alpha,7\beta,15\beta$ -Triacetiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksi-3 $\beta$ -propanoiloksijatrofa-6(17),11 <i>E</i> -dien-14-on ( <b>25</b> ).....	104
2.4.8. 5 $\alpha,8\alpha$ -Diacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-3 $\beta,7\beta$ -diizobutanoiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksijatrofa-6(17),11 <i>E</i> -dien-14-on ( <b>26</b> ).....	108
2.4.9. 5 $\alpha,8\alpha,15\beta$ -Triacetiloksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksi-3 $\beta$ -propanoiloksijatrofa-6(17),11 <i>E</i> -dien-14-on ( <b>27</b> ).....	109
2.4.10. $3\beta,5\alpha,8\alpha$ -Triacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksijatrofa-6(17),11 <i>E</i> -dien-14-on ( <b>28</b> ).....	111
2.4.11. $3\beta,5\alpha,8\alpha,15\beta$ -Tetraacetiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksijatrofa-6(17),11 <i>E</i> -dien-14-on ( <b>29</b> ).....	113

2.4.12. 5 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -Diacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-8 $\alpha$ -nikotinoiloksi-3 $\beta$ -propanoiloksi-jatrofa-6(17),11 <i>E</i> -dien-14-on (30) .....	115
2.4.13. 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,15 $\beta$ ,17-Pentaacetiloksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksi-jatrofa-5 <i>E</i> ,11 <i>E</i> -dien-14-on (31) .....	119
2.4.14. 2 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,15 $\beta$ ,17-Tetraacetiloksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksi-3 $\beta$ -propanoiloksi-jatrofa-5 <i>E</i> ,11 <i>E</i> -dien-14-on (32) .....	120
2.4.15. 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,15 $\beta$ ,17-Pentaacetiloksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-8 $\alpha$ -benzoil-oksijatrofa-5 <i>E</i> ,11 <i>E</i> -dien-14-on (33) .....	121
2.4.16. (3 <i>S</i> ,24 <i>R</i> )-Tirukal-7-en-3,24,25-triol (34) .....	123
2.4.17. (3 <i>S</i> ,24 <i>S</i> )-Tirukal-7-en-3,24,25-triol (35) .....	123
2.4.18. 12 $\beta$ -Benzoiloksi-13 $\alpha$ -izobutanoiloksi-4- <i>epi</i> -4,20-dideoksiforbol (36) .....	127
2.4.19. 12 $\beta$ -Acetiloksi-13 $\alpha$ -izobutanoiloksi-4- <i>epi</i> -4,20-dideoksiforbol (37).....	127
2.4.20. 12 $\beta$ -Benzoiloksi-13 $\alpha$ -izovaleriloksi-4- <i>epi</i> -4,20-dideoksiforbol (38) .....	130
2.4.21. 12 $\beta$ -Acetiloksi-13 $\alpha$ -izovaleriloksi-4- <i>epi</i> -4,20-dideoksiforbol (39).....	134
2.4.22. 13 $\alpha$ -Acetiloksi-12 $\beta$ -benzoiloksi-4- <i>epi</i> -4,20-dideoksiforbol (40) .....	137
2.4.23. 13 $\alpha$ -Acetiloksi-12 $\beta$ -benzoiloksi-4,20-dideoksiforbol (41).....	139
2.4.24. 13 $\alpha$ ,20-Diacetiloksi-12 $\beta$ -(2' <i>E</i> ,4' <i>E</i> -dekadienoiloksi)-4- <i>epi</i> -4-deoksiforbol (42).....	143
2.4.25. 13 $\alpha$ ,20-Diacetiloksi-12 $\beta$ -benzoiloksi-4- <i>epi</i> -4-deoksiforbol (43) .....	145
2.4.26. 2 $\alpha$ ,7 $\beta$ -Diacetiloksi-5 $\alpha$ ,15 $\beta$ -dibenzoiloksi-3 $\beta$ -hidroksijatrofa-6(17),11 <i>E</i> -dien-9,14-dion (44) .....	149
2.4.27. 3 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,15 $\beta$ -Triacetiloksi-2 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -dibenzoiloksi-jatrofa-6(17),11 <i>E</i> -dien-9,14-dion (45).....	152
2.4.28. Inoterpen C (46) .....	157
2.5. Hemijski sastav epikutikularnih voskova .....	159
2.8. Biološke aktivnosti odabranih sekundarnih metabolita i heksanskih ekstrakata lateksa ispitivanih biljnih vrsta .....	161
2.8.1. Selektivni efekat jedinjenja 3 i 4 na inhibiciju rasta tumorskih ćelijskih linija..	161

2.8.2. Selektivni efekat heksanskih ekstrakata lateksa ispitivanih biljnih vrsta na rast humanog melanoma.....	164
2.8.1. Inhibitorno dejstvo jatrofana na P-gp .....	165
2.8.2. Kombinovano dejstvo jatrofana sa hemioterapeuticima .....	166
2.8.3. Protektivni efekat na DNK humanih limfocita.....	167
3. EKSPERIMENTALNI DEO .....	170
3.1. Instrumenti i rastvarači .....	171
3.2. Biljni materijal i postupci izolovanja jedinjenja.....	174
3.2.1. Biljni materijal i postupak izolovanja jedinjenja iz lateksa <i>E. palustris</i> L. ....	174
3.2.2. Priprema uzorka za metabolomičku studiju .....	175
3.2.3. Biljni materijal i postupak izolovanja jedinjenja iz stabla i la-teksa <i>E. lucida</i> Waldst. & Kit.....	176
3.2.4. Biljni materijal i postupak izolovanja jedinjenja iz lateksa i kore-na <i>E. nicaeensis</i> All. ....	177
3.3. Određivanje hemijskog sastava epikutikularnih voskova .....	179
3.4. Ispitivanje biološke aktivnosti odabranih sekundarnih metabolita i heksanskih ekstrakata lateksa ispitivanih biljnih vrsta.....	180
3.4.1. Lekovi.....	180
3.4.2. Hemikalije i reagensi .....	180
3.4.3. Čelije i ćelijske kulture .....	181
3.4.4. Jedinjenja i ekstrakti .....	182
3.4.5. Merenje citotoksičnosti kolorimetrijskim MTT testom .....	182
3.4.6. Određivanje tipa ćelijske smrti.....	183
3.4.7. Određivanje inhibicije aktivnosti P-gp-a testom akumulacije Rho 123 .....	184
3.4.8. Statistička analiza .....	185
3.4.9. Protektivno dejstvo na DNK humanih limfocita .....	185

3.4.10. Identifikacija gljiva.....	186
3.4.11. Antifungalni esej .....	187
3.5. Spektralni podaci izolovanih jedinjenja (1–8 i 14–46) .....	189
4. ZAKLJUČAK.....	197
5. LITERATURA.....	200
Biografija.....	210



## UVOD

Ova doktorska disertacija urađena je u laboratorijama Odeljenja za instrumentalnu analizu Univerziteta u Beogradu - Hemijskog fakulteta i Centra za hemiju Naučne ustanove Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju u saradnji sa Institutom za biološka istraživanja „Siniša Stanković” i Univerzitetom u Beogradu - Biološkim fakultetom i predstavlja nastavak fitohemijskog ispitivanja biljnih vrsta roda *Euphorbia*. Predmet ove disertacije je ispitivanje hemijskog sastava sekundarnih metabolita odabranih biljnih vrsta roda *Euphorbia*, kao i određivanje biološke aktivnosti odabranih izolovanih metabolita.

U OPŠTEM DELU ove doktorske disertacije prikazane su morfološke karakteristike roda *Euphorbia* i ispitivanih biljnih vrsta (*E. palustris* L., *E. lucida* Waldst. & Kit. i *E. nicaeensis* All.), ukratko je opisan medicinski značaj biljaka roda *Euphorbia*, dati su primeri njihove upotrebe u tradicionalnoj i savremenoj medicini, kao i pregled sekundarnih metabolita izolovanih iz lateksa biljnih vrsta ovog roda.

U delu NAŠI RADOVI prikazan je detaljan postupak određivanja strukture izolovanih jedinjenja primenom spektroskopskih i spektrometrijskih metoda (1D i 2D NMR, UV, IR, polarimetrije i HR-ESI-MS). Takođe, prikazani su i rezultati analize epikutikularnih voskova listova ispitivanih biljnih vrsta gasno hromatografsko-maseno spektrometrijskom (GC/MS) tehnikom. U ovom delu opisana je i metabolomička studija biljne vrste *E. palustris* i rezultati bioloških ispitivanja odabranih izolovanih diterpena.

U EKSPERIMENTALNOM DELU date su informacije o biljnom materijalu, korišćenim instrumentima i eksperimentalnim tehnikama, prikazani su postupci izolovanja jedinjenja i navedeni njihovi spektralni podaci i podaci u vezi sa biološkim ispitivanjima.

# **1. OPŠTI DEO**

## 1.1. Familija Euphorbiaceae

Familija Euphorbiaceae je jedna od najvećih i najraznovrsnijih biljnih familija dikotiledonih skrivenosemenica.<sup>1</sup> Prema molekularnim istraživanjima, familija se sastoji iz pet podfamilija: Acalyphoideae, Crotonodeae, Euphorbiodeae, Phyllanthoideae i Oldfieldioideae,<sup>2</sup> 49 tribusa, 317 rodova i više od 10000 vrsta.<sup>1</sup>

Podfamilija Euphorbiodeae se dalje deli u 5 tribusa: Euphorbieae, Hippomaneae, Hureae, Pachystomateae i Stomatocalyceae. Tribus Euphorbieae je najbrojniji i on se dalje deli na tri podtribusa, a svaki od njih dalje na po dva roda. U podtribus Anthosteminae ubrajaju se rodovi *Anthostema* i *Dichostemma*, u podtribus Euphorbiinae rodovi *Cubanthus* i *Euphorbia*, a u podtribus Neoguillauminiinae rodovi *Calycopeplus* i *Neoguillauminia*.<sup>2-5</sup>

Najveći rodovi koji pripadaju familiji Euphorbiaceae su *Euphorbia* (oko 2100 vrsta), *Croton* (700 vrsta), *Phyllanthus* (500 vrsta), *Acalypha* (430 vrsta), *Jatropha* (175 vrsta) i *Manihot* (170 vrsta).<sup>6,7</sup>

## 1.2. Morfološke karakteristike roda *Euphorbia* L.

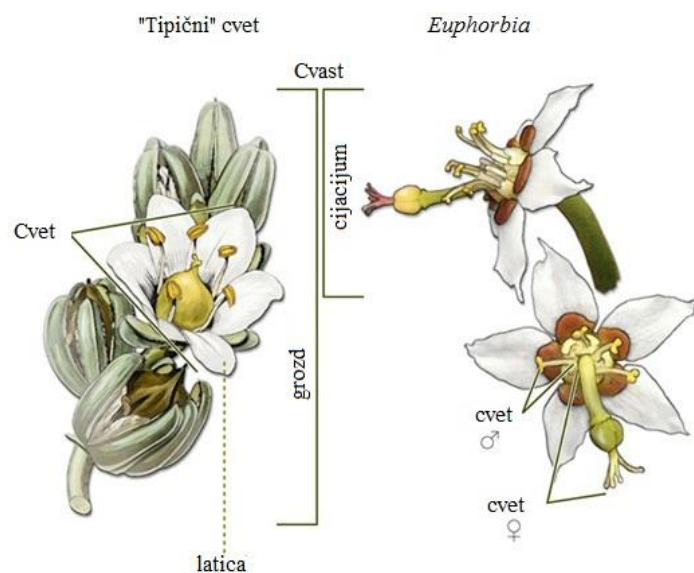
Rod *Euphorbia* L. je najbrojniji rod ne samo familije Euphorbiaceae već i celog biljnog carstva – pripada mu oko 2100 biljnih vrsta.<sup>8</sup>

Staništa ovih biljnih vrsta su uglavnom u tropskim i suptropskim delovima planete, ali se mogu naći i u umereno-kontinentalnoj zoni.<sup>9</sup> Neke vrste ovog roda su široko rasprostranjene i rastu na različitim staništima i u različitim klimatskim zonama, dok druge vrste rastu isključivo na jednom staništu (endemske vrste).<sup>9</sup>

Po svom izgledu, biljke roda *Euphorbia* mogu se veoma razlikovati – javljaju se kao zeljaste (*Euphorbia angulata* Jacq.),<sup>10</sup> žbunaste (*Euphorbia nicaeensis* All.)<sup>11</sup>, ali i drvenaste biljke (*Euphorbia dendroides* L.).<sup>12</sup> Za pustinjske predele karakteristične su forme kaktusolikih sukulenata (*Euphorbia trigona* Mill.).<sup>13</sup>

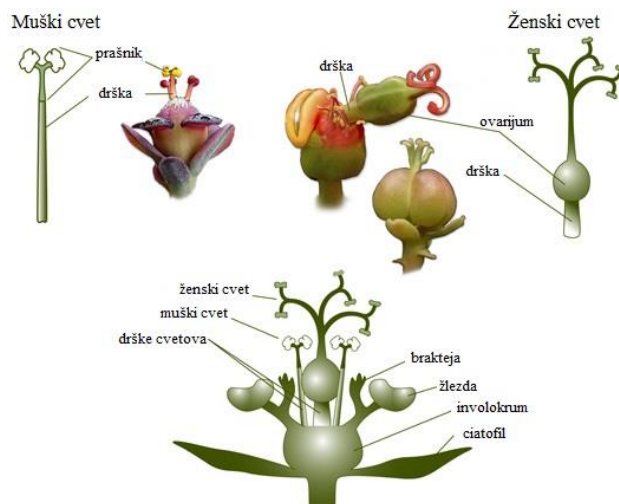
I pored navedenih razlika, ove biljke imaju i zajedničke morfološke karakteristike. Najveći broj biljnih vrsta je bledo-zelene boje i svi predstavnici roda se odlikuju

karakterističnom građom cveta. Kao i kod ostalih predstavnika porodice Euphorbiaceae, cvetovi biljaka iz roda *Euphorbia* su malih dimenzija, redukovani, jedнопolni (ili muški ili ženski) i sakupljeni u cvetni klaster poznat kao cijacijum (**Slika 1**).<sup>14</sup>



**Slika 1.** Uporedni prikaz „tipičnog” cveta i cveta biljnih vrsta roda *Euphorbia*<sup>8</sup>

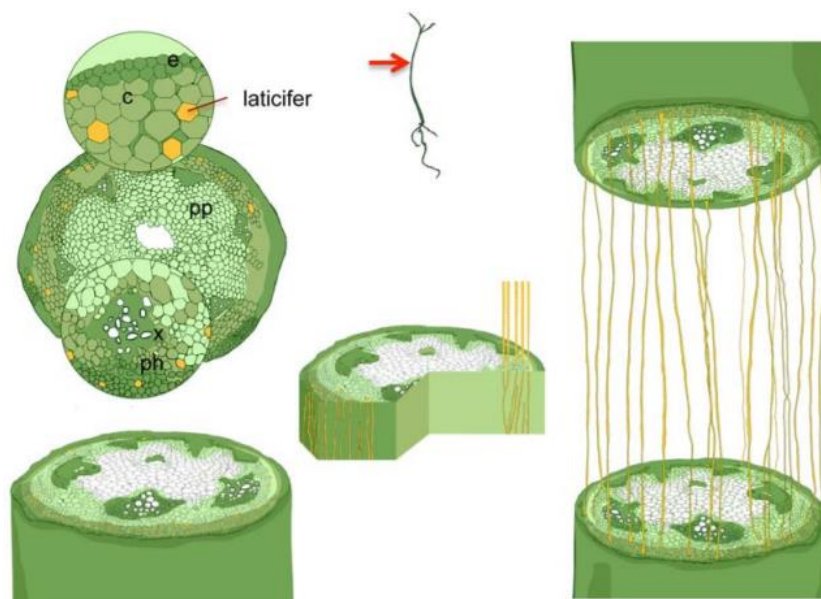
Svaki cijacijum je izgrađen od jednog trokarpalnog tučka na dugačkoj dršci koji je savijen naniže i predstavlja ženski cvet.<sup>15</sup> Oko ovog cveta nalaze se prašnici, pri čemu svaki pojedinačni prašnik predstavlja muški cvet (**Slika 2**). Cela ova cvast (cijacijum) okružena je involokrumom od brakteja koje funkcionišu kao krunični listići. Brakteje nose četiri do najviše šest krupnih polumesečastih žlezda (nektarije).<sup>16–18</sup> Listovi kod ovog biljnog roda su uglavnom postavljeni naizmenično i obično su prosti sa zaliscima.<sup>17</sup>



**Slika 2.** Delovi cijacijuma kod biljaka iz roda *Euphorbia*<sup>8</sup>

Najvažnija zajednička morfološka karakteristika ovih biljnih vrsta je postojanje mlečnih cevi u stablu i listovima, u kojima se, u velikoj količini, nalazi mlečni sok (lateks) bogat terpenima.<sup>19</sup> Mlečne cevi su izgrađene od laticifer ćelija (specijalizovanih biljnih ćelija čija je uloga da sintetišu i skladište lateks).<sup>19, 20</sup>

Da u biljkama sa lateksom postoje laticifer ćelije utvrđeno je mikroskopskim studijama kriostatskih ili parafinskih sekcija biljnih tkiva i tehnikama konvencionalnog bojenja.<sup>19</sup> Ovakav način ispitivanja nije dao potpunu trodimenzionalnu strukturu laticifer ćelija, već samo strukturu u malom preseku tkiva. Da bi se pojednostavila identifikacija laticifer ćelija i karakterizacija trodimenzionalnih odnosa između njih i okolnih tkiva u neoštećenom organu razvijen je histohemijski postupak u kome se koristi bojenje sa Sudan Crnim B.<sup>19</sup> Ova tehnika čini druga tkiva prozirnim ili transparentnim, dok mrlje koje ostaju predstavljaju laticifer ćelije i na taj način se omogućava mapiranje celokupnih orijentacija organa izgrađenih od ovih ćelija. Korišćenjem ove tehnike laticifer ćelije su detaljno ispitane i opisane kod biljne vrste *Euphorbia lathyris* (Slika 3).<sup>19</sup> Laticifer ćelije ili redovi ovih ćelija se nalaze paralelno duž hipokotila i na Slici 3 prikazani su žutom bojom. Takođe, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se ove ćelije nalaze u blizini spoljašnjeg dela stabla i da ih nema u unutrašnjem delu.<sup>19</sup>



**Slika 3.** Lokacija i zastupljenost laticifer ćelija duž hipokotilne osovine vrste *E. lathyris*<sup>19</sup>

### 1.3. Metaboliti izolovani iz lateksa roda *Euphorbia* L.

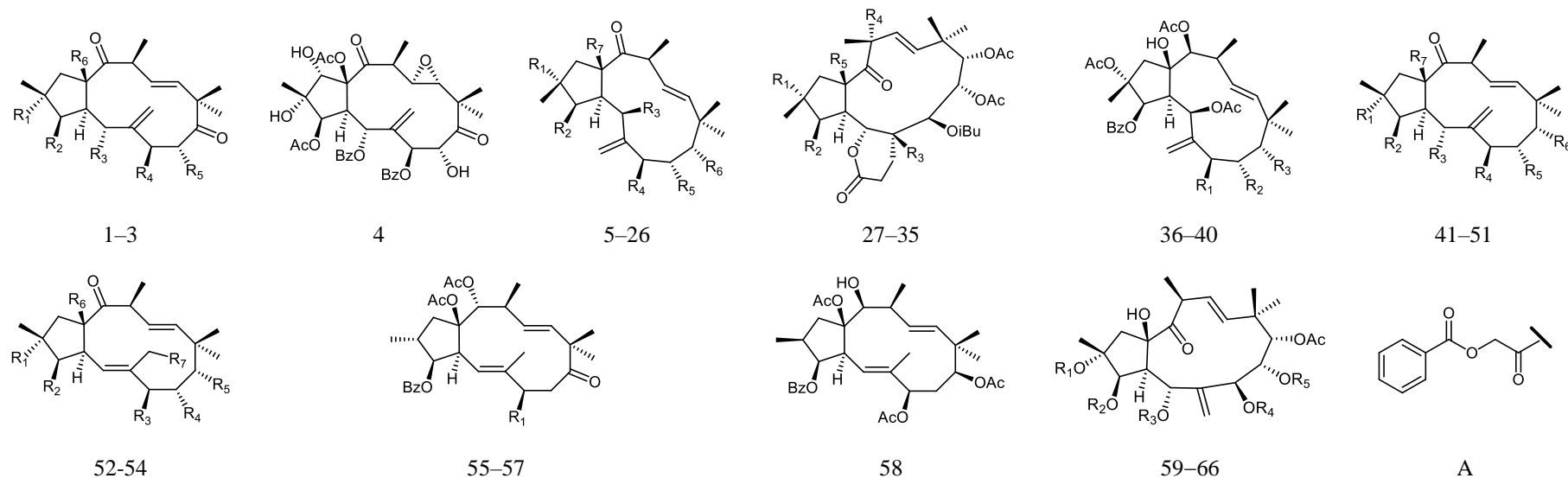
Lateks koji se sintetiše i skladišti u laticifer ćelijama je endogena, lepljiva, vodena suspenzija koja curi kada se tkivo mehanički povredi, u dodiru sa vazduhom očvršćava i tako „leči” biljku.<sup>21</sup> Lateks štiti biljku od životinja i insekata, ali nije efikasna zaštita od gljiva i bakterija.<sup>22</sup>

Hemijski sastav lateksa je izuzetno složen – sadrži širok spektar sekundarnih metabolita, kao što su diterpeni, triterpeni, fenolna i flavonoidna jedinjenja.

Sekundarni metaboliti do sada (septembar 2019. god.) izolovani iz lateksa biljnih vrsta roda *Euphorbia* prikazani su u **Tabelama 1–6**. U **Tabeli 1** prikazane su strukture jatrofanskih diterpena, dok je u **Tebeli 2** dat prikaz izolovanih latirana, tiglijana, pepluana, ingola i fitola. Strukture izolovanih ingenana prikazane su u **Tabeli 3**.

U **Tebeli 4** prikazane su strukture izolovanih fenolnih jedinjenja, dok su strukture cikloartanskih derivata prikazane u **Tabeli 5**. U **Tabeli 6** prikazani su derivati eufola i sitosterola, kao i ostali triterpeni izolovani iz lateksa roda *Euphorbia*.

**Tabela 1.** Jatrofani izolovani iz lateksa biljnih vrsta roda *Euphorbia*



R. br.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	Ime	Biljna vrsta
1	H	OPr	OBz	OiBu	OH	OH	/	Enukokurin	<i>E. lateriflora</i> <sup>23</sup>
2	OH	OAc	OBz	OBz	OH	OAc	/	Esulon A	<i>E. lateriflora</i> <sup>23</sup>
3	ONic	OiVal	OAc	H	H	OH	/	Eufodendrofan G	<i>E. dendroides</i> <sup>24</sup>
4	/	/	/	/	/	/	/	Kansuinin B	<i>E. lateriflora</i> <sup>25</sup>
5	OAc	OH	OiBu	OBz	OAc	OAc	OH	Eufodendroidin A	<i>E. dendroides</i> <sup>25</sup>
6	OAc	OH	OMeBu	OBz	OAc	OAc	OH	Eufodendroidin B	<i>E. dendroides</i> <sup>25</sup>
7	OAc	OH	ONic	OBz	OAc	OAc	OH	Eufodendroidin C	<i>E. dendroides</i> <sup>25</sup>
8	H	OH	OiBu	OBz	OAc	OAc	OH	Eufodendroidin D	<i>E. dendroides</i> <sup>26</sup>
9	H	OAc	OiBu	OBz	OAc	OAc	OH	Eufodendroidin E	<i>E. dendroides</i> <sup>25</sup>

**Tabela 1. Nastavak**

10	OH	OAc	OiBu	OBz	OAc	OAc	OH	Eufodendroidin F	<i>E. dendroides</i> <sup>25</sup>
11	OAc	OA	OAc	OiBu	OAc	OAc	OH	Eufodendroidin G	<i>E. dendroides</i> <sup>26</sup>
12	OAc	ONic	OAc	OiBu	OAc	OAc	OH	Eufodendroidin H	<i>E. dendroides</i> <sup>26</sup>
13	H	OBz	OAc	OiBu	OAc	OAc	OH	Eufodendroidin I	<i>E. dendroides</i> <sup>26</sup>
14	OH	OBz	OiBu	OBz	OAc	OAc	OH	Eufodendroidin J	<i>E. dendroides</i> <sup>26</sup>
15	OAc	OiBu	OiBu	OBz	OAc	OAc	OH	Eufodendroidin K	<i>E. dendroides</i> <sup>26</sup>
16	OAc	OAc	OiBu	OBz	OAc	OAc	OH	Eufodendroidin L	<i>E. dendroides</i> <sup>26</sup>
17	OAc	OBz	OiBu	OBz	OAc	OAc	OH	Eufodendroidin M	<i>E. dendroides</i> <sup>26</sup>
18	OAc	OH	OBz	OBz	OAc	OAc	OH	Eufodendroidin N	<i>E. dendroides</i> <sup>26</sup>
19	OAc	OH	OBz	OBz	OH	OAc	OH	Eufodendroidin O	<i>E. dendroides</i> <sup>26</sup>
20	OH	OAc	OBz	ONic	OAc	OAc	OH	Eufodendroidin P	<i>E. dendroides</i> <sup>27</sup>
21	ONic	OAc	OAc	OBz	OAc	ONic	OAc	Eufodendroidin Q	<i>E. dendroides</i> <sup>27</sup>
22	ONic	OAc	OAc	OBz	OAc	ONic	OAc	Eufodendroidin R	<i>E. dendroides</i> <sup>27</sup>
23	ONic	OAc	OAc	OiBu	OAc	ONic	OH	Eufodendroidin S	<i>E. dendroides</i> <sup>27</sup>
24	ONic	OAc	OiBu	OBz	OAc	ONic	OH	Eufodendroidin T	<i>E. dendroides</i> <sup>27</sup>
25	OAc	OBz	OAc	OiBu	OAc	$\beta$ -Me	OH	2,5,8-Triacetoksi-3-benzoiloksi-15-hidroksi-7-izobutanoiloksi-9-nikotinoiloksi-14-oksojatrofa-6(17),11E-dien	<i>E. peplus</i> <sup>28</sup>
26	H	OAc	H	OAc	H	$\alpha$ -Me	OAc	3,5,7,15-Tetraacetoksi-9-nikotinoiloksi-14-oksojatrofa-6(17),11E-dien	<i>E. peplus</i> <sup>28</sup>
27	OAc	OAc	OAc	OH	OH	/	/	13 $\alpha$ -Hidroksiteracinolid G	<i>E. dendroides</i> <sup>26</sup>
28	OAc	OAc	OAc	OH	OAc	/	/	13 $\alpha$ -Hidroksiteracinolid B	<i>E. dendroides</i> <sup>26</sup>
29	OH	OAc	OAc	H	OAc			Teracinolid K	<i>E. dendroides</i> <sup>29</sup>
30	OH	OAc	OiBu	H	OAc			Teracinolid L	<i>E. dendroides</i> <sup>29</sup>
31	OAc	OAc	OAc	H	OAc			Teracinolid B	<i>E. dendroides</i> <sup>29</sup>
32	OAc	OH	OAc	H	OAc			Teracinolid C	<i>E. dendroides</i> <sup>29</sup>



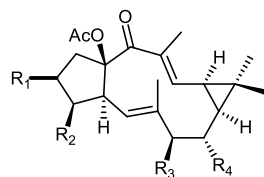
**Tabela 1. Nastavak**

33	OAc	OAc	OiBu	H	OAc			Teracinolid F	<i>E. dendroides</i> <sup>29</sup>
34	OAc	OH	OiBu	H	OAc			Teracinolid H	<i>E. dendroides</i> <sup>29</sup>
35	OAc	OAc	OiBu	H	OH	/	/	Teracinolid J	<i>E. dendroides</i> <sup>26</sup>
36	OAc	OAc	OAc	/	/	/	/	2,5,7,8,9,14-Heksaacetoksi-3-benzoiloksi-15-hidroksijatrofa-6(17),11E-dien	<i>E. peplus</i> <sup>28</sup>
37	OAc	OAc	ONic	/	/	/	/	Pepluanin A	<i>E. peplus</i> <sup>28</sup>
38	OiBu	OH	OAc	/	/	/	/	2,5,9,14-Tetraacetoksi-3-benzoiloksi-8,15-dihidroksi-7-izobutiroiloksijatrofa-6(17),11E-dien	<i>E. peplus</i> <sup>28</sup>
39	OiBu	OH	ONic	/	/	/	/	2,5,14-Triacetoksi-3-benzoiloksi-8,15-dihidroksi-7-izobutiroiloksi-9-nikotinoiloksijatrofa-6(17),11E-dien	<i>E. peplus</i> <sup>28</sup>
40	OiBu	OAc	OAc	/	/	/	/	2,5,8,9,14-Pentaacetoksi-3-benzoiloksi-15-hidroksi-7-izobutiroiloksijatrofa-6(17),11E-dien	<i>E. peplus</i> <sup>28</sup>
41	H	OPr	OAc	OiBu	OBz	ONic	OH	Eufodendrofan H	<i>E. dendroides</i> <sup>24</sup>
42	H	OPr	OAc	OiBu	ONic	ONic	OH	Eufodendrofan I	<i>E. dendroides</i> <sup>24</sup>
43	H	OPr	OAc	OiBu	OiBu	ONic	OH	Eufodendrofan J	<i>E. dendroides</i> <sup>24</sup>
44	H	OiBu	OAc	OiBu	OBz	ONic	OH	Eufodendrofan K	<i>E. dendroides</i> <sup>24</sup>
45	H	OiBu	OAc	OAc	ONic	ONic	OH	Eufodendrofan L	<i>E. dendroides</i> <sup>24</sup>
46	H	OiBu	OAc	OiBu	ONic	OAc	OH	Eufodendrofan M	<i>E. dendroides</i> <sup>24</sup>
47	H	OAc	OAc	OiBu	OAc	ONic	OH	Eufodendrofan N	<i>E. dendroides</i> <sup>24</sup>
48	OAc	OiBu	OAc	OiBu	OAc	ONic	OH	Eufodendrofan O	<i>E. dendroides</i> <sup>24</sup>
49	OAc	OiBu	ONic	OiBu	OAc	ONic	OH	Eufodendrofan P	<i>E. dendroides</i> <sup>24</sup>
50	H	OPr	OAc	OiBu	OAc	ONic	OH	Eufodendrofan A	<i>E. dendroides</i> <sup>24</sup>
51	H	OiBu	OAc	OiBu	OAc	ONic	OH	Eufodendrofan B	<i>E. dendroides</i> <sup>24</sup>
52	OAc	OPr	OiBu	OAc	ONic	OAc	OAc	Eufodendrofan Q	<i>E. dendroides</i> <sup>24</sup>
53	OAc	OAc	OiBu	ONic	ONic	OAc	OAc	Eufodendrofan R	<i>E. dendroides</i> <sup>24</sup>
54	OAc	OAc	OiBu	OAc	OBz	OAc	OAc	Eufodendrofan S	<i>E. dendroides</i> <sup>24</sup>

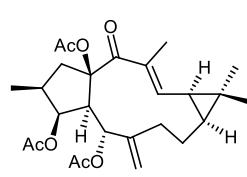
**Tabela 1. Nastavak**

55	OAc	OAc	OiBu	OAc	ONic	OAc	OAc	Eufodendrofan F	<i>E. dendroides</i> <sup>24</sup>
56	ONic	/	/	/	/	/	/	Eufoheliosnoid A	<i>E. helioscopia</i> <sup>30</sup>
57	OAc	/	/	/	/	/	/	Epiefufoskopin B	<i>E. helioscopia</i> <sup>30</sup>
58	OBz	/	/	/	/	/	/	Eufoskopin C	<i>E. helioscopia</i> <sup>30</sup>
59	/	/	/	/	/	/	/	7 $\alpha$ ,9 $\beta$ ,15 $\beta$ -Triacetoksi-3 $\beta$ -benzoiloksi-14 $\beta$ -hidroksijatrofa-5 <i>E</i> ,11 <i>E</i> -dien	<i>E. helioscopia</i> <sup>30</sup>
60	iVal	H	iVal	Ac	Ac			2,3,5,7,8,9,15-Heptahidroksijatrofa-6(17),11-dien-14-on-7,8,9-triacetat-2,5-bis(2-metilbutirat)	<i>E. obtusifolia</i> <sup>31</sup>
61	iBu	H	iBu	Ac	Ac			2,3,5,7,8,9,15-Heptahidroksijatrofa-6(17),11-dien-14-on-7,8,9-triacetat-2-izobutirat-5-(2-metilbutirat)	<i>E. obtusifolia</i> <sup>31</sup>
62	Nic	H	iVal	Ac	Ac			2,3,5,7,8,9,15-Heptahidroksijatrofa-6(17),11-dien-14-on-7,8,9-triacetat-2-nickotinat-5-(2-metilbutirat)	<i>E. obtusifolia</i> <sup>31</sup>
63	iVal	H	iVal	iBu	Ac			2,3,5,7,8,9,15-Heptahidroksijatrofa-6(17),11-dien-14-on-8,9-diacetat-7-izobutirat-2,5-bis(2-metilbutirat)	<i>E. obtusifolia</i> <sup>31</sup>
64	Ac	H	iVal	iBu	Ac			2,3,5,7,8,9,15-Heptahidroksijatrofa-6(17),11-dien-14-on-2,8,9-triacetat-7-izobutirat-5-(2-metilbutirat)	<i>E. obtusifolia</i> <sup>31</sup>
65	iVal	iVal	H	Ac	Bz			2,3,5,7,8,9,15-Heptahidroksijatrofa-6(17),11-dien-14-on-7,9-diacetat-8-benzoat-2,3-bis(2-metilbutirat)	<i>E. obtusifolia</i> <sup>31</sup>
66	iVal	iVal	H	iBu	Ac			2,3,5,7,8,9,15-Heptahidroksijatrofa-6(17),11-dien-14-on-8,9-diacetat-7-izobutirat-2,3-bis(2-metilbutirat)	<i>E. obtusifolia</i> <sup>31</sup>

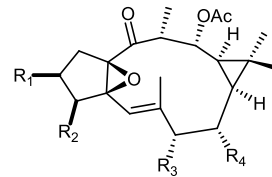
**Tabela 2.** Latirani, tigljani, pepluani, ingoli i fitol izolovani iz lateksa biljnih vrsta roda *Euphorbia*



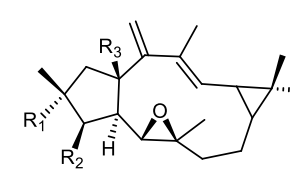
67–69



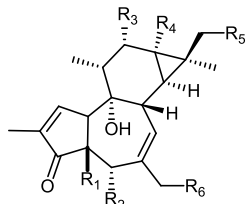
70



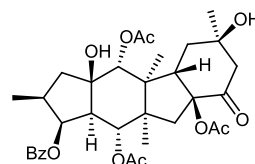
71–85



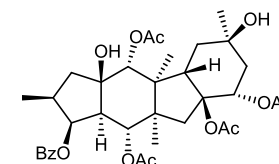
86–90



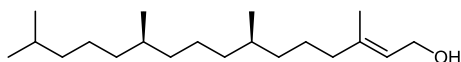
91–117



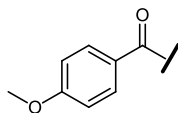
118



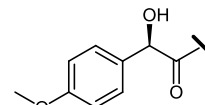
119



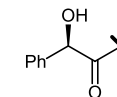
120



A



B



C

R. br.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	Ime	Biljna vrsta
67	$\alpha$ -Me	OiBu	H	OAc	/	/	8 $\alpha$ ,15 $\beta$ -Diacetoksi-3 $\beta$ -izobutanoiloksi-4 $\alpha$ ,9 $\alpha$ H,11 $\alpha$ H-latira-5E,11E-dien-14-on	<i>E. laurifolia</i> <sup>32</sup>
68	$\beta$ -Me	OiBu	H	OAc	/	/	2-epi-8 $\alpha$ ,15 $\beta$ -Diacetoksi-3 $\beta$ -izobutanoiloksi-4 $\alpha$ ,9 $\alpha$ H,11 $\alpha$ H-latira-5E,11E-dien-14-on	<i>E. laurifolia</i> <sup>32</sup>

**Tabela 2.** Nastavak.

69	$\alpha$ -Me	OH	2,4-oktadienoat	H	/	/	Eufohelioskopin A	<i>E. helioscopia</i> <sup>30</sup>
70	/	/	/	/	/	/	3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,15 $\beta$ -Triacetoksi-4 $\alpha$ ,9 $\alpha$ H,11 $\alpha$ H-latira-6(17) <i>E</i> ,11 <i>E</i> -dien-14-on	<i>E. insularis</i> <sup>27</sup>
71	$\beta$ -Me	$\beta$ -OAc	OH	OTig	/	/	3,12-Di- <i>O</i> -acetil-8- <i>O</i> -tigloilingol	<i>E. lactea</i> <sup>32</sup>
72	$\beta$ -Me	$\beta$ -OBz	OAc	OAc	/	/	Ingol 7,8,12-triacetat-3-fenilacetat	<i>E. officinarum</i> <sup>33</sup>
73	$\beta$ -Me	$\beta$ -OA	OAc	OAc	/	/	Ingol 7,8,12-triacetat-3-(4-metoksifenil)acetat	<i>E. officinarum</i> <sup>33</sup>
74	$\beta$ -Me	$\beta$ -OBz	OAc	OMe	/	/	8-Metoksiingol 7,12-diacetat-3-fenilacetat	<i>E. officinarum</i> <sup>33</sup>
75	$\alpha$ -Me	$\alpha$ -OH	OAc	OBz			2,3-Diepiingol-7,12-diacetat-8-benzoat	<i>E. canariensis</i> <sup>34</sup>
76	$\alpha$ -Me	$\alpha$ -OH	OAc	OiBu			2,3-Diepiingol-7,12-diacetat-8-izobutirat	<i>E. canariensis</i> <sup>34</sup>
77	$\alpha$ -Me	$\beta$ -OAc	OAc	OBz			2- <i>epi</i> -Ingol-3,7,12-triacetat-8-benzoat	<i>E. canariensis</i> <sup>34</sup>
78	$\beta$ -Me	$\beta$ -OAc	OAc	OiVal			3,7,12-Triacetil-8-izovaleril-ingol	<i>E. tirucalli</i> <sup>35</sup>
79	$\beta$ -Me	$\beta$ -OAc	OAc	OBz			3,7,12-Triacetil-8-benzoilingol	<i>E. obtusifolia</i> <sup>31</sup>
80	$\beta$ -Me	$\beta$ -OAc	OAng	OMe			3,12-Diacetil-7-angeloil-8-metoksiingol	<i>E. obtusifolia</i> <sup>31</sup>
81	$\beta$ -Me	$\beta$ -OH	OAng	OMe			7-Angeloil-12-acetil-8-metoksiingol	<i>E. obtusifolia</i> <sup>31</sup>
82	$\beta$ -Me	$\beta$ -OAc	OH	OBz			3,12-Diacetil-8-benzoilingol	<i>E. obtusifolia</i> <sup>31</sup>
83	$\beta$ -Me	$\beta$ -OAc	OBz	ONic			3,12-Diacetil-8-nikotini-7-fenilacetil-19-acetoksiingol	<i>E. obtusifolia</i> <sup>31</sup>
84	$\beta$ -Me	$\beta$ -OAc	OB	OAc			Euforesin A	<i>E. resinifera</i> <sup>36</sup>
85	$\beta$ -Me	$\beta$ -OAc	OC	OAc			Euforesin B	<i>E. resinifera</i> <sup>36</sup>
86	H	OPr	OAc				15- <i>O</i> -Propionil-3- <i>O</i> -izobutiriljolkinol-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -oksid	<i>E. characias</i> <sup>37</sup>
87	H	OiBu	OAc				15- <i>O</i> -Acetil-3- <i>O</i> -izobutiriljolkinol-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -oksid	<i>E. characias</i> <sup>37</sup>
88	H	OTigl	OAc				15- <i>O</i> -Tigloil-3- <i>O</i> -izobutiriljolkinol-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -oksid	<i>E. characias</i> <sup>37</sup>
89	H	OBz	OAc				15- <i>O</i> -Benzoil-3- <i>O</i> -izobutiriljolkinol-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -oksid	<i>E. characias</i> <sup>37</sup>
90	H	ONic	OAc				15- <i>O</i> -Nikotinoil-3- <i>O</i> -izobutiriljolkinol-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -oksid	<i>E. characias</i> <sup>37</sup>
91	$\beta$ -H	H	OBz	OiBu	H	H	Euforbia faktor Pr <sub>1</sub>	<i>E. prolifer</i> <sup>38</sup>
92	$\beta$ -H	OH	OBz	OiBu	H	H	Euforbia faktor Pr <sub>2</sub>	<i>E. prolifer</i> <sup>38</sup>

**Tabela 2.** Nastavak.

93	$\beta$ -H	OH	OiBu	OiBu	H	H	Euforbia faktor Pr <sub>3</sub>	<i>E. prolifer</i> <sup>38</sup>
94	$\beta$ -H	H	2,4-dekadienoat	OiBu	H	OH	Euforbia faktor Pr <sub>4</sub>	<i>E. prolifer</i> <sup>38</sup>
95	$\beta$ -H	H	2,4,6-dekatrienoat	OiBu	H	OH	Euforbia faktor Pr <sub>5</sub>	<i>E. prolifer</i> <sup>38</sup>
96	$\beta$ -OH	H	H	OiBu	OAng	OAc	12-Deoksiforbol-13-izobutirat-16-angelat-20-acetat	<i>E. cooperi</i> N. E. Br. <sup>39</sup>
97	$\beta$ -OH	H	H	OCOC <sub>11</sub> H <sub>23</sub>	H	OAc	12-Deoksi-4 $\beta$ -hidroksiforbol-13-dodecenoat-20-acetat	<i>E. fortissima</i> <sup>40</sup>
98	$\beta$ -OH	H	H	OTigl	H	OAc	12-Deoksi-4 $\beta$ -hidroksiforbol-13-tigliat-20-acetat	<i>E. fortissima</i> <sup>40</sup>
99	$\beta$ -OH	H	H	OiBu	H	OAc	12-Deoksi-4 $\beta$ -hidroksiforbol-13-izobutirat-20-acetat	<i>E. fortissima</i> <sup>40</sup>
100	$\beta$ -OH	H	H	OMeBu	H	OAc	12-Deoksi-4 $\beta$ -hidroksiforbol-13- $\alpha$ -metilbutirat-20-acetat	<i>E. fortissima</i> <sup>40</sup>
101	$\beta$ -OH	H	H	OCOC <sub>11</sub> H <sub>23</sub>	H	H	12-Deoksi-4 $\beta$ -hidroksiforbol-13-dodecenoat	<i>E. fortissima</i> <sup>40</sup>
102	$\beta$ -OH	H	H	OTigl	H	H	12-Deoksi-4 $\beta$ -hidroksiforbol-13-tigliat	<i>E. fortissima</i> <sup>40</sup>
103	$\beta$ -H	H	(2Z,4E)-2,4-oktadienoil	OAc	H	OH	12-O-(2Z,4E)-Oktadienoil-4-deoksiforbol-13-acetat	<i>E. tirucalli</i> <sup>41</sup>
104	$\alpha$ -H	H	(2Z,4E)-2,4-oktadienoil	OH	H	OH	4-Deoksi-4 $\alpha$ -forbol-12-(2Z,4E)-oktadienoat	<i>E. tirucalli</i> <sup>41</sup>
105	$\beta$ -OH	H	H	OTetradek	H	OH	12-Deoksiforbol-13-tetradekanoat	<i>E. fischeriana</i> <sup>36</sup>
106	$\beta$ -OH	H	H	7Z-heksadecenoil	H	OH	12-Deoksiforbol-13-(7Z)-heksadecenoat	<i>E. fischeriana</i> <sup>36</sup>
107	$\beta$ -OH	H	H	OLin	H	OH	12-Deoksiforbol-13-(9Z,12Z)-oktadekadienoat	<i>E. fischeriana</i> <sup>36</sup>
108	$\beta$ -OH	H	H	OPalm	H	OH	12-Deoksiforbol-13-heksadekanoat	<i>E. fischeriana</i> <sup>36</sup>
109	$\beta$ -OH	H	H	6Z-oktadecenoil	H	OH	12-Deoksiforbol-13-(6Z)-oktadecenoat	<i>E. fischeriana</i> <sup>36</sup>
110	$\beta$ -H	H	OCO(CH=CH) <sub>2</sub> C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	OAc	H	OAc	12-O-(2Z,4E)-Oktadienoil-4-deoksiforbol-13,20-diacetat	<i>E. broteri</i> <sup>42</sup>
111	$\beta$ -OH	H	OCO(CH=CH) <sub>2</sub> C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	OAc	H	OAc	12-O-(2Z,4E)-Oktadienoil)-forbol-13,20-diacetat	<i>E. broteri</i> <sup>42</sup>
112	$\beta$ -H	H	OiBu	OiBu	H	H	4,20-Dideoksiforbol-12,13-bis(izobutirat)	<i>E. obtusifolia</i> <sup>31</sup>
113	$\beta$ -H	H	OiBu	OiBu	H	OH	4-Deoksiforbol-12,13-bis(izobutirat)	<i>E. obtusifolia</i> <sup>31</sup>

**Tabela 2.** Nastavak.

114	$\beta$ -H	H	OiBu	OiBu	OAc	OH	17-Acetoksi-4-deoksiforbol-12,13-bis(izobutirat)	<i>E. obtusifolia</i> <sup>31</sup>
115	$\beta$ -H	H	OiBu	OiBu	OAc	H	17-Acetoksi-4,20-dideoksiforbol-12,13-bis(izobutirat)	<i>E. obtusifolia</i> <sup>31</sup>
116	$\beta$ -H	H	OiBu	OiBu	H	OAc	4-Deoksiforbol-12,13-bis(izobutirat)-20-acetat	<i>E. obtusifolia</i> <sup>31</sup>
117	$\alpha$ -H	H	OiBu	OiBu	H	OH	4- <i>epi</i> -4-Deoksiforbol-12,13-bis(izobutirat)	<i>E. obtusifolia</i> <sup>31</sup>
118	/	/	/	/	/	/	(2S*,3S*,4R*,5R*,6R*,8R*,11R*,13S*,14S*,15R*,16R*)-5,8,15-Triacetoksi-3-benzoiloksi-11,16-dihidroksi-9-oksopleuan	<i>E. lactea</i> <sup>32</sup>
119	/	/	/	/	/	/	(2S*,3S*,4R*,5R*,6R*,8R*,9R*,11R*,13S*,14S*,15R*,16R*)-5,8,9,15-Tetraacetoksi-3-benzoiloksi-11,16-dihidroksipepluan	<i>E. lactea</i> <sup>32</sup>
120	/	/	/	/	/	/	Fitol	<i>E. cauducifolia</i> <sup>43</sup>

**Tabela 3.** Ingenani izolovani iz lateksa biljnih vrsta roda *Euphorbia*

R. br.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Ime	Biljna vrsta
121–161						
162–165						
					A	
					B	
					C	
					D	
121	OD	H	H	OAc	Miliamin L	<i>E. milli</i> var. <i>hislopii</i> <sup>44</sup>
122	OH	OD	H	OAc	Miliamin M	<i>E. milli</i> var. <i>hislopii</i> <sup>44</sup>
123	OAc	OD	H	OAc	Miliamin N	<i>E. milli</i> var. <i>hislopii</i> <sup>44</sup>
124	OB	OH	H	OAc	Miliamin J	<i>E. milli</i> var. <i>hislopii</i> <sup>44</sup>
125	OA	OH	H	OAc	Miliamin A	<i>E. milli</i> var. <i>hislopii</i> <sup>44</sup>
126	OA	OAc	H	OH	Miliamin E	<i>E. milli</i> var. <i>hislopii</i> <sup>44</sup>
127	OH	OA	H	OAc	Miliamin D	<i>E. milli</i> var. <i>hislopii</i> <sup>44</sup>
128	OC	OH	H	OAc	Miliamin K	<i>E. milli</i> var. <i>hislopii</i> <sup>44</sup>
129	OAng	OH	OPalm	OH	3- <i>O</i> -Angeloil-17- <i>O</i> -palmatoilingenol	<i>E. cauducifolia</i> L. <sup>45</sup>
130	OPalm	OAng	OH	OH	3- <i>O</i> -Palmatoil-5- <i>O</i> -angeloilingenol	<i>E. cauducifolia</i> L. <sup>45</sup>
131	OH	OAng	OPalm	OH	5- <i>O</i> -Angeloil-17- <i>O</i> -palmatoilingenol	<i>E. cauducifolia</i> L. <sup>45</sup>
132	OAng	OPalm	OH	OH	3- <i>O</i> -Angeloil-5- <i>O</i> -palmatoilingenol	<i>E. cauducifolia</i> L. <sup>45</sup>
133	OH	OH	Otetradek-(2,4,6)-trienoil	OPalm	17- <i>O</i> -(2 <i>Z</i> ,4 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> )-Tetradeka-(2,4,6)-trienoil-20- <i>O</i> -palmatoilingenol	<i>E. cauducifolia</i> L. <sup>45</sup>
134	OH	OAng	OBz	OH	5- <i>O</i> -Angeloil-17- <i>O</i> -benzoilingenol	<i>E. cauducifolia</i> L. <sup>45</sup>

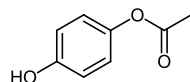
**Tabela 3.** Nastavak.

135	OH	OAng	OAc	OAc	5- <i>O</i> -Angeloil-17,20-diacetoksiingenol	<i>E. cauducifolia</i> L. <sup>45</sup>
136	OAng	OH	OBz	OAc	3- <i>O</i> -Angeloil-17- <i>O</i> -benzoil-20-acetoksiingenol	<i>E. cauducifolia</i> L. <sup>45</sup>
137	OAc	OAng	OBz	OH	3-Acetoksi-5- <i>O</i> -angeloil-17- <i>O</i> -benzoilingenol	<i>E. cauducifolia</i> L. <sup>45</sup>
138	OAc	OAng	OAc	OAc	5- <i>O</i> -Angeloil-3,17,20-triacetilingenol	<i>E. cauducifolia</i> L. <sup>45</sup>
139	OH	OAng	H	H	20-Deoksiingenol-5-angelat	<i>E. peplus</i> <sup>28</sup>
140	OAng	OH	H	OAc	Ingenol 20-acetat-3-angelat	<i>E. peplus</i> <sup>28</sup>
141	OAng	OH	H	H	20-Deoksiingenol-3-angelat	<i>E. peplus</i> <sup>28</sup>
142	OH	OH	2,4,6-Dekatrienoat	OH	17-[(2 <i>Z</i> ,4 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> )-Deka-2,4,6-trienoiloksiingenol	<i>E. cauducifolia</i> L. <sup>46</sup>
143	OAng	OH	2,4,6-Dekatrienoat	OH	3- <i>O</i> -Angeloil-17-[(2 <i>Z</i> ,4 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> )-deka-2,4,6-trienoiloksiingenol	<i>E. cauducifolia</i> L. <sup>46</sup>
144	OAc	OH	OH	OAng	3- <i>O</i> -Acetil-20- <i>O</i> -angeloil-17-hidroksiingenol	<i>E. cauducifolia</i> L. <sup>46</sup>
145	OAng	OH	OAc	OH	17-(Acetiloksi)-3- <i>O</i> -angeloil-ingenol	<i>E. cauducifolia</i> L. <sup>46</sup>
146	OAng	OH	OH	OAc	20- <i>O</i> -Acetil-3- <i>O</i> -angeloil-17-hidroksiingenol	<i>E. cauducifolia</i> L. <sup>46</sup>
147	OAng	OH	OBz	OH	3- <i>O</i> -Angeloil-17-(benzoiloksi)ingenol	<i>E. cauducifolia</i> L. <sup>46</sup>
148	OAng	OH	OBz	OAc	20- <i>O</i> -Acetil-3- <i>O</i> -angeloil-17-(benzoiloksi)ingenol	<i>E. cauducifolia</i> L. <sup>46</sup>
149	OAng	OH	H	OAc	Ingenol-3-angelat-20-acetat	<i>E. canariensis</i> <sup>34</sup>
150	OAng	OH	OBz	OH	Ingenol-3-angelat-17-benzoat	<i>E. canariensis</i> <sup>34</sup>
151	OAng	OH	OBz	OAc	Ingenol-3-angelat-17-benzoat-20-acetat	<i>E. canariensis</i> <sup>34</sup>
152	OAng	OH	OAc	OAc	Ingenol-3-angelat-17,20-diacetat	<i>E. canariensis</i> <sup>34</sup>
153	OAng	OH	H	OH	Ingenol-3-angelat	<i>E. peplus</i> <sup>28</sup>
154	OAng	OAc	H	OAc	Ingenol-3-angelat-5,20-diacetat	<i>E. canariensis</i> <sup>34</sup>
155	OAng	H	H	OAc	5-Deoksiingenol-3-angelat-20-acetat	<i>E. canariensis</i> <sup>34</sup>
156	OH	OH	OBz	OAng	Ingenol-17-benzoat-20-angelat	<i>E. canariensis</i> <sup>34</sup>
157	OAc	OAc	OBz	OAng	Ingenol-3,5-diacetat-17-benzoat-20-angelat	<i>E. canariensis</i> <sup>34</sup>

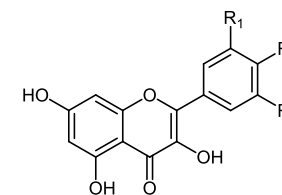


**Tabela 3.** Nastavak.

158	OCO(CH=CH) <sub>2</sub> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	OH	H	OAc	20-Acetil-ingenol-3-dekadienoat	<i>E. broteri</i> <sup>42</sup>
159	OCOC <sub>13</sub> H <sub>27</sub>	OAc	H	OAc	3- <i>O</i> -Tetradekanoil-ingenol	<i>E. broteri</i> <sup>42</sup>
160	OAc	OAc	H	OCOC <sub>13</sub> H <sub>27</sub>	20- <i>O</i> -Tetradekanoil-ingenol	<i>E. broteri</i> <sup>42</sup>
161	OAc	OCOC <sub>13</sub> H <sub>27</sub>	H	OAc	5- <i>O</i> -Tetradekanoil-ingenol	<i>E. broteri</i> <sup>42</sup>
162	CO(CH=CH) <sub>3</sub> C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	OAng	OH	Ingenol-3-(2,4,6-dekatrienoat)-16-angelat	<i>E. hermentiana</i> <sup>47</sup>
163	Ang	Ac	OAc	OAc	Ingenol-3-angelat-5,16,20-triacetat	<i>E. hermentiana</i> <sup>47</sup>
164	Ang	H	OAc	OAc	Ingenol-16,20-diacetat	<i>E. hermentiana</i> <sup>47</sup>
165	Ang	H	OAc	H	20-deoksiingenol-3-angelat-16-acetat	<i>E. hermentiana</i> <sup>47</sup>

**Tabela 4.** Fenolna jedinjenja izolovana iz lateksa biljnih vrsta roda *Euphorbia*

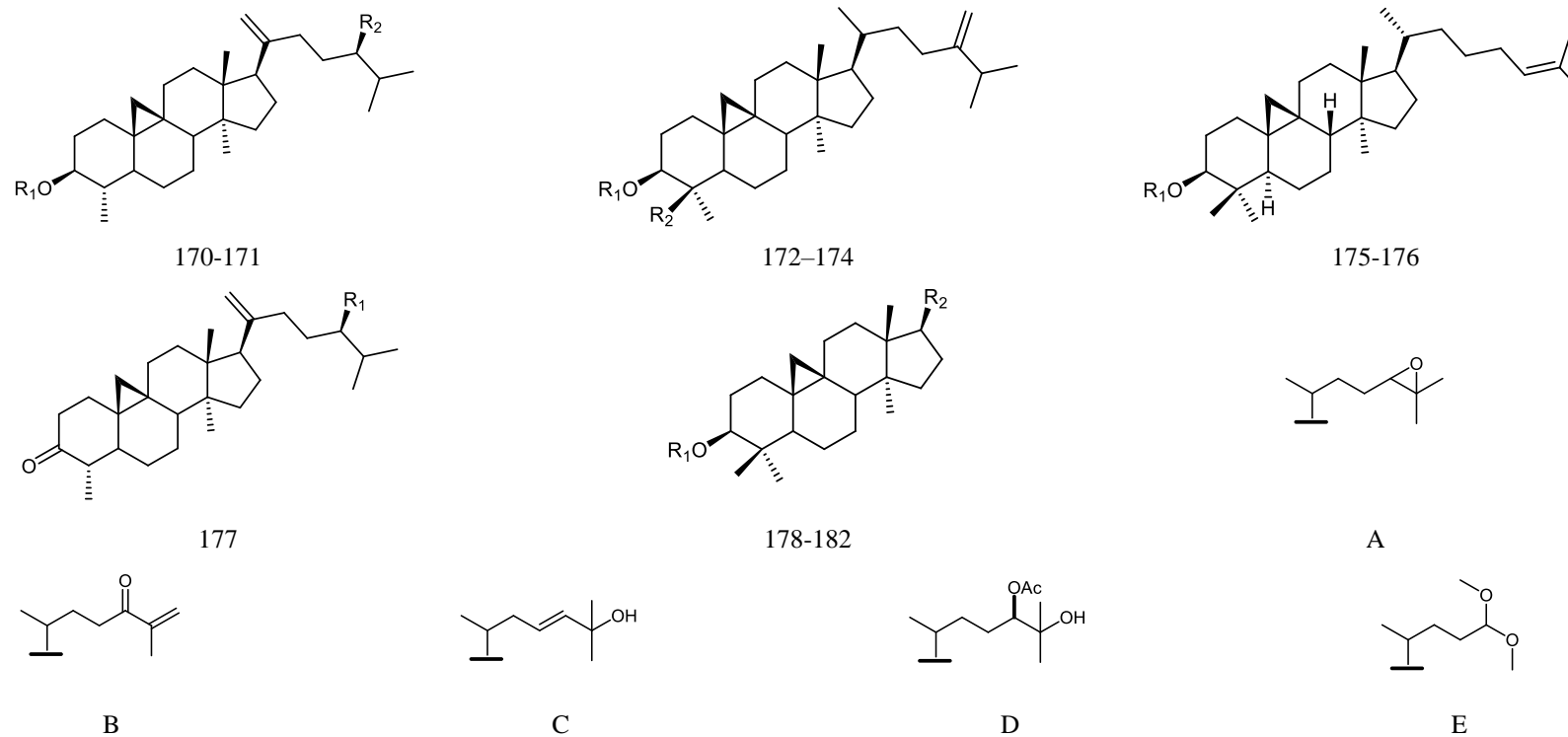
166



167-169

R. br.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Ime	Biljna vrsta
166	/	/	/	4-Hidroksifenil acetat	<i>E. antiquorum</i> <sup>48</sup>
167	OH	OH	H	Kvercetin	<i>E. helioscopia</i> <sup>49</sup>
168	OH	OH	OH	Miricetin	<i>E. helioscopia</i> <sup>49</sup>
169	H	OH	H	Kemferol	<i>E. helioscopia</i> <sup>49</sup>

**Tabela 5.** Cikloartanski derivati izolovani iz lateksa biljnih vrsta roda *Euphorbia*

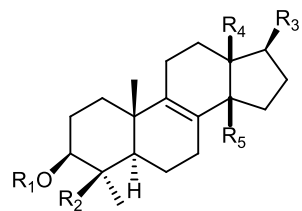


R. br.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Ime	Biljna vrsta
170	H	Et	Ciklokaducinol	<i>E. cauducifolia</i> <sup>50</sup>
171	H	Me	19-Cikloholest-20-en-3 $\beta$ -ol	<i>E. tirucalli</i> <sup>51</sup>
172	H	Me	24-Metilencikloartanol	<i>E. peplus</i> <sup>52</sup>
173	H	H	Cikloeukalenol	<i>E. antiqorum</i> <sup>48</sup>
174	Ac	Me	24-Metilencikloartanil acetat	<i>E. broteri</i> <sup>53</sup>

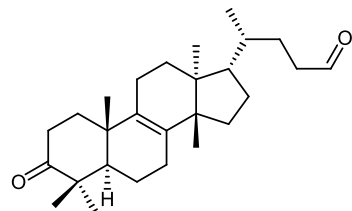
**Tabela 5.** Nastavak.

175	H	/	Cikloartenol	<i>E. peplus</i> <sup>52</sup>
176	Ac		3 $\beta$ -Acetoksicikloartenol	<i>E. broteri</i> <sup>53</sup>
177	OH	/	9,19-Ciklolanost-20(21)-en-24-ol-3-on	<i>E. neriifolia</i> <sup>54</sup>
178	OAc	A	24,25-Epoksicikloartan	<i>E. broteri</i> <sup>53</sup>
179	OAc	B	3 $\beta$ -Acetoksicikloart-25-en-24-on	<i>E. broteri</i> <sup>53</sup>
180	OAc	C	3 $\beta$ -Acetoksicikloart-23-en-25-ol	<i>E. broteri</i> <sup>53</sup>
181	OAc	D	3 $\beta$ ,24-Diacetoksi-25-hidroksicikloart	<i>E. broteri</i> <sup>53</sup>
182	OAc	E	25,26,27-Trisnor-3 $\beta$ -acetoksi-24,24-dimetoksicikloartan	<i>E. broteri</i> <sup>53</sup>

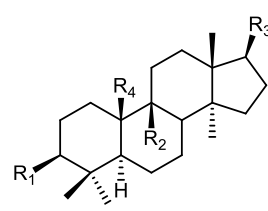
**Tabela 6.** Derivati eufola, sitosterola i ostala jedinjenja izolovana iz lateksa biljnih vrsta roda *Euphorbia*



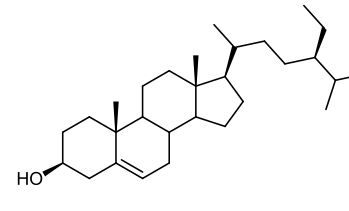
184-190



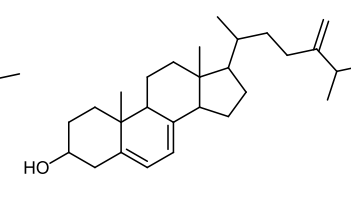
191



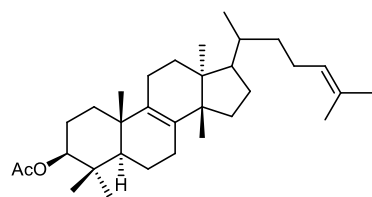
192-194



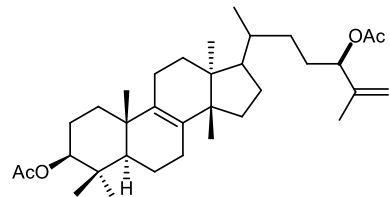
195



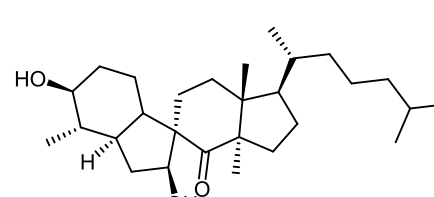
196



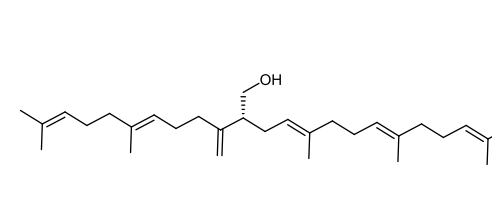
197



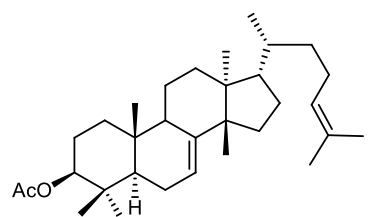
198



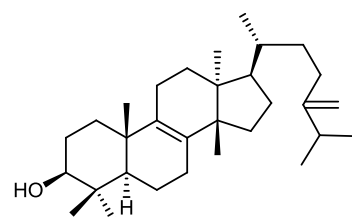
199



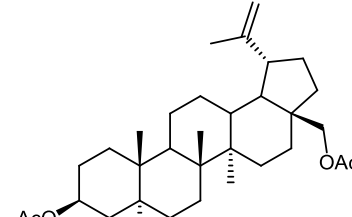
200



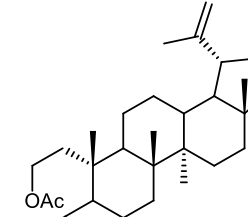
201



202



203



204

Tabela 6. Nastavak.

R. br.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	Ime	Biljna vrsta
184	Cinn	Me	A	$\alpha$ -Me	$\beta$ -Me	Eufol-3-cinamat	<i>E. antiquorum</i> <sup>48</sup>
185	H	Me	A	$\alpha$ -Me	$\beta$ -Me	Eufol	<i>E. antiquorum</i> <sup>48</sup>
186	H	Me	B	$\alpha$ -Me	$\beta$ -Me	Tirukalol	<i>E. lactea</i> Haw. <sup>55</sup>
187	H	H	C	$\beta$ -Me	$\alpha$ -Me	Obtusifoliol	<i>E. peplus</i> <sup>52</sup>
188	H	Me	C	$\alpha$ -Me	$\beta$ -Me	$\alpha$ -Euforbol	<i>E. resinifera</i> <sup>56</sup>
189	H	H	D	$\beta$ -Me	$\alpha$ -Me	31-Norlanostenol	<i>E. resinifera</i> <sup>56</sup>
190	H	Me	E	$\beta$ -Me	$\alpha$ -Me	Lanosterol	<i>E. resinifera</i> <sup>56</sup>
191	/	/	/	/	/	3-Okso-25,26,27-trinor-(5 $\alpha$ ,13 $\alpha$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ )-lanost-8-en-24-ol	<i>E. cauducifolia</i> <sup>45</sup>
192	OCinn	H	F	Me	/	Antikvuol A	<i>E. antiquorum</i> <sup>48</sup>
193	OH	Me	B	H	/	Antikvuol B	<i>E. antiquorum</i> <sup>48</sup>
194	H	H	I	Me	/	Lanost-8-en-24-ol	<i>E. cauducifolia</i> <sup>45</sup>

**Tabela 6.** Nastavak.

195	/	Sitosterol	<i>E. antiquorum</i> <sup>48</sup>
196	/	24-Metilenlanosterol	<i>E. peplus</i> <sup>52</sup>
197		Eufol-acetat	<i>E. broteri</i> <sup>53</sup>
198		Eufan-8,25-dien-3 $\beta$ ,24-diacetat	<i>E. broteri</i> <sup>53</sup>
199		3S,4S,5R,7S,9R,14R-3,7-Dihidroksi-4,14-dimetil-7[8 $\rightarrow$ 9]-abeo-holestan-8-on	<i>E. officinarum</i> <sup>33</sup>
200		Peplusol	<i>E. peplus</i> <sup>44</sup>
201		Butirospermil acetat	<i>E. broteri</i> <sup>53</sup>
202		Obtusifoliol	<i>E. broteri</i> <sup>53</sup>
203		Betulin diacetat	<i>E. broteri</i> <sup>53</sup>
204		3,4- <i>seko</i> -4(23),20(30)-Lupadien-3-metil estar	<i>E. broteri</i> <sup>53</sup>
205		3,4- <i>seko</i> -4(23),14-Terakseradien-3-metil estar	<i>E. broteri</i> <sup>53</sup>
206		3,4- <i>seko</i> -4(23),12-Oleadien-3-metil estar	<i>E. broteri</i> <sup>53</sup>
207	B	Euforol J	<i>E. resinifera</i> <sup>36</sup>
208	G	Euforol K	<i>E. resinifera</i> <sup>36</sup>
209		Kansuinon	<i>E. resinifera</i> <sup>36</sup>

Jedinjenja prisutna u lateksu imaju važnu ulogu u zaštiti biljke od predatora i patogena, ali mogu imati i važne farmakološke aktivnosti, kao što su antikancerogena, antivirusna i antiinflamatorna.<sup>57-63</sup>

#### 1.4. Medicinski značaj i primena biljnih vrsta roda *Euphorbia* L.

Upotreba biljnih vrsta roda *Euphorbia* u tradicionalnoj i savremenoj medicini je veoma raznovrsna. Ova raznovrsnost potiče od širokog spektra jedinjenja (sekundarnih metabolita) koja sintetišu biljke ovog roda. Upravo su sekundarni metaboliti odgovorni za lekovita, ali i toksična dejstva ekstrakata ovih biljaka.

Pojedine vrste roda *Euphorbia* odavno su poznate po svojim toksičnim dejstvima, koja, između ostalih, uključuju zapaljenje kože, konjuktivitis i laksativna dejstva.<sup>64</sup> Abdel-Fattah u svojim istraživanjima opisuje neke od vrsta ovog roda sa njihovim toksičnim karakteristikama. Tako su, npr., za ribe otrovne *E. scheffleri* Pax, *E. tirucalli* L. i *E. inaequilatera* Sond; za ljude su otrovne *E. ledienii* A. Berger, *E. heterophylla* L., *E. cooperi* N.E.Br. ex A. Berger, *E. candelabrum* Kotschy, *E. virosa* Willd., *E. poissonii* Pax, *E. unispina* N.E.Br. i *E. venenifera* Tremaux ex Kotschy, dok su za domaće životinje otrovne *E. caput-medusae* L., *E. silenifolia* (Haworth) Sweet, *E. ingens* E. Mey. Ex Boiss. Vrste *E. tirucalli*, *E. poissonii*, *E. unispina* i *E. venenifera* imaju iritantno dejstvo.<sup>65, 66</sup> Pored toga, neke vrste ovog roda mogu izazvati ili uticati na razvoj nekih bolesti u organizmu. Tako, *E. tirucalli* i *E. leuconeura* mogu biti kancerogeni i pospešiti prekomernu deobu ćelija koja može rezultirati pojavom karcinoma.<sup>67-69</sup> Takođe, lateksi *E. tirucalli* i *E. royleana* mogu izazvati konjuktivitis ukoliko dođu u kontakt sa očima.<sup>67, 70</sup> Ekstrakti ovih biljaka u srednjem veku korišćeni su kao otrovi za strele.<sup>71</sup>

I pored toga, tokom istorije ove biljke su zauzele važno mesto u tradicionalnoj medicini za lečenje razolikih bolesti, kao što su migrena, infekcije parazitima, infekcije bakterijama, ali i kao sredstva za prekid trudnoće.<sup>30</sup>

Biljne vrste roda *Euphorbia* se i danas mnogo upotrebljavaju kod alternativnih lečenja (**Tabela 7**). Koriste se razni delovi biljke, list, cvet, ali se najčešće koristi lateks. *E. tirucalli* je poznata po svojim lekovitim dejstvima u lečenju bradavica, nekih

karcinoma, gonoreje, artritisa, astme, kašlja, bola u uhu, neuralgije, reumatizma, zubobolje, različitih izraslina na koži, tumora i dr.<sup>67, 72</sup> *E. thymifolia* se koristi kao antivirusni agens protiv simpleks virusa-2, dok se *E. maculata* koristi za lečenje kolere, dijareje i dizenterije.<sup>73, 74</sup> *E. peplus* L., *E. peploides*, *E. pilosa* i *E. palustris* se koriste u lečenju hidrofobije.<sup>74</sup> Za većinu vrsta, iako postoji detaljan opis kako se i u kojim količinama doziraju u narodnoj medicini, mehanizam delovanja nije jasan i ispitan i zbog toga je neophodno hemijsko ispitivanje sastava ekstrakata ovih biljaka kako bi se izbegla njihova toksična i neželjena dejstva.<sup>75</sup>

Od svih do sada izolovanih jedinjenja treba izdvojiti ingenol 3-angelat (jedinjenje 153, **Tabela 3**) koji je prvi put izolovan iz lateksa *E. paralias* L., a takođe je pronađen i u *E. peplus*.<sup>28</sup> Lateks *E. peplus* korišćen je u Australiji kao alternativna terapija kod kožnih bolesti.<sup>65</sup> Godine 1986. na slučajnom uzorku koji je obuhvatao oko 2000 ispitanika u Nambouru, Australija, 164 ispitanika je navelo da su koristili lateks ove biljke u tretmanu aktinične keratoze i kancera kože, i da su dobili pozitivne rezultate u pogledu izlečenja ovih kožnih bolesti.<sup>65</sup> Efikasnost lateksa ove biljke je potvrđena i u kliničkim ispitivanjima. U kliničkoj studiji tretman je trajao 3 dana i lateks je apliciran jedanput u toku dana. Ispitano je 48 lezija koje su uključivale intraepidermalni karcinom, karcinom bazalnih ćelija i karcinom skvamoznih ćelija. Kompletan klinički klirens od više od 50% lezija posle srednjeg vremena od 15 meseci podržao je dalja klinička ispitivanja ingenol-3-angelata za lečenje aktinične keratoze.<sup>66</sup>

Ingenol-3-angelat prošao je II i III fazu kliničkih ispitivanja i dobijen je lek pod nazivom Picato<sup>®</sup> koji se koristi za lečenje aktinične keratoze, kao i kod predkancerogenih i kancerogenih promena na koži.<sup>66</sup> Proizvodi se i prodaje u formi gela za spoljašnju upotrebu u dve različite koncentracije aktivne komponente. Ukoliko je potrebno da se primeni na koži lica, koristi se Picato<sup>®</sup> 0,015%, dok se za ostale delove kože koristi Picato<sup>®</sup> 0,05%.



**Tabela 7.** Upotreba biljki roda *Euphorbia* u tradicionalnoj medicini u Turskoj<sup>75</sup>

Biljna vrsta	Deo biljke	Upotreba
<i>E. myrsinites</i> L.	Lateks	Protiv crevnih parazita
<i>E. rigida</i> Bieb.	Lateks	Protiv crevnih parazita, antihemoroidik
<i>E. macroclada</i> Boiss.	Lateks	Antipiretik kod lečenja malarije, kod lečenja hemoroida, bradavica, ekcema, gljivičnih infekcija, analgetik kod zubobolje, kod ujeda zmija ili škorpija
<i>E. seguieriana</i> Necker	Lateks	Antipiretik kod lečenja malarije, antiinflamatorni agens, za zarastanje rana
<i>E. apios</i> L.	Koren	Laksativ
<i>E. stricta</i> L.	Lateks	Analgetik kod zubobolja, žuljeva
<i>E. armena</i> Prokh.	Lateks	Za zarastanje rana, kod stanja opstipacije
<i>E. falcata</i> L. sups. <i>falcata</i> var. <i>falcata</i>	Lateks	Kod lečenja ekcema i gljivičnih infekcija
<i>E. virgata</i> Waldst. & Kitt	Cvet	Kod lečenja ekcema
<i>E. coniosperma</i> Boiss.	Lateks, nadzemni delovi	Kod zarastanja rana, ujeda zmija ili škorpija, za uklanjanje bradavica

Savremena istraživanja pokazala su da diterpeni izolovani iz biljaka ovog roda mogu delovati kao analgetici,<sup>57</sup> antipiretici,<sup>58</sup> antimikrobno,<sup>59, 60</sup> antivirusno,<sup>61</sup> antiproliferativno<sup>58</sup> i selektivno citotoksično na ćelije raka.<sup>62, 63</sup>

Pored toga što postoji velika zainteresovanost naučnika za detaljna fitohemijska istraživanja ovog biljnog roda, istraživači se intenzivno bave i proučavanjem bioloških aktivnosti samih ekstrakata. Najčešće se ispituju vodeni, etanolni i heksanski ekstrakt. Neki od ekstrakata, za koje je dokazana pozitivna biološka aktivnost na ljudski organizam, bez neželjenih dejstava na isti, patentirani su kao lekovi (**Tabela 8**).

**Tabela 8.** Pregled odabranih patenata.<sup>5</sup>

Broj patenta	Pronalazač	Potraživanje/oboljenja	Vrsta	Datum patenta
US 5707631	Advanced plant Pharm. Inc.	Sastav terapijske biljke	<i>E. lathyris</i> L.	Januar 1998.
US 6844013	Peplin Biotech Pty.	Imuno-stimulacija	<i>E. peplus</i> , <i>E. hirta</i> , <i>E. drummondii</i>	Mart 2001.
US 2003/0165579 A1	LaRiviere Grubman & Payne LLP.	Inhibicija tumora	<i>E. antiquorum</i>	Februar 2002.
US 6432452	Peplin Biotech Pty.	Antikancer jedinjenja	<i>E. peplus</i> , <i>E. hirta</i> , <i>E. drummondii</i>	Avgust 2002.
US 2003/0171334 A1	Peter Gordon Parsons	Kancer prostate	<i>E. aaron-rossii</i> , <i>E. tirucalli</i> , <i>E. tomentella</i> , <i>E. tomentosa</i>	Septembar 2003.
US 6923993	Nicholas Dodato	Antikancer jedinjenja	<i>E. obesa</i>	Avgust 2005.
US 2007/0248694 A1	PhytoMyco Research Corp.	Antiinflamatorna svojstva	<i>E. hirta</i>	Oktobar 2007.
US 2005/0198905 A1	Rejesh Jain & others	Antirektalna i bolesti debelog creva	<i>E. prostrata</i>	Maj 2008.

Neki od ekstrakta koji su registrovani kao lekovi dostupni su u maloprodaji u apotekama ili čak marketima. Takav je npr. Euphorbium (resiniferatoxin) iz lateksa *E. resinifera* koji se prodaje kao „Complexe Lehning Euphorbium N 88” i koristi kao nazalni sprej protiv virusnih infekcija, rinitisa različitog porekla, sinuzitisa, kod hroničnog začepljena nosa, kod suve i upaljene nosne membrane, kao i za olakšavanje simptoma gripa.<sup>5, 76</sup> Ekstrakt *E. pilulifera*, opisan u Steadman's drugs časopisu, može se koristiti za lečenja astme, rinitisa i drugih respiratornih infekcija i kao antispazmolitik.<sup>76</sup> Dysentral<sup>®</sup> je ekstrakt *E. hirta* i koristi se prilikom tretmana kod dijareje, dok se Radix, ekstrakt korena *E. kansui*, koristi kao purgativ.<sup>77, 78</sup>

### 1.5. Biljna vrsta *Euphorbia palustris* L.

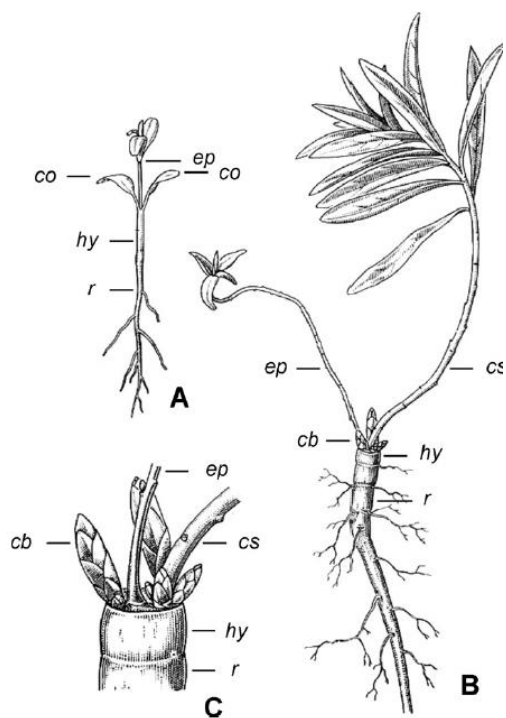
*Euphorbia palustris* L. je višegodišnja zeljasta biljka blede zelene boje koja dostiže visinu od 70–180 cm (najčešće oko 120 cm).<sup>79</sup> Kao i ostale biljke roda *Euphorbia*, ima specifičnu građu cveta i cvasti.<sup>14</sup> Cvetovi *E. palustris* su jednopolni i

sakupljeni u složene cvasti – cijacijume (**Slika 4**). Listovi su prosti sa zaliscima i postavljeni su naizmenično.<sup>79</sup>

**Slika 4.** *E. palustris* L.. A–kompleks cvasti sa nezrelim plodovima, B–trostruki ogranak cvasti sa terminalnim cijacijumima, C–cijacijum sa nezrelim plodom, D–cijacijum sa zrelim plodom, E–poprečni presek ovarijuma, F–seme, G–semenjača, H–neplodna mladica.<sup>15, 79</sup>



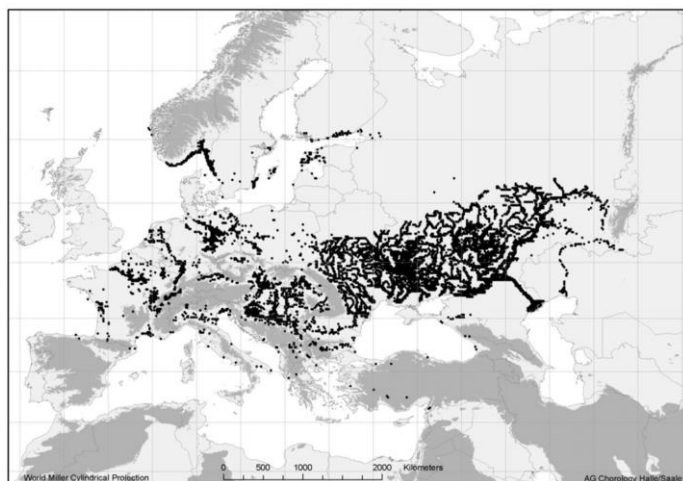
U stablu i listovima nalaze se mlečne cevi u kojima se sintetiše lateks. Korenov sistem je kod ove vrste žiličastog tipa i na osnovu njegovog izgleda može se proceniti starost biljke (**Slika 5**).<sup>79</sup>



**Slika 5.** *E. palustris* L.: A–sadnica, B–jednogodišnja biljka, C–vrh korena kod jednogodišnje biljke, r–koren, hy–hipokotil, ep–epikotil, co–kotiledon, cs–kotiledon izdanka, cb–kotiledon pupoljka.<sup>79, 80</sup>

*E. palustris* je poznata i pod nazivom barska mlečika. U literaturi se ova biljna vrsta može naći i pod drugim imenima, kao što su *Tithymalus palustris* L., *Euphorbia nuda* Velenovsky, *Euphorbia velenovsky* Bornm., *Euphorbia sauliana* Boreau ex Boiss.<sup>79</sup>

*E. palustris* je relativno retka vrsta, naročito u centralnoj Evropi. Može se naći od severne Španije na jugozapadu do južne Skandinavije na severozapadu, kao i od severozapada Kazahstana na severoistoku do jugoistočne Turske na jugoistoku (**Slika 6**).<sup>79</sup> Takođe, zapadni Sibir i Altajske planine mogu biti stanište ove vrste.<sup>57</sup> Postojanje ove vrste je zabeleženo u svim evropskim državama osim u Velikoj Britaniji, Irskoj, Belgiji, Islandu, Litvaniji, Portugalu i Malti. Najviše je ima u Mađarskoj, Hrvatskoj, Srbiji, Ukrajini i u stepskim i šumsko-stepskim oblastima evropskog jugoistočnog dela Rusije.<sup>81</sup> Na osnovu toga se može zaključiti da ovoj vrsti najviše odgovaraju suptropska (jugoistok Evrope) i umerena klima (severniji delovi Evrope).



**Slika 6.** Rasprostranjenost *E. palustris* L. u Evropi<sup>79</sup>

## 1.6. Biljna vrsta *Euphorbia lucida* Waldst. & Kit.

*Euphorbia lucida* Waldst. & Kit., kod nas poznata kao visoka mlečika, je zeljasta višegodišnja biljka sa snažnim vretenastim korenom.<sup>81</sup> Stabljika ove biljne vrste je snažna, gusto olistala, u gornjem delu razređeno granata (**Slika 7**). Dostiže visinu od 40–130 cm.<sup>81</sup> Listovi su, kao i kod većine biljaka ovog roda, žutozeleni, po obodu celi, sa skoro poprečnim nervima, goli i sjajni, sedeći, jajasto lancetasti, 5–12 cm dugi,

najširi pri osnovi, a onda se postepeno sužavaju u šiljat vrh, ređe zatupasti.<sup>22</sup> I *E. lucida* ima specifičnu građu cveta i cvasti.<sup>14</sup> Cvasti su metličasto izdužene, mnogoradijalne, terminalna šesto- do deseteradijalna sa kratkim, na vrhu dvaput dvoračvastim zracima.<sup>81</sup> Cijacijum je kratko peharast, 3–4 mm dug, sa polumesečastim nektarijama koje imaju kratke i tanke cilindrične roščiće.<sup>81</sup>



**Slika 7.** *Euphorbia lucida* Waldst. & Kit.<sup>82</sup>

Plod ove biljne vrste je gola, jajasta, duboko sa tri brazde usečena, tačkasta čaura.<sup>81</sup> Prilikom pucanja zrele čaure seme ovih biljaka može odleteti i 5–10 m od same biljke.<sup>81</sup> Seme je glatko, okruglo, svetle do žućkastomrke boje. Cveta od maja do jula.<sup>81</sup>

*E. lucida* raste na močvarnim livadama i obalnom žbunju, na vlažnom, peskovitom zemljištu. Prirodno stanište joj je na Balkanu i u srednjoj Evropi. U Srbiji se može naći na Fruškoj gori, u Beogradu (Ada Ciganlija, Makiš, Žarkovo) itd.<sup>81</sup>

### **1.7. Biljna vrsta *Euphorbia nicaeensis* All.**

*Euphorbia nicaeensis* All. (**Slika 8**), kod nas poznata kao uskolisna mlečika, je svetlo zelene boje.<sup>81</sup> Višegodišnja je biljka i raste u formi žbuna koji dostiže visinu od 30–40 cm sa korenovim sistemom vertikalnog tipa.<sup>11</sup> Stabljike su mnogobrojne, gole, često zadebljale, sa lancetastim ili skoro jajastim naizmenično raspoređenim golim listovima.<sup>11</sup> Listovi ove biljke su amfistomatski sa skoro jednakim brojem stoma sa obe

strane lista. Stome su anomocitnog tipa, okružene ograničenim brojem ćelija koje se ne razlikuju od ostalih epidermalnih ćelija po obliku i veličini.<sup>11, 14</sup> Takođe se odlikuje specifičnom građom cveta i cvasti.<sup>14</sup> Cvetovi su jednopolni i sakupljeni u složene cvasti – cijacijume.<sup>14</sup> Ispod terminalne cvasti je jedan broj bočnih štitova. Plod je glatka, gola ili mlada gusto dlakava čaura.<sup>11</sup> Seme je jajasto, glatko, sivo; širi se eksplozivnom disperzijom, kada odleće i do udaljenosti od 5 m. Cveta u maju i junu.<sup>11</sup>

U stablu i listovima i ove biljne vrste nalaze se mlečne cevi u kojima se sintetiše lateks.<sup>11</sup>

Ova biljna vrsta je veoma otporna na suve uslove življenja i uglavnom raste u krajevima sa malo padavina i dosta sunčanih dana (pogoduju joj visoke temperature).<sup>23</sup> Raste na peskovitim terenima, prisojnim stranama po krševima i stenama. U Srbiji je najrasprostranjenija u Vojvodini (Deliblatska peščara), ali se nalazi i u okolini Beograda, Niša i Pirota.<sup>11</sup>

*E. nicaeensis* je veoma polimorfna i kompleksna vrsta sa nizom opisanih geografskih varijeteta. Tipaska forma *E. nicaeensis* subsp. *nicæensis* je mediteranskog i gorskog karaktera (preferira krečnjak), nastanjuje područje Sredozemlja i severnu Afriku, dok je subsp. *glareosa* (Pallas et Bieb.) A. R. Sm. rasprostranjena u istočnoj Evropi i istočnim delovima centralne Evrope, pa raste i u našim krajevima.<sup>11</sup>

Sinonimi za ovu biljnu vrstu su *Euphorbia glareosa* M. B. i *Euphorbia pannonica* Host. subsp. *glareosa* A. R. Sm.<sup>11</sup>



**Slika 8.** *Euphorbia nicaeensis* All.

## **2. NAŠI RADOVI**

Cilj ove doktorske disertacije bio je ispitivanje hemijskog sastava sekundarnih metabolita biljnih vrsta *E. palustris*, *E. lucida* i *E. nicaeensis*, određivanje strukture izolovanih jedinjenja i ispitivanje bioloških aktivnosti odabranih sekundarnih metabolita.

Sekundarni metaboliti su izolovani primenom standardnih hromatografskih tehnika („dry-column flash” hromatografije, hromatografije na koloni, preparativne tankoslojne hromatografije i preparativne tečne hromatografije).

Strukture i relativne konfiguracije izolovanih jedinjenja određene su primenom masene spektrometrije visokog razlaganja (HRESIMS), 1D i 2D NMR spektroskopije ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY, NOESY, HSQC, HMBC), UV i IR spektroskopije i polarimetrije, kao i poređenjem dobijenih spektralnih podataka sa spektralnim podacima iz literature.

Odabrana jedinjenja podvrgnuta su testovima za ispitivanje bioloških aktivnosti.

## **2.1. Sekundarni metaboliti izolovani iz biljne vrste *Euphorbia palustris***

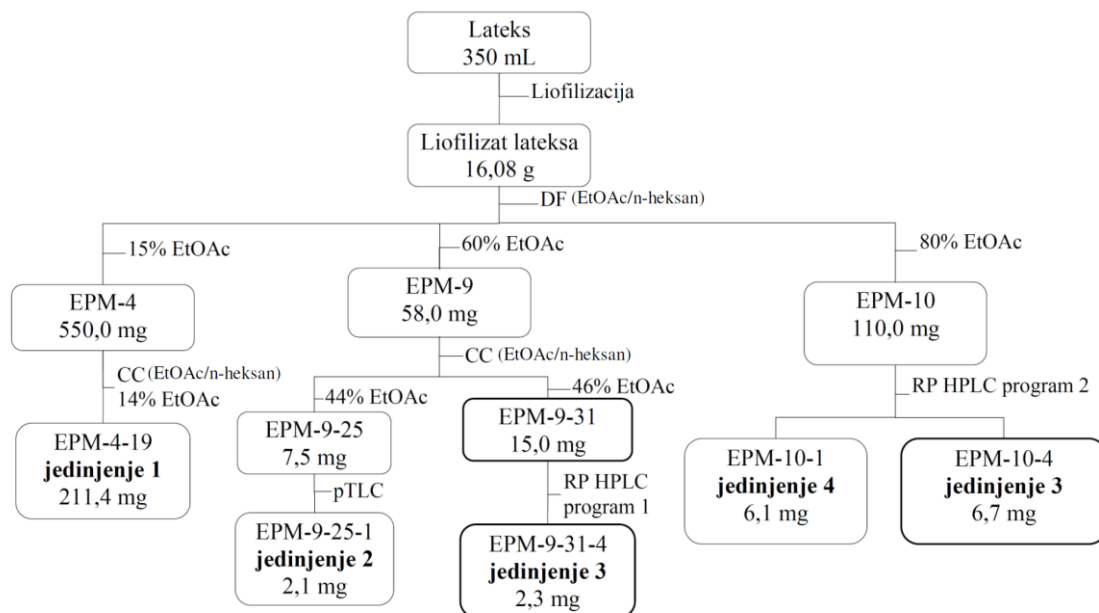
### **L.**

Lateks *E. palustris* prikupljan je u maju 2011. (oznaka EPM) i 2013. godine (oznaka EPH) u mestu Besni Fok u blizini Beograda (GPS koordinate 44°59'23,6"N; 20°23'52,1"E). Vaučer ove biljne vrste (No. 16877) deponovan je u herbarijumu Botaničke bašte „Jevremovac“ Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Lateks prikupljen 2011. godine najpre je liofilizovan i dalje frakcionisan. Liofilizovan lateks je suspendovan u 10% etil-acetatu u heksanu i grubo je frakcionisan brzom hromatografijom na koloni (DF) (gradijentno eluiranje sistemom od 100% *n*-heksana do 100% etil-acetata). Odabrane frakcije (na osnovu  $^1\text{H}$  NMR spektra) dalje su frakcionisane hromatografijom na gravitacionoj koloni (CC), preparativnom tankoslojnom hromatografijom (pTLC) ili reverzno faznom tečnom hromatografijom (RP LC). Postupak prečišćavanja materijala označenog kao EPM prikazan je na **Šemi 1**, dok su uslovi hromatografisanja detaljno opisani u poglavlju **3.2.1**.

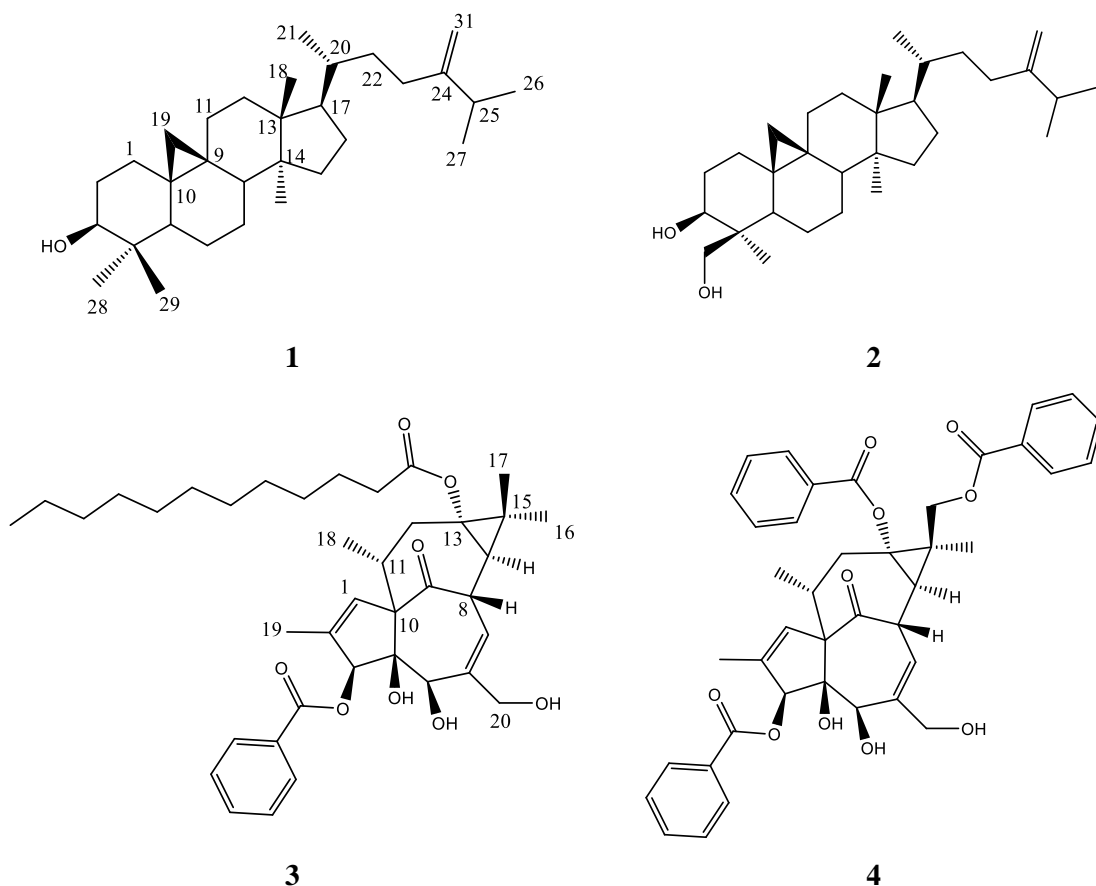


Na opisani način, iz lateksa *E. palustris* izolovana su četiri sekundarna metabolita – dva cikloartanska derivata (**1** i **2**) i dva ingenanska estra (**3** i **4**) čije su strukture prikazane na **Slici 9**.

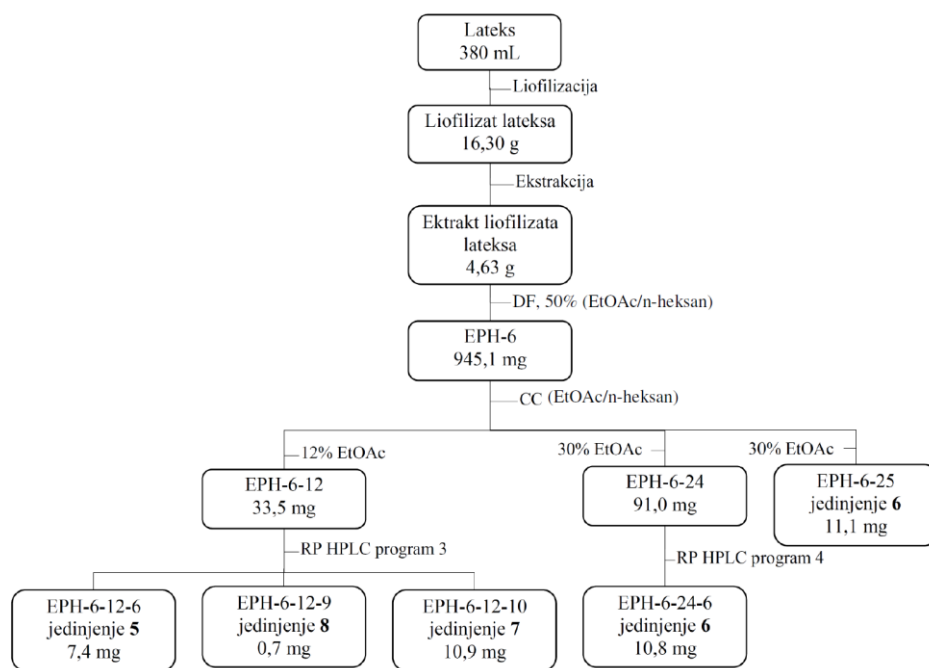


**Šema 1.** Put izolovanja jedinjenja 1–4 iz lateksa *E. palustris* (maj 2011.)

Lateks *E. palustris* prikupljan 2013. godine je posle liofilizacije ekstrahovan smešom etil-acetata i *n*-heksana (1/1,V/V). Dobijeni ekstrakt je frakcionisan „*dry-column flash*” hromatografijom, a frakcija EPH-6 je dalje frakcionisana kolonskom hromatografijom na silika gelu. Odabrane frakcije (na osnovu  $^1\text{H}$  NMR spektara) dodatno su prečišćavane reverzno faznom tečnom hromatografijom. Postupak frakcionisanja materijala označenog kao EPH prikazan je na **Šemi 2**, dok su uslovi hromatografisanja detaljno opisani u poglavlju **3.2.1**.

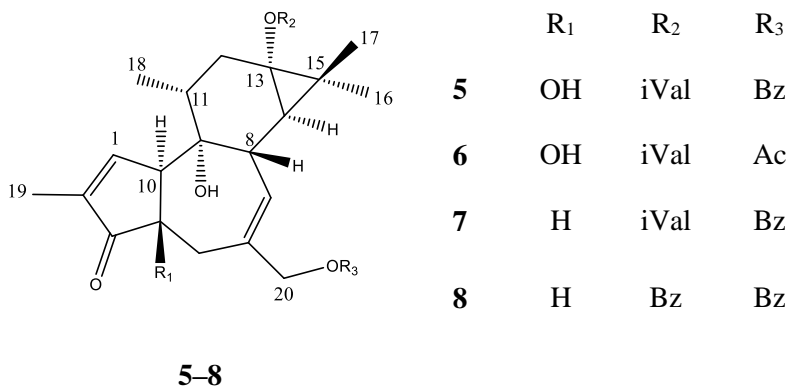


**Slika 9.** Strukture jedinjenja izolovanih iz lateksa *E. palustris* (maj 2011.)



**Šema 2.** Put izolovanja jedinjenja 5–8 iz lateksa *E. palustris* (maj 2013.)

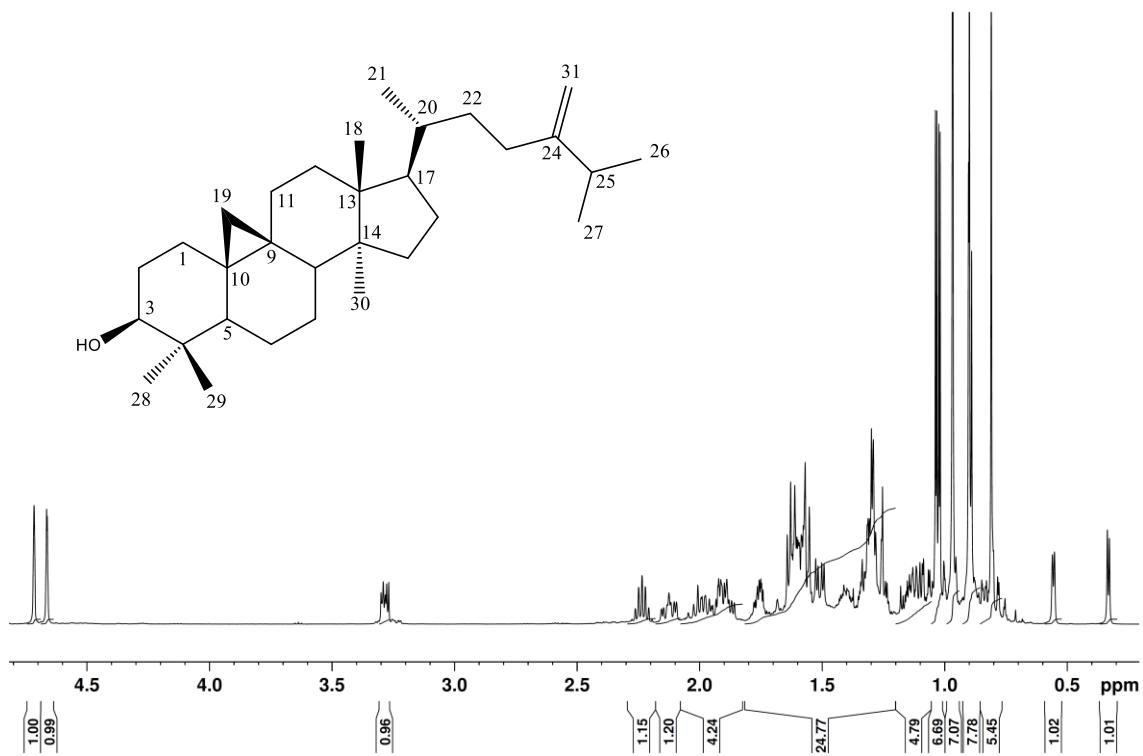
Iz lateksa *E. palustris* prikupljenog 2013. godine izolovana su četiri tiglijanska diterpena **5–8** (Slika 10). Jedinjenja **5**, **6** i **8** su po prvi put izolovani tiglijanski derivati.



**Slika 10.** Strukture jedinjenja izolovanih iz lateksa *E. palustris* (2013.)

### 2.1.1. 24-Metilencikloartan-3-ol (1)

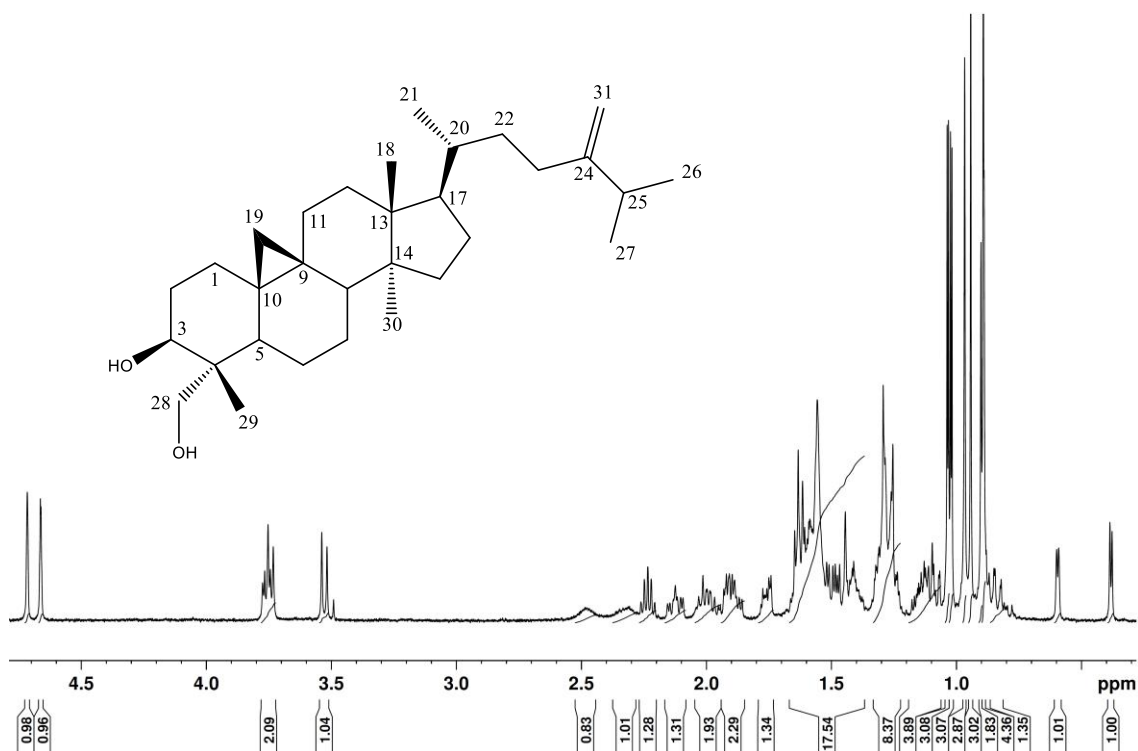
Jedinjenje **1** je izolovano kao bela amorfna susptanca. Njegova struktura određena je analizom  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektara, na osnovu kojih je dobijena i molekulska formula jedinjenja ( $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}$ ). Iz molekulske formule utvrđeno je da u molekulu postoji šest nezasićenja, od kojih jedno odgovara dvostrukoj ugljenik-ugljenik vezi (geminalno supstituisana). U  $^1\text{H}$  NMR spektru (**Slika 11**, **Tabela 9**) izdvajaju se dva dubleta na niskim hemijskim pomeranjima (0,33 i 0,55 ppm), sa integralima po 1H i malom konstantom kuplovanja ( $J=4$  Hz). U HSQC spektru uočavaju se korelacije ova dva dubleta sa istim ugljenikom (29,8 ppm). Ovakvi signali u  $^1\text{H}$  NMR spektru su karakteristični za triterpene cikloartanskog tipa i potiču od protona metilenske grupe iz ciklopropanovog prstena ( $\text{C}_{19}$ ). Analizom HSQC, HMBC, COSY i NOESY spektara određena je struktura izolovanog molekula. Pregledom literature i upoređivanjem podataka za hemijska pomeranja vodonika i ugljenika potvrđeno je da je izolovani molekul 24-metilencikloartan-3-ol, prvi put izolovan iz *E. peplus*.<sup>52</sup>



Slika 11. <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja 1

### 2.1.2. 24-Metilencikloartan-3,28-diol (2)

Jedinjenje **2** izolovano je kao bela amorfna supstanca molekulske formule  $C_{31}H_{52}O_2$ . Na osnovu molekulske formule, i u ovom jedinjenju postoji šest nezasićenja, od kojih jedno odgovara dvostrukoj ugljenik-ugljenik vezi (geminalno supstituisana). U  $^1H$  NMR spektru (**Slika 12, Tabela 9**) ovog jedinjenja, kao i kod jedinjenja **1**, uočavaju se dva dubleta (0,40 i 0,60 ppm) sa malom konstantom kuplovanja ( $J=4$  Hz) karakterističnom za cikloartanske derivate. Poređenjem eksperimentalnih i literaturnih podataka utvrđeno je da je izolovani molekul 24-metilencikloartan-3,28-diol, prvi put izolovan iz *E. guyoniana*.<sup>83</sup>



Slika 12.  $^1H$  NMR spektar jedinjenja **2**

**Tabela 9.**  $^1\text{H}$  (500 MHz) i  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) podaci za jedinjenja **1** i **2** ( $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz))

Položaj	<b>1</b>		<b>2</b>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1 $\alpha$	1,58* m		1,57* m	
1 $\beta$	1,25* m	32,0	1,24* m	31,7
2 $\alpha$	1,76* m		1,76* m	
2 $\beta$	1,58* m	30,4	1,62* m	30,2
3 $\alpha$	3,29 m	78,8	3,75 d (11,4; 4,0)	77,1*
4	-	40,5	-	43,7
5	1,30* m	47,1	1,47* m	42,5
6 $\alpha$	1,61* m		1,43* m	
6 $\beta$	0,80* m	21,1	0,83* m	21,0
7 $\alpha$	1,34* m		1,31* m	
7 $\beta$	0,97* m	28,1	1,08* m	25,7
8	1,51* m	48,0	1,50* m	47,9
9	-	20,0	-	19,9
10	-	26,1	-	26,4
11 $\alpha$	0,97* m		1,30* m	
11 $\beta$	1,34* m	26,0	1,92* m	28,1
12	1,30* m	35,6	1,30* m	35,6
13	-	45,3	-	45,2
14	-	48,8	-	48,7
15	1,64* m	32,9	1,63* m	32,9
16 $\alpha$	2,00 m		2,01 m	
16 $\beta$	1,11* m	26,5	1,11* m	26,4
17	1,62* m	52,3	1,61* m	52,3
18	0,90 s	18,0	0,97 s	18,0
19 egzo	0,33 d (4,0)		0,40 d (4,0)	
19 endo	0,55 d (4,0)	29,9	0,60 d (4,0)	30,0
20	1,40* m	36,1	1,40* m	36,1
21	0,90 d (6,5)	18,4	0,89 d (6,4)	18,3
22 $\alpha$	1,58* m		1,58* m	
22 $\beta$	1,15* m	35,0	1,15* m	35,0
23 $\alpha$	2,12 m		2,13 m	
23 $\beta$	1,91* m	31,3	1,89* m	31,3
24	-	156,9	-	156,9
25	2,24 sept (6,7)	33,8	2,23 sept (6,7)	33,8
26	1,03 d (6,7)	21,9	1,03 d (6,7)	21,9
27	1,03 d (6,7)	22,0	1,03 d (6,7)	22,0
28a			3,75 d (10,4)	
28b	0,82 s	14,0	3,53 d (10,4)	71,2
29	0,97 s	19,3	0,94 s	10,1
30	0,97 s	25,4	0,89 s	19,3
31a	4,72 brs		4,71 brs	
31b	4,61 brd (1,4)	105,9	4,61 brd (1,4)	106,1

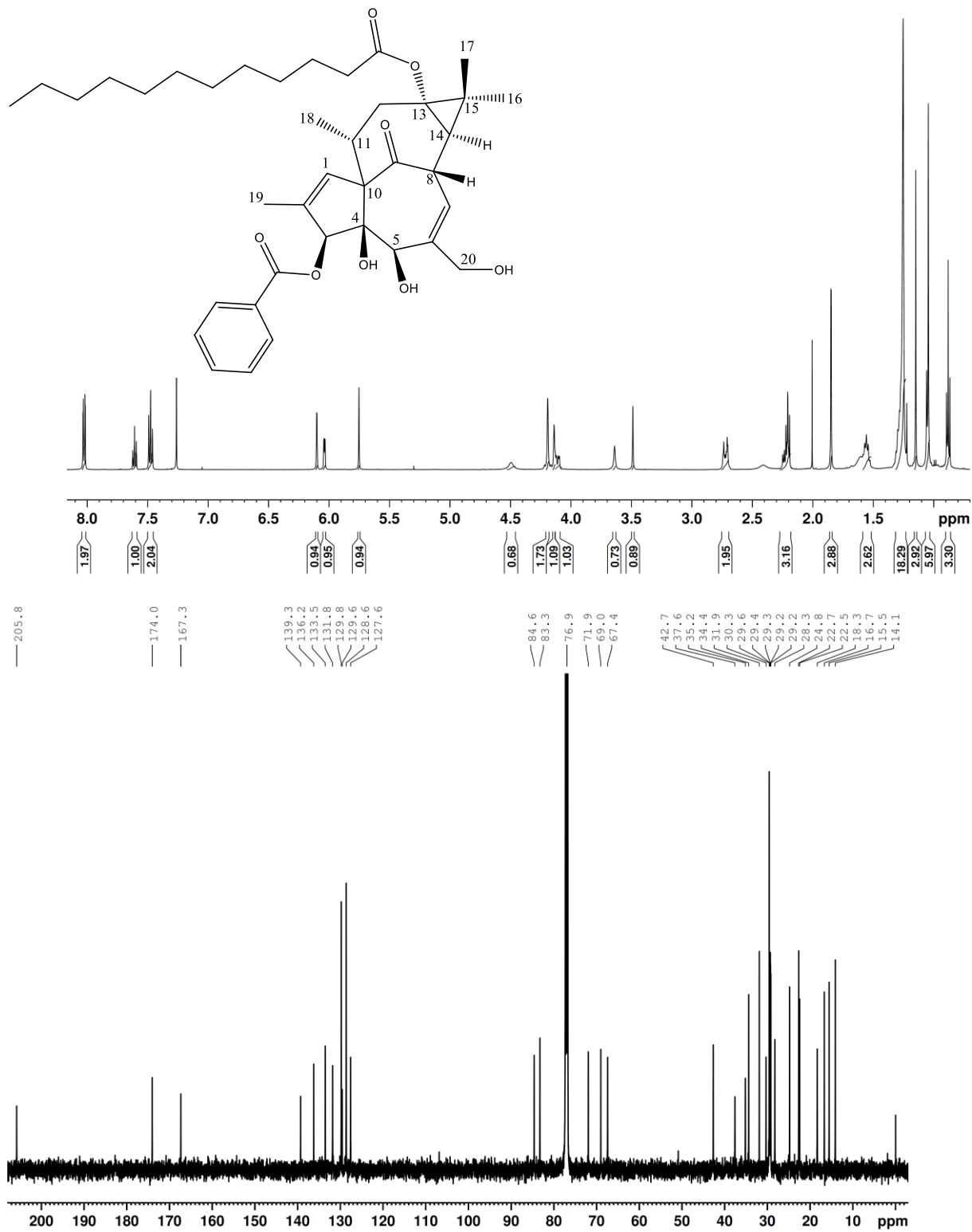
\* – hemijska pomeranja očitana iz HSQC spektra

### 2.1.3. 3 $\beta$ -Benzoiloksi-13 $\alpha$ -dodekanoiloksiingenol (3)

Jedinjenje **3** izolovano je iz lateksa *E. palustris* kao bezbojna amorfna supstanca. Analizom  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektara (**Slika 13**, **Tabela 10**) utvrđena je molekulska formula jedinjenja ( $\text{C}_{39}\text{H}_{54}\text{O}_8$ ), koja je potvrđena analizom HRESIMS spektra, na osnovu  $m/z$  vrednosti 651,3897 za  $[\text{M}+\text{H}]^+$  jon. Poređenjem literaturnih i eksperimentalnih podataka utvrđeno je da je izolovani molekul 3 $\beta$ -benzoiloksi-13 $\alpha$ -dodekanoiloksiingenol. Jedinjenje **3** opisano je prvi put kao sekundarni metabolit *E. kansui*.<sup>84</sup>

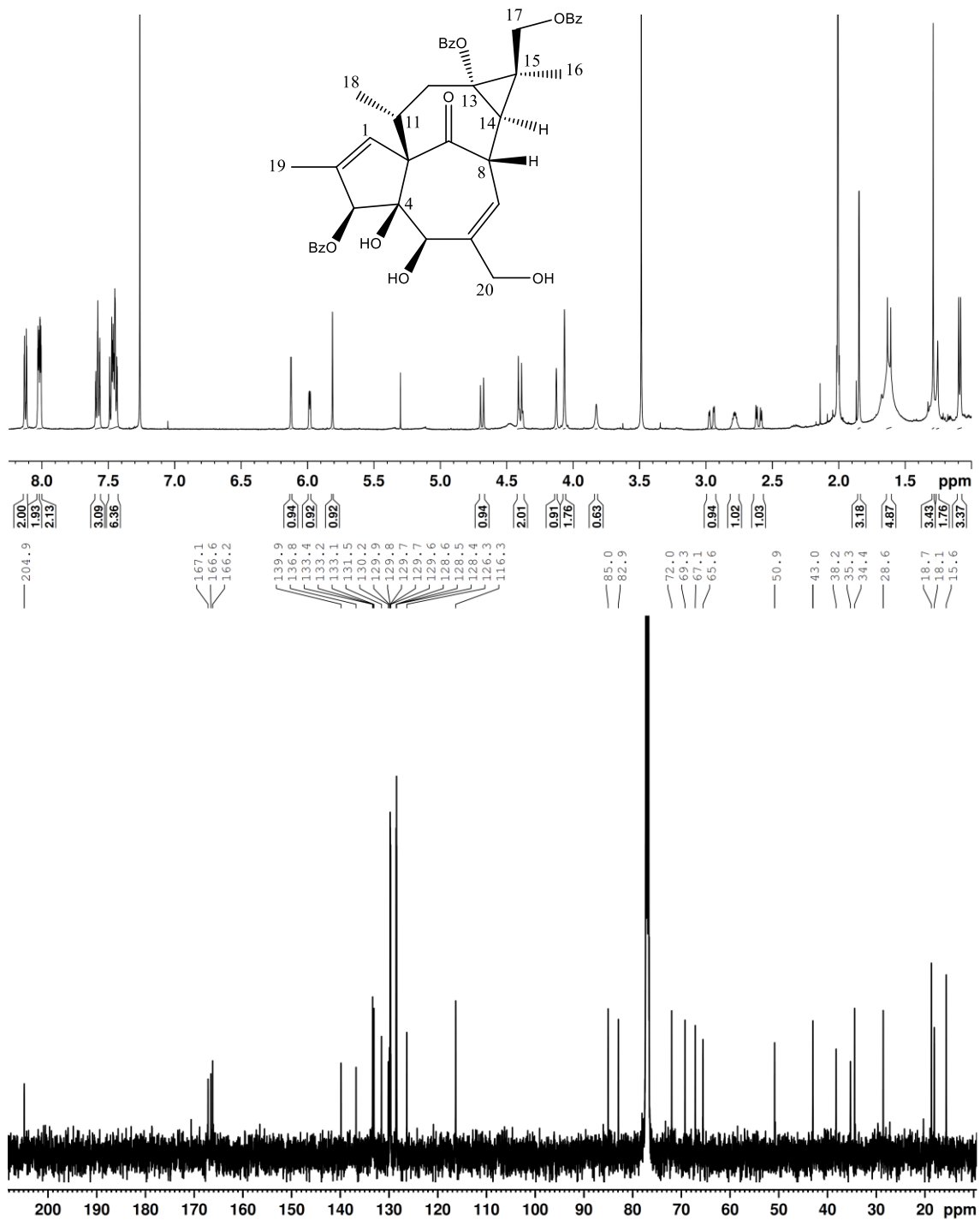
### 2.1.4. 3 $\beta$ ,13 $\alpha$ ,17-Tribenzoiloksiingenol (4)

Jedinjenje **4** izolovano je kao bezbojna amorfna supstanca. Molekulska formula jedinjenja ( $\text{C}_{41}\text{H}_{40}\text{O}_{10}$ ) određena je analizom  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektara (**Slika 14**, **Tabela 10**), a zatim je potvrđena analizom HRESIMS spektra, na osnovu  $m/z$  693,2424 za  $[\text{M}+\text{H}]^+$  jon. Struktura jedinjenja određena je primenom 2D NMR metoda (HSQC, HMBC, COSY i NOESY). Poređenjem literaturnih podataka sa eksperimentalnim utvrđeno je da je jedinjenje **4** 3 $\beta$ ,13 $\alpha$ ,17-tribenzoiloksiingenol, ranije izolovan kao sekundarni metabolit *E. esula*.<sup>85</sup>



Slika 13. <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektri jedinjenja 3





Slika 14.  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri jedinjenja 4

**Tabela 10.**  $^1\text{H}$  (500 MHz) i  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) podaci za jedinjenja **3** i **4** ( $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz))

Položaj	<b>3</b>		<b>4</b>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	6,10 d (1,4)	131,8	6,12 d (1,5)	131,6
2	-	136,2	-	136,8
3	5,75 s	83,3	5,81 s	82,9
4	-	84,6	-	85,0
5	4,14 s	76,9	4,13 s	76,6
6	-	139,3	-	139,9
7	6,04 d (4,5)	127,6	5,98 d (4,3)	126,3
8	4,10 dd (12,8; 4,9)	42,7	4,40 d (13,0)	43,0
9	-	205,8	-	204,9
10	-	71,9	-	72,0
11	2,71 m	37,6	2,78 m	38,2
12 $\alpha$	2,74 m	35,2	2,96 dd (17,0; 3,0)	35,3
12 $\beta$	2,24 m		2,60 dd (17,0; 4,4)	
13	-	69,0	-	69,3
14	1,22 m	28,3	1,62 d (13)	28,6
15	-	30,3	-	34,4
16	1,04 s	22,5	1,29 s	18,7
17a	1,15 s	16,7	4,69 d (11,9)	65,6
17b			4,39 d (11,9)	
18	1,05 d (7,0)	18,3	1,08 d (7,3)	18,1
19	1,85 d (1,4)	15,5	1,84 d (1,5)	15,6
20	4,19 s	67,4	4,07 s	67,1
OR-3				
C=O	-	167,3	-	167,2
1	-	129,6	-	130,2
2	8,03 dd (7,5;1,4)	129,8	8,01 dd (3,8; 1,6)	129,7
3	7,48 t (7,5)	128,6	7,43 m	128,4
4	7,61 tt (7,5; 1,4)	133,5	7,58 m	133,4
OR-13				
C=O	-	174,0	-	166,2
1	2,20 t (7,6)	34,4	-	129,9
2	1,56 m	24,8	8,02 dd (3,5; 1,5)	129,8
3	1,26 m	31,9*; 29,6*; 29,4*;	7,43 m	128,5
4	1,26 m	29,3*; 29,2*; 29,2*;	7,58 m	133,2
5-10	1,26 m	22,7*		
11	0,88 t (8,0)	14,1		
OR-17				
C=O			-	166,6
1			-	129,7
2			8,12 dd (8,6; 1,5)	129,7
3			7,43 m	128,6
4			7,58 m	133,1

\*— nesigurna asignacija

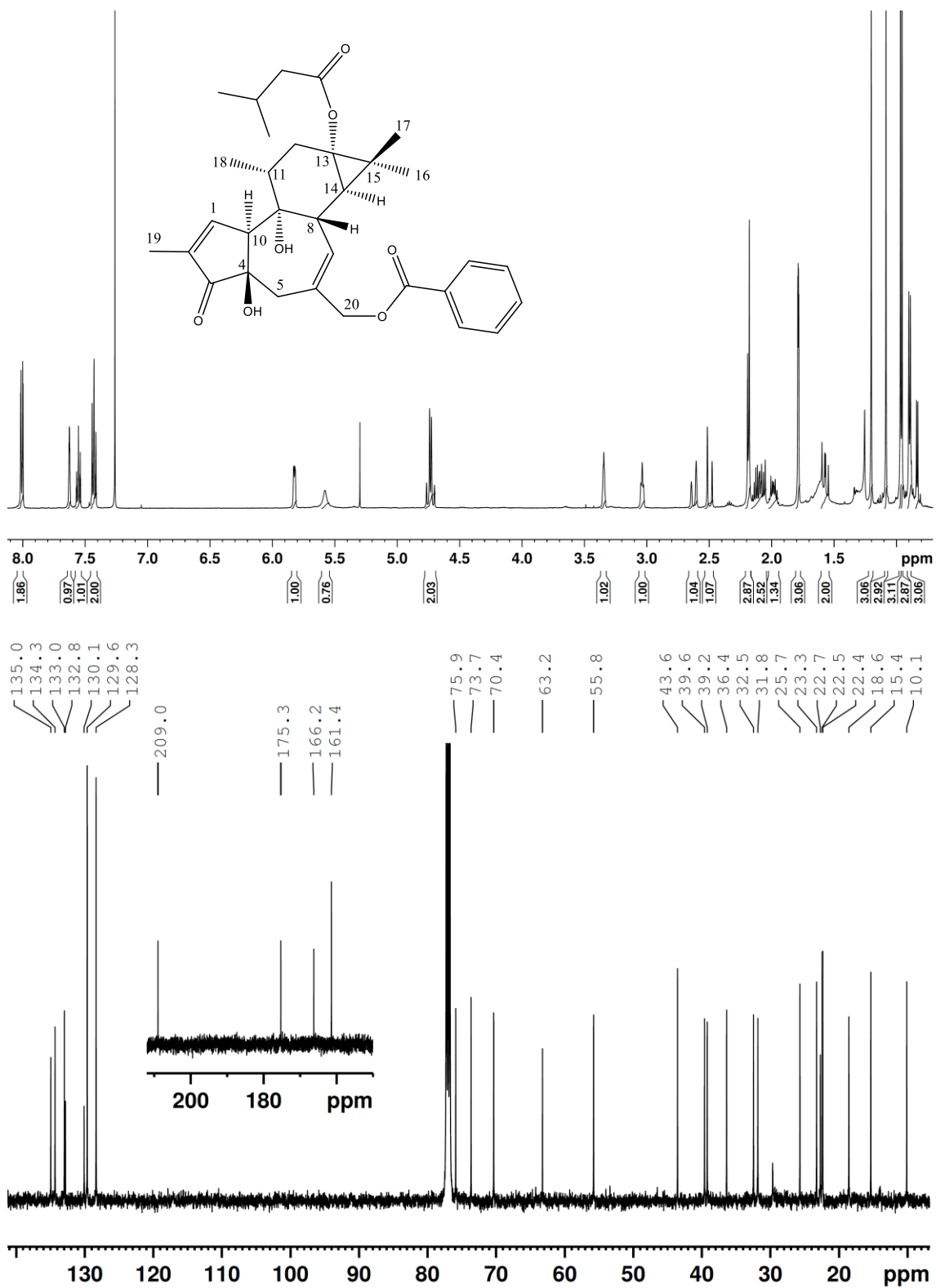
### 2.1.5. 20-Benzoiloksi-13 $\alpha$ -izovaleriloksi-12-deoksiforbol (5)

Jedinjenje **5** izolovano je kao bezbojna amorfna supstanca. Molekulska formula izolovanog jedinjenja ( $C_{32}H_{40}O_7$ ) određena je iz HRESIMS spektra na osnovu  $m/z$  537,2854 za  $[M+H]^+$  jon. Analizom  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR spektara (**Slika 15**, **Tabela 11**) zaključuje se da u izolovanom molekulu postoje dve estarske grupe (izovalerat i benzoat), jedna keto grupa i dve ugljenik-ugljenik dvostruke veze (obe trisupstituisane). Potpuna struktura jedinjenja određena je primenom 2D NMR tehnika.

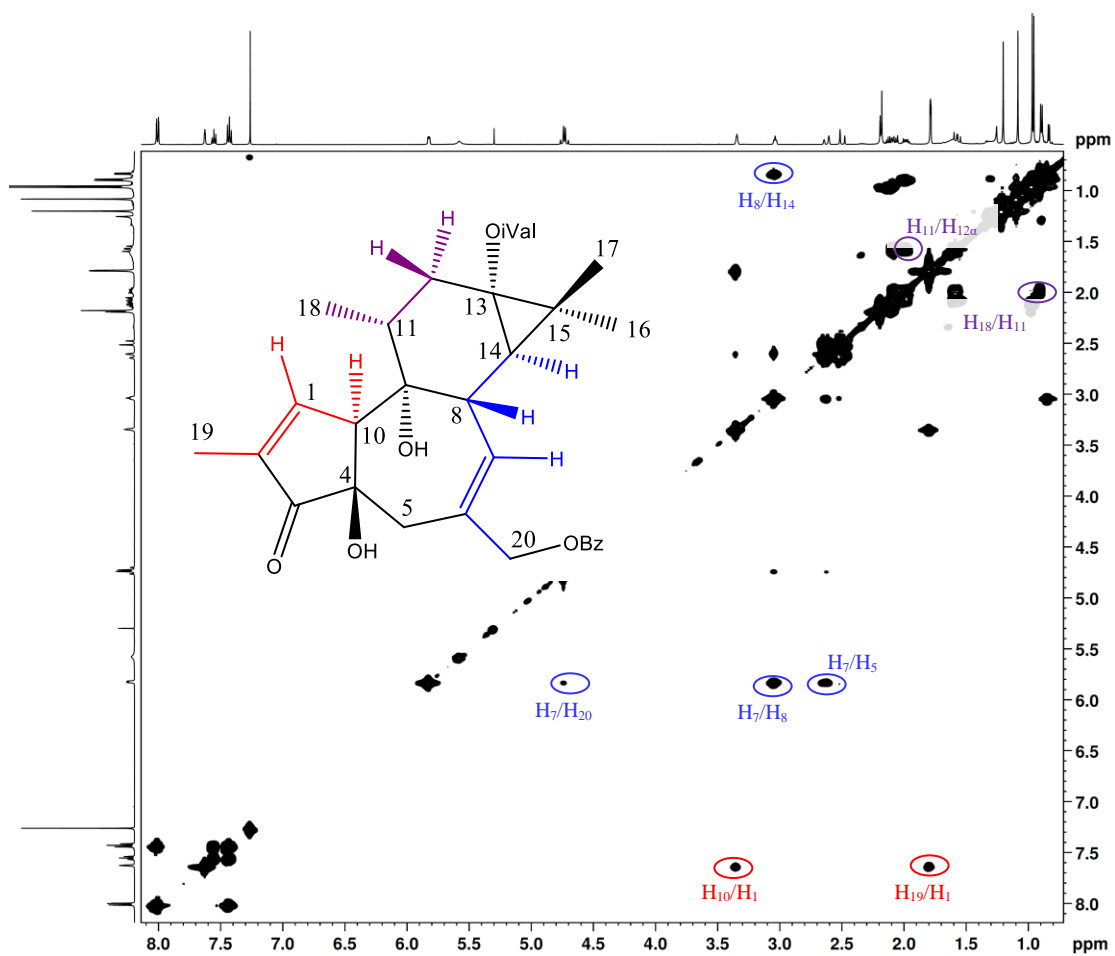
U COSY spektru jedinjenja **5** (**Slika 16**) postoje tri spinska sistema samog jezgra (**A**, **B** i **C**). Spinski sistem **A** čine protoni  $H_1$ ,  $H_{10}$  i  $H_{19}$  (korelacije  $H_{10}/H_1$  i  $H_1/H_{19}$ ), spinski sistem **B** čine protoni  $H_5$ ,  $H_7$ ,  $H_8$ ,  $H_{14}$  i  $H_{20}$  (korelacije  $H_5/H_7$ ,  $H_7/H_8$ ,  $H_7/H_{20}$  i  $H_8/H_{14}$ ), dok spinski sistem **C** čine protoni  $H_{11}$ ,  $H_{12}$  i  $H_{18}$  (korelacije  $H_{18}/H_{11}$ ,  $H_{11}/H_{12}$ ). Budući da u COSY spektru ne postoji korelacija protona  $H_4/H_5$ , u položaju  $C_4$  vezana je hidroksilna grupa.

COSY fragmenti **A**, **B** i **C** međusobno su povezani pomoću korelacija koje se uočavaju u HMBC spektru (**Slika 17**) između odgovarajućih protona i ugljenika. Proton  $H_{5\alpha}$  spreže se sa ugljenicima  $C_3$  ( $^3J_{C,H}$ ),  $C_7$  ( $^3J_{C,H}$ ) i  $C_{20}$  ( $^3J_{C,H}$ ), proton  $H_{5\beta}$  sa ugljenicima  $C_4$  ( $^2J_{C,H}$ ) i  $C_{10}$  ( $^3J_{C,H}$ ), a proton  $H_{19}$  sa ugljenicima  $C_1$  ( $^3J_{C,H}$ ),  $C_2$  ( $^2J_{C,H}$ ) i  $C_3$  ( $^3J_{C,H}$ ). Postojanje ovih korelacija omogućilo je povezivanje spinskih sistema **A** i **B**.

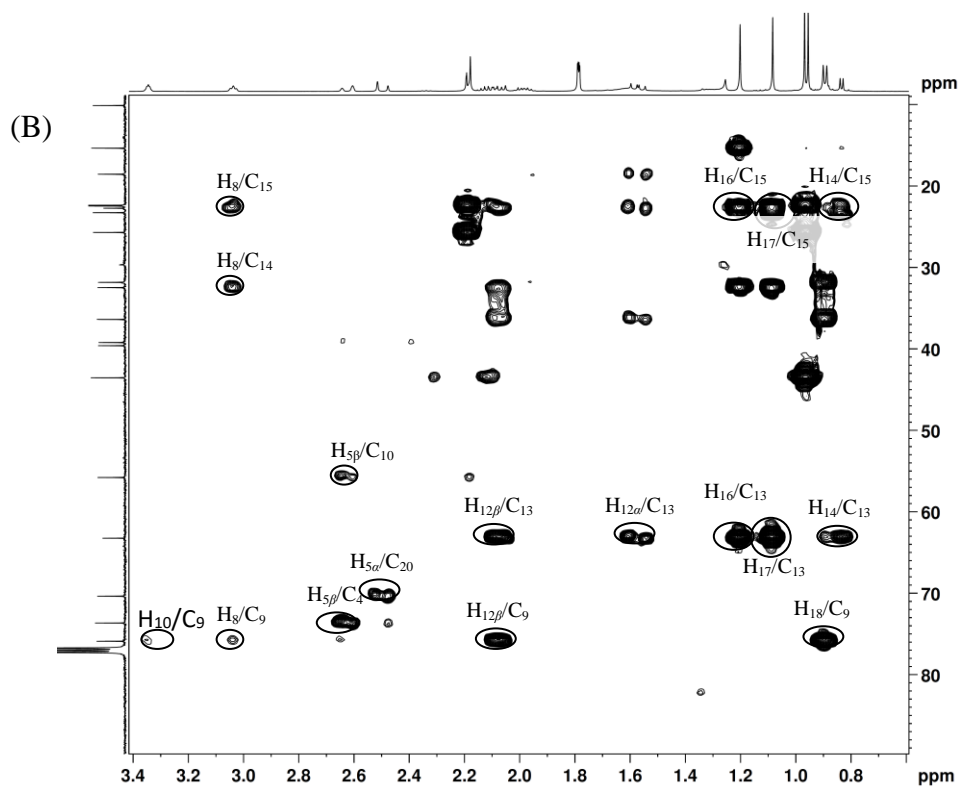
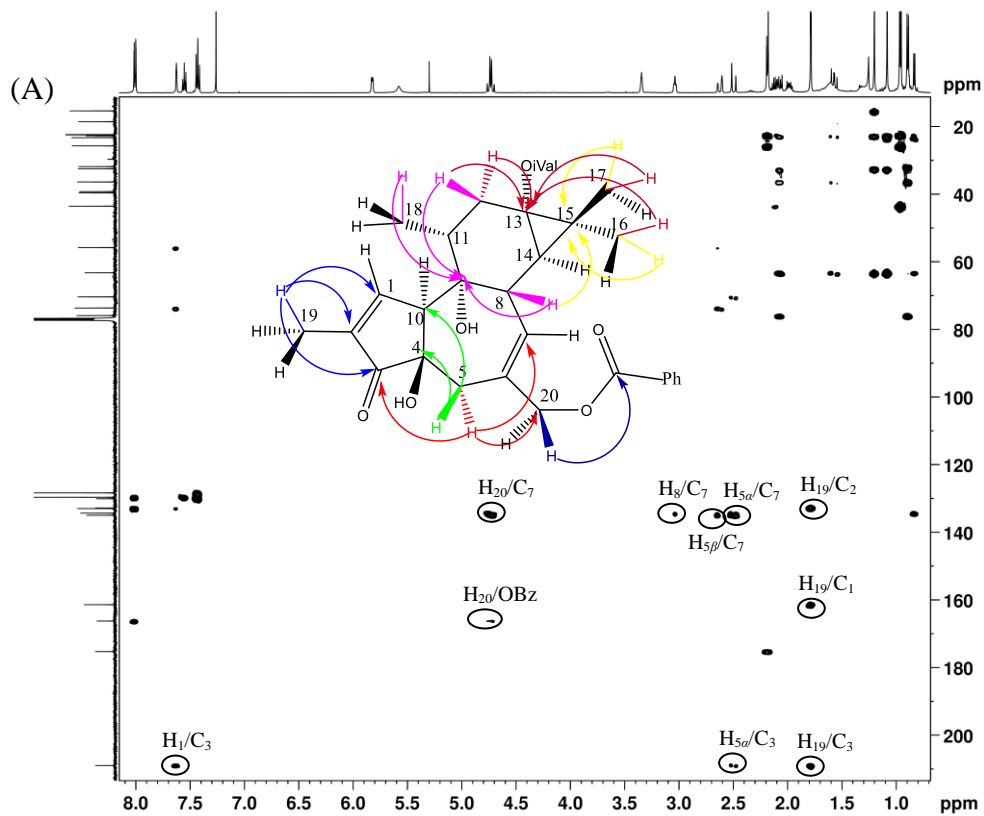
Spinski sistemi **B** i **C** povezani su na osnovu korelacija koje postoje između protona  $H_8$ ,  $H_{11}$ ,  $H_{12}$  i  $H_{14}$  i odgovarajućih ugljenika. Proton  $H_8$  spreže se sa ugljenikom  $C_9$  ( $^2J_{C,H}$ ), a sa ovim ugljenikom sprežu se i protoni  $H_{12\beta}$  ( $^3J_{C,H}$ ) i  $H_{18}$  ( $^3J_{C,H}$ ). U HMBC spektru se uočava još jedna korelacija ugljenika  $C_9$  i to sa protonom  $H_{10}$  ( $^2J_{C,H}$ ), što omogućava povezivanje spinskih sistema **A** i **C**. Ovakvo povezivanje spinskih sistema ukazalo je da je izolovani molekul derivat forbola.<sup>86</sup>



Slika 15. <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektri jedinjenja 5



Slika 16. COSY spektar jedinjenja 5



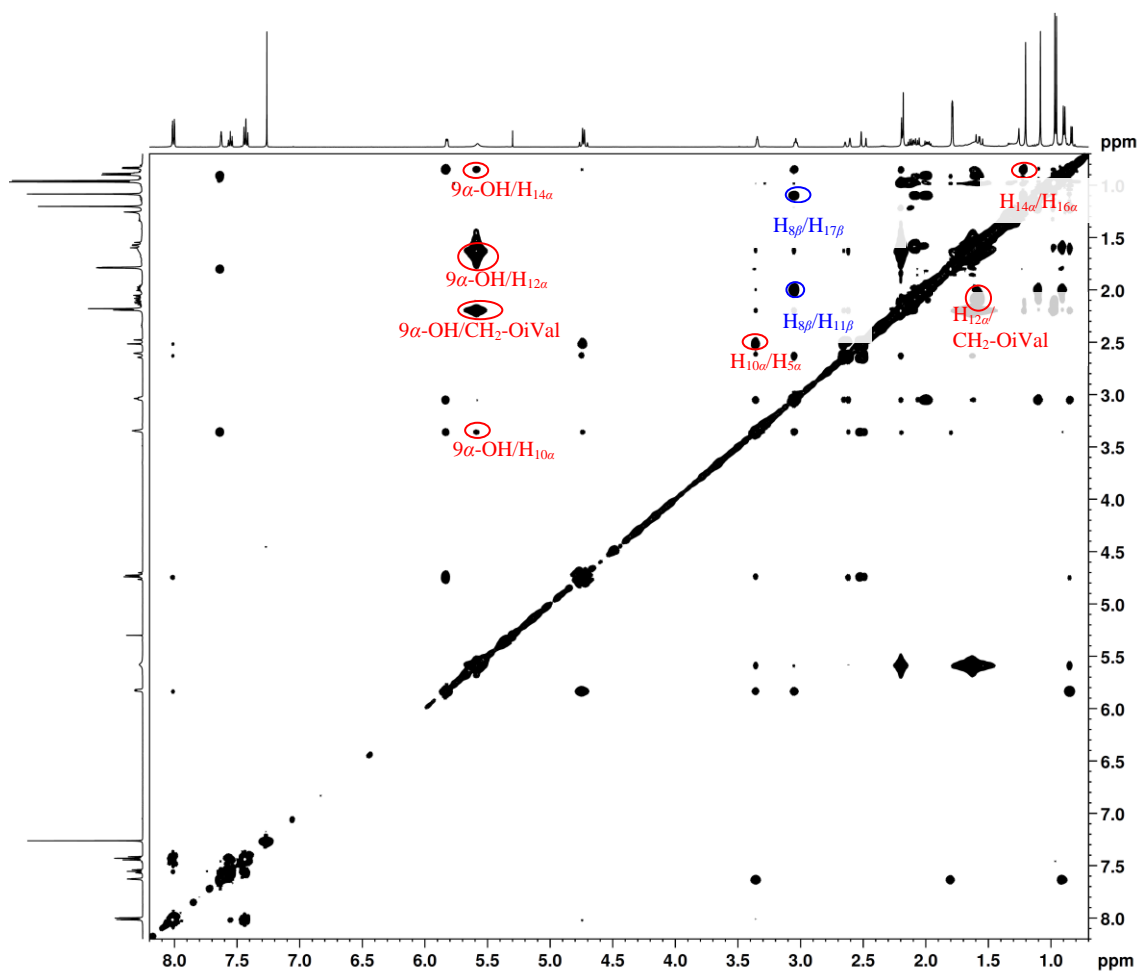
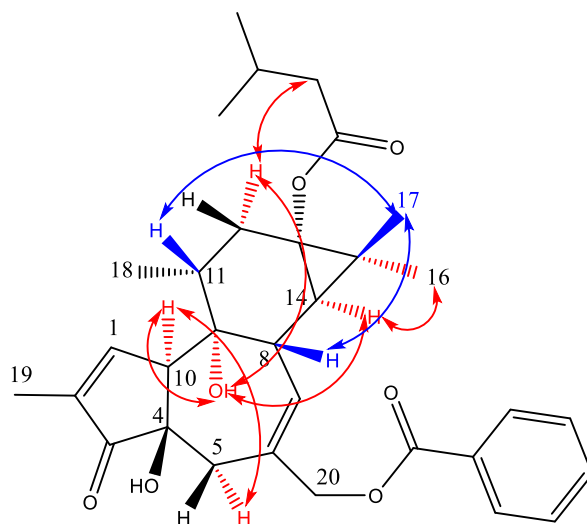
Slika 17. (A) HMBC spektar i (B) alifatični deo HMBC spektra jedinjenja 5

Povezivanjem spinskih sistema određeni su supstituenti na najvećem broju kvaternarnih ugljenika u forbolskom jezgru. Preostala dva kvaternarna ugljenika su na 63,4 ppm i 22,9 ppm. Veliko hemijsko pomeranje jednog od ova dva ugljenika (63,4 ppm) ukazuje da je za njega vezana estarska grupa. Za drugi kvaternarni ugljenik (22,9 ppm) – ugljenik C<sub>15</sub> vezani su sp<sup>3</sup>-hibridizivani ugljenici, što se vidi iz korelacija koje ostvaruje sa protonima H<sub>8</sub> (<sup>3</sup>J<sub>C,H</sub>), H<sub>16</sub> (<sup>2</sup>J<sub>C,H</sub>) i H<sub>17</sub> (<sup>2</sup>J<sub>C,H</sub>). Postojanje korelacije protona H<sub>20</sub> sa karbonilnim ugljenikom na 166,4 ppm (<sup>2</sup>J<sub>C,H</sub>) dokazuje da je u položaju C<sub>20</sub> vezan benzoat, dok se izovalerat nalazi u položaju C<sub>13</sub>.

Relativna konfiguracija izolovanog molekula određena je na osnovu korelacionih signala koji se vide u NOESY spektru (**Slika 18**), pri čemu je uzeto da proton H<sub>10α</sub> zauzima α-orijentacija (konfiguracija pretpostavljena kao biogenetska).<sup>86</sup>

NOE korelacije javljaju se između protona H<sub>10α</sub> i protona H<sub>5α</sub> i hidroksilne grupe vezane u položaju C<sub>9</sub>, što ukazuje da je ona α-orijentisana. U NOESY spektru uočavaju se korelacije protona ove hidroksilne grupe sa protonima H<sub>14α</sub>, H<sub>12α</sub> i protonom na hemijskom pomeranju 2,18 ppm (metilenska grupa izovalerata, čime se potvrđuje njena α-orijentacija). Na osnovu postojanja NOE korelacije protona H<sub>14α</sub> sa protonom H<sub>16α</sub> određen je položaj C<sub>17</sub>. Postojanje NOE korelacija ove metil grupe sa protonima čija su hemijska pomeranja 3,04 ppm (H<sub>8</sub>) i 1,99 ppm (H<sub>11</sub>) određuje njihovu β-orijentaciju.

Na osnovu svih podataka, izolovan je 20-benzoiloksi-13α-izovaleriloksi-12-deoksiforbol, jedinjenje koje do sada nije opisano u literaturi.

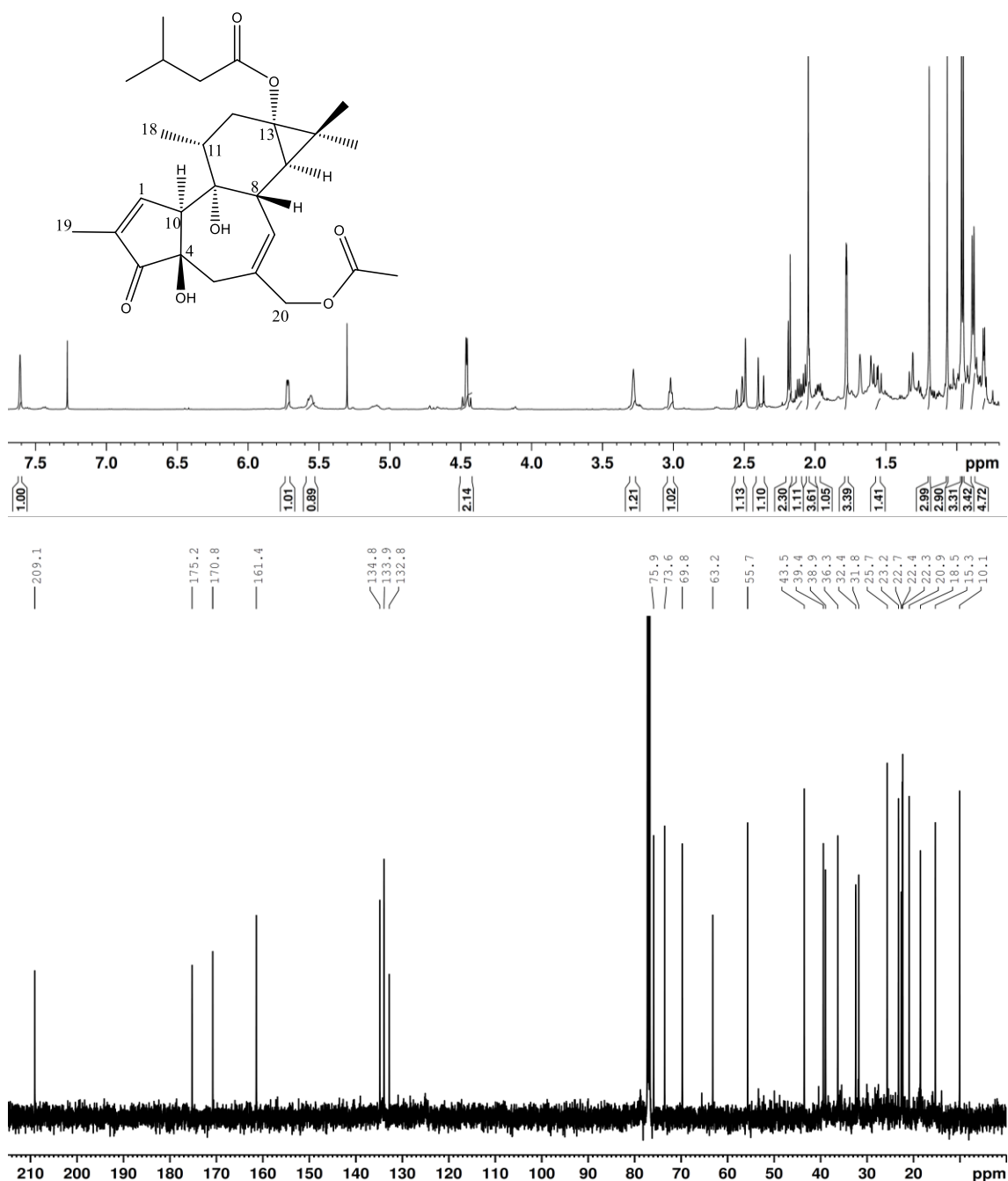


Slika 18. NOESY spektar jedinjenja 5



### 2.1.6. 20-Acetiloksi-13 $\alpha$ -izovaleriloksi-12-deoksiforbol (6)

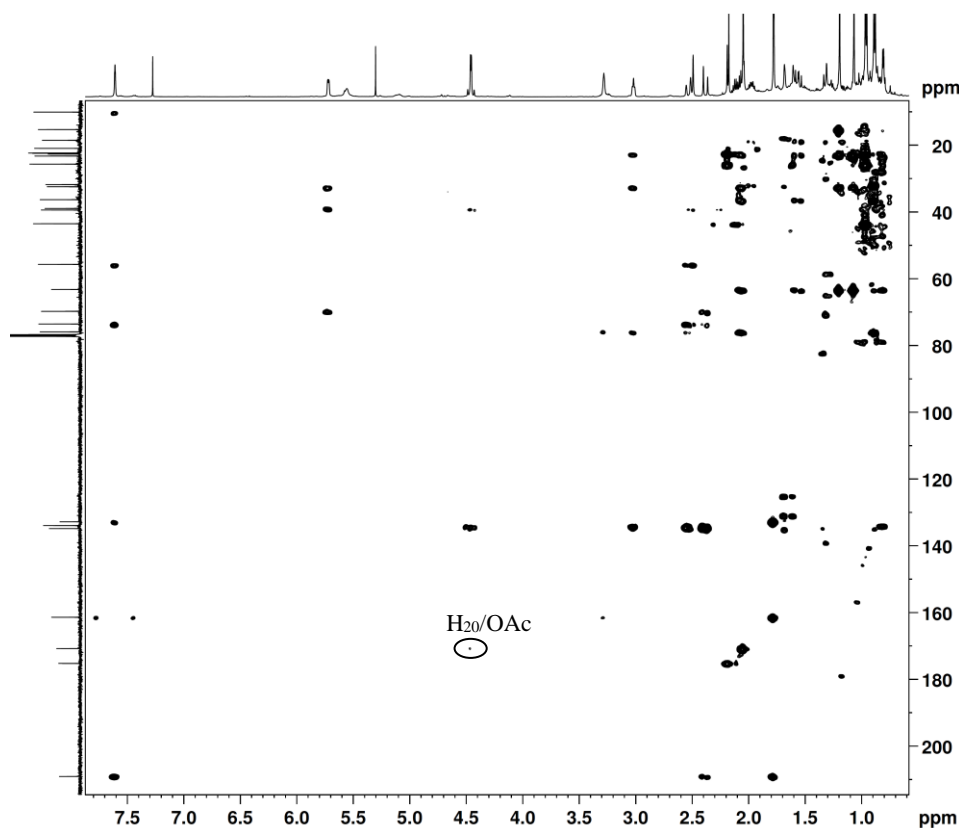
Jedinjenje **6** je izolovano kao bezbojna amorfna supstanca. Molekulska formula jedinjenja ( $C_{27}H_{38}O_7$ ) izračunata je na osnovu  $m/z$  497,2510 za  $[M+Na]^+$  jon u HRESIMS spektru. Na osnovu  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR spektara (Slika 19, Tabela 11), u



Slika 19.  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR spektri jedinjenja **6**

izolovanom molekulu postoje dve estarske grupe (izovalerat i acetat), jedna keto grupa i dve ugljenik-ugljenik dvostruke veze (obe trisupstituisane).

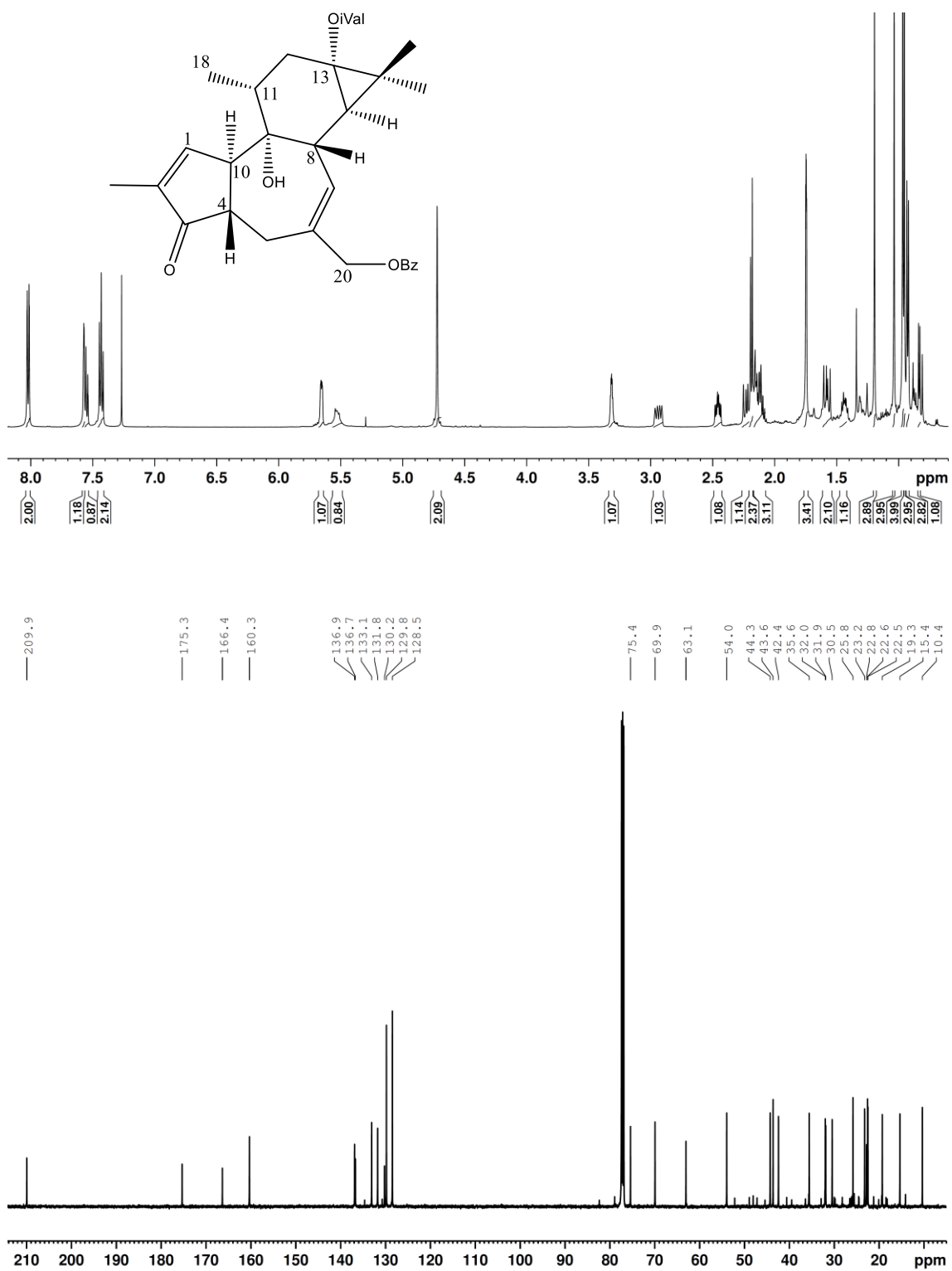
Struktura ovog jedinjenja je, na osnovu spektralnih podataka, slična strukturi jedinjenja **5**, s tim što je kod jedinjenja **5** u položaju C<sub>20</sub> vezan benzoat, dok se kod jedinjenja **6** u ovom položaju nalazi acetat. Sprezanjem protona H<sub>20</sub> sa karbonilom na 170,9 ppm, u HMBC spektru (**Slika 20**), određen je položaj acetata u molekulu. Izolovano jedinjenje do sada nije opisano u literaturi.



**Slika 20.** HMBC spektra jedinjenja **6**

### 2.1.7. 20-Benzoiloksi-13 $\alpha$ -izovaleriloksi-4,12-dideoksiforbol (**7**)

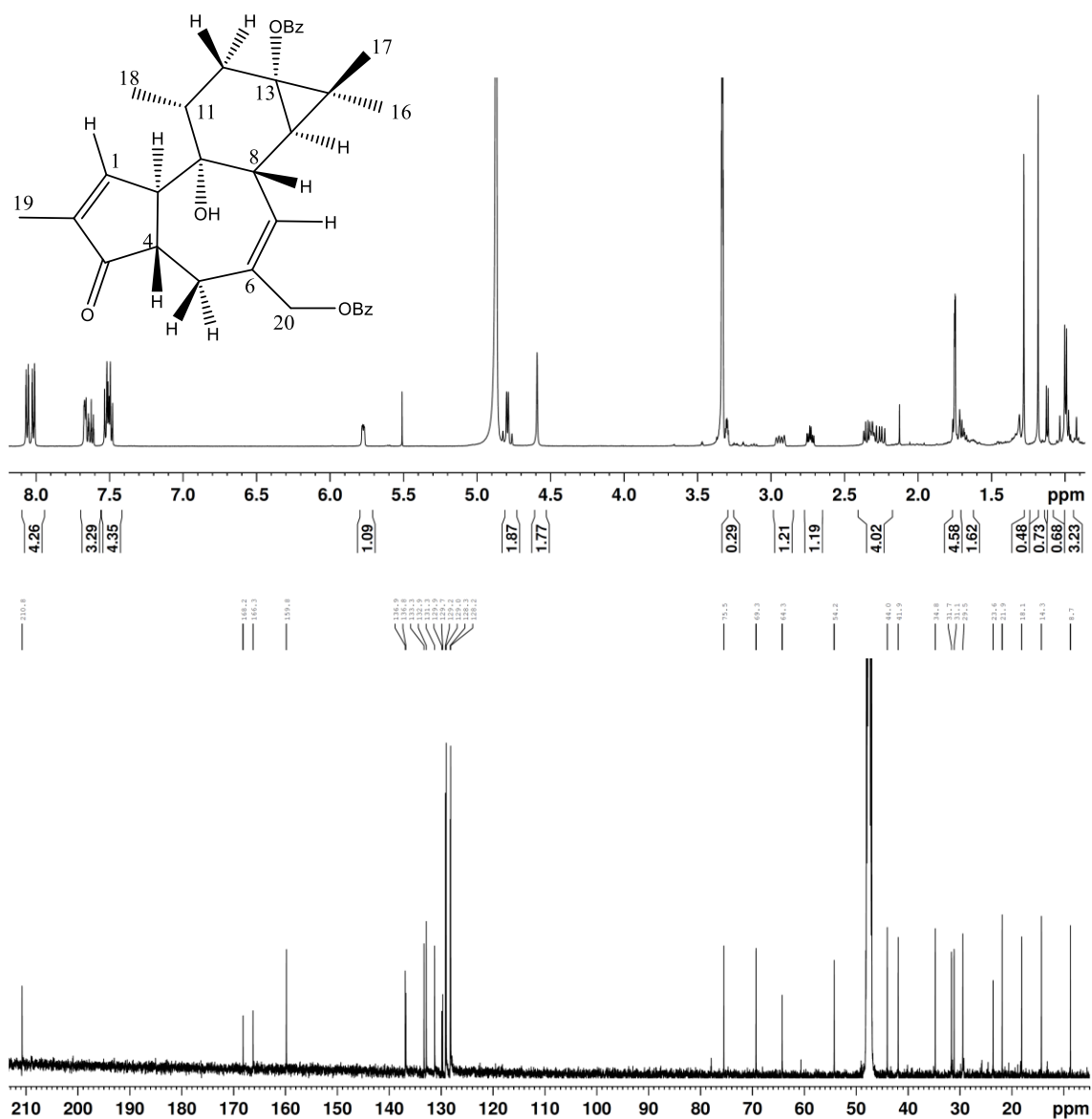
Jedinjenje **7** je izolovano kao bezbojna amorfnja supstanca molekulske formule C<sub>32</sub>H<sub>40</sub>O<sub>6</sub> (za [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 521,2898). Analizom <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektara (**Slika 21**, **Tabela 11**) utvrđeno je da je ovo jedinjenje 20-benzoiloksi-13 $\alpha$ -izovaleriloksi-4,12-dideoksiforbol, ranije izolovan iz *Euphorbia pannonica* Host.<sup>87</sup>



Slika 21. <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektri jedinjenja 7

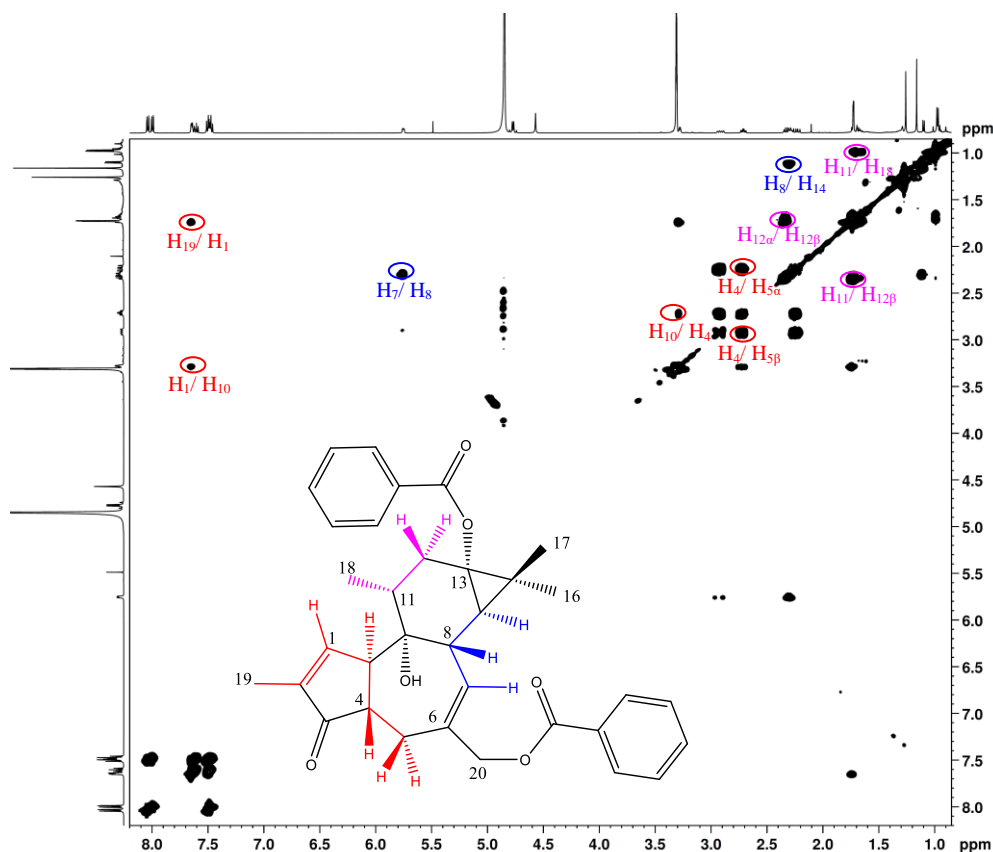
### 2.1.8. 13 $\alpha$ ,20-Dibenzoiloksi-4,12-dideoksiforbol (8)

Jedinjenje **8** izolovano je iz lateksa ispitivane biljne vrste kao bezbojna amorfna supstanca molekulske formule C<sub>34</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub> (izračunata iz  $m/z$  541,2586 za [M+H]<sup>+</sup>). Analizom 1D (Slika 22, Tabela 11) i 2D NMR spektara ovog jedinjenja utvrđeno je da sadrži dve benzoatne estarske grupe, ali i drugačiji spinski sistem od jedinjenja **5** i **6**.



Slika 22. <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektri jedinjenja **8**

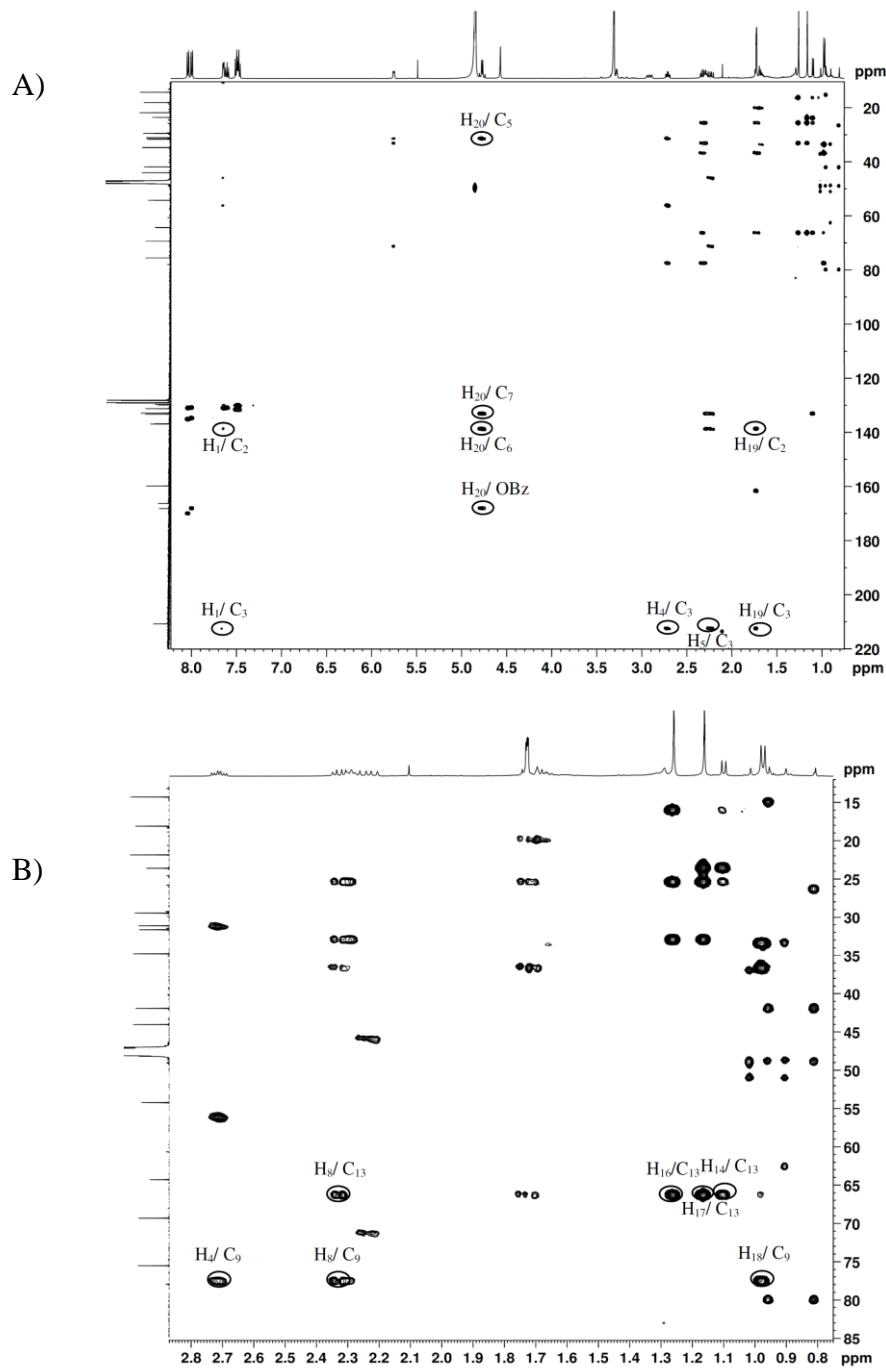
U  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spektru jedinjenja **8** (Slika 23) uočavaju se tri spinska sistema jezgra: spinski sistem **A**, koga čine protoni  $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_{10}$  i  $\text{H}_{19}$  (korelacije  $\text{H}_{19}/\text{H}_1$ ,  $\text{H}_1/\text{H}_{10}$ ,  $\text{H}_{10}/\text{H}_4$  i  $\text{H}_4/\text{H}_5$ ), spinski sistem **B**, koga čine protoni  $\text{H}_7$ ,  $\text{H}_8$  i  $\text{H}_{14}$  (korelacije  $\text{H}_7/\text{H}_8$  i  $\text{H}_8/\text{H}_{14}$ ) i spinski sistem **C**, koga čine protoni  $\text{H}_{11}$ ,  $\text{H}_{12}$  i  $\text{H}_{18}$  (korelacije  $\text{H}_{18}/\text{H}_{11}$  i  $\text{H}_{11}/\text{H}_{12}$ ).



Slika 23. COSY spektar jedinjenja **8**

Povezivanje COSY fragmenata, kao i određivanje supstituenata na kvaternarnim ugljenicima omogućeno je analizom HMBC spektra (Slika 24). Položaj ugljenika  $\text{C}_2$  određen je na osnovu sprezanja ovog ugljenika sa protonima  $\text{H}_1$  ( $^2J_{\text{C,H}}$ ) i  $\text{H}_{19}$  ( $^2J_{\text{C,H}}$ ). Položaj ugljenika  $\text{C}_3$  određen je na osnovu njegovog sprezanja sa protonima  $\text{H}_1$  ( $^3J_{\text{C,H}}$ ),  $\text{H}_4$  ( $^2J_{\text{C,H}}$ ),  $\text{H}_5$  ( $^3J_{\text{C,H}}$ ) i  $\text{H}_{19}$  ( $^3J_{\text{C,H}}$ ). Određivanje položaja  $\text{C}_6$ , a ujedno i povezivanje spinskih sistema **A** i **B** omogućuje sprezanje protona  $\text{H}_{20}$  sa ugljenicima  $\text{C}_5$  ( $^3J_{\text{C,H}}$ ),  $\text{C}_6$  ( $^2J_{\text{C,H}}$ ) i  $\text{C}_7$  ( $^3J_{\text{C,H}}$ ). Ovi protoni ( $\text{H}_{20}$ ) sprežu se i sa karbonilnim ugljenikom čije je hemijsko pomeranje 167,8 ppm ( $^2J_{\text{C,H}}$ ), što ukazuje da je u ovom položaju vezan benzoat. Povezivanje spinskog sistema **B** sa spinskim sistemom **C** omogućuje sprezanje

ugljenika C<sub>9</sub> sa protonima H<sub>8</sub> (<sup>2</sup>J<sub>C,H</sub>), H<sub>4</sub> (<sup>3</sup>J<sub>C,H</sub>) i H<sub>18</sub> (<sup>3</sup>J<sub>C,H</sub>). U molekulu je preostao još jedan kvaternarni oksigenovani ugljenik (C<sub>13</sub>, 64,3 ppm) i još jedan benzoat, tako da je taj benzoat vezan za ugljenik C<sub>13</sub>. Izolovani molekul do sada nije opisan u literaturi.



**Slika 24.** (A) HMBC spektar; (B) alifatični deo HMBC spektra jedinjenja **8**

**Tabela 11.**  $^1\text{H}$  (500 MHz) i  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) podaci jedinjenja **5–7** ( $\text{CDCl}_3$ , TMS) i **8** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz))

Položaj	<b>5</b>		<b>6</b>		<b>7</b>		<b>8</b>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	7,63 dd (2,4; 1,4)	161,4	7,61 brs	161,4	7,57 brs	160,3	7,61 brs	159,8
2	-	132,8	-	132,8	-	136,7	-	136,8
3	-	209,0	-	209,1	-	209,9	-	210,8
4	-	73,7	-	73,6	2,45 td (10,5; 4,5)	44,3	2,71 td (9,8; 4,5)	44,0
5 $\alpha$	2,50 d (19,0)	39,2	2,38 d (19,0)	38,9	2,23 dd (18,0; 10,0)	30,5	2,23 m	31,1
5 $\beta$	2,63 d (19,0)		2,53 d (19,0)		2,93 dd (18,0; 10,0)		2,93 dd (18,0; 9,0)	
6	-	135,0	-	134,8	-	136,9	-	136,9
7	5,82 d (5,7)	134,3	5,72 d (5,4)	133,9	5,66 dd (3,0; 2,5)	131,8	5,69 d (5,0)	131,3
8	3,04 t (5,5)	39,6	3,02 t (5,0)	39,4	2,16 m	42,4	2,22 m	41,9
9 (OH)	5,58 brs	75,9	5,56 brs	75,9	5,53 brs	75,4	5,81 brs	75,5
10	3,34 brs	55,8	3,28 brs	55,7	3,31 m	54,0	3,38 brs	54,2
11	1,98 m	36,4	1,98 m	36,3	1,44 m	35,6	1,66 m	34,8
12 $\alpha$	1,57 dd (14,4; 10,8)	31,8	1,57 dd (15,0; 11,5)	31,8	1,54 m	32,0	1,77 m	31,7
12 $\beta$	2,07 m		2,06 m		2,15 m		2,23 dd (18,4; 9,2)	
13	-	63,2	-	63,2	-	63,1	-	64,3
14	0,83 d (5,5)	32,5	0,81 d (5,4)	32,4	0,83 d (5,5)	31,9	1,10 d (6,0)	23,6
15	-	22,7	-	22,7	-	22,8	-	21,9
16	1,20 s	23,3	1,19 s	23,2	1,20 s	23,2	1,28 s	29,5
17	1,08 s	15,4	1,07 s	15,3	1,04 s	15,4	1,18 s	14,3
18	0,89 d (6,5)	18,6	0,89 d (6,5)	18,5	0,93 d (6,5)	19,3	0,99 d (6,5)	18,1
19	1,79 dd (2,9; 1,4)	10,1	1,78 dd (2,9; 1,3)	10,1	1,74 dd (2,5; 1,3)	10,4	1,76 brs	8,7
20	4,73 ABq (12,2)	70,4	4,46 ABq (12,2)	69,8	4,72 brs	69,9	4,74 s	69,3
OR-13								
C=O	-	175,3	-	175,2	-	175,3	-	168,2
1	2,19 d (7,0)	43,6	2,18 d (6,8)	43,5	2,19 d (7,0)	43,6	-	128,3*
2	2,10 m	25,7	-	25,7	2,11 m	25,8	8,04 dd (8,0; 1,0)	129,9
3	0,95 d (6,5)	22,4	0,96 d (6,6)	22,4	0,96 d (6,6)	22,6	7,50 t (8,5)	133,3
4	0,95 d (6,5)	22,5	0,96 d (6,6)	22,3	0,96 d (6,6)	22,5	7,62 m	129,2
OR-20								
C=O	-	166,2	-	170,8	-	166,4	-	166,3
1	-	130,1	2,05 s	20,9	-	128,3*	-	128,2*
2	8,00 dd (9,3; 1,4)	129,6	-	-	8,02 dd (8,0; 1,4)	129,9	7,99 dd (8,5; 1,5)	129,7
3	7,34 t (7,4)	128,3	-	-	7,43 t (8,0)	133,3	7,47 t (7,6)	132,9
4	7,55 tt (7,4; 1,4)	133,0	-	-	7,54 m	129,2	7,59 m	129,0

\* – nesigurna asignacija

## 2.2. Metabolomička studija zdravih i zaraženih jedinki *Euphorbia palustris* L.

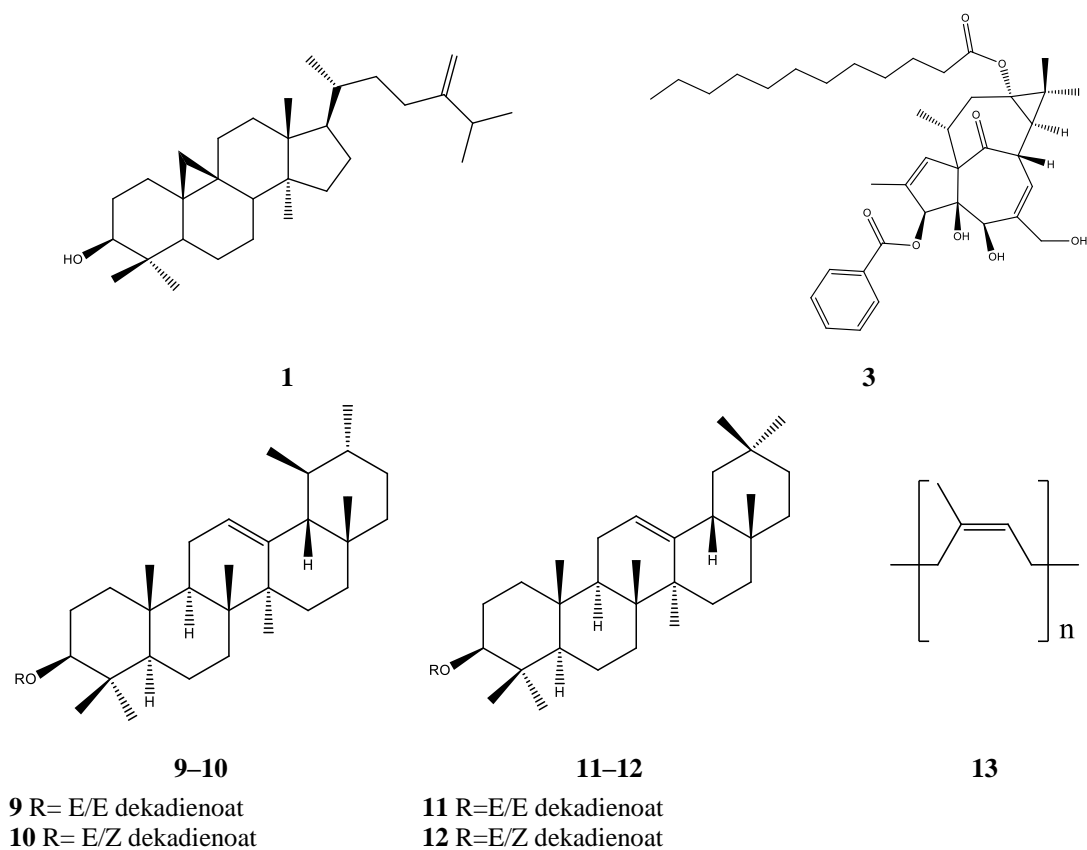
U okviru ove doktorske disertacije analizirani su i sekundarni metaboliti zdravih jedinki *E. palustris*, kao i jedinki inficiranih *Fusarium sporotrichioides* i *Alternaria alternata*.<sup>88</sup> Biljni materijal (lateks) prikupljan je u aprilu 2014. godine. Lateks je prikupljan svakih sedam dana (ukupno četiri puta) u mestu Besni Fok u blizini Beograda (GPS koordinate 44°59'23,6"N; 20°23'52,1"E). Biljke iz kojih je uzet lateks nalazile su se na istoj parceli, ali su bile podeljene na dve populacije koje su bile međusobno udaljene. Prilikom prve posete biljke obe populacije bile su zdrave, bez znakova infekcije, međutim prilikom druge posete (sedam dana posle prve) u jednoj populaciji na biljkama je uočena gljivična infekcija. Izgled inficirane i zdrave *E. palustris* prikazan je na **Slici 25**. Lateks je i ovog puta uzet i sa jedne i sa druge populacije s ciljem analize metabolita zdravih i zaraženih biljaka. Lateks je prikupljan još tri puta na svakih sedam dana. Važno je napomenuti i to da su uzorci lateksa u svakom uzorkovanju prikupljeni na istoj lokaciji.



**Slika 25.** Fotografija inficirane (levo) i zdrave (desno) *E. palustris*

Sekundarni metaboliti ekstrahovani iz lateksa deuterio-hloroformom identifikovani su pomoću 1D (<sup>1</sup>H) i 2D spektara (COSY, NOESY, TOCSY, HSQC, HMBC i 2D-J). Strukture identifikovanih jedinjenja prikazane su na **Slici 26**. Svi identifikovani metaboliti su do sada poznata jedinjenja.

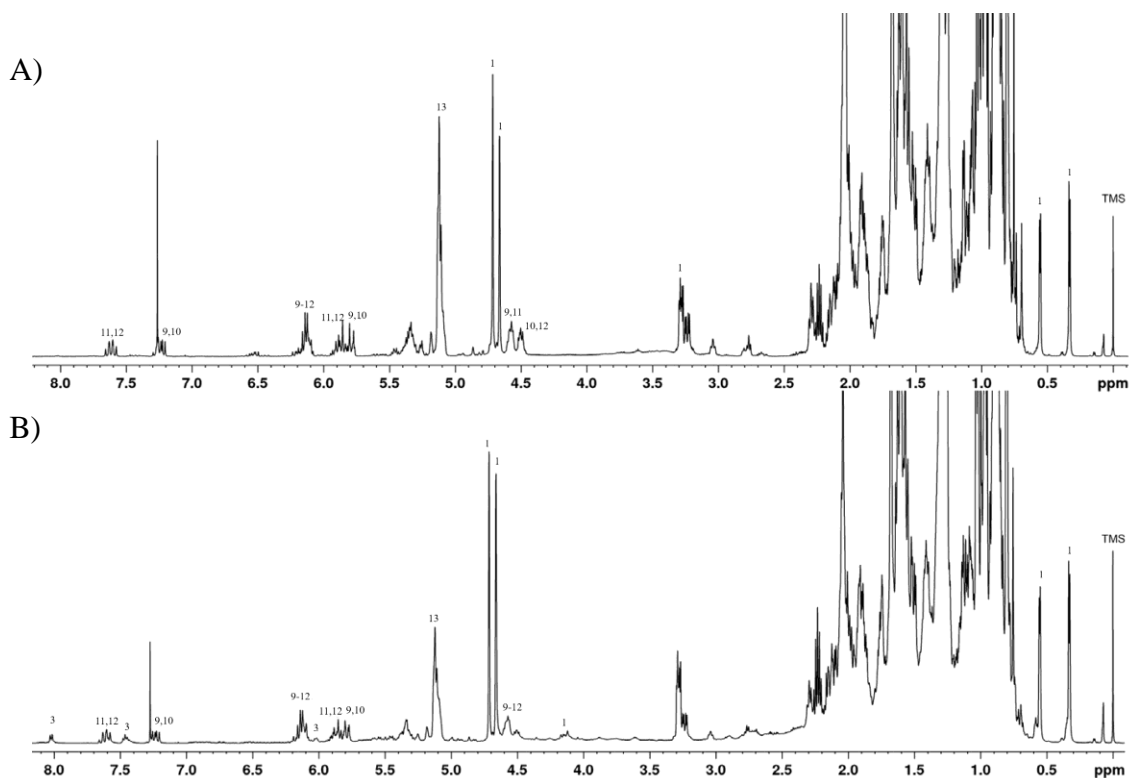




**Slika 26.** Strukture jedinjenja identifikovanih u  $\text{CDCl}_3$  ekstraktu lateksa zdravih i inficiranih jedinki *E. palustris*

U  $^1\text{H}$  NMR spektru ekstrakta zaražene biljke (**Slika 27 B**) izdvajaju se signali na 8,02 ppm (dd, 8,5 i 1,5 Hz) i 7,47 ppm (dd, 8,5 i 7,6 Hz) koji pripadaju benzoil grupi  $3\beta$ -benzoiloksi-13 $\alpha$ -dodekanoiloksiingenola (**3**). Signali protona sa dvostruke veze 24-metilencikloatran-3-ola (**1**) na 4,71 ppm i 4,66 ppm, kao i protona  $\text{H}_3$  (3,28 ppm, dd, 11,4 i 4,5 Hz) i ciklopropanskog prstena na 0,55 ppm (d, 4 Hz) i 0,33 ppm (d, 4 Hz) su lako prepoznati i pripisani ovom jedinjenju. Ostali signali ovog jedinjenja preklapljeni su sa signalima jedinjenja **9–12**. U opsegu od 5,70–7,70 ppm nalaze se signali karakteristični za dvostruke veze amirinskih dekadienskih estara (jedinjenja **9–12**). Preostali protoni iz alifatičnih lanaca asignirani su pomoću COSY i TOCSY spektara. Mesto vezivanja estarskog dela za amirinsko jezgro određeno je pomoću korelacije protona na 4,57 ppm i karbonilnog ugljenika na 167,0 ppm. Geometrijski izomeri *E/E* i *E/Z*, kao i izomeri  $\alpha$ - i  $\beta$ -amirina lako su razdvojeni na osnovu karakterističnih

hemijskih pomeranja protona sa dvostruke veze. Spektroskopski podaci važni za karakterizaciju jedinjenja **1**, **3**, **9–13** prikazani su u **Tabeli 12**.

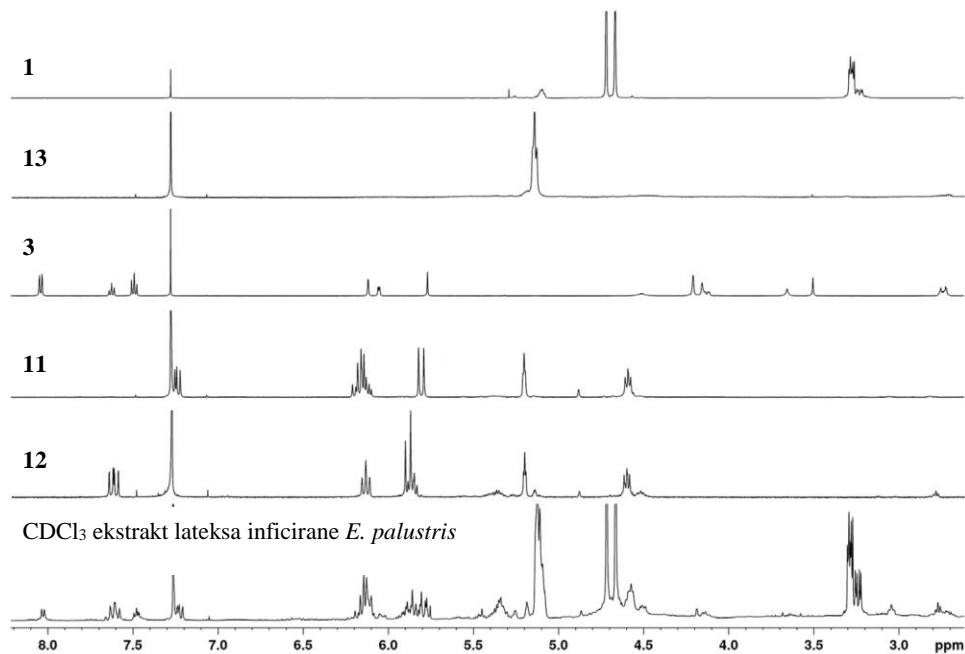


**Slika 27.**  $^1\text{H}$  NMR spektar  $\text{CDCl}_3$  ekstrakta lateksa zdrave (A) i inficirane (B) *E. palustris*

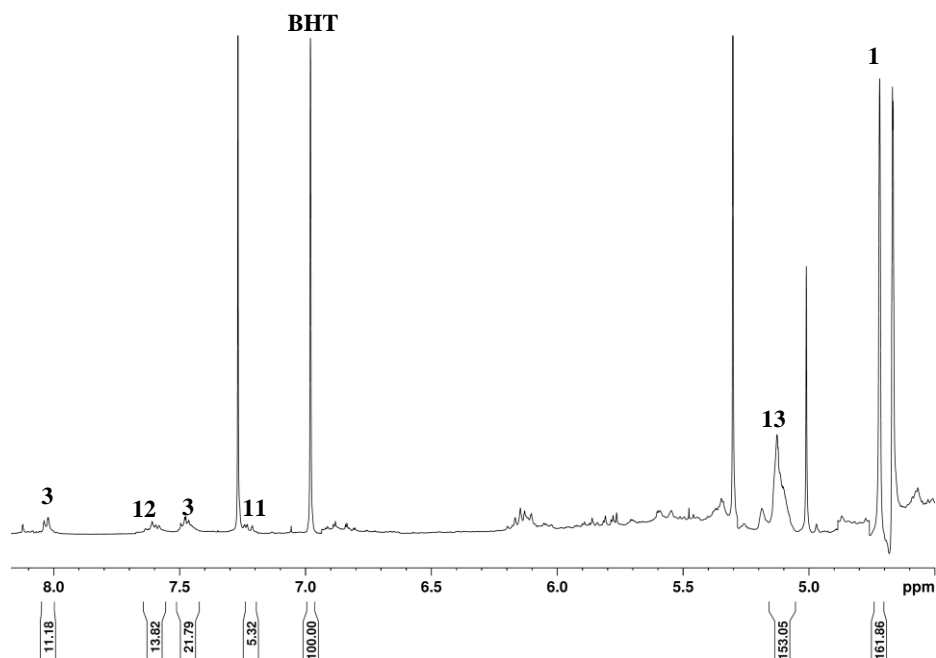
**Tabela 12.** Ključni  $^1\text{H}$  NMR podaci za jedinjenja identifikovana u  $\text{CDCl}_3$  ekstraktu lateksa *E. palustris*

Jedinjenje	Hemijsko pomeranje (ppm) i konstante kuplovanja (Hz)
<b>1</b>	4,71 brs; 4,66 brs; 3,28 dd (11,4; 4,5); 2,23 sep (7,0); 1,03 d (7,0); 1,02 d (7,0); 0,97 s; 0,96 s; 0,90 s; 0,89 d (6,5); 0,81 s; 0,55 brd (4,0); 0,33 brd (4,0)
<b>3</b>	8,02 dd (8,5; 1,5); 7,59 tt (7,6; 1,5 Hz); 7,47 dd (8,5; 7,6); 6,10 d (1,6); 6,02 brd (4,3); 4,15 m; 2,75 m; 1,25 m
<b>9</b>	7,23 dd (15,3; 10,0); 6,11 d (15,3); 6,15 dd (15,3; 10,0); 5,79 d (15,3); 5,13 t (3,8); 4,57 m; 2,16 dd (13,25; 7,1); 1,08 s; 1,02 s; 1,00 s; 0,91 s; 0,89 s; 0,80 s
<b>10</b>	7,23dd (15,3; 10,0); 6,11 d (15,3); 6,15 dd (15,3;10,0); 5,79 d (15,3); 5,13 t (3,8); 4,58 m; 2,16 dd (13,5; 7,1), 1,08 s; 1,02 s; 1,00 s; 0,91 s; 0,89 s; 0,80 s
<b>11</b>	7,60 dd (15,3; 11,7); 5,84 d (9,5); 6,12 dd (11,7; 9,6); 5,87 d (15,3); 5,19 t (3,8); 4,57 m; 2,29 t (7,5); 1,14 s; 0,97 s; 0,90 s; 0,89 s; 0,88 s; 0,83 s
<b>12</b>	7,60 dd (15,3; 11,7); 5,84 d (9,5); 6,12 dd (11,7; 9,6); 5,87 d (15,3); 5,19 t (3,8); 4,58 m; 2,29 t (7,5); 1,14 s; 0,97 s; 0,90 s; 0,89 s; 0,88 s; 0,83 s
<b>13</b>	5,12 m; 2,04 m; 1,68 brs

Delovi  $^1\text{H}$  NMR spektara jedinjenja **1**, **3** i **11–13** prikazani su na **Slici 28** zajedno sa delom  $^1\text{H}$  NMR spektra  $\text{CDCl}_3$  ekstrakta inficirane *E. palustris* radi lakšeg



**Slika 28.** Delovi  $^1\text{H}$  NMR spektara (2,60–8,20 ppm)  $\text{CDCl}_3$  ekstrakta lateksa inficirane *E. palustris* (A) i čistih jedinjenja **1**, **3**, **11**, **12** i **13**



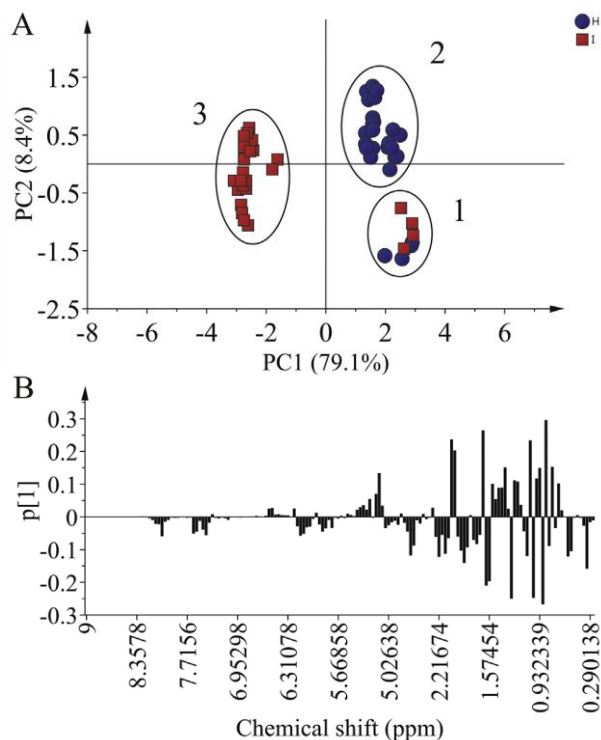
**Slika 29.** Deo  $^1\text{H}$  NMR spektra korišćen za kvantifikaciju jedinjenja **1**, **3**, **11–13**

prepoznavanja signala protona navedenih jedinjenja u samom ekstraktu. Na **Slici 29** prikazan je ekstrakt inficirane *E. palustris* sa dodatim standardom (BHT). U spektru su obeleženi signali pomoću kojih su identifikovana jedinjenja kvantifikovana.

Da bi se razumela ukupna varijabilnost unutar uzoraka, primenjena je multivarijantna analiza podataka. Za ovu svrhu korišćena je analiza glavnih komponenti (PCA), metod bezrezervnog smanjenja dimenzija. Pre PCA, podaci su normalizovani na ukupnu površinu i skalirani pareto metodom.

Najveće razdvajanje uzoraka dobijeno je po prvoj PC1 osi (**Slika 30**). Ispitivanjem grafika skorova (PC1 naspram PC2) pokazano je da su lateksi iz svih biljaka iz prvog uzorkovanja, kao i lateksi iz zdravih biljaka iz 2–4. uzorkovanja (grupa 1 i 2) jasno odvojeni od lateksa inficiranih biljaka duž PC1 ose (grupa 3). Lateksi iz grupa 1 i 2 pokazuju pozitivne PC1 vrednosti, dok lateksi iz grupe 3 imaju negativne vrednosti na PC1 osi. Da bi se utvrdilo koje promenljive su odgovorne za ovakvo razdvajanje, ispitana je PC1 osa. Ovo ispitivanje je pokazalo velike pozitivne vrednosti za signale na 5,12, 2,04 i 1,68 ppm (pripadaju *cis*-1,4-poliizoprenu). Negativne vrednosti dobijene su za signale na 8,02, 7,59, 7,47, 6,10 i 6,02 ppm (pripadaju 3 $\beta$ -benzoiloksi-13 $\alpha$ -dodekanoiloksiingenolu) i 3,28, 0,55 i 0,33 ppm (pripadaju 24-metilenecikloartan-3-olu). Uzorci iz prvog prikupljanja (grupa 1) i preostali uzorci zdravih biljaka (grupa 2) odvojeni su jedni od drugih duž druge ose (PC2). Prema PC2 opterećenju, dekadienoatni estri armirina su diskriminirajuća jedinjenja.

Dobijeni rezultati pokazuju da je lateks inficiranih biljaka sadržao manje *cis*-1,4-poliizoprena (**13**) i više 3 $\beta$ -benzoiloksi-13 $\alpha$ -dodekanoiloksiingenola (**3**) i 24-metilenecikloartanola (**9**). Da bi se ovi zaključci potvrdili i kako bi se preciznije utvrdila razlika koja postoji u ekstraktima zdravih i inficiranih biljaka urađena je kvantitativna <sup>1</sup>H NMR analiza (**Slika 28**), a dobijeni rezultati su prikazani u **Tabeli 13**.



**Slika 30.** Rezultati PCA (A) i razdvajanje duž ose PC1 (B) signala iz  $^1\text{H}$  NMR spektara ekstrakta lateksa zdravih (plavi krugovi) i inficiranih (crveni kvadrati) biljaka *E. palustris* u deuterisanom hloroformu. 1: I prikupljanje materijala, 2: II–IV prikupljanje materijala zdravih jedinki, 3: II–IV prikupljanje materijala inficiranih jedinki.

**Tabela 13.** Sadržaj jedinjenja ( $\mu\text{g/mL}$ ) u lateksu *E. palustris* određen kvantitativnom  $^1\text{H}$  NMR spektroskopijom

Jedinjenje	I prikupljanje lateksa	II–IV prikupljanje lateksa zdravih biljaka	II–IV prikupljanje lateksa inficiranih biljaka
1	$4791 \pm 28$	$4871 \pm 45$	$5969 \pm 152$
3	$15 \pm 8$	$19 \pm 6$	$372 \pm 25$
9–12	$825 \pm 15$	$923 \pm 32$	$882 \pm 51$
13	$1517 \pm 16$	$1544 \pm 45$	$846 \pm 73$

Koncentracije identifikovanih jedinjenja, osim amirinskih estara, u prvom prikupljanju lateksa *E. palustris*, kao i od drugog do četvrtog prikupljanju lateksa zdravih biljaka približno su jednake. Međutim, koncentracije identifikovanih jedinjenja u prvom prikupljanju lateksa, izuzev amirinskih estara, znatno se razlikuju od

koncentracija istih jedinjenja u lateksima inficiranih biljaka: koncentracija  $3\beta$ -benzoioksi-13 $\alpha$ -dodekanoiloksiingenola (**3**) je u inficiranim biljkama uvećana za više od 20 puta, koncentracija 24-metilencikloartan-3-ola (**1**) je uvećana za oko 25%, dok je koncentracija *cis*-1,4-poliizoprena (**13**) smanjena kod inficiranih biljaka i to za ~55%.

Po dobijanju rezultata o uticaju infekcije na koncentraciju identifikovanih metabolita u lateksu, izolovani su patogeni koji su izazvali infekciju jedne populacije i ispitano je antimikrobno i antifungalno dejstvo lateksa zdravih, lateksa inficiranih biljaka, kao i jedinjenja **1** i **3**.

Kombinovanu gljivičnu infekciju u jednoj populaciji izazvali su *F. sporotrichioides* i *A. alternata*, pri čemu je *F. sporotrichioides* dominantna gljivična vrsta izolovana iz tamnih tačaka sa inficiranog lista *E. palustris*. Gljive su identifikovane prema morfološkim karakteristikama i molekularnim poređenjem homologija dobijenih sekvenci sa sekvenciranim genima u NCBI (eng. National Center for Biotechnology Information) bazi. Specifični prajmeri za ITS1 i ITS2 regione, kao i za amplifikaciju aktinskog i  $\beta$ -tubulinskog gena, korišćeni su za molekularno identifikaciju (**Tabela 14**). Identitet *F. sporotrichioides* potvrđen je sekvenciranjem  $\beta$ -tubulinskog gena, dok je konačna potvrda *A. alternata* dobijena iz oba sekvenciranja gena, aktina i  $\beta$ -tubulina (**Tabela 15**).

Nakon izolovanja i identifikacije patogena određene su vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne fungicidne koncentracije (MFC) ekstrakta lateksa zdravih i inficiranih biljaka, kao i jedinjenja **1** i **3**. Flukonazol (sintetički antifungalni agens) korišćen je kao pozitivna kontrola. Rezultati ovog ispitivanja prikazani su u **Tabeli 16**.

**Tabela 14.** Prajmeri korišćeni za amplifikaciju i njihovi odgovarajući PCR profili

Prajmer	Sekvenca (5'-3')	Gen
<b>ITS1-F</b> <b>ITS4-R</b>	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS1 i ITS2 regioni + 5.8S rRNK
<b>ITS3-F</b> <b>TW13-R</b>	GCATCGATGAAGAACGCAGC GGTCCGTGTTTCAAGACG	Parcijalni deo velike subjedinice ribozoma 5.8S + unutrašnji transkribovani spejser 2 + parcijalni deo velike subjedinice 28S
<b>LepactF_2</b> <b>LepactR</b>	ACAGTCCAAGCGTGGTATCC CAATGATCTTGACCTTCAT	Aktinski gen
<b>T1-F</b> <b>BT12-R</b> <b>BT12-internal R</b>	AACATGCGTGAGATTGTAAGT GTTGTCAATGCAGAAGGTCTCG CCTCMGTGTAGTGMCCCTTG	$\beta$ -tubulinski gen

Svi ispitani uzorci su pokazali jaku antifungalnu aktivnost na izolovane gljivične patogene. Aktivnost ekstrakta lateksa zaraženih biljaka bila je jača od lateksa zdravih biljaka. Uzorci iz prvog uzorkovanja lateksa i uzorci lateksa iz II–IV uzorkovanja zdravih biljaka nisu pokazali značajnu razliku u antimikotičnoj aktivnosti. Čista jedinjenja pokazala su jači antifungalni efekat od ekstrakta lateksa zaraženih biljaka. Osim toga, jedinjenja **1** i **3** pokazuju jaču antifungalnu aktivnost u poređenju sa flukonazolom. Dobijeni rezultati pokazali su da postoji veza između hemijskog sastava lateksa i njegove antifugalne aktivnosti na testiranim patogenima. Veći udeo u odbrambenoj aktivnosti može se pripisati 24-metilenecikloartan-3-olu (**1**), jer je njegova koncentracija u lateksu zaraženih biljaka bila 16 puta veća od koncentracije 3 $\beta$ -O-benzoil-13 $\alpha$ -O-dodekanoiloksiingenola (**3**). Drugi antifungalni mehanizmi se ne mogu isključiti, kao što je prisustvo nekih malih, još uvek neodređenih antimikotičnih metabolita, kao i postojanje sinergističkog efekta među komponentama lateksa.

**Tabela 15.** Identifikovane gljivice prema različitim regionima gena

Određivanje gljiva prema mikro- i makroskopskim karakteristikama	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	<i>Alternaria alternata</i>
Prajmer ITS1-F i ITS4-R (ITS1)	<i>F. sporotrichioides</i> FS2 [JF303883]	<i>A. alternata</i> KSH50T [KF380793]
Ident (%)	99,80	99,81
Prajmer ITS3-F i TW13-R (ITS2)	<i>F. sporotrichioides</i> MAFF 236639 [AB587027]	<i>A. alternata</i> U12.1 [KR906685]
Ident (%)	99,55	99,21
Prajmer LepactF_2 i LepactR (Aktinski gen)	<i>F. sporotrichioides</i> 209 [JQ342171]	<i>A. alternata</i> FSU512 [AY748985]
Ident (%)	97,70	99,48
Prajmer T1-F i BT12-R ili BT12-internal R ( $\beta$ -tubulinski gen)	<i>F. sporotrichioides</i> NRRL 3299 [GQ915448]	<i>A. alternata</i> [HQ413316]
Ident (%)	99,81	100,00

**Tabela 16.** Antifungalna aktivnost ekstrakata lateksa i jedinjenja **1** i **3** izolovanih iz *E. palustris*

	Ekstrakt lateksa posle prvog uzorkovanja	Ekstrakt lateksa zdravih biljaka	Ekstrakt lateksa inficiranih biljaka	Jedinjenje <b>1</b>	Jedinjenje <b>3</b>	Flukonazol
<i>F. sporotrichioides</i>						
MIC*	$2,75 \times 10^{-2}$	$2,40 \times 10^{-2}$	$9,33 \times 10^{-3}$	$1,66 \times 10^{-3}$	$4,07 \times 10^{-3}$	
MFC*	$4,47 \times 10^{-2}$	$4,79 \times 10^{-2}$	$1,58 \times 10^{-2}$	$8,71 \times 10^{-3}$	$6,46 \times 10^{-3}$	1,78
<i>A. alternata</i>						
MIC*	$1,05 \times 10^{-1}$	$9,33 \times 10^{-2}$	$3,39 \times 10^{-2}$	$1,05 \times 10^{-2}$	$6,17 \times 10^{-3}$	
MFC*	$4,37 \times 10^{-1}$	$4,17 \times 10^{-1}$	$1,70 \times 10^{-2}$	$2,09 \times 10^{-2}$	$3,02 \times 10^{-2}$	1,51

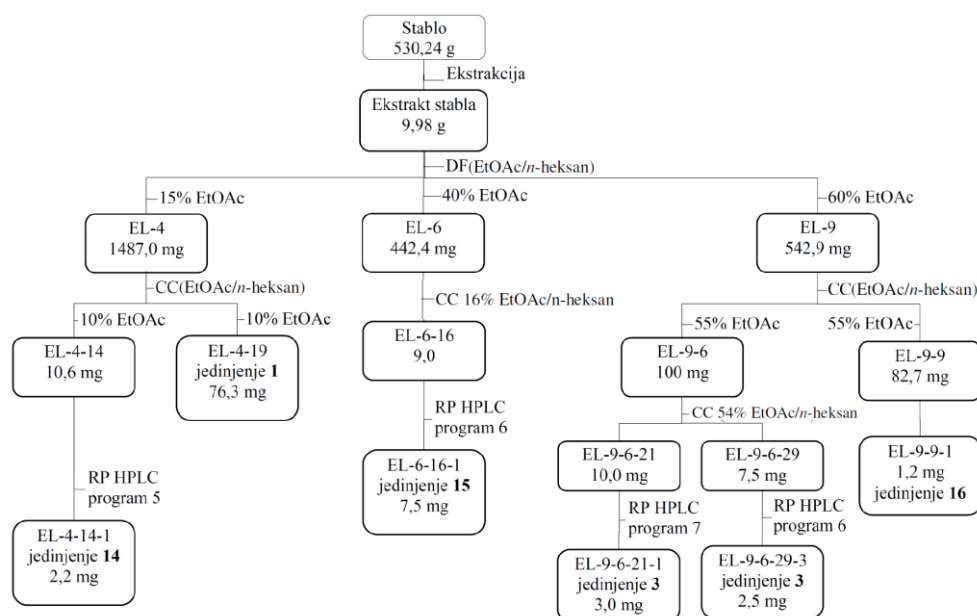
\*– srednja vrednost (n=5) minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, mg/mL) i minimalne fungicidne koncentracije (MFC, mg/mL)



## 2.3. Sekundarni metaboliti izolovani iz biljne vrste *Euphorbia lucida* Waldst. & Kit.

Predmet proučavanja kod *E. lucida* je bilo stablo biljke koje je prikupljeno u maju 2012. godine na Makiškom polju (oznaka EL), kao i lateks biljke, prikupljen u maju 2013. godine (oznaka LUC) na istom lokalitetu (GPS koordinate 44°46'24,9"N, 20°22'22,7"E). Vaučer (No. 16879) je deponovan u herbarijumu Botaničke bašte „Jevremovac” Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

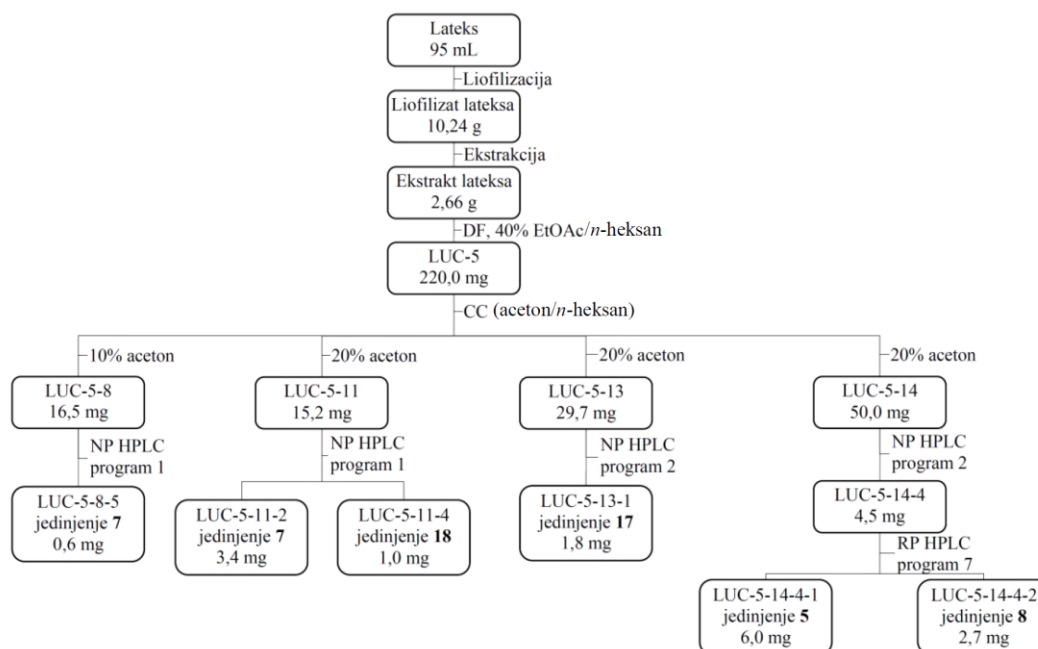
Stablo *E. lucida* je samleveno i ekstrahovano smešom rastvarača etil-acetat/*n*-heksan (1/1 V/V). Dobijeni ekstrakt je frakcionisan brзом hromatografijom na koloni (DF), nakon čega su odabrane frakcije (na osnovu signala u <sup>1</sup>H NMR spektru) dalje razdvajane hromatografijom na gravitacionoj koloni (uslovi hromatografisanja prikazani su u poglavlju 3.2.3). Posle hromatografije na gravitacionoj koloni, finalno prečišćavanje je urađeno primenom preparativne tečne hromatografije na reverznoj fazi (Šema 3).



Šema 3. Put izolovanja jedinjenja iz stabla *E. lucida* (maj 2012.)

Iz stabla biljke izolovano je pet jedinjenja: jedan triterpen cikloartanskog tipa (1), tri diterpena ingenanskog tipa (3, 14 i 15) i jedan derivat kumarina (16).

Lateks *E. lucida* prikupljen 2013. godine je najpre liofilizovan, a zatim ekstrahovan smešom rastvarača etil-acetat/*n*-heksan (1/1 V/V). Dobijeni ekstrakt je prošao frakcionisanje „dry-flash column” hromatografijom, a odabrane frakcije i razdvajanje hromatografijom na gravitacionoj kolini (uslovi hromatografisanja prikazani su u poglavlju 3.2.3). Dalje prečišćavanje frakcija od interesa rađeno je normalno faznom tečnom hromatografijom (Šema 4). Na ovaj način izolovana su jedinjenja 7, 17 i 18. Za izolovanje jedinjenja 5 i 8 posle normalno fazne tečne hromatografije bilo je potrebno primeniti i reverzno faznu tečnu hromatografiju. Jedinjenja izolovana iz stabla i lateksa *E. lucida* prikazana su u Tabeli 17.

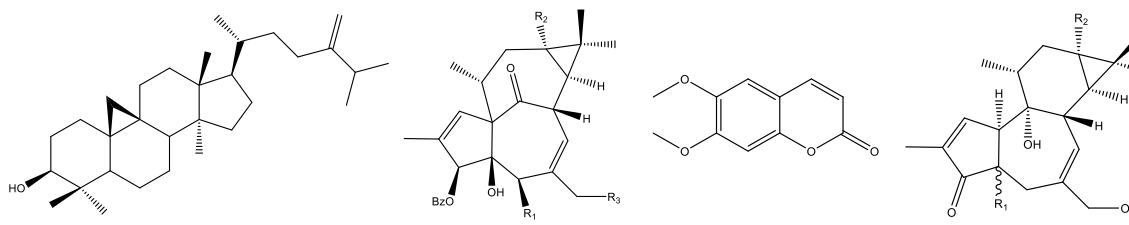


Šema 4. Put izolovanja jedinjenja iz stabla *E. lucida* (maj 2013.)

Od ukupnog broja izolovanih jedinjenja po prvi put je izolovano jedinjenje 18, dok je jedinjenje 15 prvi put opisano kao prirodni proizvod. Ovo jedinjenje opisano je u literaturi, ali kao sintetički derivat prirodnog proizvoda.

Jedinjenja 1 (24-metilencikloartan-3-ol), 3 ( $3\beta$ -benzoiloksi-13 $\alpha$ -izovaleriloksiingenol), 5 (20-benzoiloksi-13 $\alpha$ -dodekanoiloksi-12-deoksifobol), 7 (20-benzoiloksi-13 $\alpha$ -izovaleriloksi-4,12-dideoksiforbol) i 8 (13 $\alpha$ ,20-dibenzoiloksi-4,12-dideoksiforbol) izolovana su i kao metaboliti biljne vrste *E. palustris* i njihova karakterizacija opisana je u poglavlju 2.1.

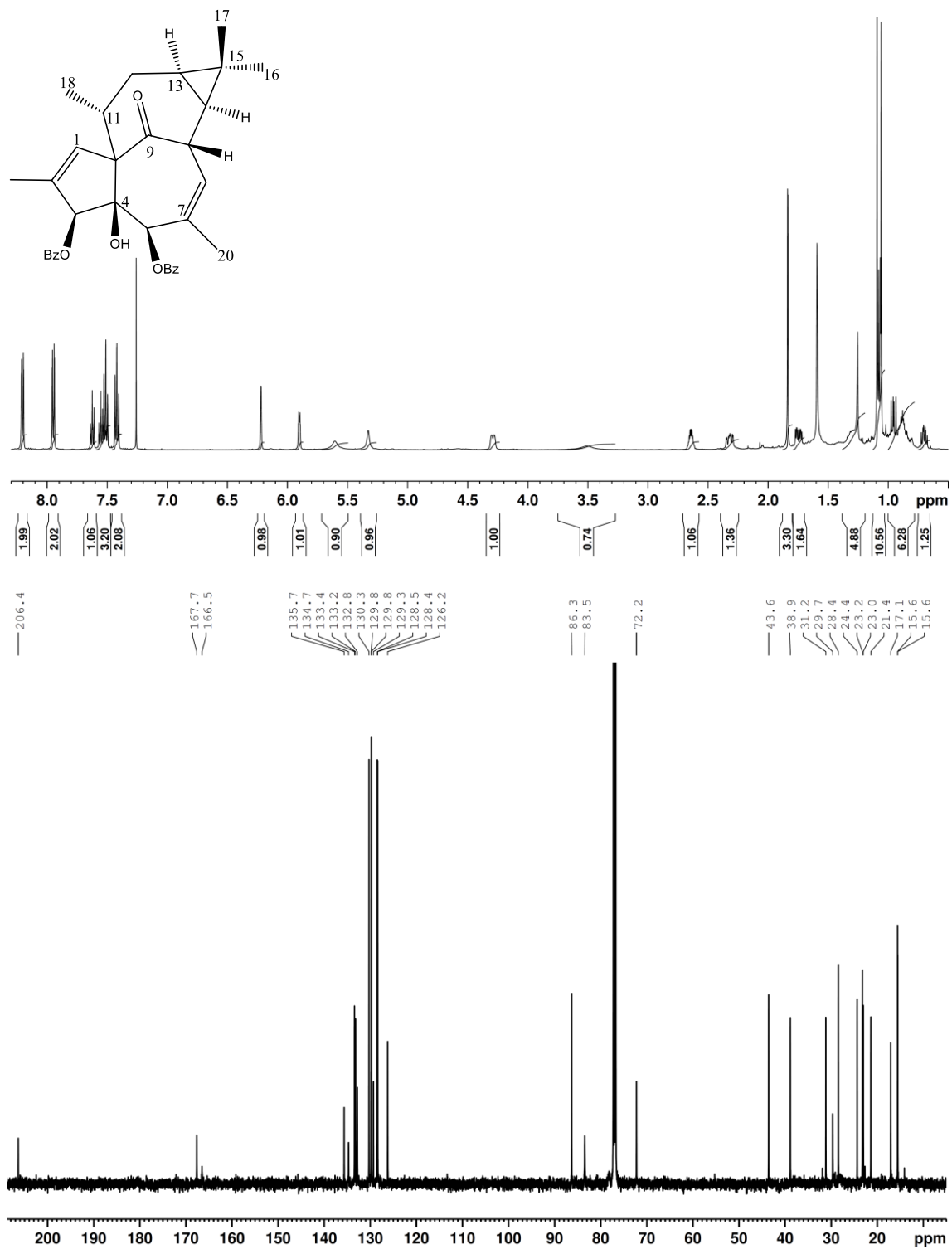
**Tabela 17.** Jedinjenja izolovana iz *E. lucida*



<b>1</b>	<b>3, 14, 15</b>		<b>16</b>	<b>5, 7, 8, 17, 18</b>
<b>Jedinjenje</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>Polazni materijal</b>
<b>1</b>				Stablo biljke
<b>3</b>	OH	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> CO O	OH	Stablo biljke
<b>14</b>	OBz	H	H	Stablo biljke
<b>15</b>	OBz	H	OBz	Stablo biljke
<b>16</b>				Stablo biljke
<b>5</b>	$\beta$ -H	OiVal		Lateks
<b>7</b>	$\beta$ -H	OBz		Lateks
<b>8</b>	$\beta$ -H	OiBu		Lateks
<b>17</b>	$\beta$ -H	OiBu		Lateks
<b>18</b>	$\alpha$ -H	OiBu		Lateks

### 2.3.1. 3 $\beta$ ,5 $\beta$ -Dibenzoiloksi-20-deoksiingenol (14)

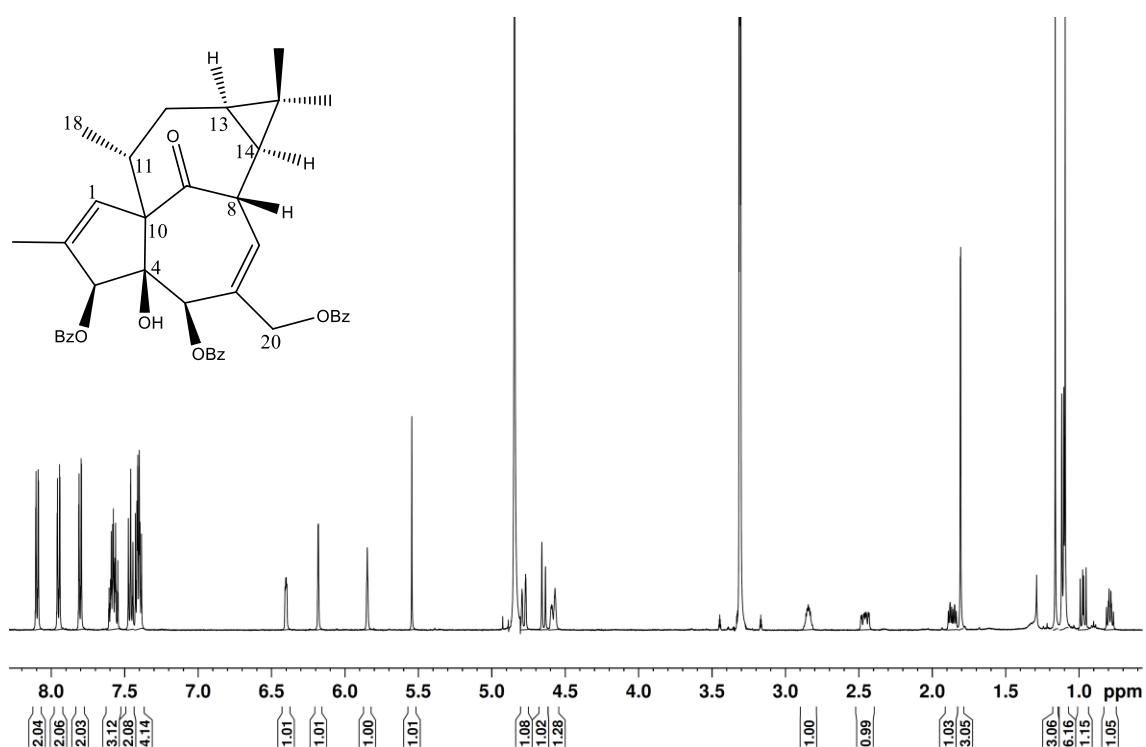
Jedinjenje **14** je izolovano kao bezbojna amorfna supstanca molekulske formule C<sub>34</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub>, koja je izračunata na osnovu  $m/z$  563,2410 za jon [M+Na]<sup>+</sup> u HRESIMS spektru ovog jedinjenja. U <sup>1</sup>H NMR spektru izolovanog jedinjenja (**Slika 31, Tabela 18**) uočavaju se signali dva benzoata (7,3–8,3 ppm), kao i signal na 6,22 ppm (1H,  $J=1,5$  Hz) karakterističan za proton H<sub>1</sub> kod derivata ingenola. Osim toga, u ovom spektru se uočava samo jedan signal u opsegu 4,00–4,30 ppm, i to sa integralom 1H i konstantom kuplovanja od 12,5 Hz, koji pripada protonu H<sub>8</sub> kod ingenola. Izostanak još jednog signala sa integralom 2 u ovom delu <sup>1</sup>H NMR spektra upućuje na to da položaj C<sub>20</sub> nije oksigenovan. Daljom analizom spektara i poređenjem sa literaturnim podacima zaključeno je da je ovo jedinjenje već izolovano iz *E. palustris* kao Euforbia faktor P<sub>8</sub>.<sup>89</sup>



Slika 31. <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektri jedinjenja 14

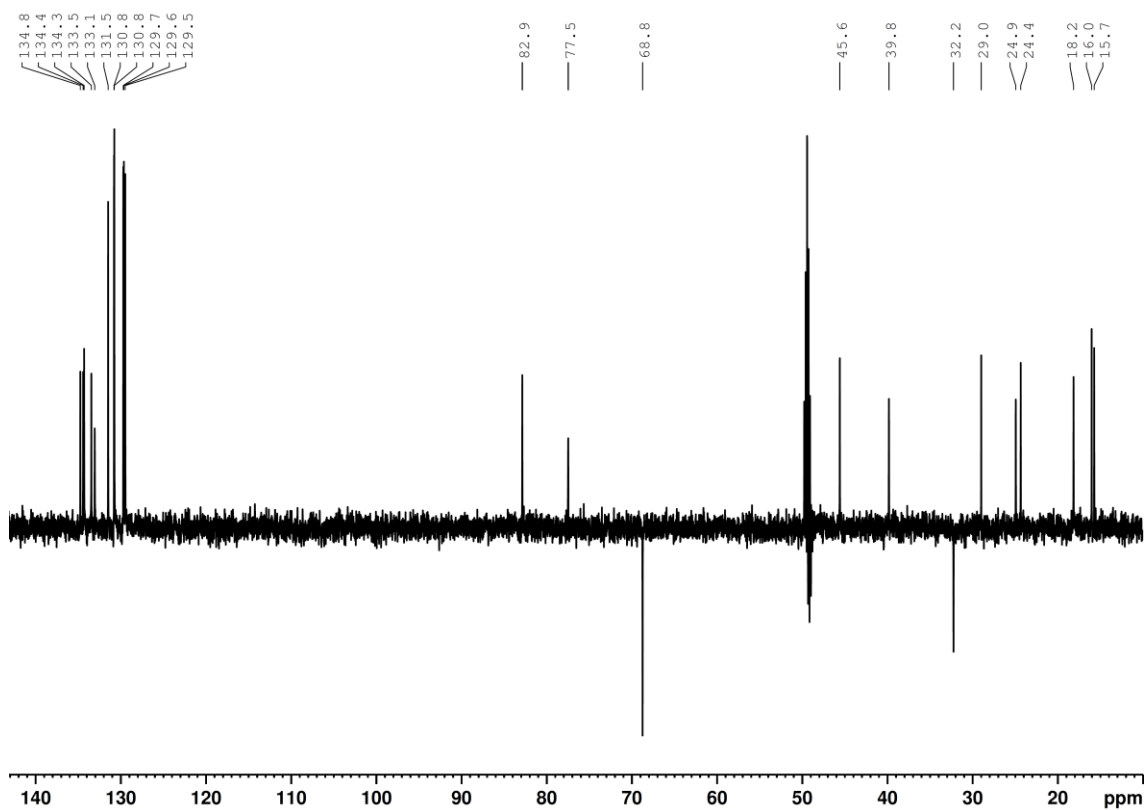
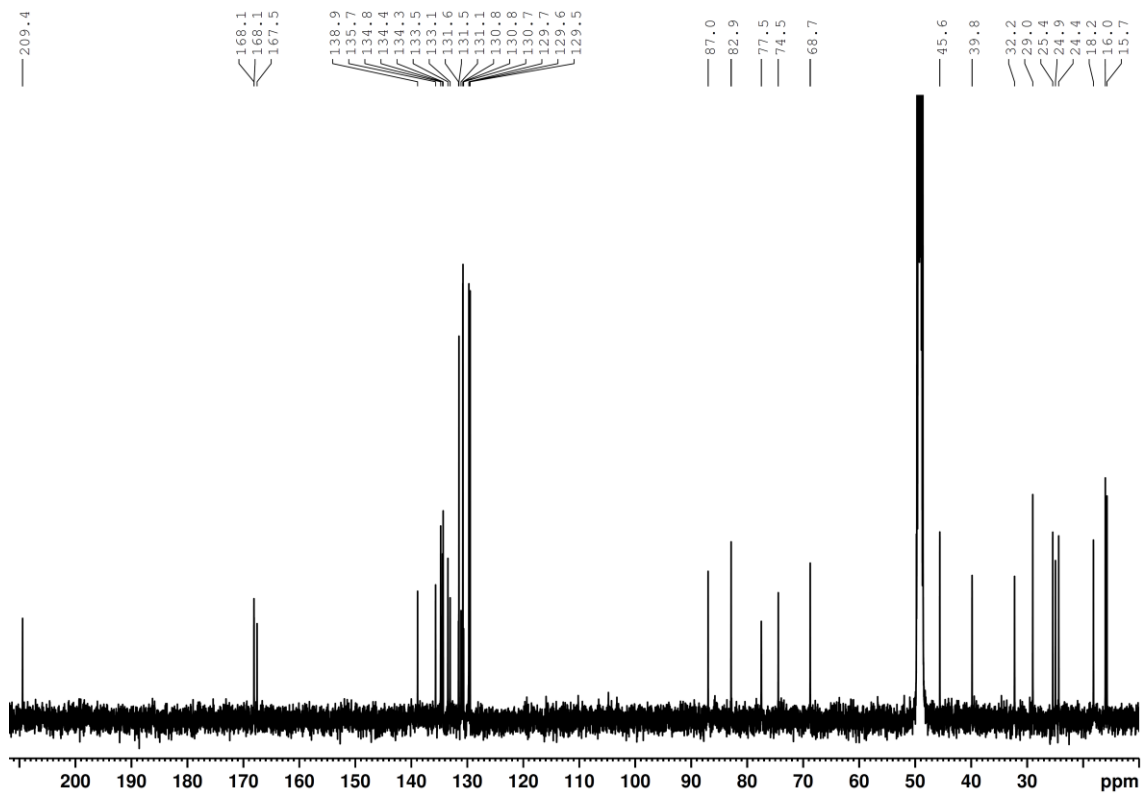
### 2.3.2. 3 $\beta$ ,5 $\beta$ ,20-Tribenzoiloksiingenol (15)

Jedinjenje **15** je izolovano kao bezbojna amorfna supstanca molekulske formule C<sub>41</sub>H<sub>40</sub>O<sub>8</sub> (na osnovu *m/z* 683,2410 za [M+Na]<sup>+</sup> jon). U <sup>1</sup>H NMR spektru (**Slika 32**, **Tabela 18**) izolovanog jedinjenja uočavaju se signali u opsegu 7,30–8,20 ppm koji pripadaju benzoatima. Na osnovu izgleda signala i broja protona, izolovano jedinjenje sadrži tri benzoil estarske grupe.



**Slika 32.** <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja **15**

U <sup>13</sup>C NMR spektru jedinjenja **15** (**Slika 29**, **Tabela 19**) uočava se ugljenik keto grupe (209,4 ppm), kao i ugljenici estraskih grupa (168,1; 168,1 i 167,5 ppm). Takođe, u ovom spektru se uočavaju i ugljenici sa dvostrukih ugljenik-ugljenik veza. Pored sp<sup>2</sup>-hibridizovanih ugljenika koji potiču iz benzoata, u molekulu postoje još dve dvostruke veze i to trisupstituisane. U DEPT spektru (**Slika 32**) izolovanog jedinjenja postoje dve metilenske grupe.



Slika 32.  $^{13}\text{C}$  NMR i DEPT spektri jedinjenja 15

Daljom analizom 1D i 2D NMR spektara utvrđeno je da je izolovano jedinjenje već opisano u literaturi, ali ne kao prirodni proizvod, već kao sintetički derivat prirodnog proizvoda. Ovaj molekul dobija se jednostavnom esterifikacijom ingenola sa benzoil-hloridom u baznoj sredini.<sup>90</sup>

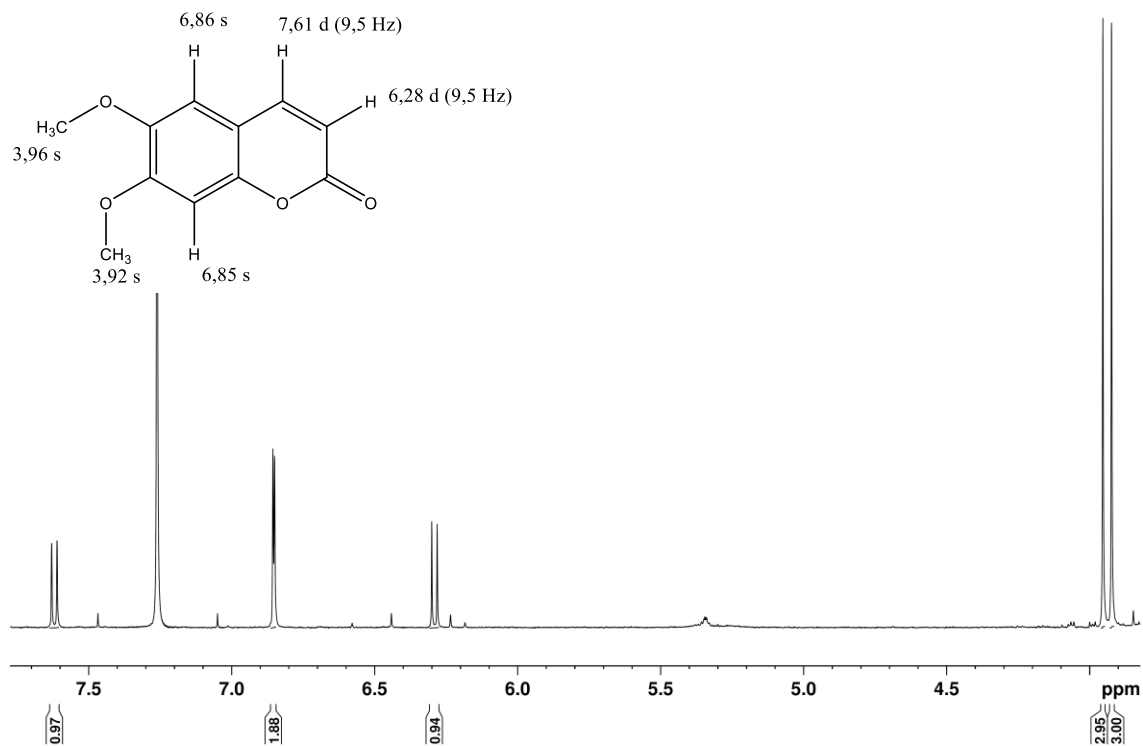
**Tabela 18.** <sup>1</sup>H (500 MHz) i <sup>13</sup>C (125 MHz) podaci za jedinjenja **14** (CDCl<sub>3</sub>, TMS) i **15** (CD<sub>3</sub>OD), δ (ppm), *J* (Hz)

Položaj	<b>14</b>		<b>15</b>	
	δ <sub>H</sub>	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	δ <sub>C</sub>
1	6,22 d (14,0)	132,8	6,18 d (1,5)	133,1
2	-	135,7	-	138,9
3	5,33 brs	83,5	5,54 brs	82,9
4 (OH)	3,51 brs	86,3	-	87,0
5	5,61 brs	78,1*	5,84 brs	77,5
6	-	134,7	-	135,7
7	5,90 m	126,2	6,42 m	133,5
8	4,29 d (12,0)	43,6	4,58 m	45,6
9	-	206,4	-	209,4
10	-	72,2	-	74,5
11	2,64	38,9	2,85 m	39,8
12 <sub>α</sub>	1,74	31,2	1,87 dt (16,0; 6,0)	32,2
12 <sub>β</sub>	2,31	23,0	2,46 ddd (15,0; 5,0; 3,0)	24,9
13	0,71	23,2	0,79 td (8,8; 6,3)	24,4
14	0,95 dd	24,4	0,97 dd (11,8; 8,3)	25,4
15	-	28,4	-	29,0
16	1,06 s	15,6	1,09 s	16,0
17	1,09 s	17,1	1,17 s	18,2
18	1,07 d (7,1)	15,6	1,11 d (7,2)	15,7
19	1,86 d	21,4	1,81 d (1,5)	68,7
20	1,60 s	-	4,65 d (12,0)	4,78 d (12,0)
OR-3				
C=O	-	167,7	-	168,1
1	-	129,3	-	130,7
2	7,95 dd (8,5; 1,3)	129,8	7,96 dd (8,5; 1,3)	130,8
3	7,42 t (7,5)	128,4	7,46	129,7
4	7,56 tt (7,5; 1,4)	128,5	7,58	134,6
R-5				
C=O	-	-	-	168,1
1	-	-	-	131,6
2	8,21 dd (8,4; 1,4)	130,3	8,11 dd (8,5; 1,3)	131,5
3	7,52 t (7,5)	133,2	7,41 m	129,6
4	7,62 tt (7,5; 1,7)	133,4	7,56 m	134,3
R-20				
C=O	-	-	-	167,5
2	-	-	-	131,1
3	-	-	7,82 dd (8,5; 1,3)	130,8
4	-	-	7,40 m	129,5
5	-	-	7,57 m	134,4

\*– očitano iz HSQC spektra

### 2.3.3. Skoparon (16)

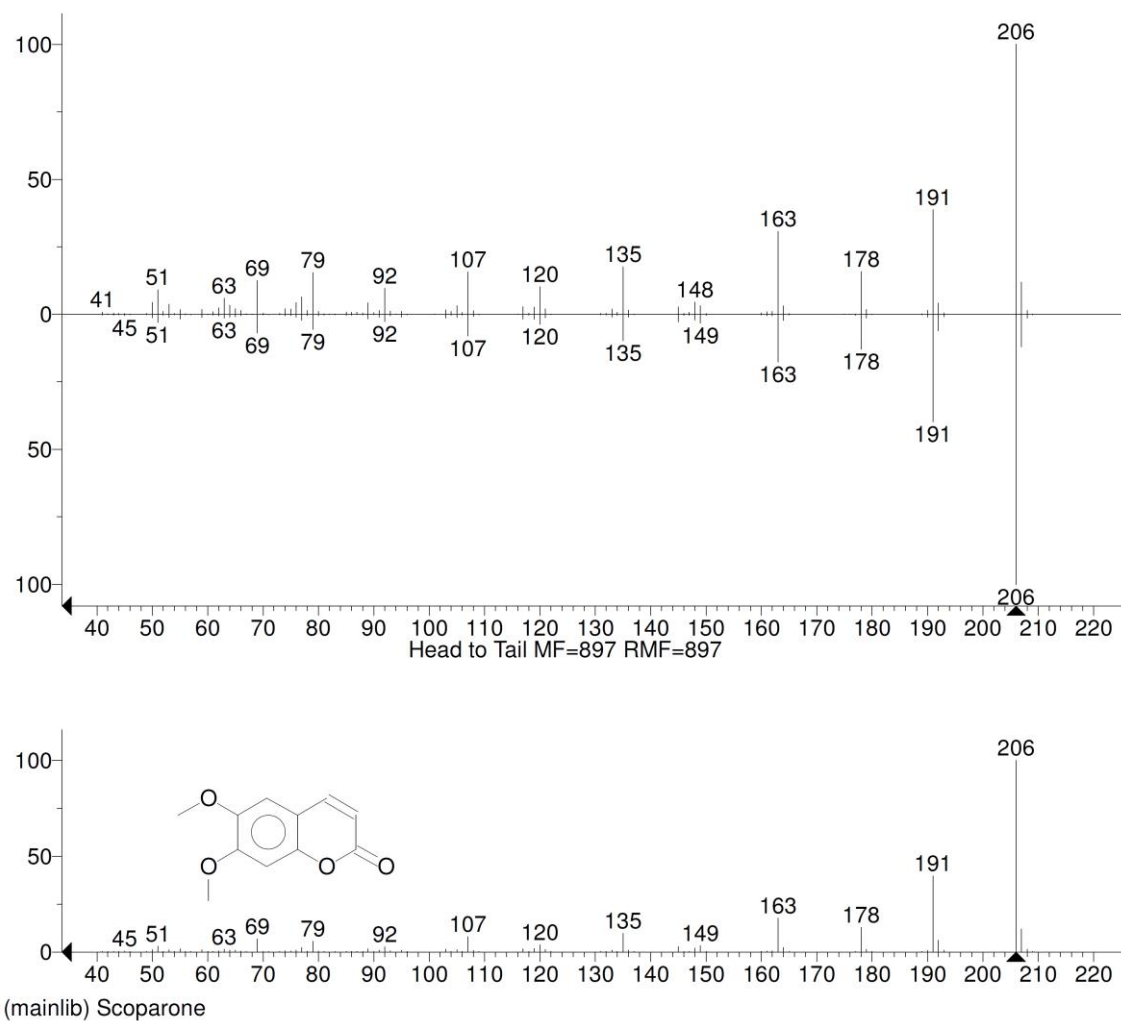
Jedinjenje **16** izolovano je kao blede žuta amorfna supstanca. U  $^1\text{H}$  NMR spektru ovog jedinjenja (**Slika 33**) uočavaju se četiri protona u oblasti od 6–8 ppm i dve metoksi grupe ( $\delta$  3,92 i 3,96 ppm).



**Slika 33.**  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja **16**

Izolovano jedinjenje je analizirano GC/MS tehnikom (**Slika 34**). Analizom podataka dobijenih iz  $^1\text{H}$  NMR spektra i GC/MS spektara utvrđeno je da je izolovani molekul skoparon. Skoparon je prvi put okarakterisan kao sekundarni metabolit *Afraegle paniculata*.<sup>91</sup>

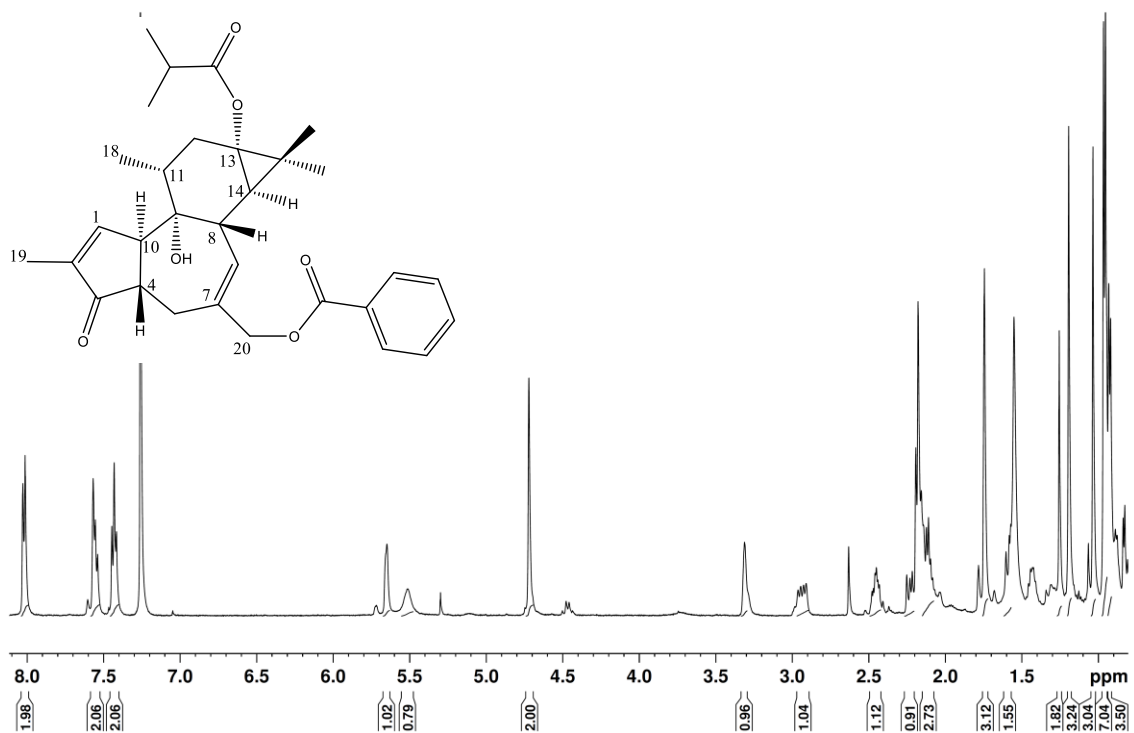




**Slika 34.** Rezultat GC/MS analize jedinjenja **16**

#### 2.3.4. 20-Benzoiloksi-13 $\alpha$ -izobutanoiloksi-4,12-dideoksiforbol (**17**)

Jedinjenje **17** izolovano je kao amorfna bezbojna supstanca molekulske formule  $C_{31}H_{38}O_6$  (na osnovu  $m/z$  524,3007 za  $[M+NH_4]^+$ ). Analizom 1D i 2D NMR spektara ovog jedinjenja i poređenjem dobijenih rezultata sa literaturnim podacima, identifikovano jedinjenje je 13 $\alpha$ -izobutanoiloksi-20-benzoiloksi-4,12-dideoksiforbol, prvi put opisan kao sekundarni metabolit biljne vrste *E. pannonica*.<sup>87</sup>  $^1H$  NMR spektar ovog jedinjenja prikazan je na **Slici 35**, a  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR podaci su dati u **Tabeli 19**.



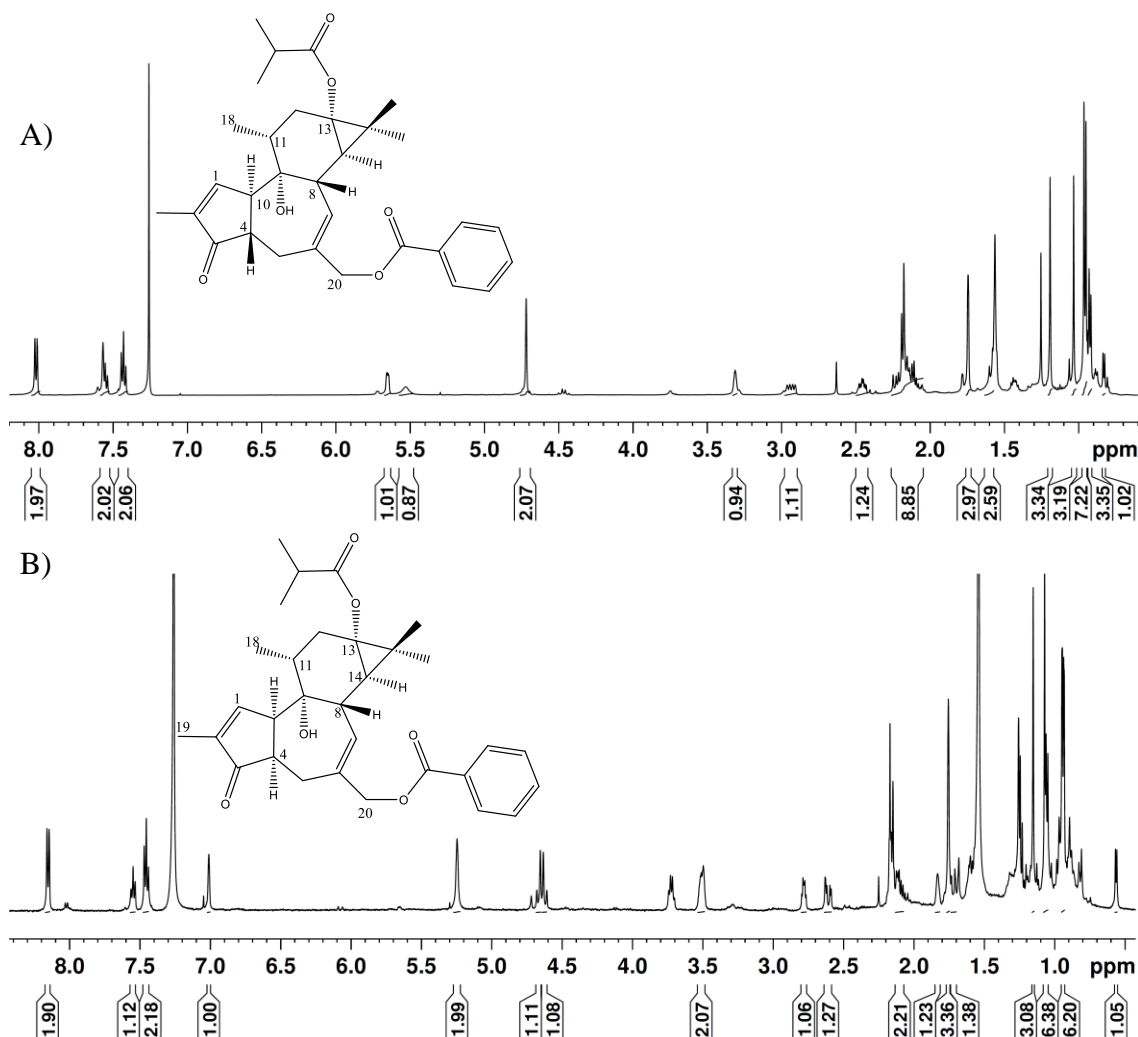
Slika 35. <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja 17

### 2.3.5. 20-Benzoiloksi-13 $\alpha$ -izobutanoiloksi-4-*epi*-4,12-dideoksiforbol (18)

Jedinjenje **18** izolovano je kao bezbojna amorfna supstanca molekulske formule C<sub>31</sub>H<sub>38</sub>O<sub>6</sub> (na osnovu  $m/z$  507,2741 za [M+H]<sup>+</sup>). Molekulske formule jedinjenja **17** i **18** su identične i u <sup>1</sup>H NMR spektrima oba jedinjenja uočavaju se dva estra i to po jedan benzoat i izobutirat (Slika 36, Tabela 19). Poređenjem hemijskih pomeranja protona ova dva jedinjenja zaključuje se da jedinjenje **18** nema istu strukturu kao jedinjenje **17**.

**Tabela 19.**  $^1\text{H}$  (500 MHz) i  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) podaci za jedinjenja **17** i **18** ( $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz))

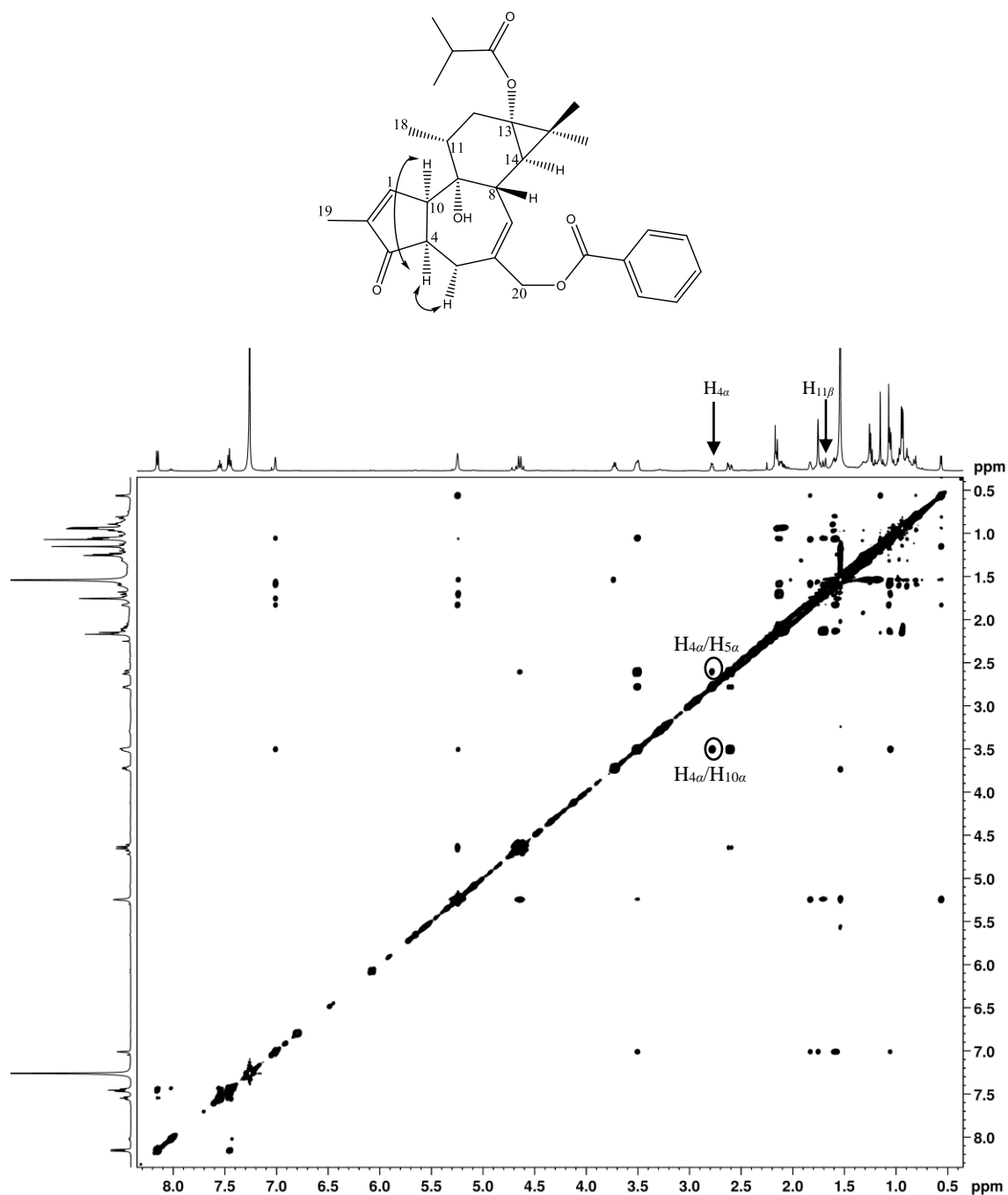
Položaj	<b>17</b>		<b>18</b>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	7,57 s	160,0	7,01 s	156,1
2	-	138,0	-	144,2
3	-	211,4	-	213,0
4	2,45 td (10,0; 4,5)	44,0	2,78 m	49,3
5 $\alpha$	2,22 m	29,8	2,61 dd (15,4;4,0)	
5 $\beta$	2,97 dd (18,0; 9,2)		3,50 m	26,7
6	-	133,5	-	133,5
7	5,65 d (5,7)	131,6	5,25 brs	130,1
8	2,17 m	41,7	1,83 brs	41,4
9-OH	5,53 s	76,3	5,25 brs	76,9
10	3,31 m	53,2	3,50 m	46,0
11	1,43 m	34,8	1,57 m	36,6
12	1,58 m	31,4	1,71 m	30,2
12	2,15 m		2,15 m	
13	-	64,3	-	64,2
14	0,83 d (5,8)	31,4	0,55 d (5,1)	32,9
15	-	24,3	-	25,4
16	1,03 s	14,5	1,09 s	15,1
17	1,20 s	22,6	1,15 s	23,1
18	0,92 d (5,8)	18,4	1,05 d (5,5)	15,6
19	1,76 d (2,0)	9,6	1,76 s	10,4
20	4,72 s	69,6	4,62 d (12,0) 4,66 d (12,0)	71,6
<b>OR-13</b>				
C=O	-	176,3	-	176,3
1	2,10 m	43,2	2,12 m	43,3
2	0,95 d (6,7)	21,4	0,93 d (6,4)	22,1
3	0,95 d (6,7)	21,4	0,94 d (6,4)	22,5
<b>OR-20</b>				
C=O	-	167,1	-	168,1
1	-	129,9	-	129,8
2	8,02 d (7,4)	129,3	8,15 d (7,9)	129,7
3	7,42 t (7,7)	128,2	7,45 t (7,9)	128,6
4	7,55 t (7,8)	132,4	7,55 t (7,1)	132,8



**Slika 36.** Uporedni prikaz <sup>1</sup>H NMR spektara jedinjenja **17** (A) i **18** (B)

U COSY spektru jedinjenja **18** uočavaju se isti spinski sistemi kao i kod jedinjenja **17**, što znači da je raspored supstituenata isti (estri se nalaze u položajima C<sub>13</sub> i C<sub>20</sub>). Takođe, proton na 4,65 ppm jedinjenja **18** spreže se sa karbonilnim ugljenikom na 168,2 ppm i, na osnovu ovog sprezanja, benzoat je u položaju C<sub>20</sub>, dok je u položaju C<sub>13</sub> vezan izobutirat. Estarske grupe su na isti način raspoređene i kod jedinjenja **17**. Jedino po čemu se razlikuju ova dva jedinjenja jeste stereochemija stereocentra C<sub>4</sub>. Petočlani i sedmočlani prstenovi tiglijanskog jezgra mogu biti povezani *cis* ili *trans*.<sup>86</sup> Kod najvećeg broja prirodnih tiglijana ova dva prstena povezana su *trans*, dok se kod manjeg broja tiglijanskih derivata nailazi na *cis* vezivanje. Karakteristika *cis* vezivanja je da proton H<sub>1</sub> ima niže hemijsko pomeranje (6,90–7,10 ppm) u <sup>1</sup>H NMR spektru u poređenju sa istim protonom *trans* izomera (7,50–7,70 ppm). Proton H<sub>1</sub> kod jedinjenja

**18** ima hemijsko pomeranje od 7,01 ppm, što upućuje da je jedinjenje **18** 4-epimer jedinjenja **17**. Da je proton H<sub>4</sub> α-orientisan dokazuje i izostanak NOE korelacije ovog protona sa protonom H<sub>11β</sub> u NOESY spektru (**Slika 37**) i postojanje NOE korelacija između H<sub>4α</sub> sa protonima H<sub>5α</sub> i H<sub>10α</sub>. Jedinjenje **18** predstavlja novi tiglijanski derivat.



**Slika 37.** NOESY spektar jedinjenja **18**

## 2.4. Sekundarni metaboliti izolovani iz biljne vrste *Euphorbia nicaeensis* All.

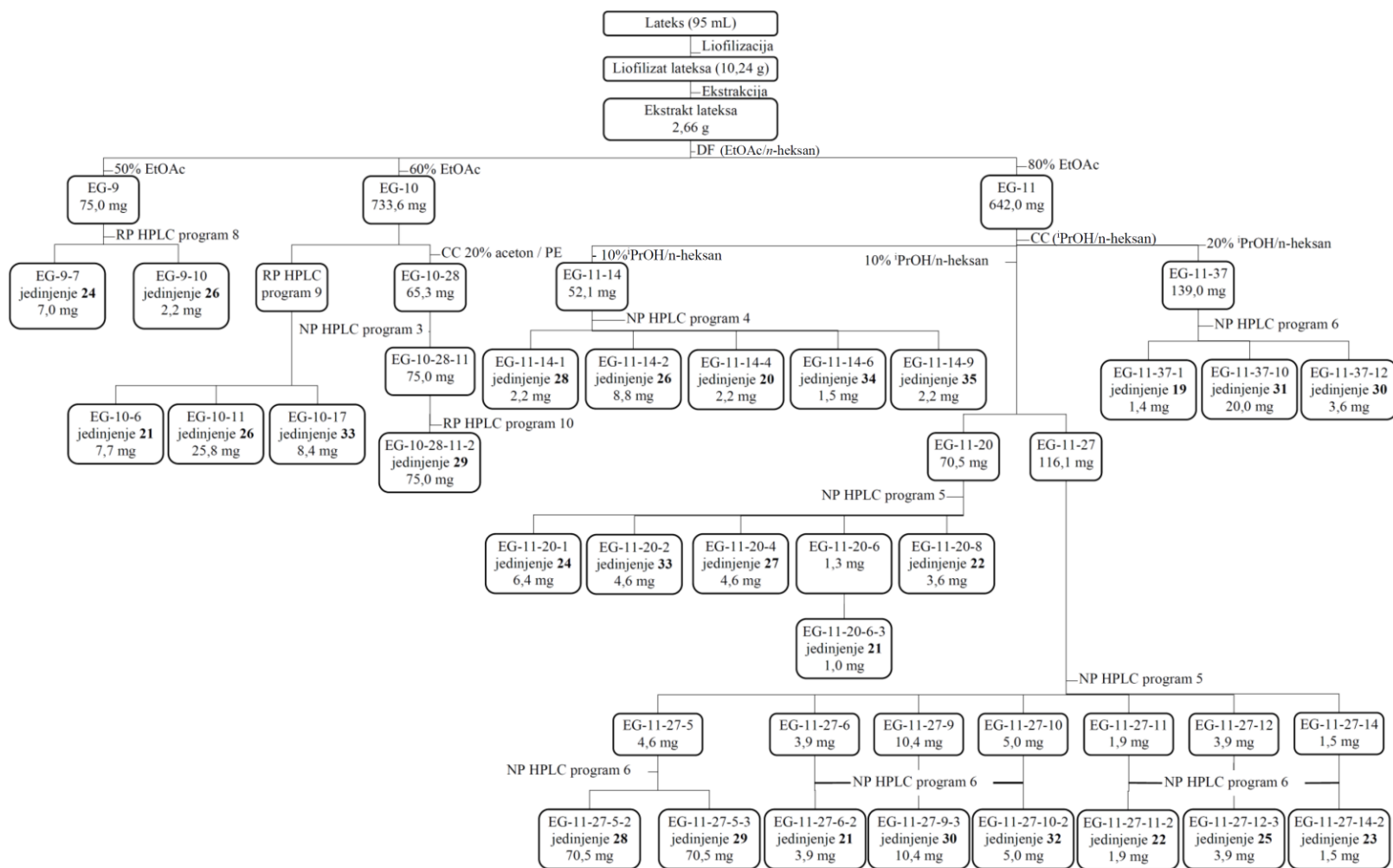
Lateks biljne vrste *E. nicaeensis* prikupljen je na Zagajičkim brdima u Deliblatskoj peščari u junu 2014. godine (GPS koordinate 44°56'57,4"N, 21°11'13,5"E). Vaučer biljne vrste (No. 16865) deponovan je u herbarijumu Botaničke bašte „Jevremovac” Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Prikupljeni lateks je najpre liofilizovan, zatim ekstrahovan smešom rastvarača etil-acetat/*n*-heksan (1/1 V/V) i dobijeni ekstrakt je grubo frakcionisan „*dry-column flash*” hromatografijom. Odabrane frakcije su dalje frakcionisane direktno normalno faznom tečnom hromatografijom ili najpre hromatografijom na gravitacionoj koloni nakon koje je sledila normalno fazna tečna hromatografija (Šema 5). Uslovi hromatografisanja prikazani su u poglavlju 3.2.4.

Primenom hromatografskih tehnika iz lateksa *E. nicaeensis* izolovano je 17 jedinjenja (Tabela 20) od kojih 15 jedinjenja pripada diterpenima jatrofanskog tipa, dok su preostala dva jedinjenja triterpeni lanostanskog tipa (34 i 35). Od ukupnog broja izolovanih jatrofana, sedam jedinjenja je po prvi put izolovano i opisano (19, 21–23, 25, 29, 30)<sup>93</sup>, dok je preostalih osam (20, 24, 26–28, 31–33) prvi put izolovano iz biljne vrste *E. dendroides*.<sup>24, 93</sup>

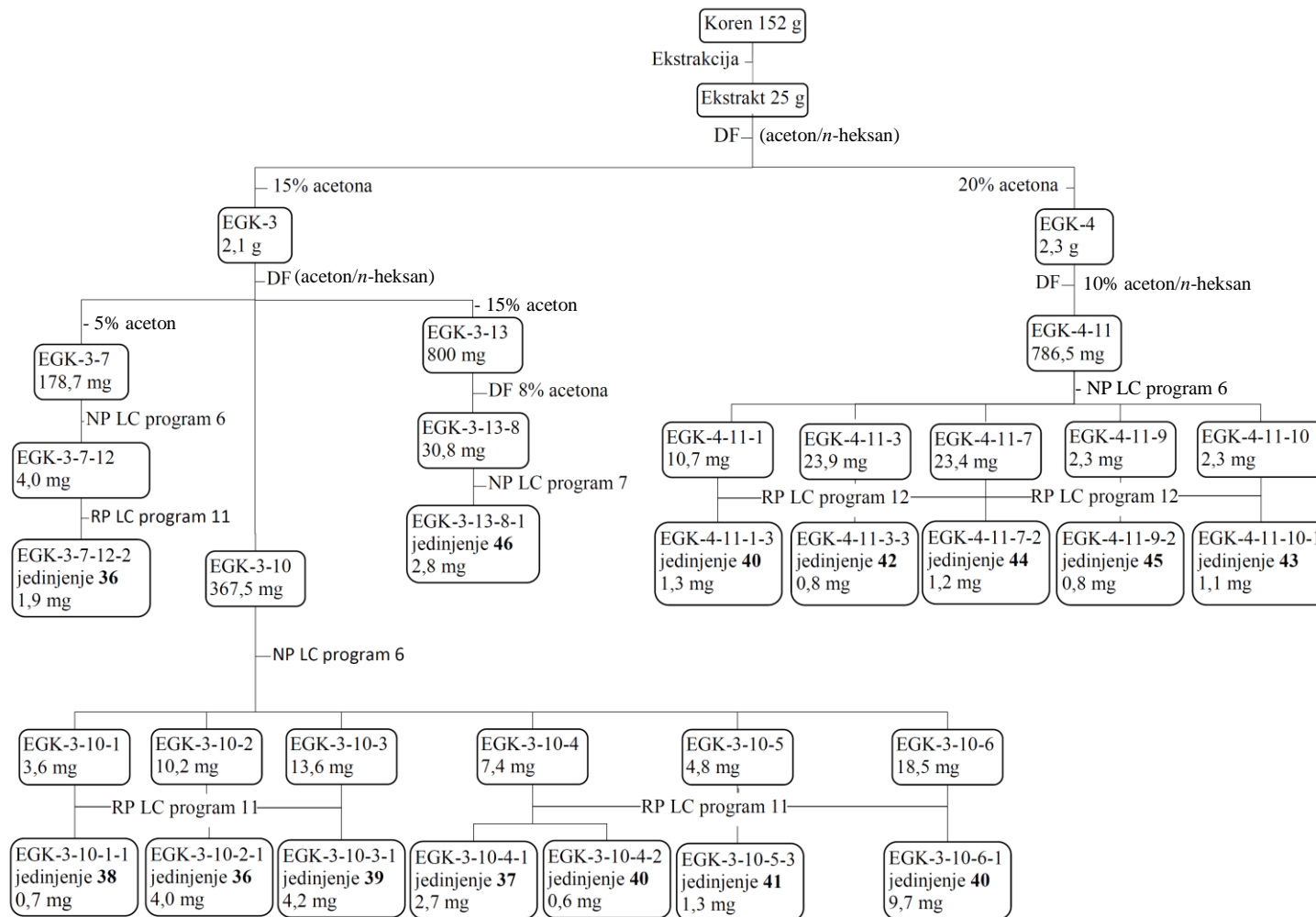
Koren *E. nicaeensis* prikupljen je u maju 2018. godine na istom lokalitetu kao i lateks. Biljni materijal je osušen, samleven i dodatno prosušen. Potpuno suv samleven koren podvrgnut je kontinualnoj ekstrakciji 96%-nim etanolom uz zagrevanje tokom 2 h, a zatim je ostavljen preko noći u rastvaraču. Dobijeni ekstrakt je frakcionisan „*dry-column flash*” hromatografijom. Odabrane frakcije su još jednom razdvajane „*dry-column flash*” hromatografijom, a zatim je za neke od ovako dobijenih frakcija primenjena normalno fazna tečna hromatografija (Šema 6). Pojedine frakcije dobijene razdvajanjem normalno faznom tečnom hromatografijom dodatno su prečišćene reverzno faznom tečnom hromatografijom.

Iz korena *E. nicaeensis*, primenom hromatografskih tehnika, izolovano je jedanaest jedinjenja od kojih osam pripada diterpenima tiglijanskog tipa (**36–43**), dva diterpenima jatrofanskog tipa (**44** i **45**) i jedan triterpenskim derivatima (**46**) (**Tabela 21**). Od ukupnog broja izolovanih tiglijana, šest jedinjenja je po prvi put izolovano i okarakterisano. Takođe, izolovani jatrofani do sada nisu poznati.



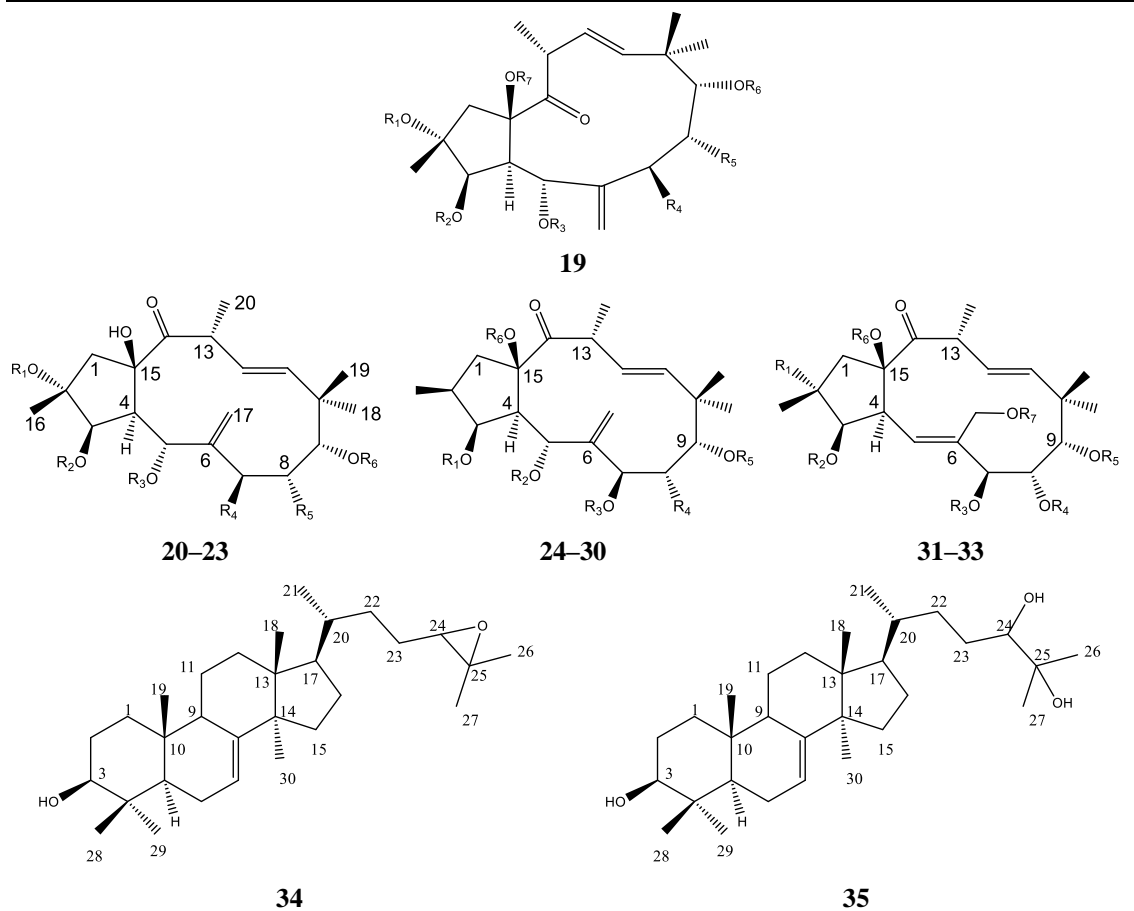
Šema 5. Put izolovanja jedinjenja 19–35 iz lateksa *E. nicaeensis* (jun 2014.)





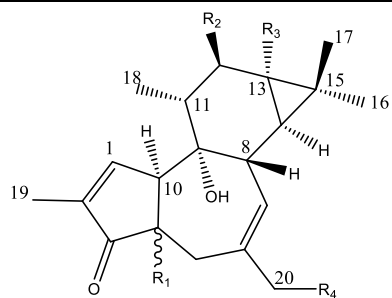
Šema 6. Put izolovanja jedinjenja 36–47 iz korena *E. nicaeensis* (maj 2018.)

**Tabela 20.** Jedinjenja izolovana iz lateksa *E. nicaeensis*

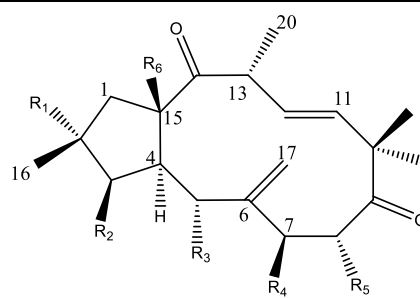


Jedinjenje	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
<b>19</b>	H	Ac	Ac	H	H	Nic	Ac
<b>20</b>	Ac	iBu	Ac	OiBu	OAc	Nic	-
<b>21</b>	Ac	Pr	Ac	O <sup>i</sup> Bu	OAc	Nic	-
<b>22</b>	Nic	iBu	Ac	OiBu	OAc	Ac	-
<b>23</b>	Nic	Pr	Ac	OiBu	OAc	Ac	-
<b>24</b>	Pr	Ac	iBu	OAc	Nic	H	-
<b>25</b>	Pr	Ac	Ac	H	Nic	Ac	-
<b>26</b>	iBu	Ac	iBu	OAc	Nic	H	-
<b>27</b>	Pr	Ac	iBu	OAc	Nic	Ac	-
<b>28</b>	Ac	Ac	iBu	OAc	Nic	H	-
<b>29</b>	Ac	Ac	iBu	OAc	Nic	Ac	-
<b>30</b>	Pr	Ac	iBu	ONic	Ac	H	-
<b>31</b>	OAc	Ac	iBu	Ac	Nic	Ac	Ac
<b>32</b>	OAc	Pr	iBu	Ac	Nic	Ac	Ac
<b>33</b>	OAc	Ac	iBu	Ac	Bz	Ac	Ac

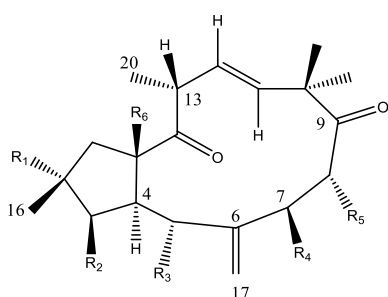
**Tabela 21.** Jedinjenja izolovana iz korena *E. nicaensis*



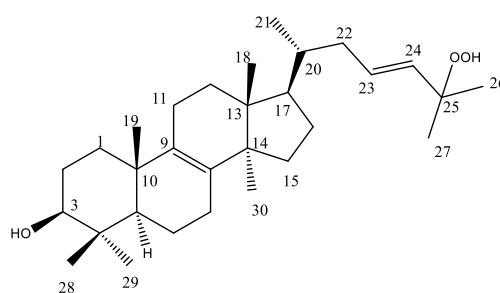
**36–43**



**44**



**45**



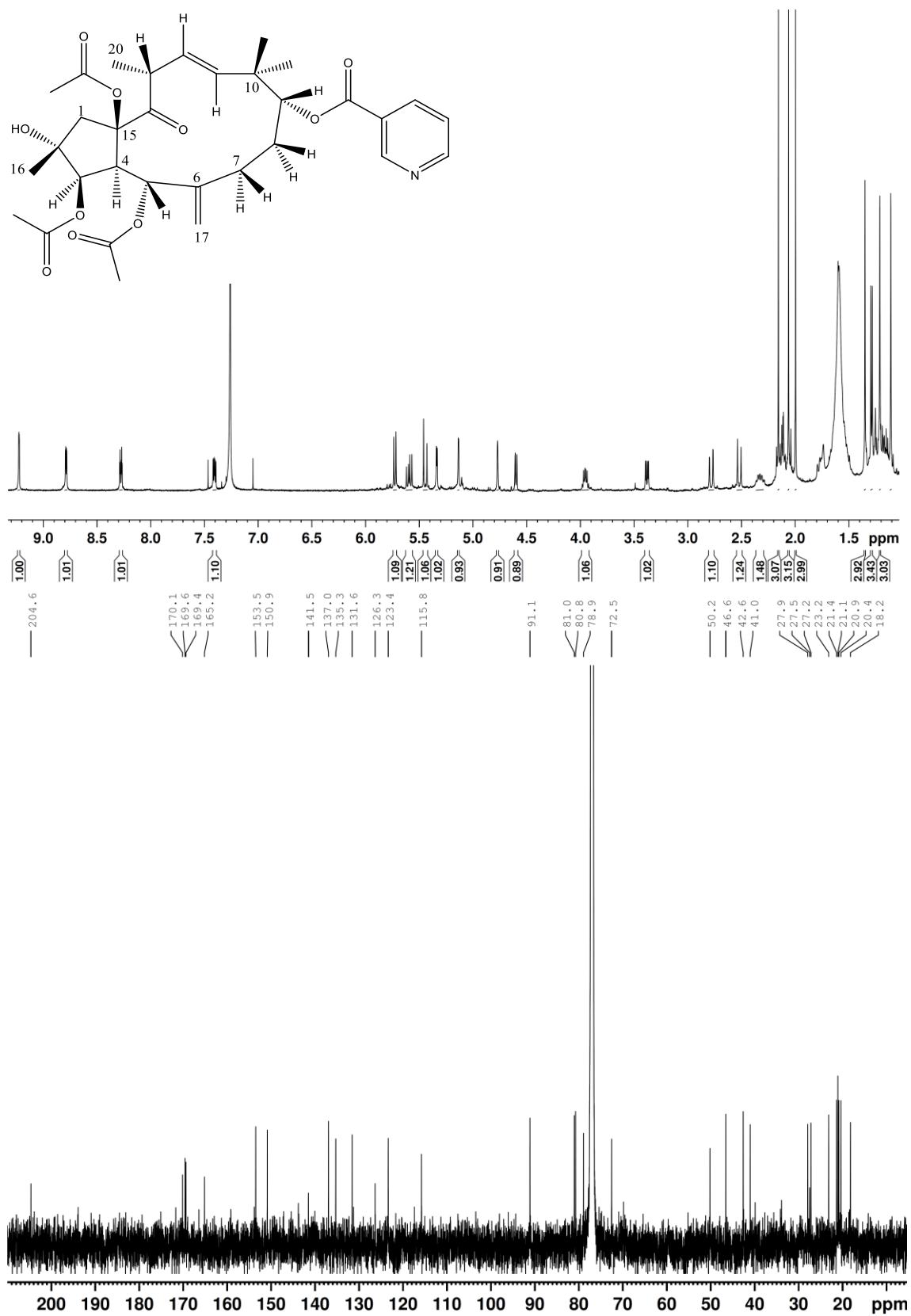
**46**

Jedinjenje	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
36	$\alpha$ -H	OBz	OiBu	H		
37	$\alpha$ -H	OAc	OiBu	H		
38	$\alpha$ -H	OBz	OiVal	H		
39	$\alpha$ -H	OAc	OiVal	H		
40	$\alpha$ -H	OBz	OAc	H		
41	$\beta$ -H	OBz	OAc	H		
42	$\alpha$ -H	OCO(CH=CH) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	OAc	OAc		
43	$\alpha$ -H	OBz	OAc	OAc		
44	OAc	OH	OBz	OAc	H	OBz
45	OBz	OAc	OBz	H	OAc	OAc

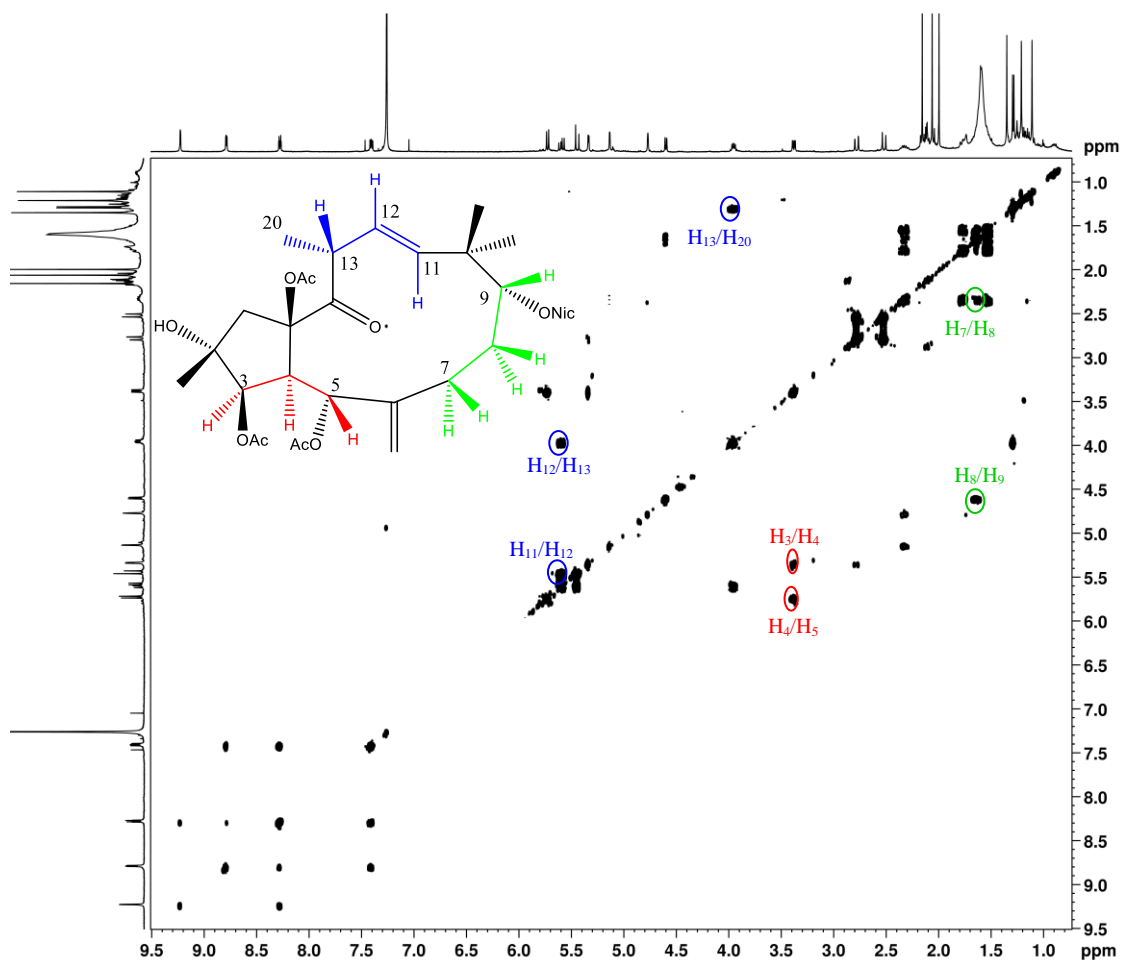
### 2.4.1. *3β,5α,15β*-Triacetiloksi-*2α*-hidroksi-*9α*-nikotinoiloksijatrofa- 6(17),11*E*-dien-14-on (19)

Jedinjenje **19** je izolovano kao bezbojna, amorfna susptanca. Molekulska formula jedinjenja  $C_{32}H_{41}NO_{10}$  dobijena je na osnovu podataka iz  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR (**Slika 38**, **Tabela 22**) i potvrđena je merenjem precizne molekulske mase – HRESIMS spektrometrijom za  $[M+H]^+$  jon izmerena je  $m/z$  vrednost 600,2803. Na osnovu molekulske formule, u molekulu postoji 13 nezasićenja. Detaljnom analizom  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR spektara može se zaključiti da je izolovano jedinjenje diterpenski poliestar koji u svojoj strukturi sadrži četiri estra (tri acetata i jedan nikotinat). Takođe, analizom ovih spektara utvrđeno je da u molekulu postoje i dve dvostruke ugljenik-ugljenik veze (jedna geminalno supstituisana i jedna *trans* supstituisana), pet kvaternarnih ugljenikovih atoma, od kojih su dva  $sp^2$ -hibridizovana (ugljenik keto grupe i ugljenik geminalno supstituisane dvostruke veze), dok su preostala tri  $sp^3$ -hibridizovana (od kojih su dva oksigenovana). Na osnovu svih spektroskopskih podataka utvrđeno je da je izolovano jedinjenje *3β,5α,15β*-triacetiloksi-*2α*-hidroksi-*9α*-nikotinoiloksijatrofa-6(17), 11*E*-dien-14-on i da ovo jedinjenje do sada nije opisano u literaturi.

$^1H$ - $^1H$  COSY spektar (**Slika 39**) omogućio je određivanje spinskih sistema koji su dalje međusobno povezivani pomoću korelacija koje se vide u HMBC spektru. U COSY spektru uočena su tri spinska sistema. Spinski sistem **A** čine protoni  $H_3$ ,  $H_4$  i  $H_5$  (korelacije  $H_3/H_4$  i  $H_4/H_5$ ), spinski sistem **B** čine protoni  $H_7$ ,  $H_8$  i  $H_9$  (korelacije  $H_7/H_8$  i  $H_8/H_9$ ), a spinski sistem **C** čine protoni  $H_{11}$ ,  $H_{12}$ ,  $H_{13}$  i  $H_{20}$  (korelacije  $H_{11}/H_{12}$ ,  $H_{12}/H_{13}$  i  $H_{13}/H_{20}$ ).



Slika 38. <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektri jedinjenja 19



**Slika 39.** COSY spektar jedinjenja **19**

Položaj egzometilenske dvostruke veze određen je pomoću HMBC spektra (**Slika 40**) na osnovu sprežanja  $C_5/H_{17a}$  i  $C_7/H_{17a}$ . Sprežanje  $C_5/H_{17a}$  i  $C_7/H_{17a}$  omogućuje povezivanje spinskih sistema **A** i **B**. Spinski sistemi **B** i **C** međusobno su povezani preko ugljenika  $C_{10}$ , koji se spreže sa protonima  $H_{11}$  ( $^2J_{C,H}$ ),  $H_{18}$  ( $^2J_{C,H}$ ) i  $H_{19}$  ( $^2J_{C,H}$ ). Na kraju, povezivanje spinskih sistema **A** i **C** omogućeno je sprežanjem protona  $H_{1\beta}$  sa ugljenikom  $C_{15}$  ( $^2J_{C,H}$ ) i protona  $H_{1\alpha}$  sa ugljenikom  $C_{14}$  ( $^3J_{C,H}$ ). Ugljenik  $C_2$  spreže se sa protonima iz metil grupe ( $H_{16}$ ). Drugi supstituent na atomu  $C_2$  je oksigenovana grupa. Na ovaj način fragmenti A–C povezani su u jatrofanski skelet.<sup>59</sup>

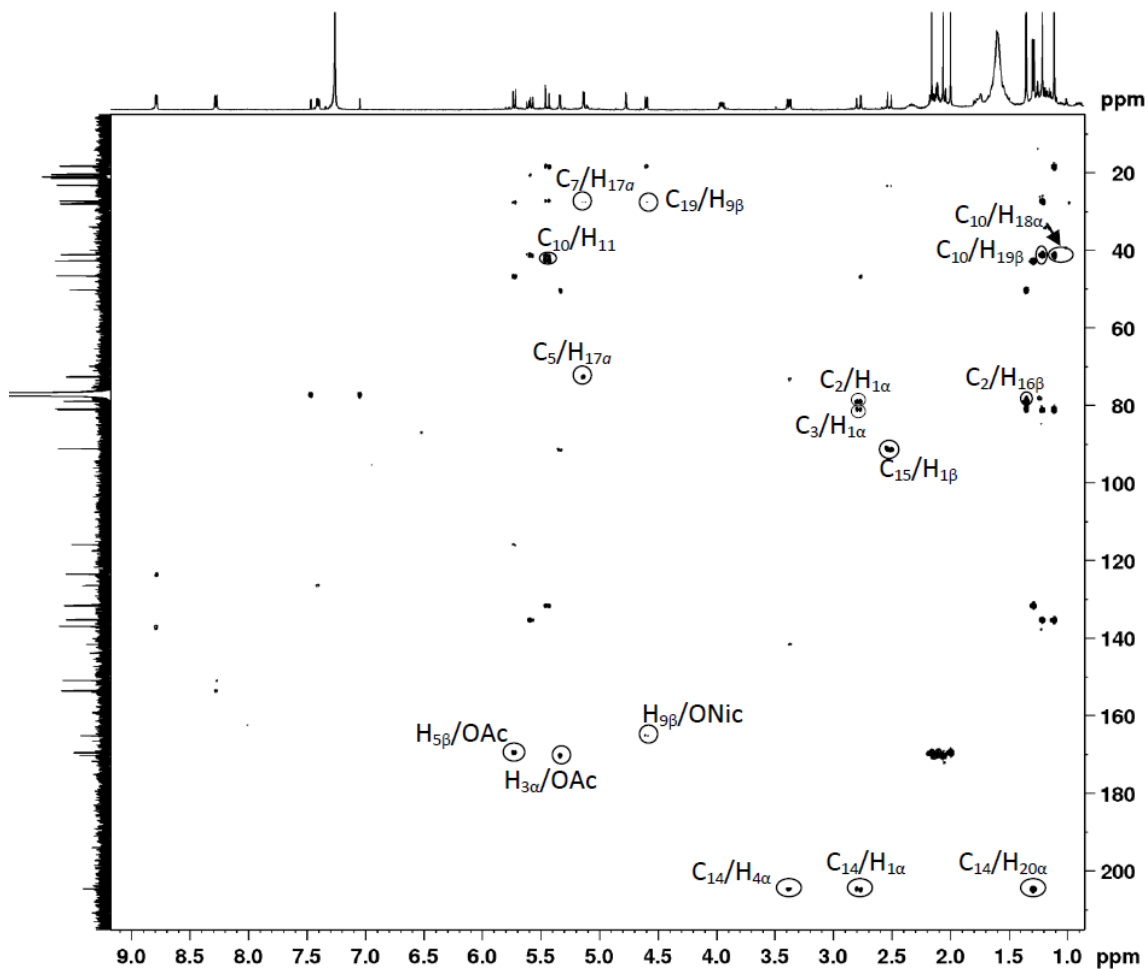
Položaj estarskih grupa (3-OAc, 5-OAc i 9-ONic) utvrđen je takođe pomoću HMBC spektra. Proton  $H_3$  (5,34 ppm) spreže se sa karbonilom acetata na 170,2 ppm.

Položaj drugog acetata određen je na osnovu sprežanja protona H<sub>5</sub> sa karbonilom na 169,4 ppm. Karbonil na 165,2 ppm spreže se sa protonom H<sub>9</sub>.

Određivanje položaja trećeg acetata omogućuje korelacija protona metil grupe ovog acetata (2,16 ppm) sa prostorno bliskim H<sub>5β</sub> (5,73 ppm) u NOESY spektru. Da bi metil grupa iz acetata imala NOE korelaciju sa protonom H<sub>5β</sub>, ovaj acetat mora biti u položaju C<sub>15</sub>, jer kada bi bio u položaju C<sub>2</sub> rastojanje između ova dva protona bi bilo veće od 4 Å i ne bi postojala NOE korelacija ovih protona. Stoga je za preostali kvaternarni C<sub>2</sub> vezana hidroksilna grupa čiji proton nije detektovan u <sup>1</sup>H NMR spektru. Hemijska pomeranja C<sub>2</sub> i C<sub>15</sub> u saglasnosti su sa strukturno bliskim eufoharicinom D izolovanim iz *E. characias*.<sup>94</sup>

Pomoću NOESY spektra (**Slika 41**) određena je relativna kofiguracija ovog jedinjenja. NOE korelacije između protona H<sub>5</sub>/H<sub>17a</sub> i velika vrednost konstante kuplovanja *J*<sub>4,5</sub> (10,1 Hz) ukazuje da izolovani jatrofan pripada *endo*-tipu konformacije sa egzometilenskom 6(17)-dvostrukom vezom normalnom na glavnu ravan molekula koja se javlja kod jatrofana bez supstituenata u položaju C<sub>7</sub>.<sup>95</sup>

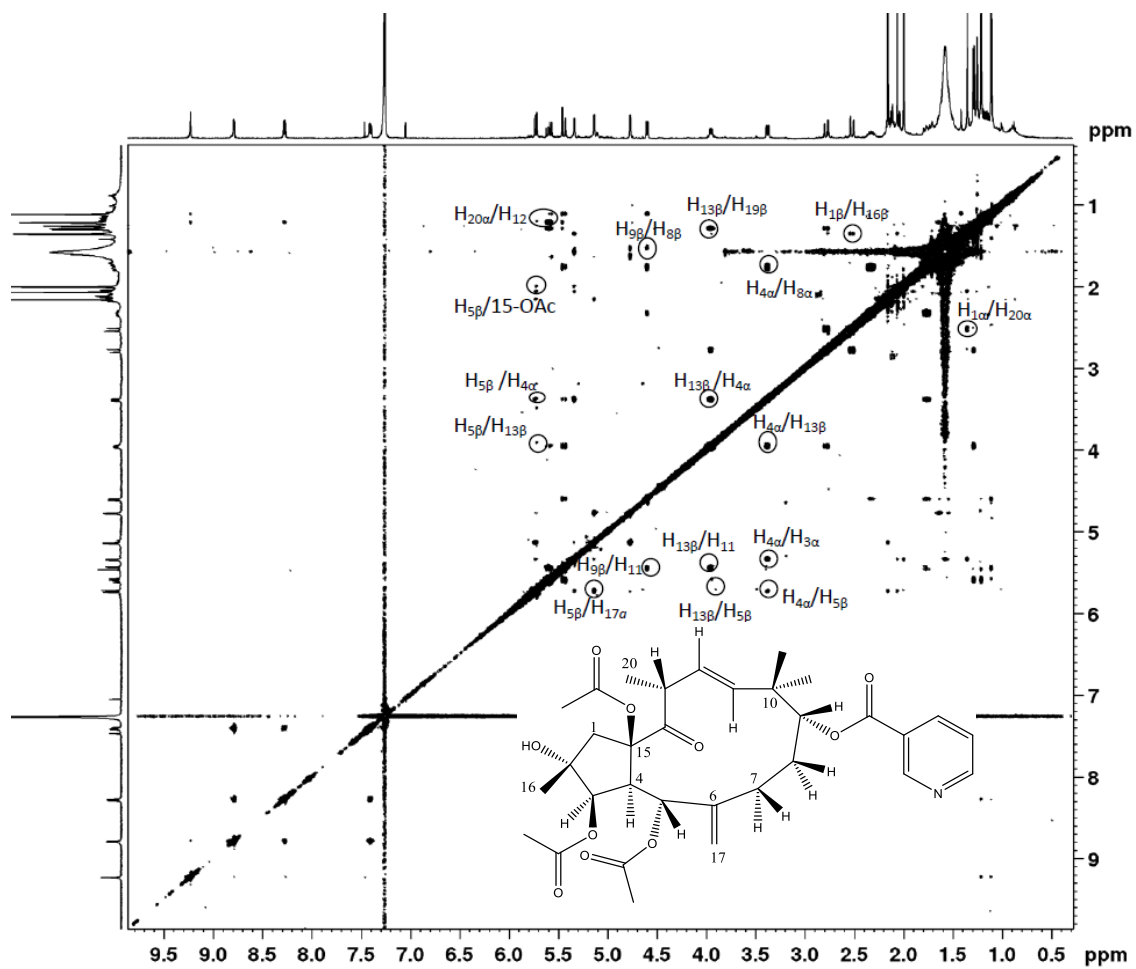
NOE korelacije protona H<sub>4α</sub> (konfiguracija pretpostavljena kao biogenetska)<sup>23</sup> sa protonom H<sub>3</sub> određuje α-orijentaciju ovog protona, a time i 3β-OAc orijentaciju.



Slika 40. HMBC spektar jedinjenja 19

Oksigenovani kvaternarni ugljenici su C<sub>2</sub> i C<sub>5</sub>. Protoni iz metil grupe C<sub>16β</sub> imaju korelaciju sa protonom H<sub>1β</sub> (2,50 ppm), dok se proton H<sub>1α</sub> spreže sa protonom H<sub>20α</sub>, a on dalje sa protonom H<sub>12α</sub>. Budući da je dvostruka veza u položaju C<sub>11</sub> *trans* supstituisana, proton H<sub>11</sub> je  $\beta$ -orijentisan. Proton H<sub>11β</sub> spreže se sa protonom H<sub>13β</sub>. Ova korelacija potvrđuje prethodno definisanu orijentaciju položaja C<sub>20α</sub>. NOE korelacija protona H<sub>13β</sub> sa protonom H<sub>5</sub> daje relativnu konformaciju protona H<sub>5β</sub>. Proton H<sub>13β</sub> spreže se i sa protonom H<sub>19β</sub>. Relativna konformacija protona H<sub>9</sub> određena je na osnovu njegovog sprezanja sa protonom H<sub>11β</sub>. Proton na hemijskom pomeranju 1,53 ppm (H<sub>8</sub>) spreže se sa protonom H<sub>9β</sub> što znači da je  $\beta$ -orijentisan, dok je proton H<sub>8</sub> na hemijskom pomeranju 1,65 ppm  $\alpha$ -orijentisan.





Slika 41. NOESY spektar jedinjenja 19

**Tabela 22.**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) i  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) podaci jedinjenja **19**, **21–23** ( $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz))

Položaj	19		21		22		23	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1 $\alpha$	2,78 dd (17; 1)	50,2	3,29 d (16)	53,2	3,36 d (16)	52,9	3,34 d (16)	52,9
1 $\beta$	2,50 d (17)		1,98 d (16)		2,13 d (16)		2,15 d (16)	
2	-	78,9	-	88,1	-	88,3	-	88,3
3	5,34 d (4)	80,8	5,61 d (3)	80,4	5,97 d (3)	78,1	5,98 d (3)	78,2
4	3,38 dd (10; 4)	46,6	3,49 brs	52,5	3,50 brs	51,0	3,49 brs	51,1
5	5,73 d (10)	72,5	5,49 brs	70,2	5,55 brs	68,5	5,53 brs	68,5
6	-	141,5	-	146,7*	-	145,3*	-	147,4*
7	2,33 m	27,5	5,02 brs	70,2	4,83 brs	68,9	4,81 brs	68,9
8 $\alpha$	1,65 m	27,9	-	72,4	-	70,8	-	70,8
8 $\beta$	1,53 m		5,59 brs		5,43 brs		5,44 brs	
9	4,60 d (8)	81,0	5,20 s	83,1	4,91 d (1)	80,0	4,92 brs	80,0
10	-	41,0	-	42,2	-	40,5	-	40,5
11	5,44 d (16)	135,3	5,94 d (16)	139,2	5,77 d (16)	137,8	5,78 d (16)	138,0
12	5,60 dd (16; 10)	131,6	5,79 m	129,6	5,72 m	127,4	5,76 m	127,4
13	3,98 dq (10; 7)	42,6	4,24 qv (7)	42,0	4,19 qv (7)	40,5	4,19 qv (7)	40,4
14	-	204,6	-	215,6*	-	213,7	-	213,7
15	-	91,1	-	89,3	-	87,7	-	87,7
16	1,34 s	23,2	1,51 s	20,2	1,65 s	18,8	1,66 s	18,8
17a	5,13 d (2)		5,11 brs		5,11 brs		5,12 brs	
17b	4,77 brs	115,8	5,03 brs	113,9	5,03 brs	113,1*	5,03 brs	112,3
18	1,11 s	18,2	1,04 s	26,9	1,25 s	24,8	1,27 s	24,6
19	1,21 s	27,2	1,34 s	26,4	0,94 s	25,0	0,94 s	25,2
20	1,29 d (7)	20,4	1,18 m	20,1	1,15 d (7)	19,1	1,16 d (7)	18,5
OR-2								
C=O			-	170,7	-	164,4	-	164,5
2			1,99 s	22,6	9,32 dd (2;1)	151,3	9,32 dd (2;1)	151,5
3					-	127,2	-	127,1
4					8,51 dt (8; 2)	137,8	8,51 dt (8;2)	137,7
5					7,38 ddd (8; 5; 1)	123,1	7,38 ddd (8; 5; 1)	123,1
6					8,74 dd (5; 2)	152,8	8,75 dd (5; 2)	153,0
OR-3								
C=O	-	170,1	-	173,7	-	174,6	-	172,1
2	2,06 s	20,9	2,42 q (8)	29,4	2,67 sp (7)	34,1	2,47 q (8)	27,8
3			1,20 t (8)	10,5	1,25 d (7)	18,4	1,23 t (8)	9,0
4					1,29 d (7)	19,4		
OR-5								
C=O		169,4	-	172,3	-	169,3	-	169,9
2		21,1	2,20 s	23,7	2,03 s	20,8	2,02 s	20,58
3								
R-7								
C=O			-	176,1	-	174,8	-	174,7
2			1,92 m	35,1	2,42 sp (7)	33,7	2,40 sp (7)	33,7
3			0,61 brs	19,3	0,96 d (7)	18,3	0,96 d (7)	18,3
4			0,87 d (6)	20,3	1,07 d (7)	18,5	1,08 d (7)	19,1
R-8								
C=O			-	171,5	-	169,9	-	169,9
2			2,06 s	22,3	2,03 s	20,7	2,03 s	21,1
OR-9								
C=O		165,2	-	165,6	-	169,9	-	169,2
2		150,9	9,23 brs	152,9	1,97 s	21,1	1,98 s	20,7
3		126,3	-	126,5*				
4		137,0	8,25 d (8)	138,8				
5		123,4	7,41 dd (8; 5)	125,0				
6		153,5	8,80 d (5)	155,3				
OR-15								
C=O		169,6						
2	2,16 s	21,4	2,80 brs	-	2,94 brs	-	2,93 brs	-

\*-očitano iz HMBC spektra

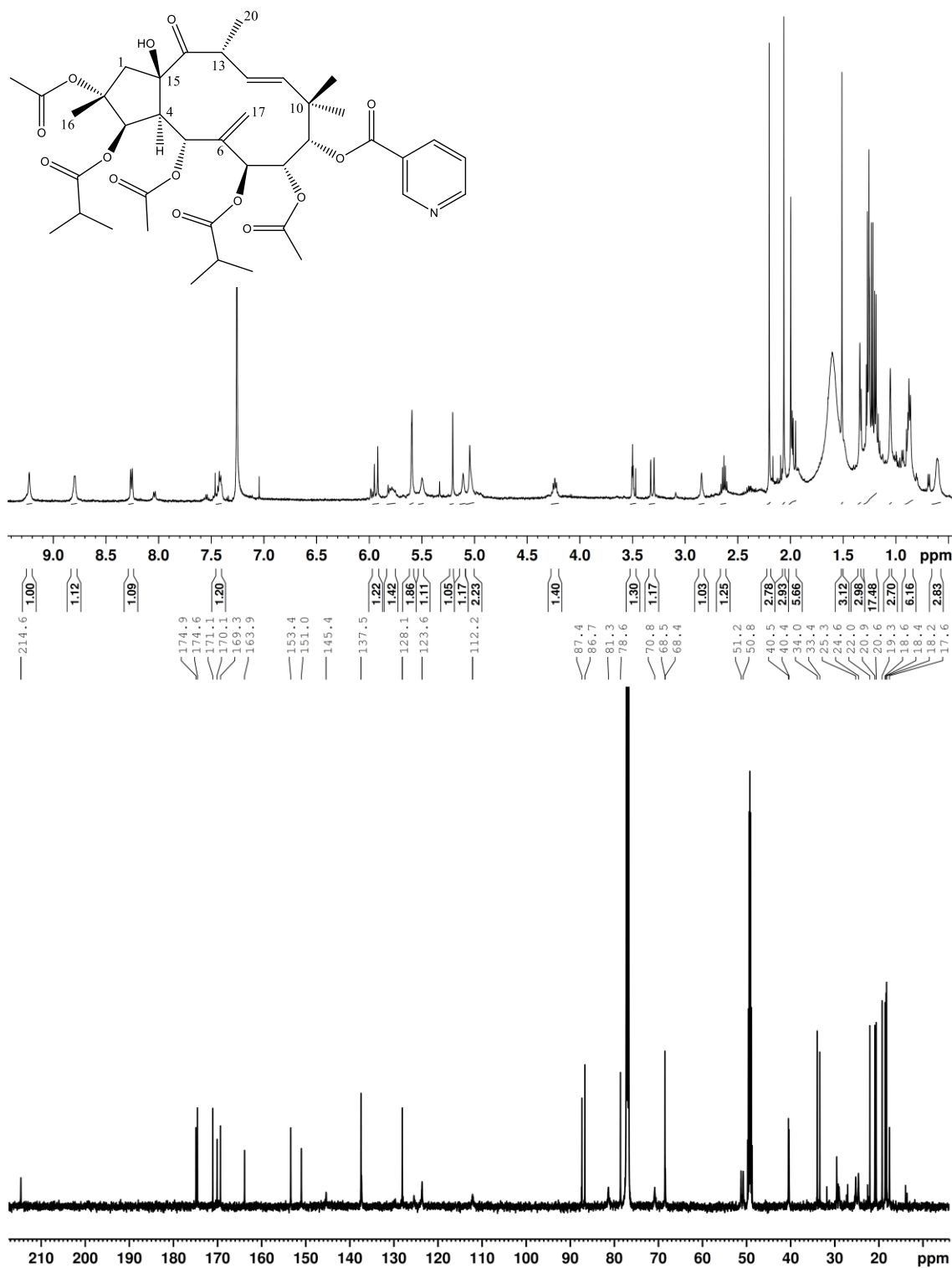
#### **2.4.2. 2 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Triacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diizobutanoiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksijatrofa-6(17),11*E*-dien-14-on (20)**

Jedinjenje **20** je izolovano kao amorfna bezbojna supstanca molekulske formule C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>NO<sub>14</sub> ( na osnovu *m/z* 772,3557 jona [M+H]<sup>+</sup> u HRESIMS). Poređenjem <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektara (**Slika 42**, **Tabela 23**) sa literaturnim podacima može se zaključiti da je izolovano jedinjenje eufodendrofan O ranije izolovan iz *E. dendroides*.<sup>24</sup>

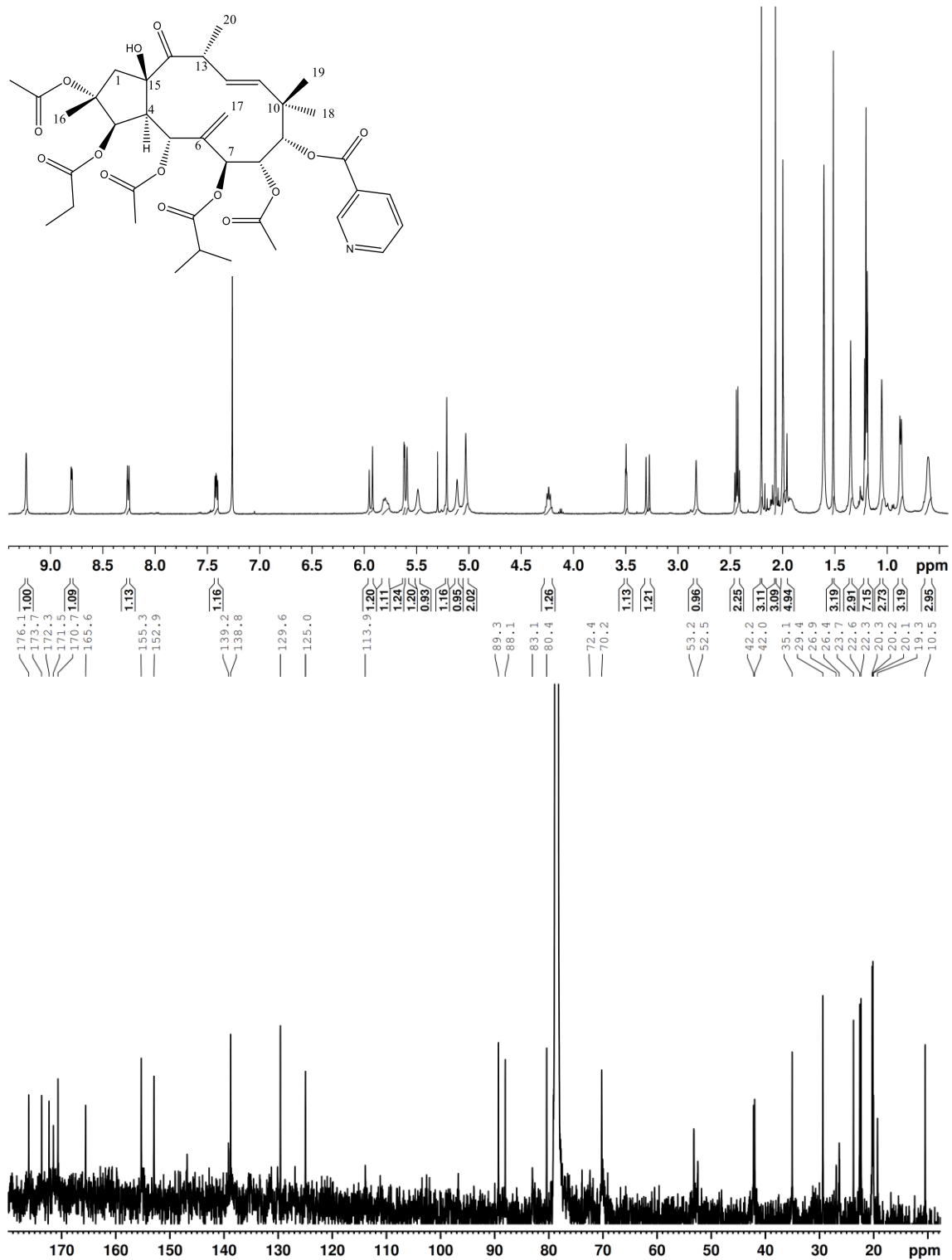
#### **2.4.3. 2 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Triacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksi-3 $\beta$ -propanoiloksijatrofa-6(17),11*E*-dien-14-on (21)**

Jedinjenje **21** je izolovano kao amorfna bezbojna supstanca molekulske formule C<sub>39</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>14</sub> koja je utvrđena na osnovu podataka iz <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR i HRESIMS spektara (*m/z* 758,3368 za [M+H]<sup>+</sup> jon). U poređenju sa jedinjenjem **20** (eufodendrofan O) jedinjenje **21** ima masu manju za 14 amu, tj. u svojoj strukturi ima jednu metilensku grupu manje od jedinjenja **20**. Na osnovu podataka dobijenih iz <sup>1</sup>H NMR spektra (**Slika 43**, **Tabela 22**), kao i iz HSQC spektra, jedinjenje **21** poseduje heksaesterifikovani jatrofanski skelet. Za razliku od jedinjenje **20**, kod koga su za jatrofansko jezgro vezana tri acetata, dva izobutirata i jedan nikotinat, za jatrofansko jezgro jedinjenja **21** vezana su tri acetata, jedan izobutirat, jedan nikotinat i jedan propionat.

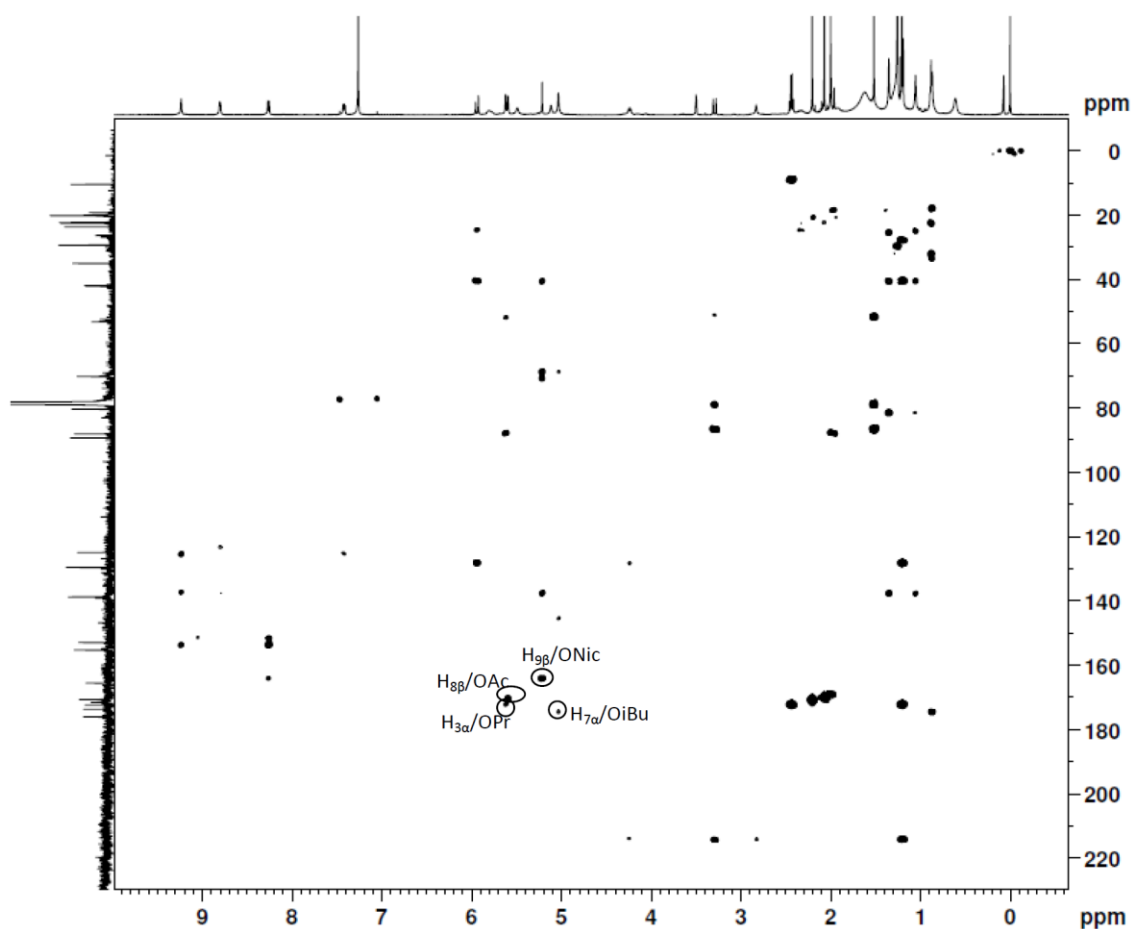
Položaj estara određen je na osnovu <sup>3</sup>J<sub>C,H</sub> korelacija u HMBC spektru (**Slika 44**). U ovom spektru mogu se uočiti korelacije protona H<sub>3</sub> sa karbonilnim ugljenikom na 173,7 ppm (karbonil propionata), zatim protona H<sub>7</sub> sa ugljenikom na 176,1 ppm (karbonil izobutirata), protona H<sub>8</sub> sa ugljenikom na 171,5 ppm (karbonil acetata) i protona H<sub>9</sub> sa ugljenikom na 165,5 ppm (karbonil nikotinata), dok se korelacije preostala dva estarska karbonila (sa hemijskim pomeranjima 170,7 i 172,3 ppm) sa odgovarajućim vodonocima ne uočavaju na spektru.



Slika 42. <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR spektri jedinjenja 20

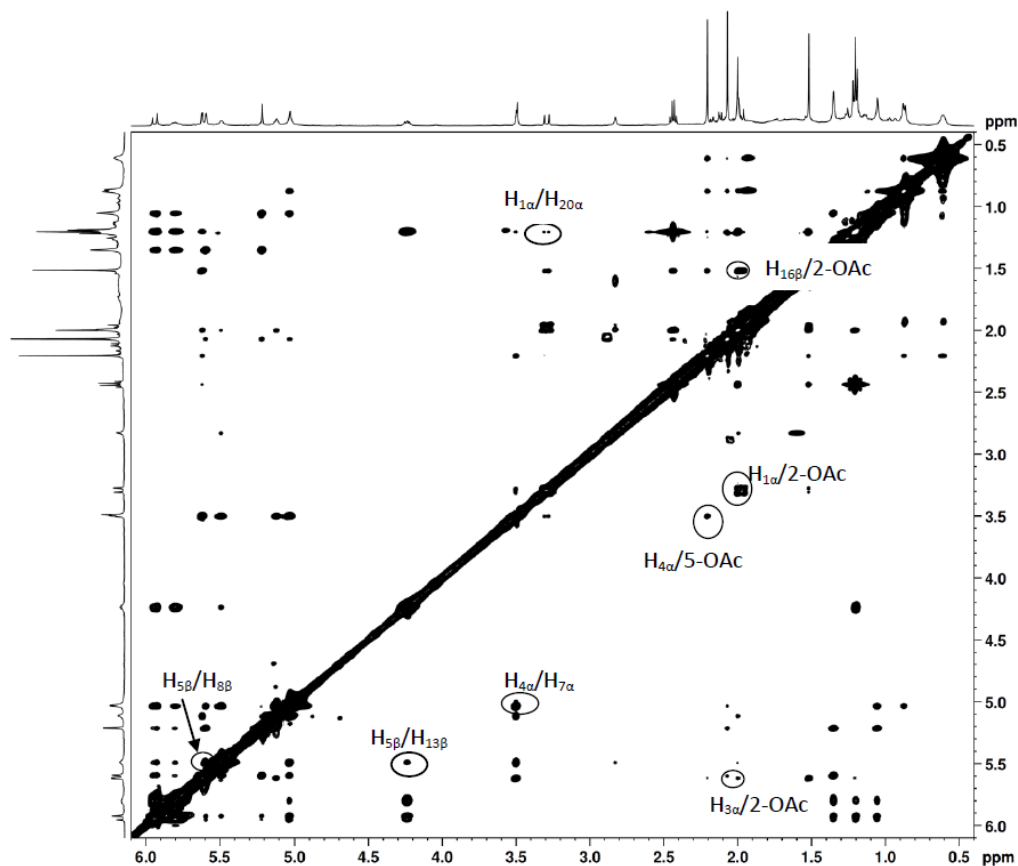


Slika 43.  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri jedinjenja 21



**Slika 44.** HMBC spektar jedinjenja **21**

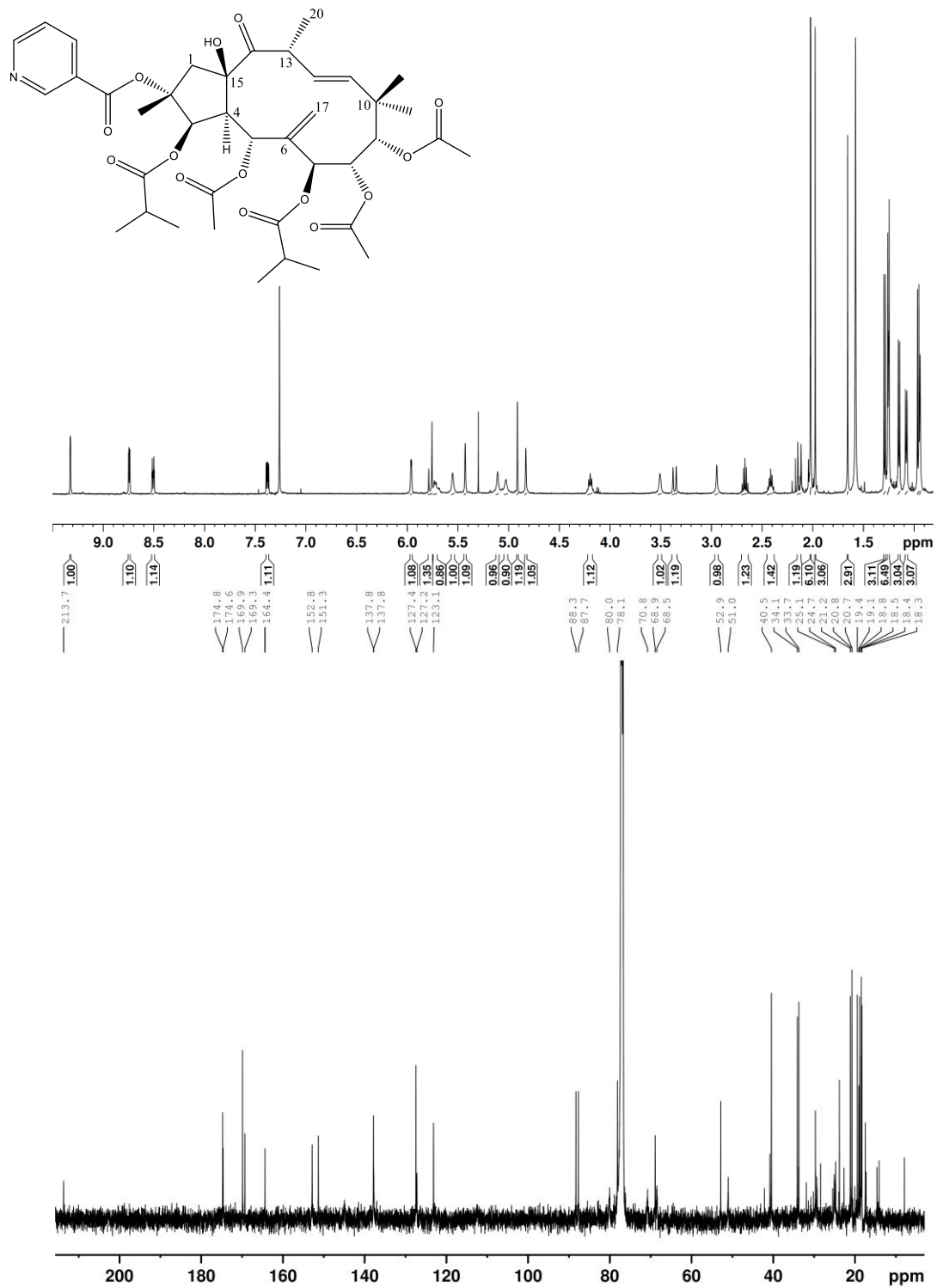
Mesta vezivanja preostala dva acetata i hidroksilne grupe određena su analizom NOESY spektra (**Slika 45**). U NOESY spektru ovog jedinjenja uočavaju se korelacije metil grupe jednog acetata (1,99 ppm) sa protonima  $H_{1\alpha}$ ,  $H_{16\beta}$  i  $H_{3\alpha}$ . Da bi se ovaj acetat nalazio na rastojanju manjem od  $3\text{\AA}$  u odnosu na navedene protone, on mora biti u položaju  $C_2$ . Drugi acetat, sa metil grupom na 2,20 ppm, pokazuje korelacije sa protonom  $H_{4\alpha}$ , što znači da je vezan za ugljenik  $C_5$ . Za preostali oksigenovani položaj ( $C_{15}$ ) vezana je hidroksilna grupa, što dokazuje korelacija protona hidroksilne grupe sa protonima  $H_{16\beta}$ . Na taj način se potvrđuje i relativna konfiguracija na  $C_{15}$  atomu. Relativne konfiguracije ostalih ugljenikovih atoma u jezgru određene su na isti način kao i kod jedinjenja **19** i odgovaraju konfiguracijama ovog jedinjenja.



Slika 45. Deo NOESY spektra jedinjenja **21**

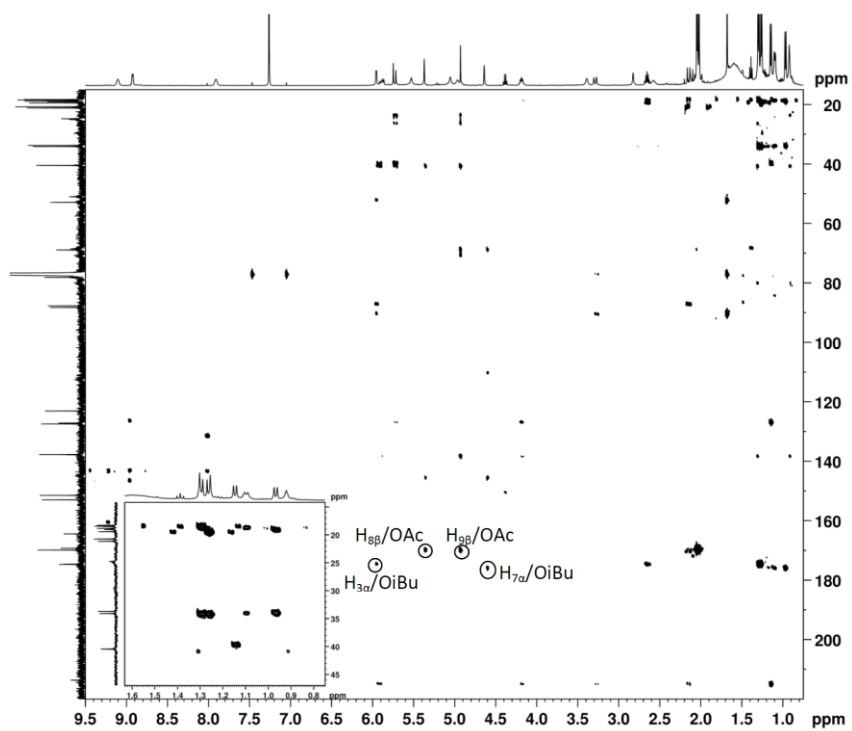
#### 2.4.4. *5α,8α,9α*-Triacetiloksi-*15β*-hidroksi-*3β,7β*-diizobutanoiloksi-*2α*-nikotinoiloksijatrofa-*6(17),11E*-dien-*14*-on (**22**)

Jedinjenje **22** je izolovano kao amorfna bezbojna supstanca molekulske formule  $C_{40}H_{53}NO_{14}$ . Merenjem precizne mase jedinjenja **22** ( $[M+H]^+$  jon sa  $m/z$  772,3532) potvrđena je molekulska formula ovog jedinjenja dobijena analizom 1D i 2D NMR spektara (Slika 46, Tabela 22). U poređenju sa jedinjenjem **21**, jedinjenje **22** ima masu veću za 14 amu, tj. u svojoj strukturi ima jednu metilensku grupu više od jedinjenja **21**. Na osnovu podataka dobijenih iz  $^1H$  NMR spektra (Slika 46), kao i iz HSQC spektra, jedinjenje **22** ima heksaesterifikovani jatrofanski skelet. Jatrofansko jezgro supstituišu tri acetata, dva izobutirata i jedan nikotinat.

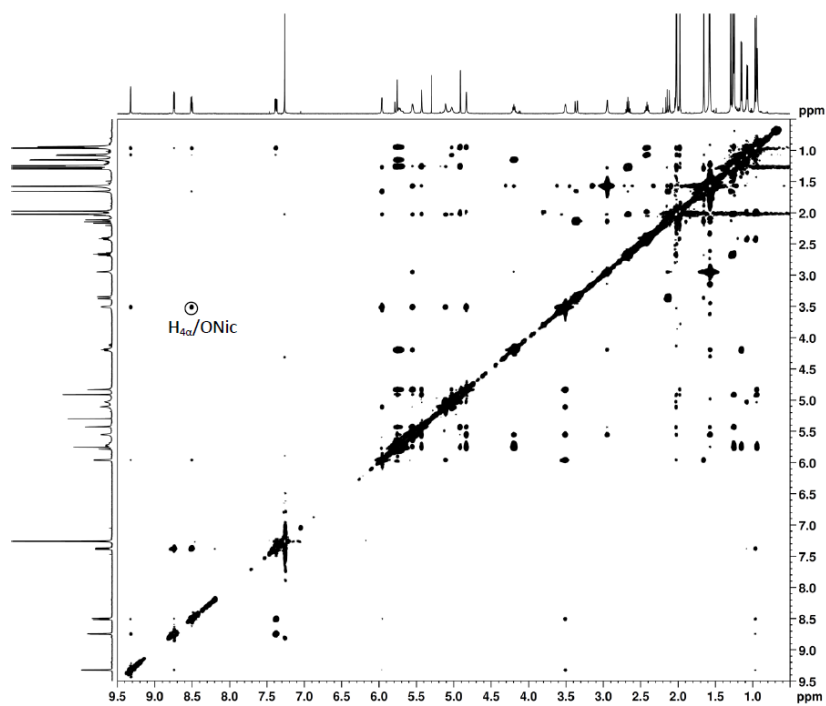


Slika 46. <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektar jedinjenja 22





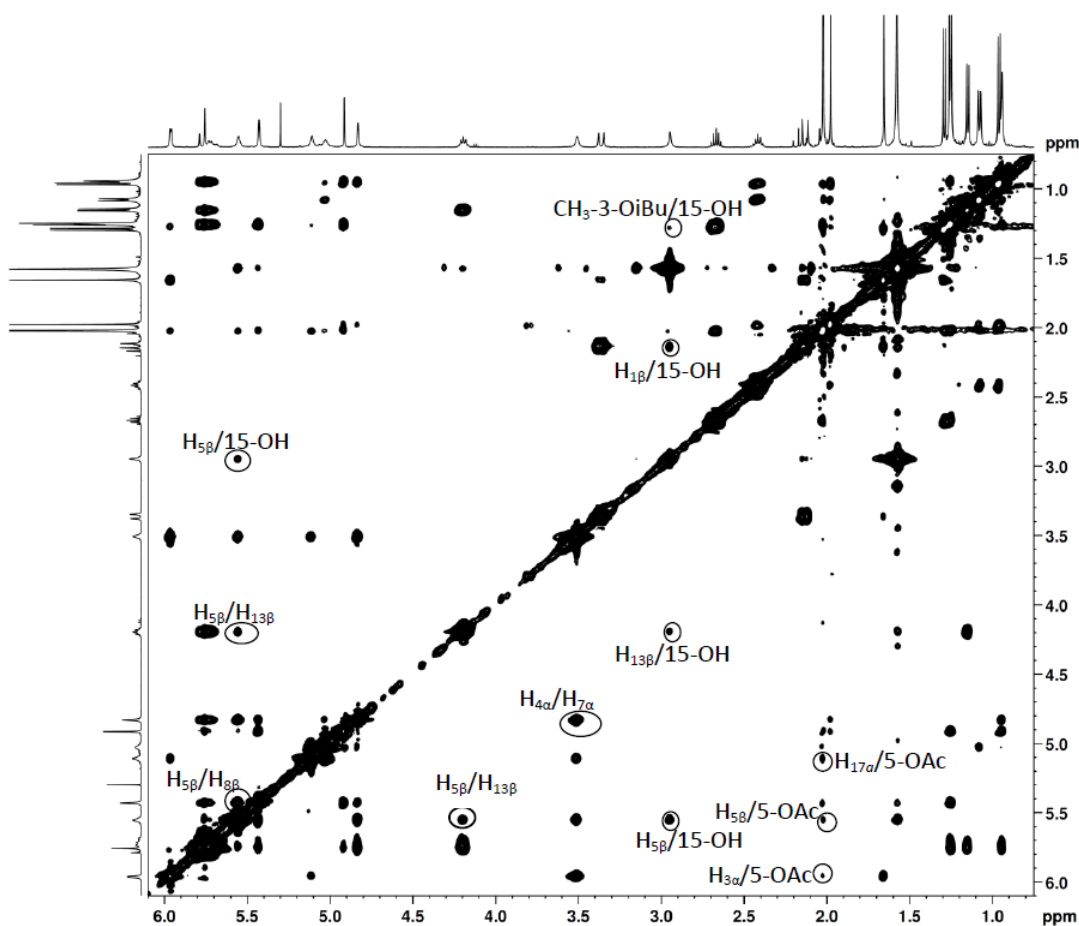
Slika 47. HMBC spektar jedinjenja 22



Slika 48. NOESY spektar jedinjenja 22

HMBC spektar (Slika 47) omogućio je određivanje položaja dva acetata (položaji C<sub>8</sub> i C<sub>9</sub>) i dva izobutirata (položaji C<sub>3</sub> i C<sub>7</sub>) na osnovu korelacija oksimetinskih protona sa karbonilima estara vezanih za njihov ugljenik.

Raspored preostala dva estra (acetat i nikotinat) i hidroksilne grupa na tri oksigenovana položaja (C<sub>2</sub>, C<sub>5</sub> i C<sub>15</sub>) određen je na osnovu NOE korelacija u NOESY spektru ovog jedinjenja (Slika 48). Jedna od dve metil grupe iz izobutirata vezanog u položaju C<sub>3</sub> spreže se sa protonom hidroksilne grupe. Proton hidroksilne grupe spreže se i sa protonima H<sub>1β</sub>, H<sub>13β</sub> i H<sub>5β</sub>, što ukazuje da je hidroksilna grupa vezana za ugljenik C<sub>15</sub> i da je β-orijentisana (Slika 49). Da je acetat vezan u položaju C<sub>5</sub> dokazuju sprežanja vodonika iz metil grupe acetata (2,03 ppm) sa protonima H<sub>3α</sub>, H<sub>5β</sub> i H<sub>17a</sub>. Preostala estarska grupa (nikotinat) je u ovom jedinjenju vezana za ugljenik u položaju C<sub>2</sub>, što potvrđuje i NOE korelacija vodonika iz nikotinata na 8,51 ppm sa vodonikom H<sub>4α</sub>.



Slika 49. Deo NOESY spektar jedinjenja 22

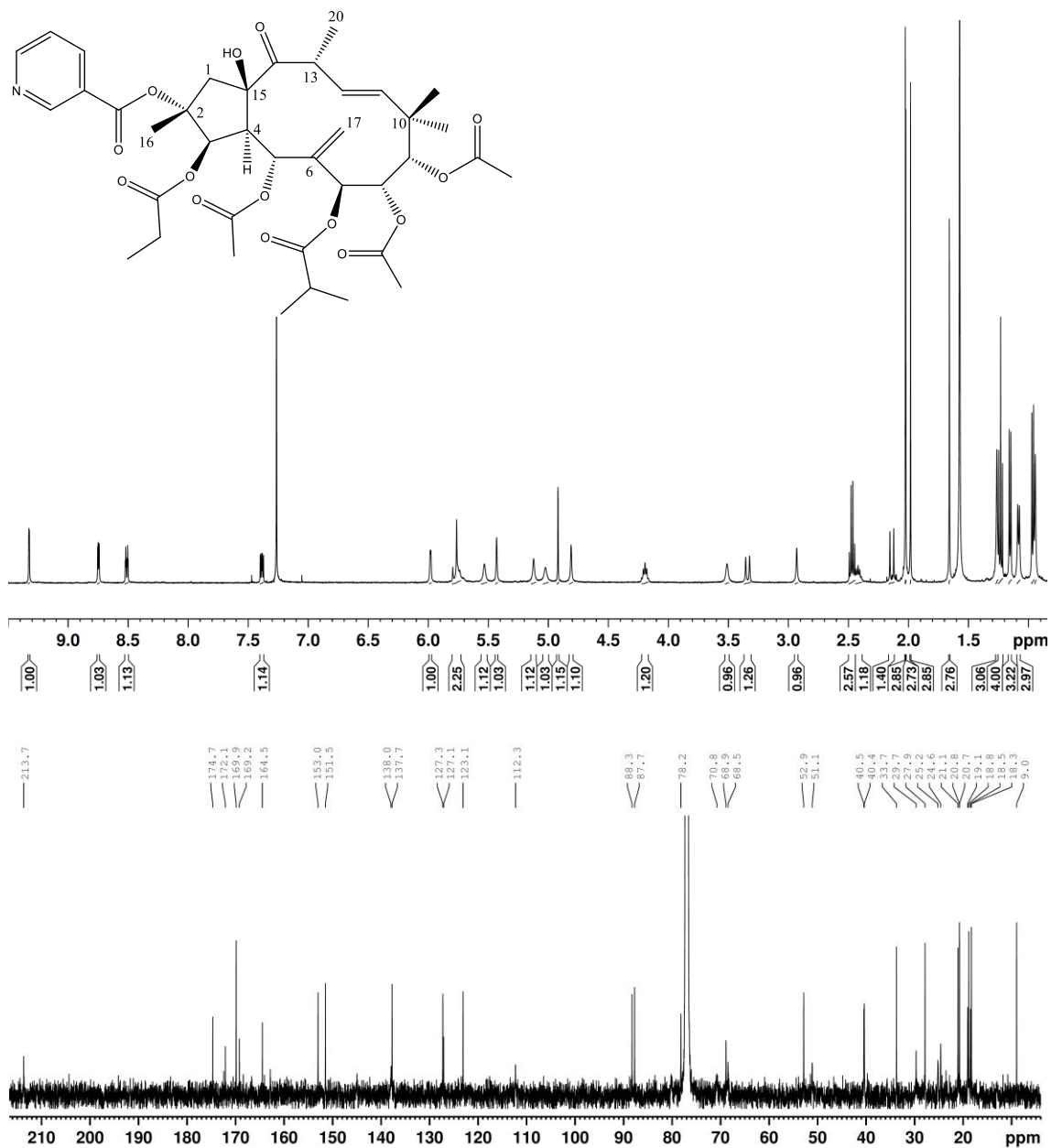
#### 2.4.5. *5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -Triacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-2 $\alpha$ -nikotinoiloksi-3 $\beta$ -propanoiloksijatrofa-6(17),11*E*-dien-14-on (23)*

Jedinjenje **23** je izolovano kao amorfna bezbojna supstanca molekulske formule C<sub>39</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>14</sub>. Merenjem precizne mase jedinjenja **23** ( $m/z$  758,3375 za [M+H]<sup>+</sup> jon) potvrđena je molekulska formula ovog jedinjenja dobijena analizom 1D (**Slika 50**, **Tabela 22**) i 2D NMR spektara. U poređenju sa jedinjenjem **22** jedinjenje **23** ima masu manju za 14 amu, tj. u svojoj strukturi ima jednu metilensku grupu manje od jedinjenja **22**. Takođe, ovaj molekul ima istu molekulsku formulu kao jedinjenje **21**. Poređenjem <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektara jedinjenja **21** i **23** uočavaju se značajne razlike u hemijskim pomeranjima i protona i ugljenika, što znači da ovi molekuli imaju različit raspored estarskih grupa u jatrofanskom jezgru.

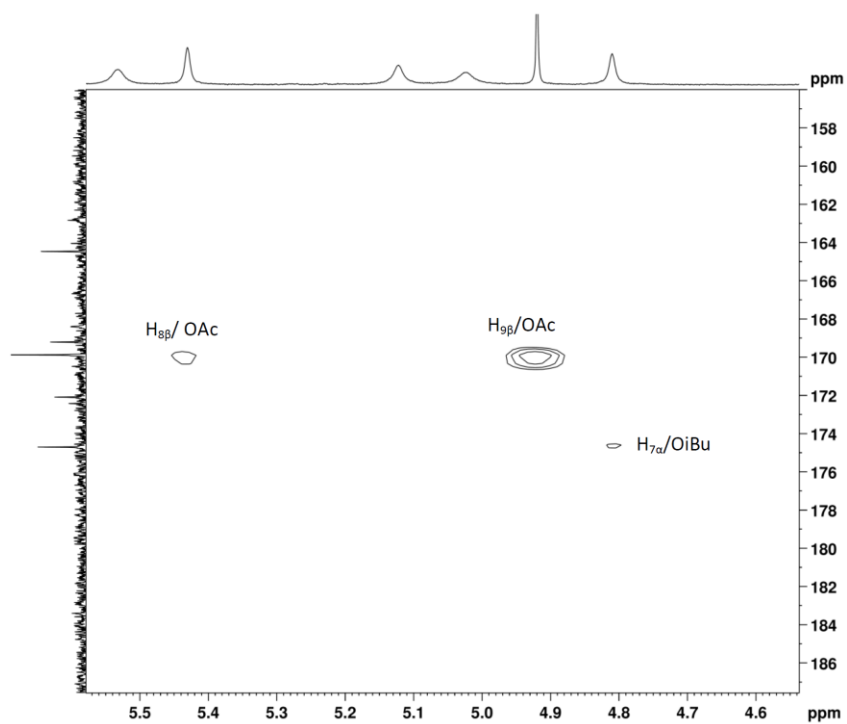
HMBC spektar ovog jedinjenja omogućio je određivanje položaja samo tri estra, dva acetata u položajima C<sub>8</sub> i C<sub>9</sub>, kao i izobutirata u položaju C<sub>7</sub> (**Slika 51**). Položaji ostalih estara određeni su pomoću korelacija koje se javljaju u NOESY spektru (**Slike 48 i 49**).

Položaj nikotinata je, kao i kod jedinjenja **22**, određen NOE korelacijom između protona na hemijskom pomeranju 8,51 ppm i protona H<sub>4 $\alpha$</sub>  (**Slika 52**).

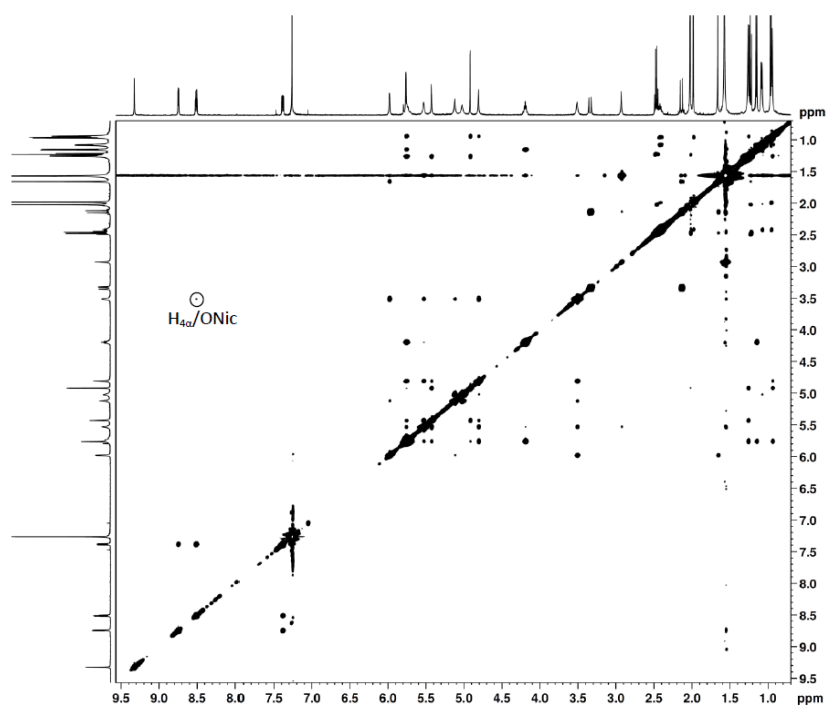
Kao i kod jedinjenja **22**, da se hidroksilna grupa nalazi u položaju C<sub>15</sub> određeno je na osnovu NOE korelacija protona hidroksilne grupe sa protonima H<sub>1 $\beta$</sub> , H<sub>13 $\beta$</sub>  i H<sub>5 $\beta$</sub> . Sprezanje protona metil grupe acetata (2,02 ppm) sa protonima H<sub>3 $\alpha$</sub> , H<sub>5 $\beta$</sub>  i H<sub>17 $a$</sub>  dokazuje da je acetat u položaju C<sub>5</sub>. NOE korelacije koje ostvaruju protoni metilenske grupe propionata sa protonima H<sub>16 $\beta$</sub>  i H<sub>5 $\beta$</sub> , kao i sprezanje sa protonima iz metil grupe acetata vezanog u položaju C<sub>5</sub> ukazuju da je propionat u položaju C<sub>3</sub> (**Slika 53**). Relativna konfiguracija ovog jedinjenja potvrđena je NOESY spektrom i odgovara relativnoj konfiguraciji do sada opisanih jatrofana. Jedinjenje **23** predstavlja novi jatrofanski derivat.



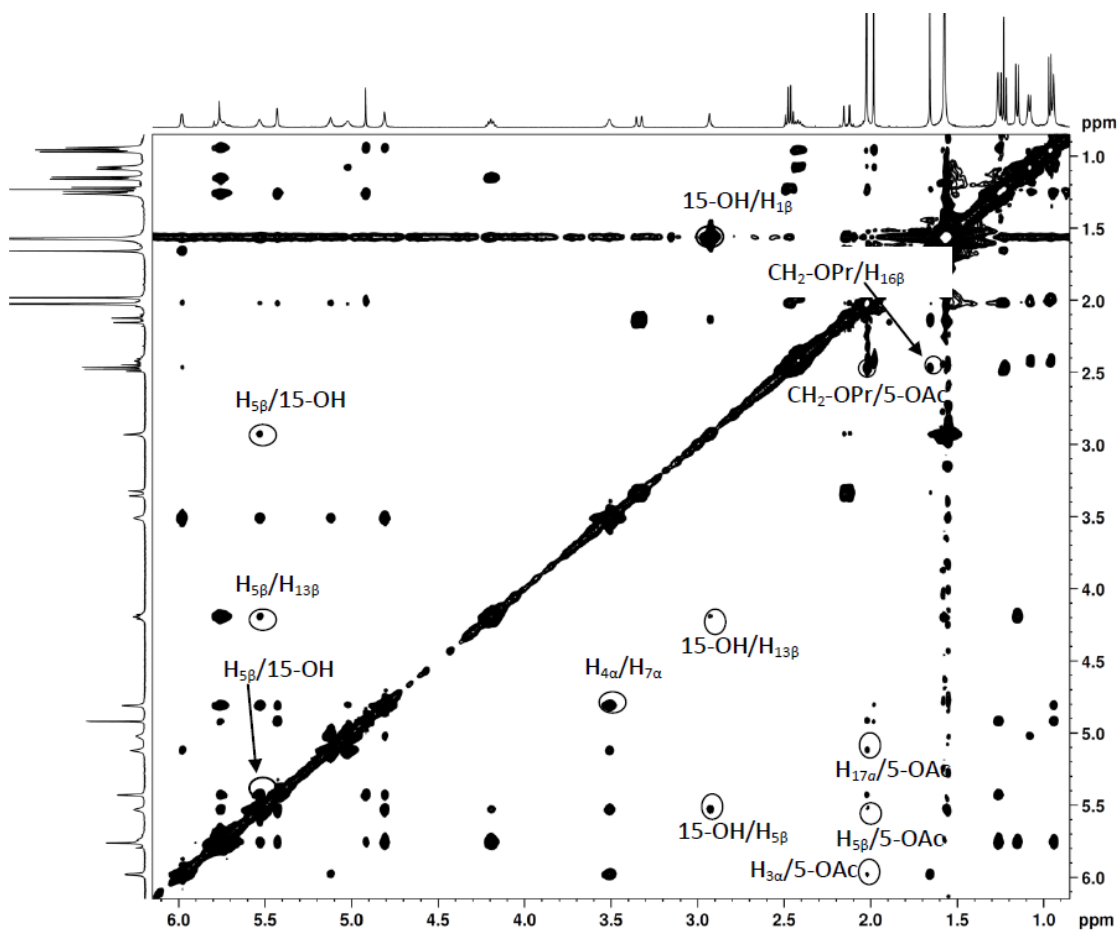
Slika 50.  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri jedinjenja 23



Slika 51. Deo HMBC spektra jedinjenja 23



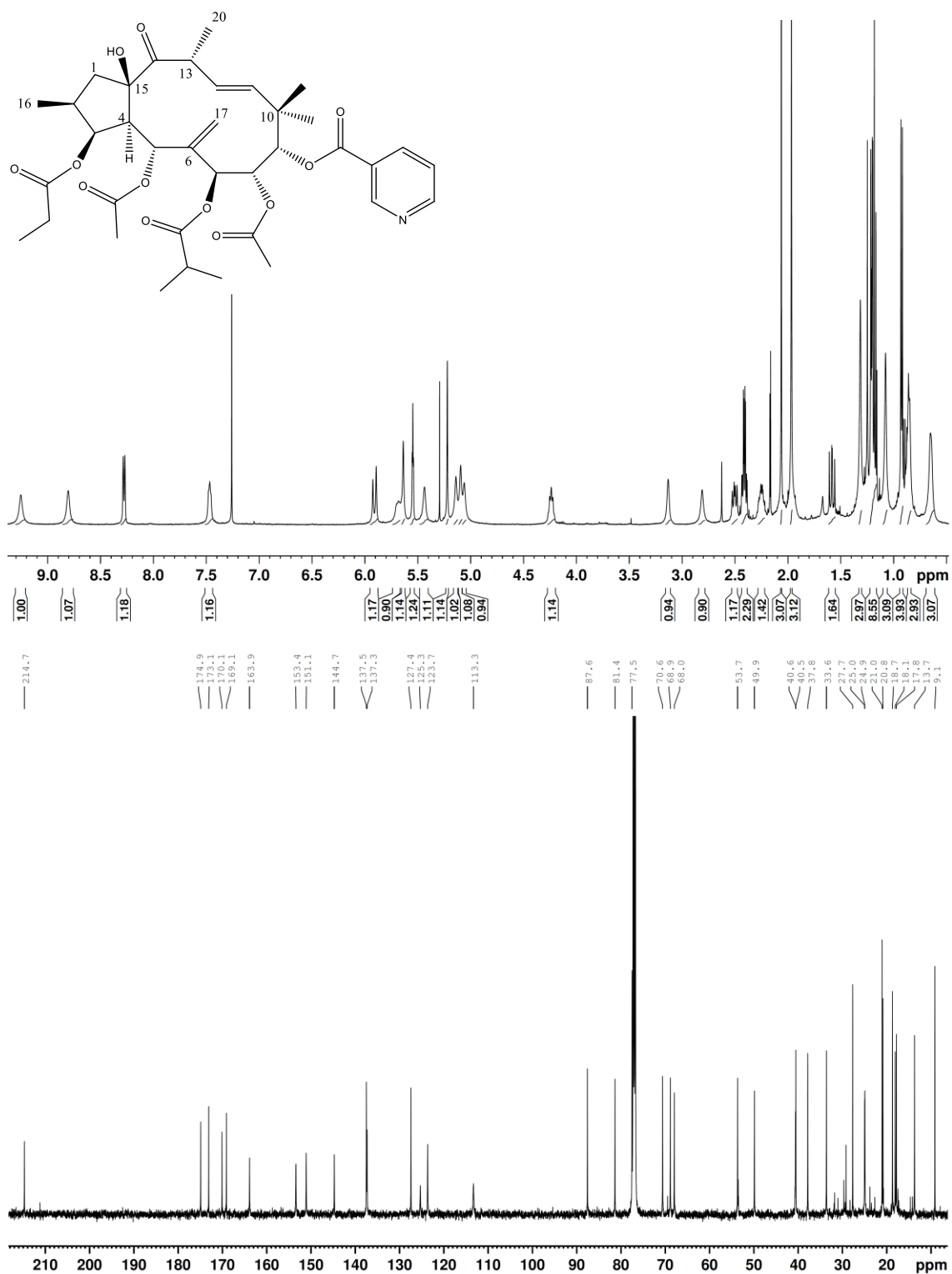
Slika 52. NOESY spektar jedinjenja 23



Slika 53. Deo NOESY spektar jedinjenja 23

#### 2.4.6. *5α,8α*-Diacetiloksi-*15β*-hidroksi-*9α*-nikotinoiloksi-*3β*-propanoil-oksijatrofa-6(17),*11E*-dien-14-on (24)

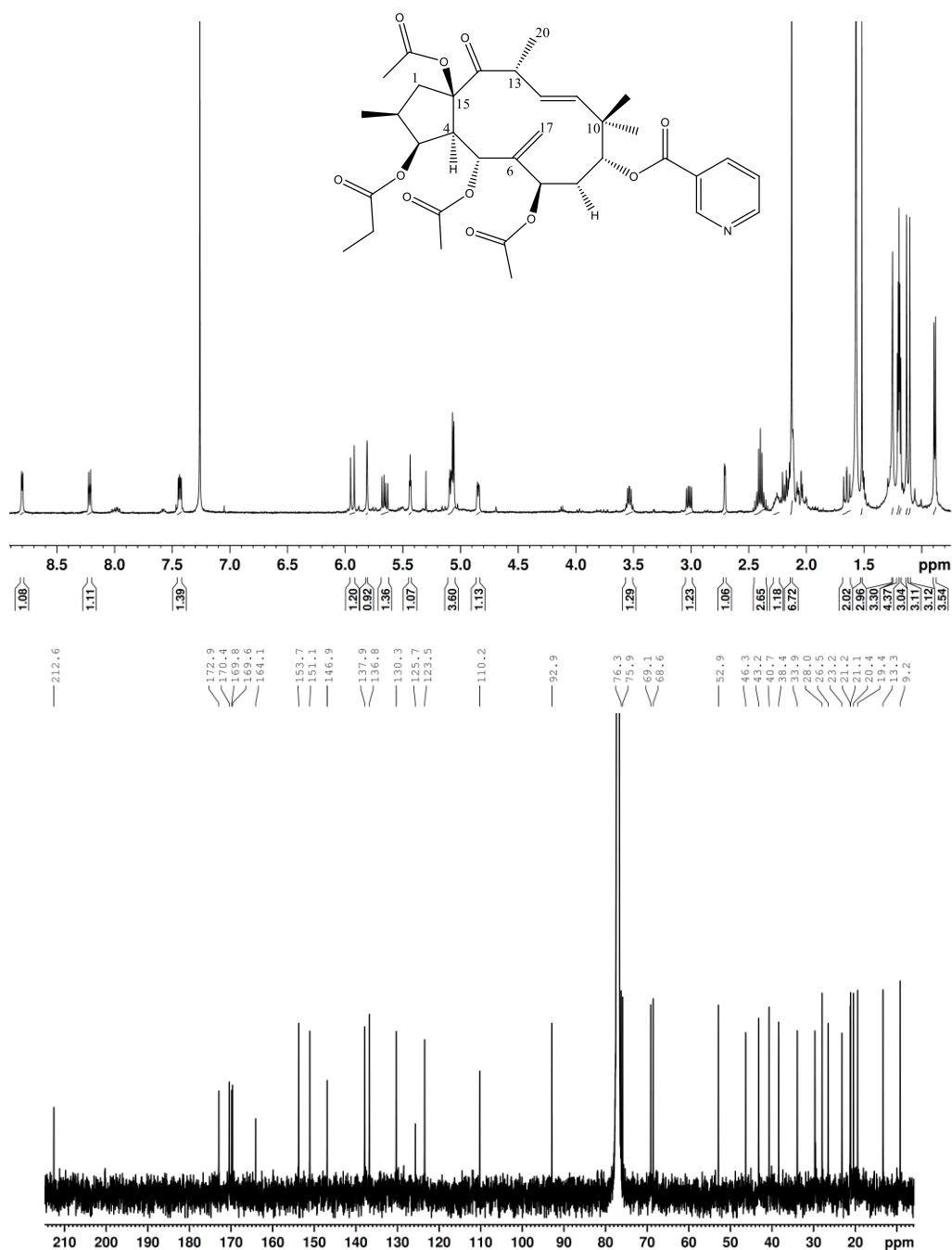
Jedinjenje **24** je izolovano kao amorfna bezbojna supstaca molekulske formule  $C_{37}H_{49}NO_{12}$ . Molekulska formula ovog jedinjenja je potvrđena na osnovu jona  $[M+H]^+$  u HRESIMS sa  $m/z$  700,3335. Poređenjem  $^1H$  NMR i  $^{13}C$  NMR spektara (Slika 54, Tabela 23) sa literaturnim podacima može se zaključiti da je ovo jedinjenje ranije izolovani eufodendrofan A.<sup>93</sup>



Slika 54. <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR spektri jedinjenje 24

### 2.4.7. 5 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,15 $\beta$ -Triacetiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksi-3 $\beta$ -propanoiloksijatropa-6(17),11 $E$ -dien-14-on (25)

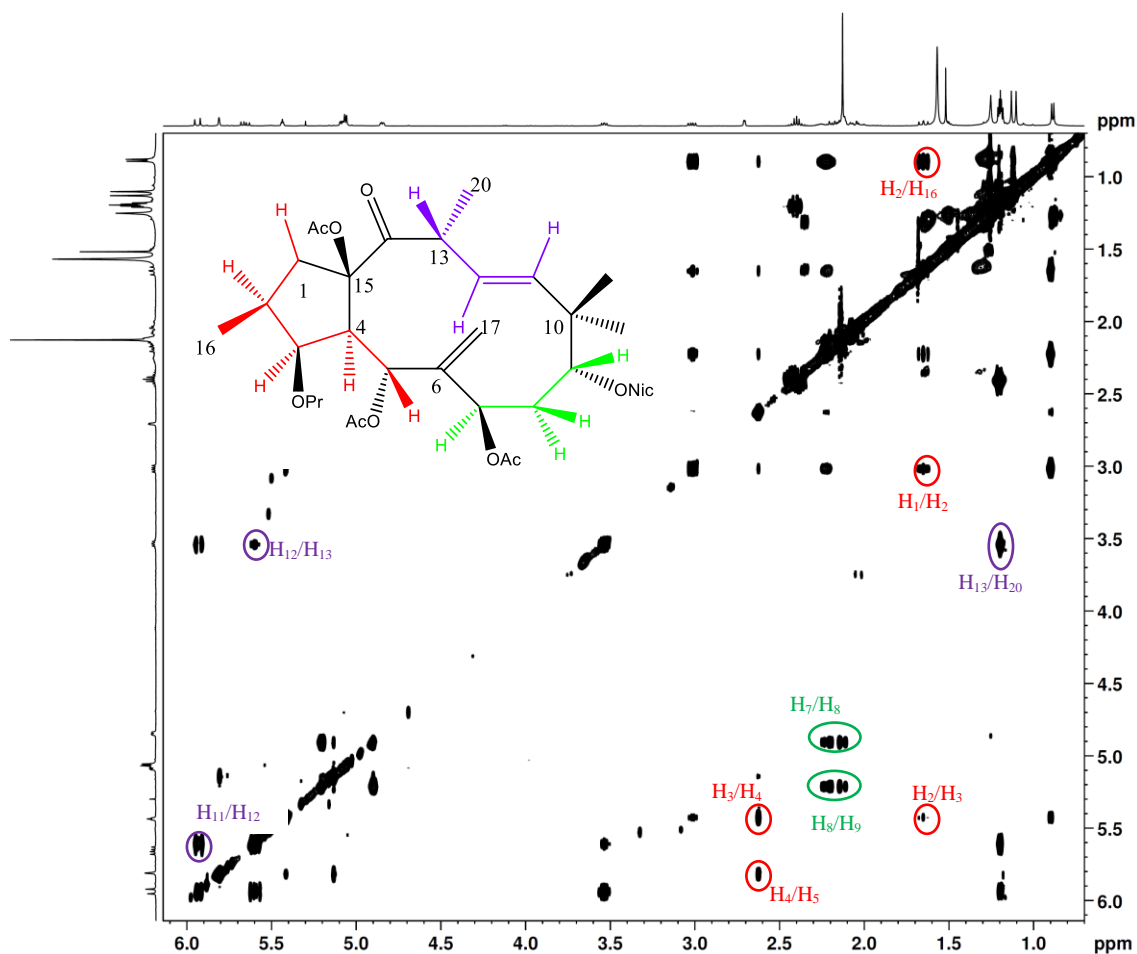
Jedinjenje **25** izolovano je kao amorfna bezbojna supstanca molekulske formule C<sub>35</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>11</sub> (potvrđena merenjem precizne mase [M+H]<sup>+</sup> jona –  $m/z$  656,3063).



Slika 55. <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR spektri jedinjenja **25**

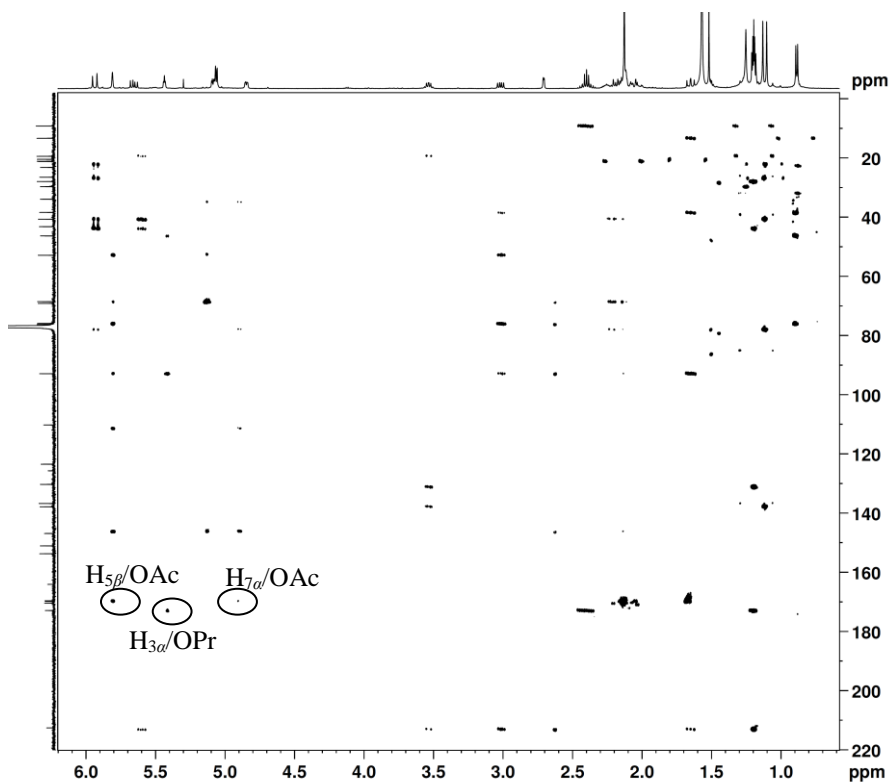


Analizom  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR spektara (Slika 55, Tabela 24) utvrđeno je da u izolovanom jedinjenju postoje tri spinska sistema (Slika 56). Spinski sistem A čine protoni  $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_5$  i  $\text{H}_{16}$  (korelacije  $\text{H}_1/\text{H}_2$ ,  $\text{H}_2/\text{H}_3$ ,  $\text{H}_2/\text{H}_{16}$ ,  $\text{H}_3/\text{H}_4$  i  $\text{H}_4/\text{H}_5$ ), spinski sistem B protoni  $\text{H}_7$ ,  $\text{H}_8$  i  $\text{H}_9$  (korelacije  $\text{H}_{7\alpha}/\text{H}_{8\alpha}$  i  $\text{H}_{8\beta}/\text{H}_{9\beta}$ ) i spinski sistem C protoni  $\text{H}_{11}$ ,  $\text{H}_{12}$ ,  $\text{H}_{13}$  i  $\text{H}_{20}$  (korelacije  $\text{H}_{11}/\text{H}_{12}$ ,  $\text{H}_{12}/\text{H}_{13}$  i  $\text{H}_{13}/\text{H}_{20}$ ). Takođe, analizom  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR spektra uočeno je da u izolovanom jedinjenju postoji pet estarskih grupa i to tri acetata i po jedan nikotinat i propionat.

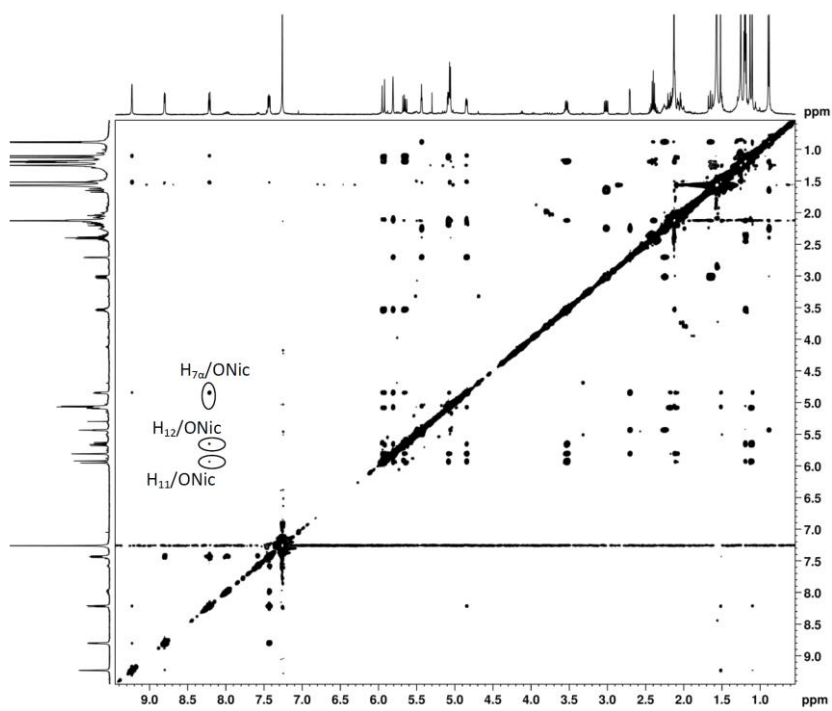


Slika 56. COSY spektar jedinjenja 25

U HMBC spektru (Slika 57), prateći korelacije oksimetinskih protona i odgovarajućih karbonila, moguće je odrediti položaj tri estra: propionata u položaju  $\text{C}_3$  i acetata u položajima  $\text{C}_5$  i  $\text{C}_7$ .



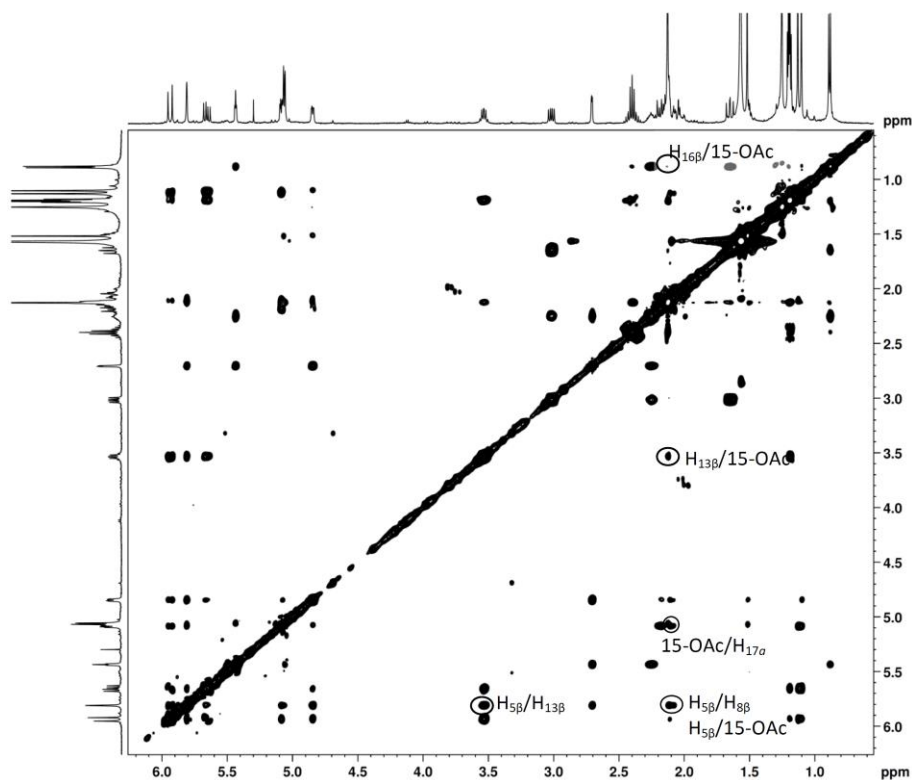
Slika 57. HMBC spektar jedinjenja 25



Slika 58. NOESY spektar jedinjenja 25

Analizom NOESY spektra utvrđeno je da je relativna konfiguracija jedinjenja **25** ista kao kod prethodno opisanih jatrofana. Takođe, pomoću NOESY spektra (**Slika 58**) utvrđen je i položaj preostala dva estra (nikotinat u položaju C<sub>9</sub> i acetat u položaju C<sub>15</sub>).

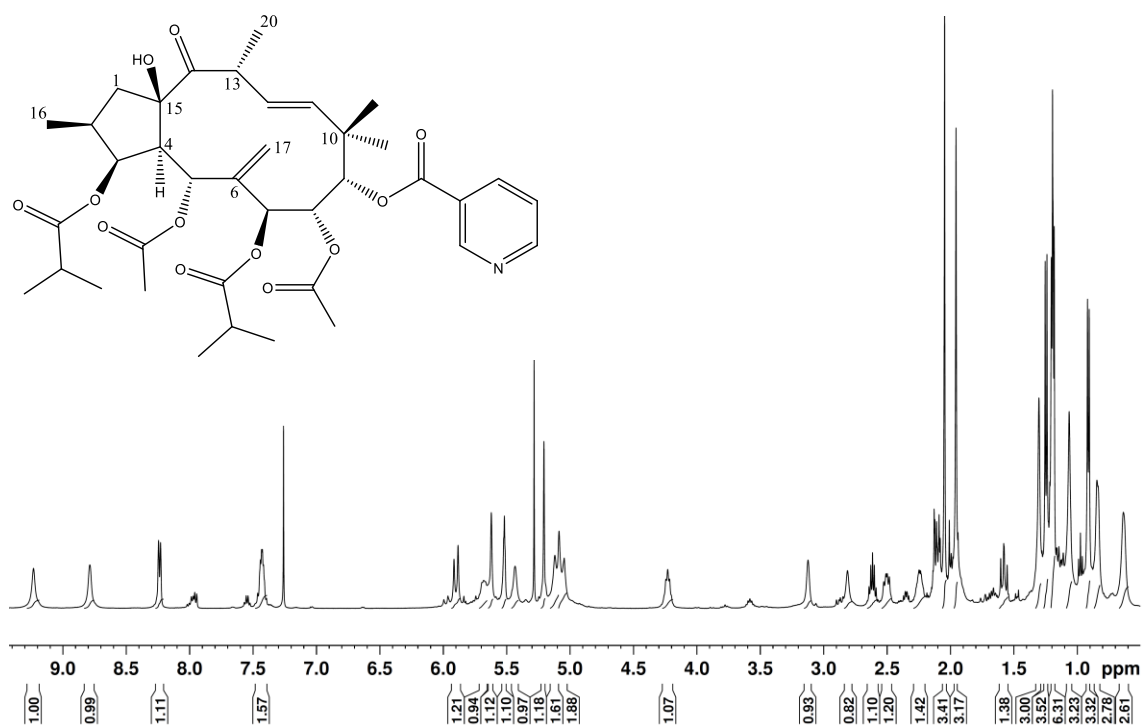
S obzirom da se proton nikotinata (8,22 ppm) spreže sa protonima H<sub>7 $\alpha$</sub> , H<sub>11</sub> i H<sub>12</sub>, u položaju C<sub>9</sub> je vezan nikotinat. Na osnovu NOE korelacija (**Slika 59**) protona metil grupe acetata sa protonima H<sub>5 $\beta$</sub> , H<sub>13 $\beta$</sub> , H<sub>16 $\beta$</sub>  i H<sub>17 $\alpha$</sub>  dokazano je da je u položaju C<sub>15</sub> vezan acetat. Jedinjenje **25** predstavlja novi jatrofanski derivat.



**Slika 59.** Deo NOESY spektar jedinjenja **25**

### 2.4.8. 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Diacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diizobutanoiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksijatropa-6(17),11 $E$ -dien-14-on (26)

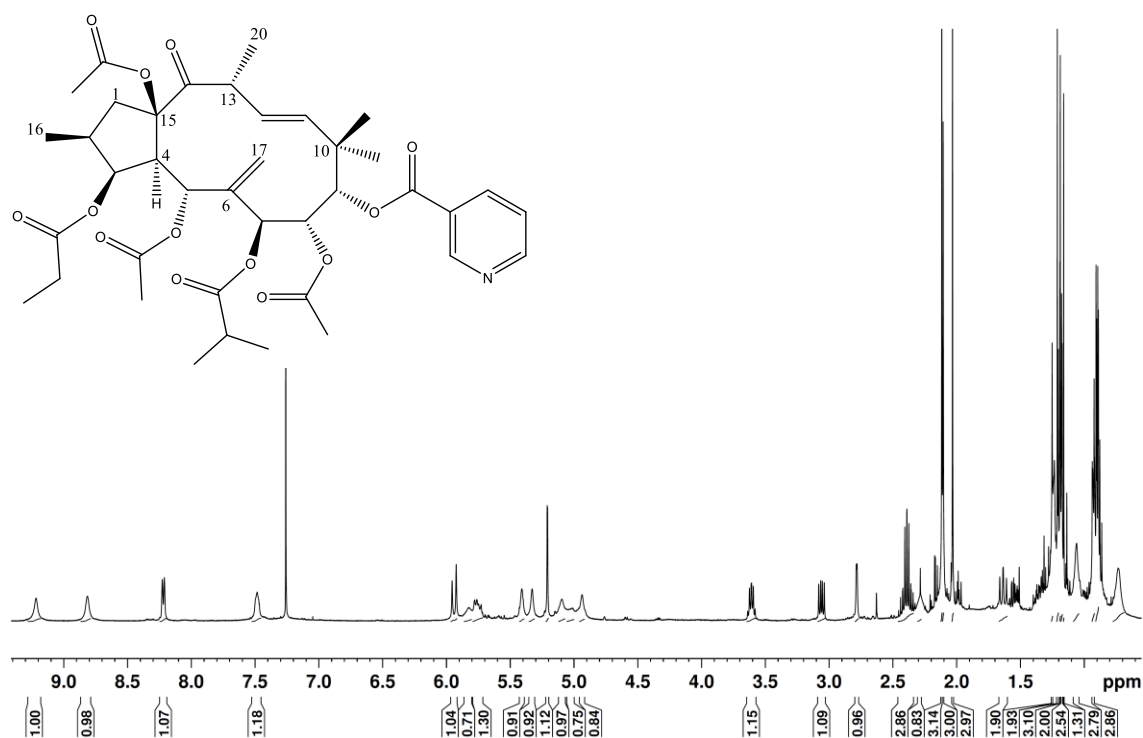
Jedinjenje **26** je izolovano kao amorfna bezbojna supstaca molekulske formule C<sub>38</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>12</sub> (na osnovu  $m/z$  714,3489 jona [M+H]<sup>+</sup> u HRESIMS). Analizom <sup>1</sup>H NMR (Slika 60, Tabela 23) i <sup>13</sup>C NMR spektra utvrđeno je da u izolovanom jedinjenju postoji pet estarskih grupa i to po dva acetata i izobutirata i jedan nikotinat. Pretragom literature i detaljnom analizom spektara utvrđeno je da istu molekulsku formulu i strukturu ima eufodendrofan B ranije izolovan iz biljne vrste *E. dendreodes*.<sup>24</sup>



Slika 60. <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja **26**

### 2.4.9. 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,15 $\beta$ -Triacetiloksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksi-3 $\beta$ -propanoiloksijatrofa-6(17),11*E*-dien-14-on (27)

Jedinjenje **27** je izolovano kao amorfna, bezbojna supstaca molekulske formule C<sub>39</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>13</sub> (na osnovu jona [M+H]<sup>+</sup> u HRESIMS sa *m/z* 742,3438). Analizom <sup>1</sup>H NMR (Slika 61, Tabela 23) i <sup>13</sup>C NMR spektra utvrđeno je da u izolovanom jedinjenju postoji šest estarskih grupa i to tri acetata i po jedan izobutirat, nikotinat i propionat. Poređenjem podataka iz <sup>1</sup>H NMR spektra sa podacima iz literature zaključeno je da je izolovani molekul već opisan u literaturi kao eufodendrofan C.<sup>93</sup>



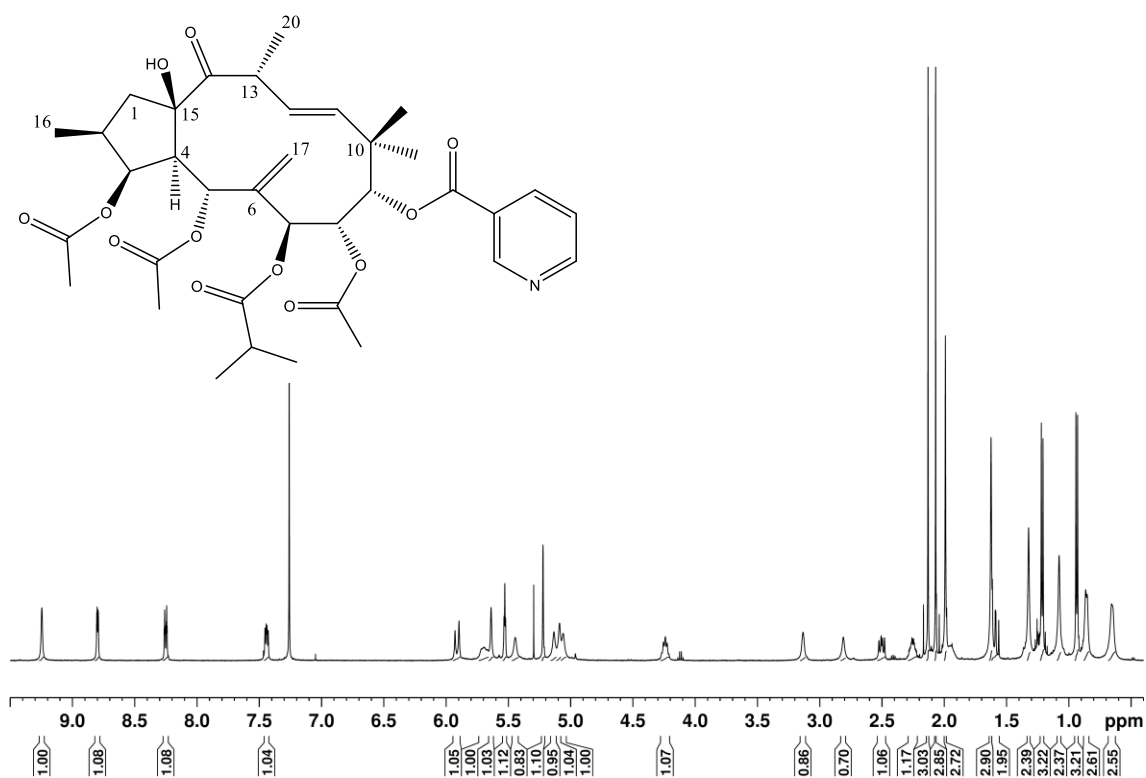
Slika 61. <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja 27

**Tabela 23.**  $^1\text{H}$  (500 MHz) i  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) podaci za **20**, **24**, **26** i **27** ( $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz))

Položaj	20		24		26		27	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1 $\alpha$	3,31 d (16)		2,51 dd (14; 9)		2,51 m		3,06 dd (14; 8)	
1 $\beta$	1,98 m	51,2	1,59 dd (14; 11)	49,9	1,58 m	50,0	1,63 dd (14; 13)	45,8
2		87,4	2,26 m	37,8	2,24 m	38,0	2,29 brs	38,3
3	5,60 brs	78,6	5,55 t (3)	77,5	5,52 brs	77,6	5,41 brs	76,2
4	3,51 t (3)	50,8	3,13 brs	53,7	3,13 brs	53,7	2,79 d (3)	52,8
5	5,50 brs	68,4	5,44 brs	68,0	5,43 brs	68,0	5,83 m	67,8
6		145,4	-	144,7	-	144,8	-	144,7
7	5,04 brs	68,5	5,09 brs	68,9	5,09 brs	69,1	5,09 brs	68,4
8	5,59 brs	70,8	5,64 brs	70,6	5,62 brs	70,8	5,33 brs	71,1
9	5,21 brs	81,3	5,22 brs	81,4	5,21 brs	81,4	5,21 d (2)	80,0
10		40,5	-	40,5	-	40,9	-	40,2
11	5,92 d (16)	137,5	5,92 d (16)	137,5	5,90 d (16)	137,6	5,93 d (16)	137,0
12	5,77 m	128,1	5,71 m	127,4	5,68 m	127,8	5,76 dd (16;9)	131,5
13	4,23 m	40,4	4,24 m	40,6	4,23 m	40,6	3,61 dq (8;6)	42,8
14		214,6	-	214,7	-	214,6	-	212,3
15		86,7	-	87,6	-	87,9	-	92,9
16	1,51 s	18,4	0,93 d (7)	13,7	0,91 d (7)	13,7	0,93 d (7)	13,4
17a	5,11 brs		5,06 brs		5,05 brs		4,94 brs	
17b	5,03 brs	112,2	5,14 brs	113,3	5,12 brs	113,8	5,02 brs	111,1
18	1,05 brs	25,3	1,08 brs	25,0	1,07 brs	25,3	1,06 brs	26,9
19	1,34 brs	24,6	1,32 brs	24,9	1,30 brs	24,8	1,24 brs	24,0
20	1,21 d (7)	18,2	1,21 d (7)	18,7	1,19 d (7)	18,6	1,18 d (7)	19,9
R-2								
C=O		171,1						
1		22,0						
OR-3								
C=O		174,6		173,1		175,6		173,0
1	2,63 sept (7)	33,4	2,41 qd (7; 3)	22,7	2,62 sept (7)	34,3	2,39 qd (9; 7)	28,0
2	1,18 d (7)	18,6	1,19 m	9,1	1,24 d (7)	19,8	1,19 t (7)	9,2
3	1,25 brs	19,3			1,18 d (7)	18,5		
OR-5								
C=O		169,3		170,1		169,1		169,5
1	2,20 s	20,9	2,06 s	20,8	2,05 s	21,1	2,04 s	21,1
OR-7								
C=O		174,9		174,9		174,9		175,5
1	1,98 m	34,0	1,95 m	33,6	1,96 m	33,7	2,42 m	33,7
2	0,89 d (7)	17,6	0,86 brs	17,8	0,84 brs	17,9	0,89 d (7)	18,8
3	0,61 brs	18,6	0,65 brs	18,1	0,64 brs	18,0	0,73 brs	17,9
R-8								
C=O		170,1		169,1		170,0		170,5
1	2,06 s	20,6	1,97 s	21,0	1,96	20,8	2,11 s	21,1
OR-9								
C=O		163,9		163,9		164,1		164,0
1	9,23 brs	151,0	9,25 brs	151,1	9,23 brs	151,5	9,22 d (2)	151,3
2		128,1		125,3		125,4		125,3
3	8,79 brs	137,4	8,80 brs	137,3	8,79 brs	137,1	8,81 dd (5;2)	137,0
4	8,26 d (8)	123,6	8,26 d (8)	123,7	8,24 d (8)	123,5	8,19 dt (8;2)	123,6
5	7,43 m	153,4	7,47 m	153,4	7,43 m	153,8	7,45 ddd (8;5;2)	153,9
OR-15								
C=O								169,0
1	2,83 s		2,81 brs		2,81 brs		2,12 s	20,6

### 2.4.10. 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Triacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksijatrofa-6(17),11 $E$ -dien-14-on (28)

Jedinjenje **28** je izolovano kao amorfna bezbojna supstanca molekulske formule C<sub>36</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>12</sub> (izračunata na osnovu  $m/z$  686,3184 jona [M+H]<sup>+</sup>). Analizom <sup>1</sup>H NMR (Slika 62, Tabela 24) i <sup>13</sup>C NMR spektara (Tabela 24) utvrđeno je da u izolovanom jedinjenju postoje tri acetata, jedan izobutirat i jedan nikotinat. Poređenjem dobijenih podataka sa literaturom zaključeno je da je izolovano jedinjenje eufodendrofan N, ranije izolovan iz biljne vrste *E. dendroides*.<sup>24</sup>



Slika 62. <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja **28**

**Tabela 24.**  $^1\text{H}$  (500 MHz) i  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) NMR podaci za **25** i **28–30** ( $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz))

Položaj	<b>25</b>		<b>28</b>		<b>29</b>		<b>30</b>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1 $\alpha$	3,02 dd (14;8)		2,50 (14;8) dd		3,03 dd (14;8)		2,53 m	
1 $\beta$	1,65 dd (14;12)	46,3	1,59 (14;12) dd	49,8	1,60 m	45,7	1,59 m	49,9
2	2,26 m	38,4	2,25 m	37,8	2,27 brs	38,0	2,26 m	8,0
3	5,44 t (3)	76,3	5,53 t (3)	77,9	5,40 brs	76,3	5,57 brs	77,5
4	2,71 d (3)	52,9	3,14 brs	53,8	2,78 d (3)	52,8	3,06 brs	53,8
5	5,81 brs	68,6	5,44 brs	68,0	5,82 brs	67,4	5,41 brs	68,6
6	-	146,9	-	144,8	-	144,6	-	145,8
7	4,86 dd (8;3)	69,1	5,06 brs	69,0	4,98 brs	68,4	4,90 brs	68,9
8 $\alpha$	2,20 m		-		-		-	
8 $\beta$	2,14 m	33,9	5,64 brs	70,8	5,33 brs	70,4	5,75 brs	72,1
9	5,09 dd (8;3)	75,9	5,22 brs	81,4	5,20 d (2)	79,9	5,07 brs	80,4
10	-	40,7	-	40,8	-	40,0	-	40,5
11	5,93 d (16)	137,9	5,91 d (16)	137,6	5,94 d (16)	135,7	5,86 brs	137,8
12	5,65 dd (16;9)	130,3	5,70 m	127,7	5,77 m	131,4	5,87 brs	127,0
13	3,53 dq (9;7)	43,2	4,24 m	40,6	3,60 dq (9;7)	42,5	4,20 brs	39,9
14	-	212,6	-	214,8	-	212,7	-	214,6
15	-	92,9	-	87,6	-	92,6	-	87,5
16	0,88 d (7)	13,3	0,94 d (7)	13,7	0,90 d (7)	13,4	0,92 d (6)	13,6
17a	5,06 d (1)		5,14 brs		5,07 brs		4,99 brs	
17b	5,07 brs	110,2	5,09 brs	113,6	5,14 m	110,9	5,08 brs	111,3
18	1,10 s	23,2	1,08 brs	24,8	0,93 brs	18,9	0,98 brs	26,2
19	1,13 s	26,5	1,32 brs	25,1	1,24 brs	26,6	1,22 m	29,6
20	1,20 d (7)	19,4	1,21 d (7)	18,6	1,18 d (7)	20,1	1,20 m	19,2
OR-3								
C=O	-	172,9		169,8	-	169,9	-	172,8
1	2,40 q (7)	28,0	2,07	21,7	2,10 s	33,5	2,40 m	27,8
2	1,20 t (7)	9,2					1,16 t (8)	9,1
OR-5								
C=O	-	169,6		169,2	-	169,7	-	169,1
1	2,13 s	21,1	1,99 s	20,8	2,12 s	20,7	1,96 s	20,8
OR-7								
C=O	-	169,8		174,9	-	175,5		174,7
1	1,57 s	20,4	1,96 m	33,7	2,15 m	38,0	2,56 m	34,0
2			0,86 d (5)	17,3	0,73 brs	24,1	0,99 brs	18,5
3			0,65 brs	18,8	1,06 brs	17,7	1,40 brs	18,2
R-8								
C=O	-			170,0	-	169,0		164,0
1			2,07 s	21,0	2,04 s	21,2	9,20 brs	151,1
2								126,0
3							8,27 d (8)	137,2
4							7,37 dd (8;4)	123,3
5							8,76 d (4)	153,4
OR-9								
C=O	-	164,1		164,1	-	164,0		169,8
1	9,23 d (2)	151,1		150,7	9,22 d (2)	151,2	2,07 s	20,9
2	-	125,7	9,23 brs	125,4	-	125,1		
3	8,22 dt (8;2)	136,8	8,80 (5;2) dd	137,2	8,19 dt (8;2)	137,0		
4	7,43 dd (8;5)	123,5	8,25 dt (8;2)	123,6	7,45 ddd (8;5;2)	123,6		
5	8,80 dd (5;2)	153,7	7,44 (8;5) dd	153,1	8,80 dd (5;2)	153,8		
OR-15								
C=O	-	170,4			-	170,6		
1	2,13 s	21,2	2,81 brs		2,12 s	21,3	2,60 brs	



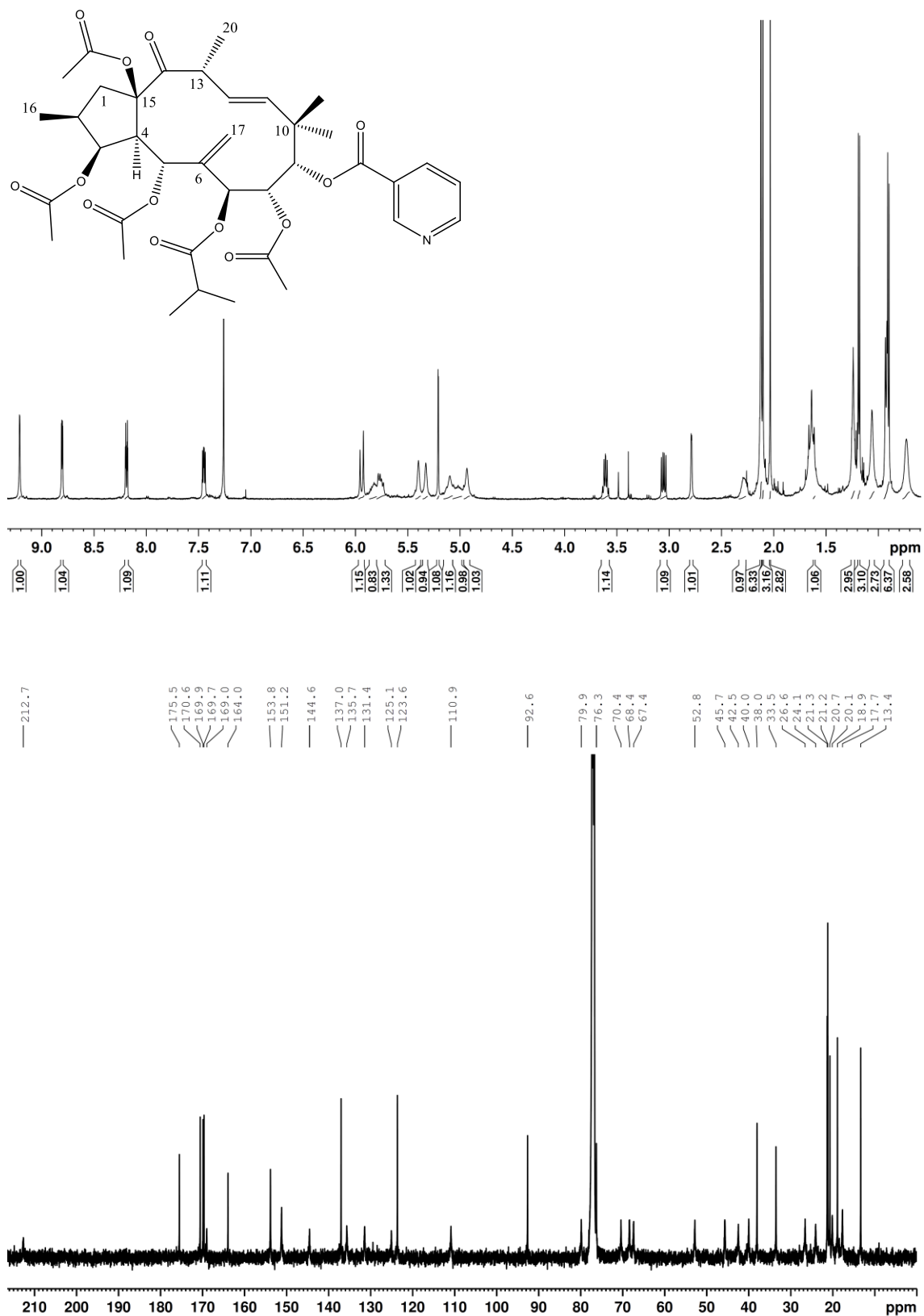
#### 2.4.11. 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,15 $\beta$ -Tetraacetiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksi-7 $\beta$ -izobutanoil-oksijatrofa-6(17),11*E*-dien-14-on (29)

Jedinjenje **29** izolovano je kao amorfna bezbojna supstanca molekulske formule C<sub>38</sub>H<sub>49</sub>NO<sub>13</sub> ([M+H]<sup>+</sup> jon sa *m/z* 728,3271 u HRESIMS). Analizom <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR spektara (**Slika 63**, **Tabela 24**) utvrđeno je da u izolovanom jedinjenju postoje četiri acetata, jedan izobutirat i jedan nikotinat.

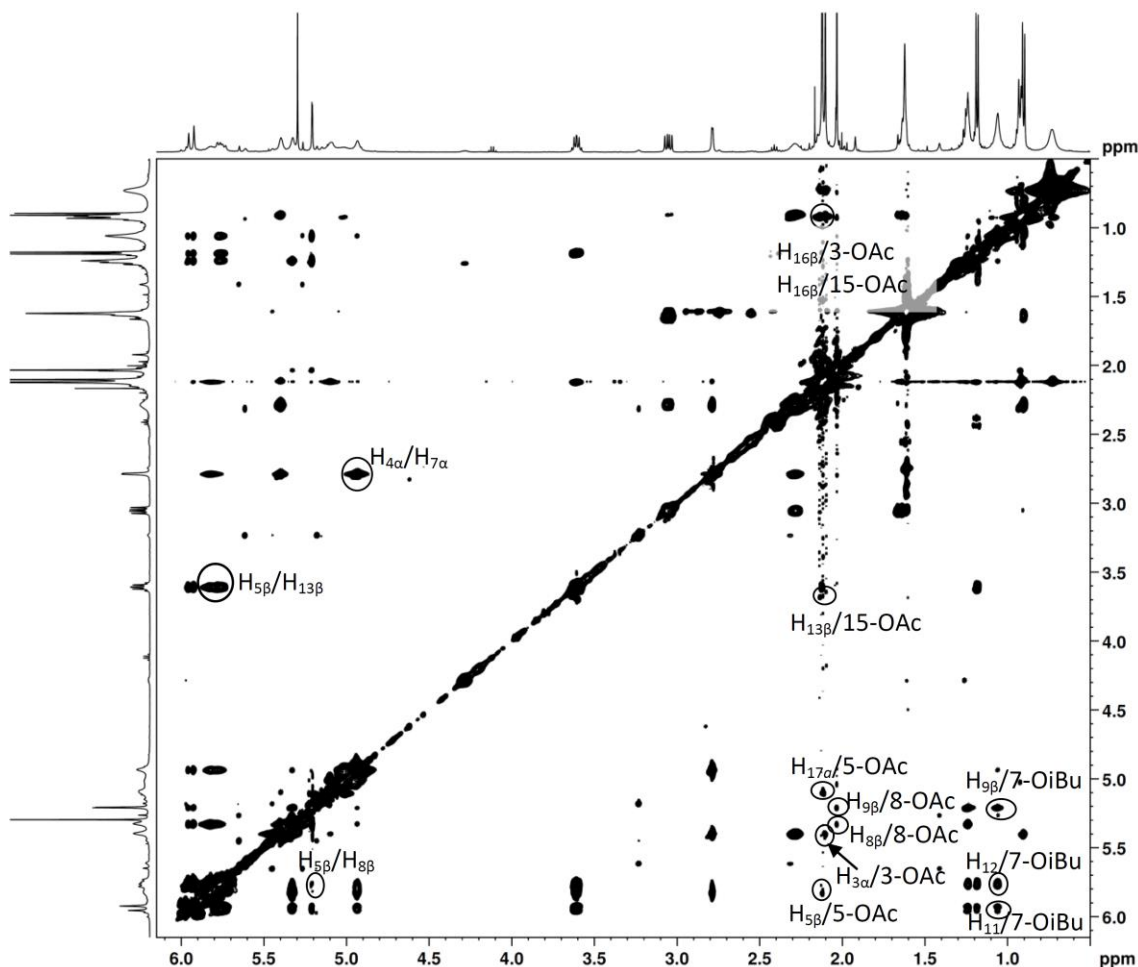
Kako se u HMBC spektru vidi samo korelacija protona H<sub>9</sub> i karbonila na 164,0 ppm (dokaz da je u ovom položaju vezan nikotinat), ali ne i korelacije ostalih oksimetinskih protona i odgovarajućih karbonila, položaj preostalih estarskih grupa određen je iz NOESY spektra (**Slika 64**).

U NOESY spektru uočavaju se korelacije koje potiču od sprezanja protona metil grupe izobutirata (1,06 ppm) sa H<sub>9 $\beta$</sub> , H<sub>11</sub> i H<sub>12</sub>. Da bi metil grupa izobutirata ostvarila ove korelacije mora biti vezana u položaju C<sub>7</sub> ili C<sub>9</sub>. Budući da se u HMBC spektru vidi korelacija protona H<sub>9 $\beta$</sub>  sa karbonilom na 164,0 ppm, izobutirat je vezan u položaj C<sub>7</sub>. To znači da su u položajima C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>8</sub> i C<sub>15</sub> vezani acetati.

Proton H<sub>16 $\beta$</sub>  spreže se sa protonima dva acetata (2,10 i 2,12 ppm) što ukazuje da se jedan acetat nalazi u položaju C<sub>3</sub>, a drugi u položaju C<sub>15</sub>. Protoni metil grupe acetata (2,10 ppm) sprežu se sa protonom H<sub>3 $\alpha$</sub> , pa je ovaj acetat vezan za C<sub>3</sub>. Acetat sa protonima metil grupe na 2,12 ppm vezan je u položaju C<sub>15</sub>, što dokazuje njihovo sprezanje sa protonom H<sub>13 $\beta$</sub> . Međutim, protoni na 2,12 ppm sprežu se i sa protonima H<sub>5 $\alpha$</sub>  (5,82 ppm) i H<sub>17a</sub> (5,07 ppm), što znači da signal na 2,12 ppm potiče od dve metil grupe dva različita acetata. Na osnovu korelacija koje se uočavaju, drugi acetat sa metil grupom na 2,12 ppm vezan je u položaju C<sub>5</sub>. Poslednji acetat, sa metil grupom na 2,04 ppm, vezan je u položaju C<sub>8</sub>, što potvrđuju korelacije između protona ove metil grupe sa protonima H<sub>8 $\beta$</sub>  i H<sub>9 $\beta$</sub> .



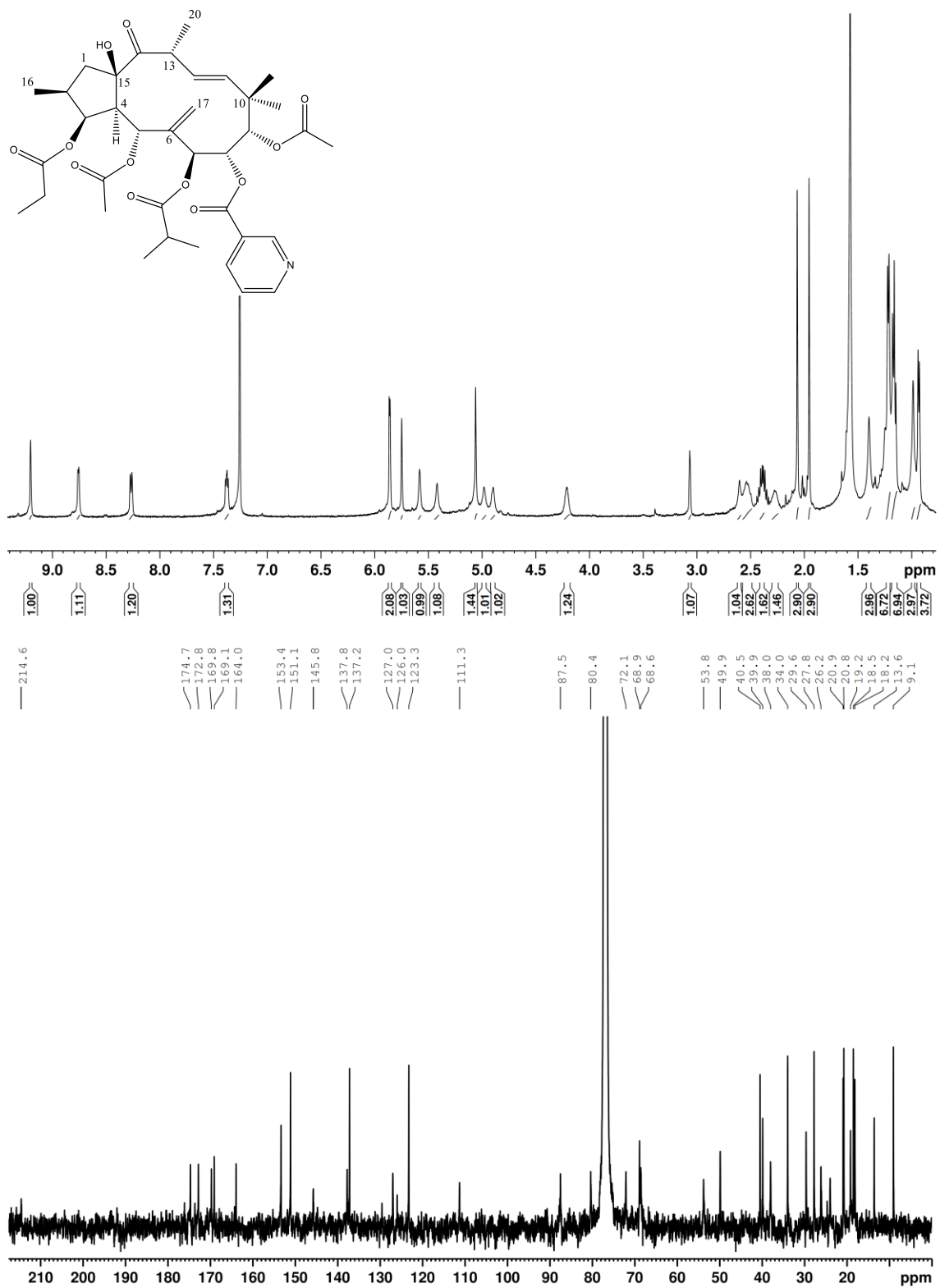
Slika 63. <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR spektri jedinjenja 29



Slika 64. NOESY spektar jedinjenja 29

#### 2.4.12. $5\alpha,9\alpha$ -Diacetiloksi- $15\beta$ -hidroksi- $7\beta$ -izobutanoiloksi- $8\alpha$ -nikotinoiloksi- $3\beta$ -propanoiloksi- $6(17),11E$ -dien-14-on (30)

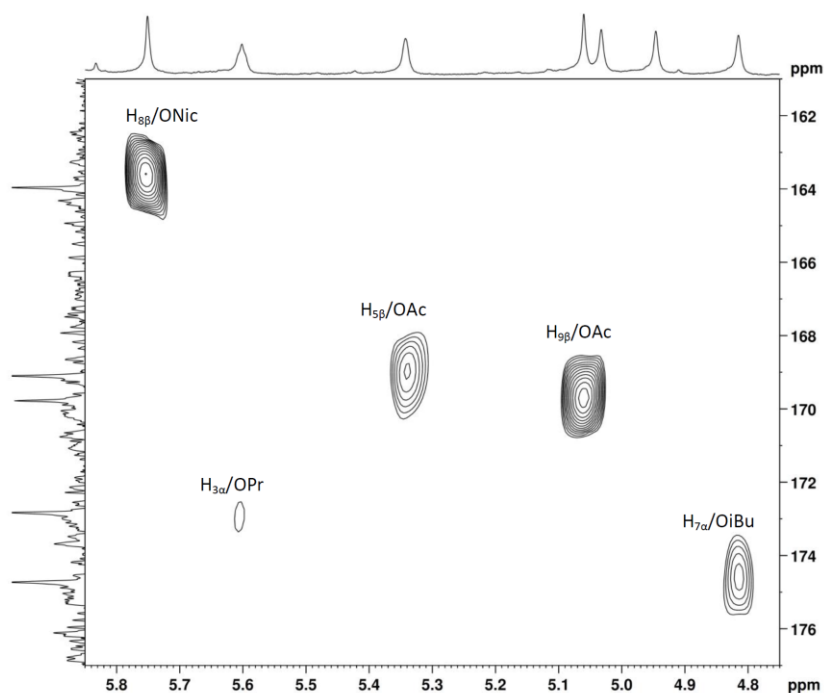
Jedinjenje **30** je izolovano kao amorfna bezbojna supstanca molekulske formule  $C_{37}H_{49}NO_{12}$  (na osnovu  $m/z$  700,3331 za jon  $[M+H]^+$  u HRESIMS). Analizom  $^1H$  NMR i  $^{13}C$  NMR spektara (Slika 65, Tabela 24) utvrđeno je da izolovano jedinjenje sadrži pet estarskih grupa i to dva acetata i po jedan izobutirat, nikotinat i propionat. Istu molekulsku formulu i iste estre ima i jedinjenje **24** (eufodendrofan A). Poređenjem  $^1H$  NMR spektara ovih jedinjenja utvrđeno je da se njihove strukture razlikuju. Najveća razlika je uočena za hemijska pomeranja protona  $H_7$ ,  $H_8$  i  $H_9$ , što je ukazalo na različit raspored estrarskih grupa u ovom delu molekula u poređenju sa eufodendrofanom A.



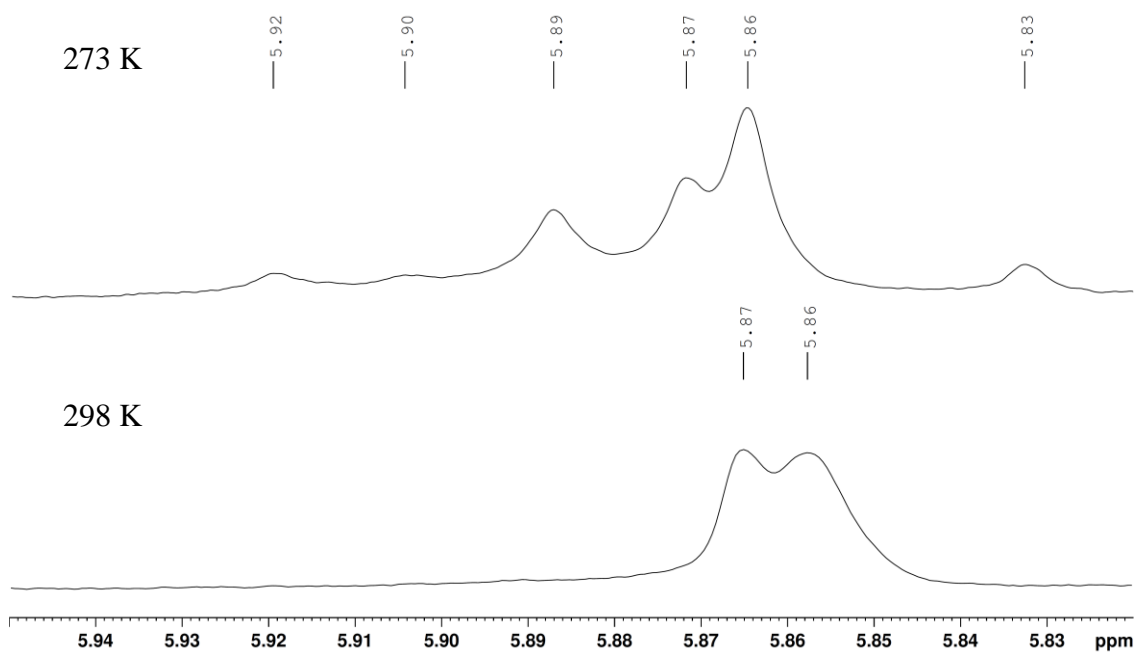
**Slika 65.** <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektri jedinjenja **30**

Analizom HMBC spektra (**Slika 66**) određen je položaj estara vezanih za jatrofansko jezgo.

U  $^1\text{H}$  NMR spektru snimljenom na 298 K asignacija protona  $\text{H}_{11}$  i  $\text{H}_{12}$  nije moguća, jer su njihova hemijska pomeranja 5,87 i 5,86 ppm, a signali oba protona imaju oblik proširenog singleta (**Slika 65**). Za proton  $\text{H}_{11}$  očekuje se da ima oblik dubleta sa *trans*-konstantom kuplovanja, dok se za proton  $\text{H}_{12}$  očekuje dublet-dubleta. Da bi asignacija ova dva protona bila moguća, snimljen je i  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja na 273 K (**Slika 67**). Na ovoj temperaturi signali pomenutih protona se razdvajaju i dobija se dublet na hemijskom pomeranju 5,84 ppm i sa konstantom kuplovanja 15 Hz ( $J_{\text{trans}}$ ), što odgovara protonu  $\text{H}_{11}$ , kao i jedan AB-kvartet na hemijskom pomeranju 5,89 ppm i sa konstantama od 15 i 10 Hz ( $J_{\text{trans}}$  i  $J_{\text{vic}}$ ), što odgovara protonu  $\text{H}_{12}$ .



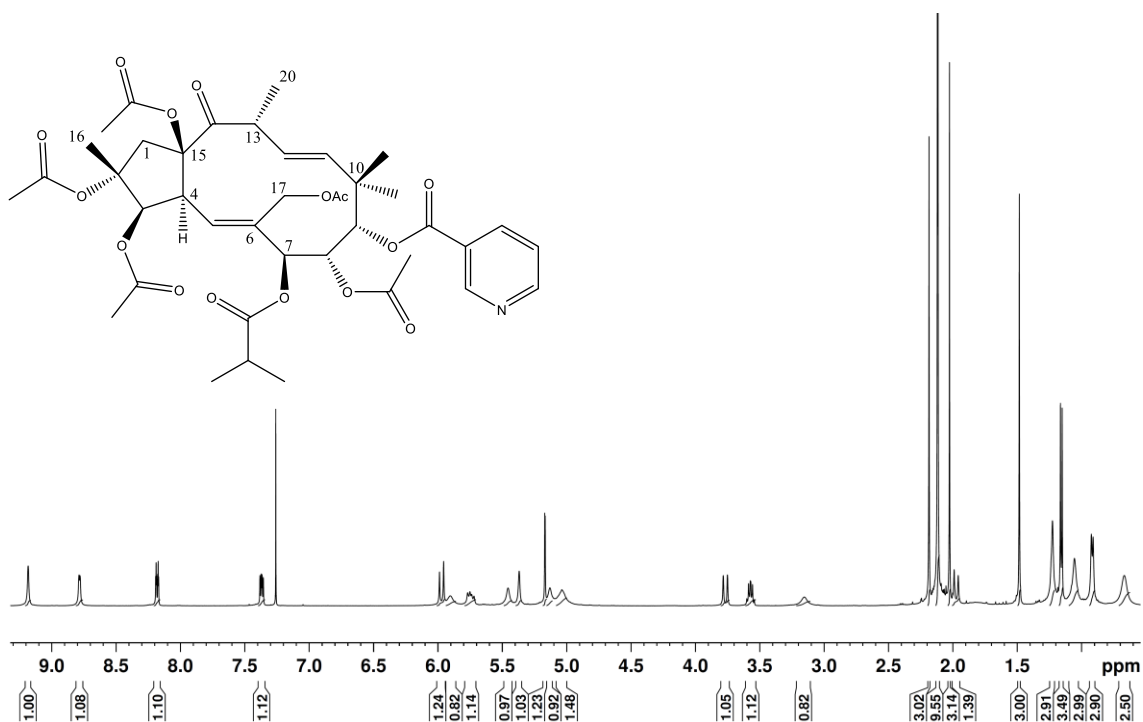
**Slika 66.** Deo HMBC spektra jedinjenja **30**



**Slika 67.** Deo  $^1\text{H}$  NMR spektra jedinjenja **30** snimljenog na različitim temperaturama

### 2.4.13. 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,15 $\beta$ ,17-Pentaacetiloksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksijatrofa-5*E*,11*E*-dien-14-on (31)

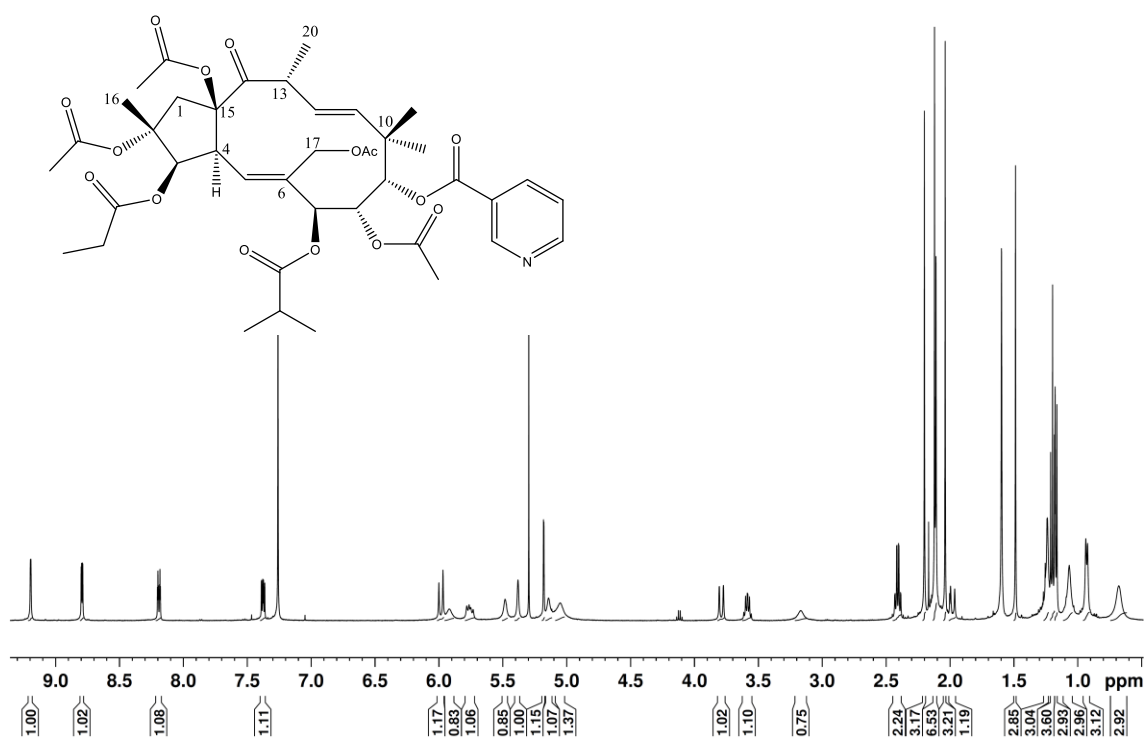
Jedinjenje **31** je izolovano kao amorfna bezbojna supstanca molekulske formule C<sub>40</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>15</sub> (na osnovu jona [M+H]<sup>+</sup> u HRESIMS sa *m/z* 786,3346). Detaljnom analizom <sup>1</sup>H NMR (Slika 68, Tabela 25) i <sup>13</sup>C NMR spektra (Tabela 25) utvrđeno je da u izolovanom jedinjenju postoji sedam estarskih grupa i to pet acetata i po jedan izobutirat i nikotinat. Pretragom literature i upoređivanjem spektralnih podataka zaključeno je da je ovaj molekul ranije izolovan iz biljne vrste *E. dendroides* kao eufodendrofan F.<sup>93</sup>



Slika 68. <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja **31**

#### 2.4.14. 2 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,15 $\beta$ ,17-Tetraacetiloksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoil- oksi-3 $\beta$ -propanoiloksi-5*E*,11*E*-dien-14-on (32)

Jedinjenje **32** je izolovano kao amorfna bezbojna supstanca molekulske formule C<sub>41</sub>H<sub>53</sub>NO<sub>15</sub> (na osnovu jona [M+Na]<sup>+</sup> u HRESIMS sa *m/z* 822,3316). U poređenju sa jedinjenjem **31**, u jedinjenju **32** postoji jedna metilenska grupa više. Daljom analizom <sup>1</sup>H NMR (Slika 69, Tabela 25) i <sup>13</sup>C NMR spektara (Tabela 25) utvrđeno je da je ovo jedinjenje eufodendrofan Q ranije izolovano iz biljne vrste *E. dendroides*.<sup>24</sup>

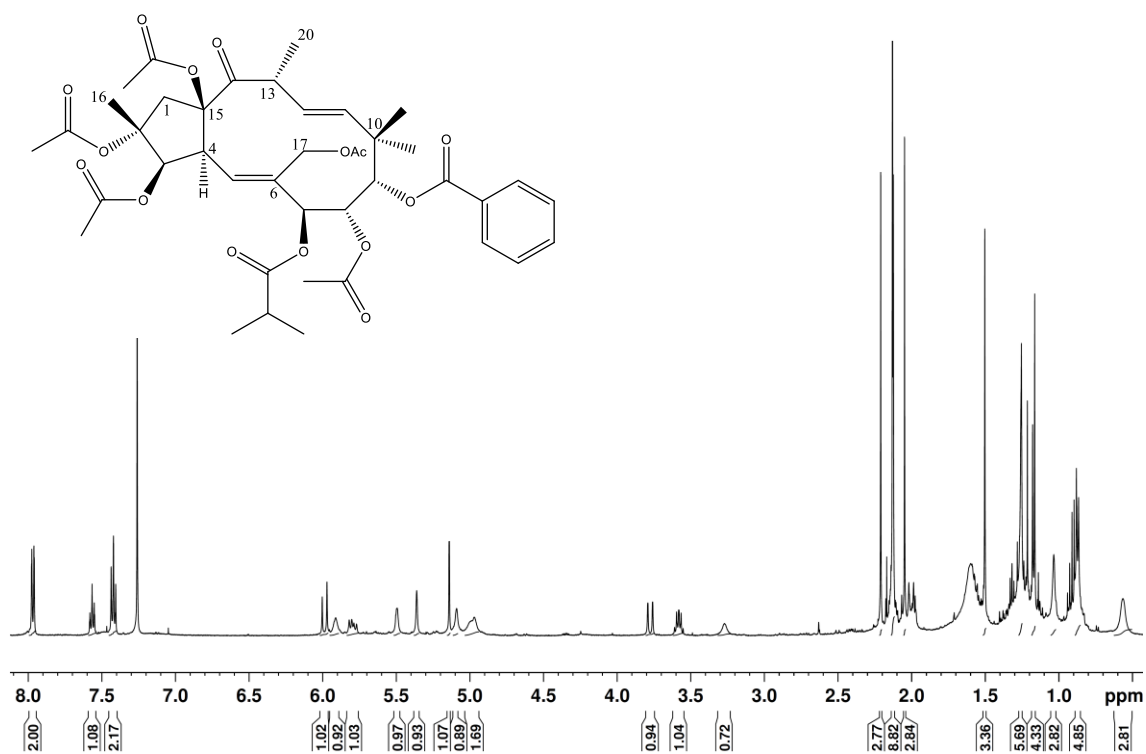


Slika 69. <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja **32**



#### 2.4.15. 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,15 $\beta$ ,17-Pentaacetiloksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-8 $\alpha$ -benzoil-oksijatrofa-5*E*,11*E*-dien-14-on (33)

Jedinjenje **33** je izolovano kao amorfna bezbojna supstanca molekulske formule C<sub>40</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>15</sub> (potvrđena na osnovu  $m/z$  807,3196 jona [M+Na]<sup>+</sup> u HRESIMS). Analizom <sup>1</sup>H NMR (Slika 70, Tabela 25) i <sup>13</sup>C NMR spektra (Tabela 25) utvrđeno je da u izolovanom jedinjenju postoji sedam estarskih grupa i to pet acetata i po jedan izobutirat i nikotinat. Pretragom literature po molekulskoj formuli i poređenjem spektralnih podataka zaključeno je da je jedinjenje identične strukture ranije izolovano iz *E. dendroides* (eufodendrofan S).<sup>24</sup>



Slika 70. <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja **33**

**Tabela 25.**  $^1\text{H}$  (500 MHz) i  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) podaci za eufodendropane **31–33** ( $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz))

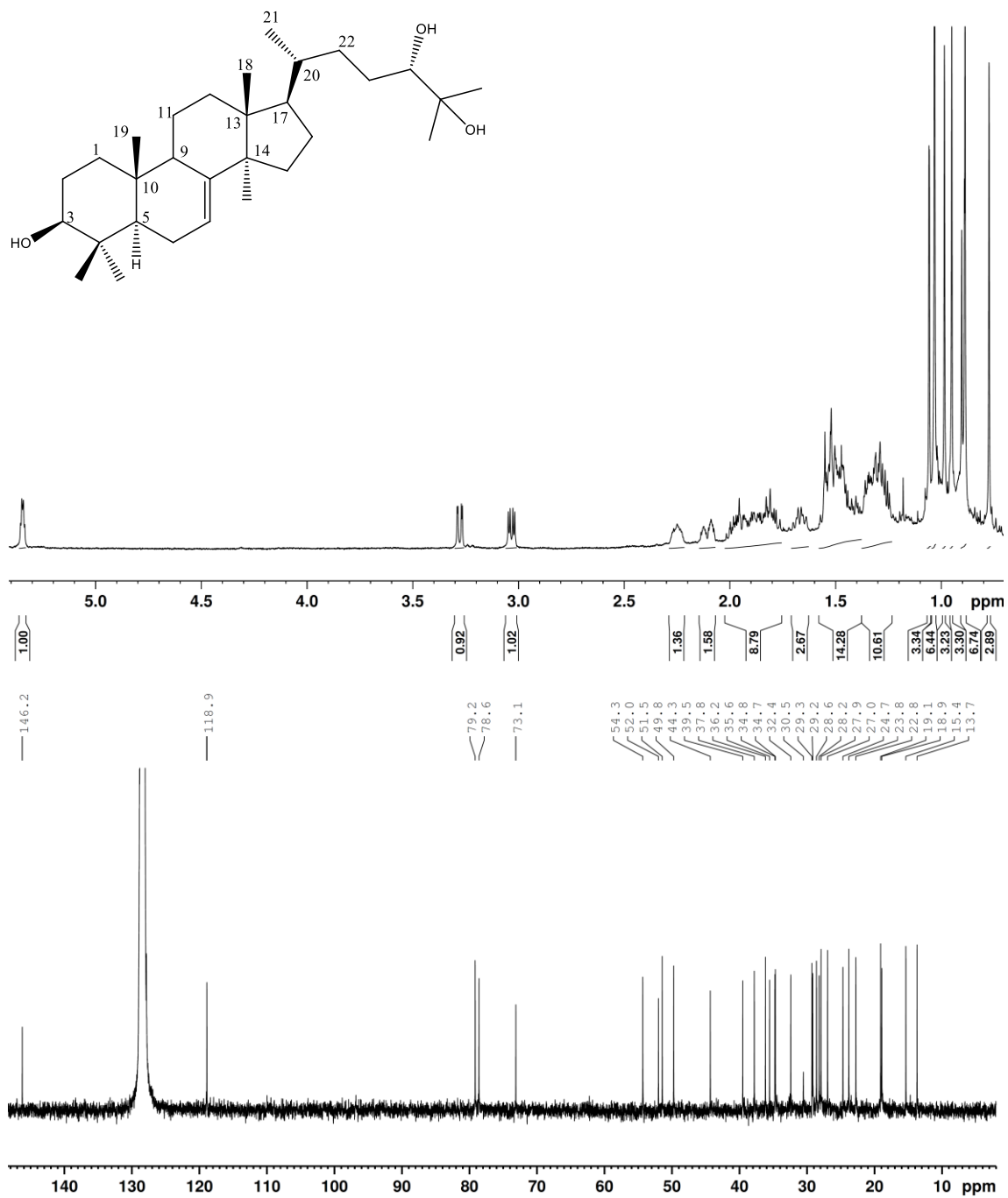
Položaj	<b>31</b>		<b>32</b>		<b>33</b>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1 $\alpha$	3,75 d (16)	47,5	3,77 d (16)	47,5	3,77 d (16)	47,7
1 $\beta$	1,96 d (16)		1,96 d (16)		2,05 m	
2		86,4		86,4		86,4
3	5,46 brs	77,9	5,48 brs	77,8	5,49 brs	78,0
4	3,16 brs	49,9	3,17 brs	49,9	3,27 brs	49,9
5	5,13 brs	111,7	5,14 brs	111,4	5,09 brs	111,5
6		125,2		125,2		125,4
7	5,05 brs	68,0	5,05 brs	68,2	4,96 brs	68,3
8	5,37 brs	71,2	5,38 brs	71,2	5,36 brs	71,3
9	5,17 d (2)	80,0	5,18 d (2)	79,6	5,14 d (2)	79,6
10		40,1		40,1		40,0
11	5,96 d (16)	131,9	5,97 d (16)	131,9	5,98 d (16)	131,8
12	5,75 dd (16;9)	137,1	5,76 dd (16;9)	137,1	5,79 dd (16;9)	137,4
13	3,57 dq (9;6)	43,3	3,58 dq (9;6)	43,3	3,58 dq (9;6)	43,1
14		211,5		212,1		211,9
15		92,8		92,8		92,9
16	1,48 s	18,8	1,48 s	18,0	1,50 s	18,0
17a	5,05 brs	67,8	5,05 brs	67,8	5,00 brs	67,7
17b	5,91 brs		5,92 brs		5,91 brs	
18	1,06 brs	26,9	1,06 brs	24,0	1,04 brs	24,5
19	1,23 brs	24,1	1,29 brs	27,0	1,26 brs	26,5
20	1,16 d (6)	20,0	1,17 d (6)	20,0	1,17 d (6)	20,1
R-2						
1		168,9		169,5		169,0
2	2,03 s	20,6	2,04 s	22,2	2,12 s	22,0
OR-3						
1		170,6		172,2		170,4
2	2,12 s	21,0	2,41 qd (8;2)	27,9	2,13 s	21,8
3			1,20 t (8)	9,0		
OR-7						
1		174,8		174,8		174,8
2	2,11 m	33,5	2,11 m	33,5	1,95 m	33,3
3	0,92 d (6)	17,7	0,93 d (7)	18,0	0,87 d (7)	17,4
4	0,67 brs	18,0	0,68 brs	18,9	0,56 brs	18,7
OR-8						
1		169,9		170,6		169,7
2	2,11 s	21,2	2,11 s	20,6	2,05 s	20,6
OR-9						
1		163,9		163,9		165,3
2	9,19 brs	151,3	9,19 d (2)	151,3		130,0
3		125,2		124,9	7,92 dd (8;1)	129,9
4	8,78 d (5)	137,1	8,79 dd (5;2)	137,2	7,42 t (8)	128,4
5	8,18 dt (8;2)	123,3	8,19 dt (8;2)	123,3	7,75 tt (8;1)	133,1
6	7,37 dd (8;5)	153,8	7,38 dd (8;5;2)	153,8		
OR-15						
1		170,3		170,3		168,9
2	2,19 s	22,2	2,20 s	21,1	2,21 s	21,3
OR-17						
1		169,5		170,0		170,8
2	2,13 s	21,3	2,12 s	21,1	2,13 s	21,0

#### 2.4.16. (3S,24R)-Tirukal-7-en-3,24,25-triol (34)

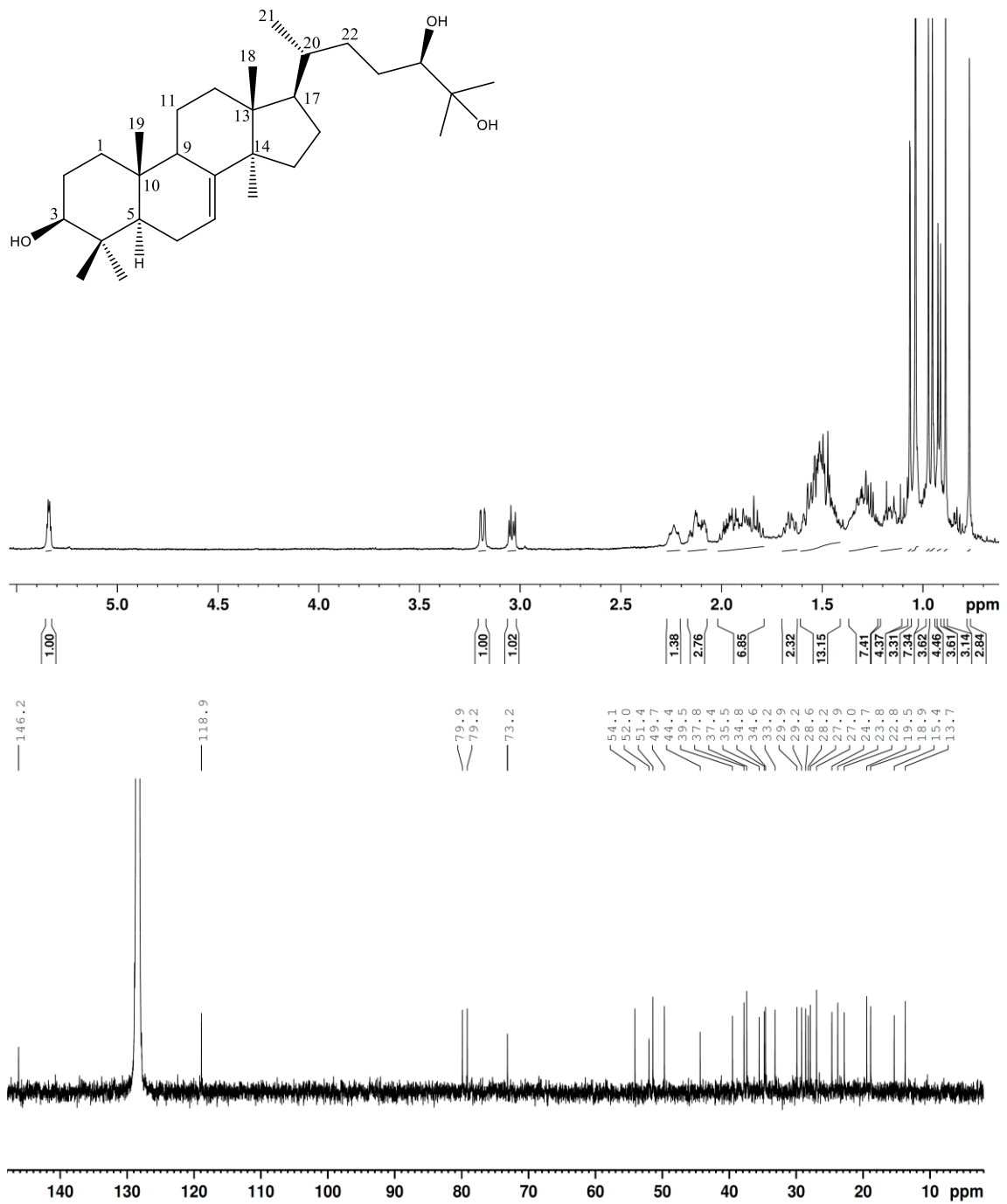
Jedinjenje **34** je izolovano kao amorfna bezbojna supstanca molekulske formule  $C_{30}H_{52}O_3$ . Na osnovu molekulske formule može se tvrditi da u molekulu postoji pet nezasićenja. Analizom  $^1H$  NMR (**Slika 71**, **Tabela 26**) i  $^{13}C$  NMR spektra (**Tabela 26**) utvrđeno je da u izolovanom jedinjenju postoji samo jedna dvostruka ugljenik-ugljenik veza, što znači da je izolovani molekul tetraciklični triterpen. Poređenjem eksperimentalnih podataka sa podacima iz literature zaključeno je da je jedinjenje **34** (3S,24R)-Tirukal-7-en-3,24,25-triol, ranije izolovan iz *Ailanthus excelsa*.<sup>96</sup>

#### 2.4.17. (3S,24S)-Tirukal-7-en-3,24,25-triol (35)

Jedinjenje **35** izolovano je kao amorfna bezbojna supstanca molekulske formule  $C_{30}H_{50}O_2$ . Na osnovu molekulske formule, u molekulu postoji šest nezasićenja. Analizom  $^1H$  NMR (**Slika 72**, **Tabela 26**) i  $^{13}C$  NMR spektra (**Tabela 26**) utvrđeno je da u izolovanom jedinjenju postoji samo jedna dvostruka ugljenik-ugljenik veza i jedan epoksidni prsten, što dalje znači da je izolovani molekul triterpen sa tetracikličnim skeletom. Pretragom literature po molekulskoj formuli i poređenjem eksperimentalnih i podataka iz literature zaključeno je da je izolovani molekul (3S,24S)-Tirukal-7-en-3,24,25-triol, prvi put izolovan iz *Celastrus stylosus*.<sup>97</sup>



Slika 71.  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri jedinjenja 34



Slika 72.  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri jedinjenja 35

**Tabela 26.**  $^1\text{H}$  (500 MHz) i  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) podaci za jedinjenja **34** i **35** ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz))

Položaj	<b>34</b>		<b>35</b>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1 $\alpha$	0,96 m		0,95 m	
1 $\beta$	1,53 m	37,8	1,52 m	37,8
2 $\alpha$	1,46 m		1,48 m	
2 $\beta$		28,6	0,96 m	28,6
3 $\alpha$	3,03 dd (11; 5)	79,2	3,03 dd (11; 5)	79,2
4		39,5		39,5
5	1,27 m	51,5	1,26 m	51,4
6 $\alpha$	2,12 m		2,09 m	
6 $\beta$	1,90 m	24,7	1,93 m	24,7
7	5,35 dd (7; 3)	118,9	5,34 dd (7; 3)	118,9
8		146,2		146,2
9	2,25 m	49,8	2,24 m	49,7
10		35,5		35,5
11	1,49 m	18,9	1,49 m	18,9
12 $\alpha$	1,51 m		1,52 m	
12 $\beta$	1,67 m	34,8	1,66 m	34,8
13		44,3		44,4
14		52,0		52,0
15 $\alpha$	1,88 m		1,88 m	
15 $\beta$	1,80 m	34,7	1,83 m	34,6
16 $\alpha$	2,00 m		1,50 m	
16 $\beta$	1,32 m	29,3	1,44 m	29,2
17	1,55 m	54,3	1,56 m	54,1
18	0,99 s	22,8	0,98 s	22,8
19	0,78 s	13,7	0,77 s	13,7
20	1,48 m	36,2	1,44 m	37,4
21	0,90 d (6,5)	19,1	0,92 d (6,5)	19,5
22 $\alpha$	1,82 m		0,98 m	
22 $\beta$	1,23 m	32,4	2,13 m	33,2
23 $\alpha$			1,15 m	
23 $\beta$	1,41 m	29,2	1,57 m	29,9
24	3,28 dd (10; 2)	78,6	3,18 dd (10; 2)	79,2
25		73,2		73,2
26	1,04 s	23,8	1,04 s	23,8
27	1,04 s	27,0	1,04 s	26,9
28	0,89 s	15,4	0,88 s	15,4
29	0,95 s	28,2	0,96 s	28,2
30	1,06 s	27,9	1,06 s	27,9

#### 2.4.18. 12 $\beta$ -Benzoiloksi-13 $\alpha$ -izobutanoiloksi-4-*epi*-4,20-dideoksiforbol

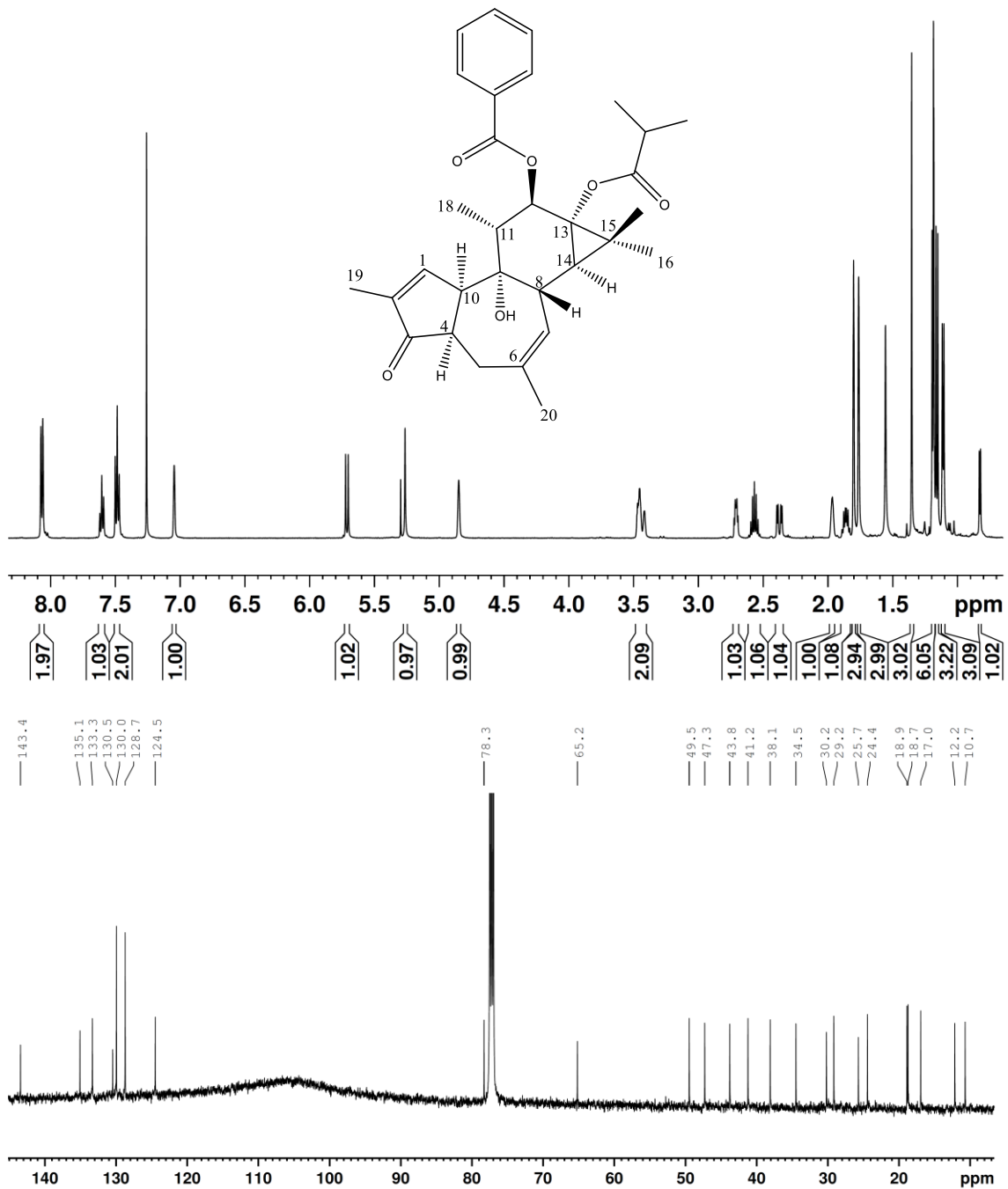
(36)

Jedinjenje **36** izolovano je kao bezbojna amorfna supstanca molekulske formule C<sub>31</sub>H<sub>38</sub>O<sub>6</sub> (potvrđena na osnovu *m/z* 507,2741 jona [M+H]<sup>+</sup> u HRESIMS). Analizom <sup>1</sup>H NMR (**Slika 73, Tabela 27**) i <sup>13</sup>C NMR spektra (**Tabela 27**) utvrđeno je da u izolovanom jedinjenju postoje dve estarske grupe i to jedan izobutirat i jedan benzoat. Pretragom literature po molekulskoj formuli i upoređivanjem spektralnih podataka zaključeno je da je ovakav molekul već izolovan iz biljne vrste *E. bupleuroides* kao 12 $\beta$ -benzoiloksi-13 $\alpha$ -izobutanoiloksi-4-*epi*-4,20-dideoksiforbol.<sup>98</sup>

#### 2.4.19. 12 $\beta$ -Acetiloksi-13 $\alpha$ -izobutanoiloksi-4-*epi*-4,20-dideoksiforbol

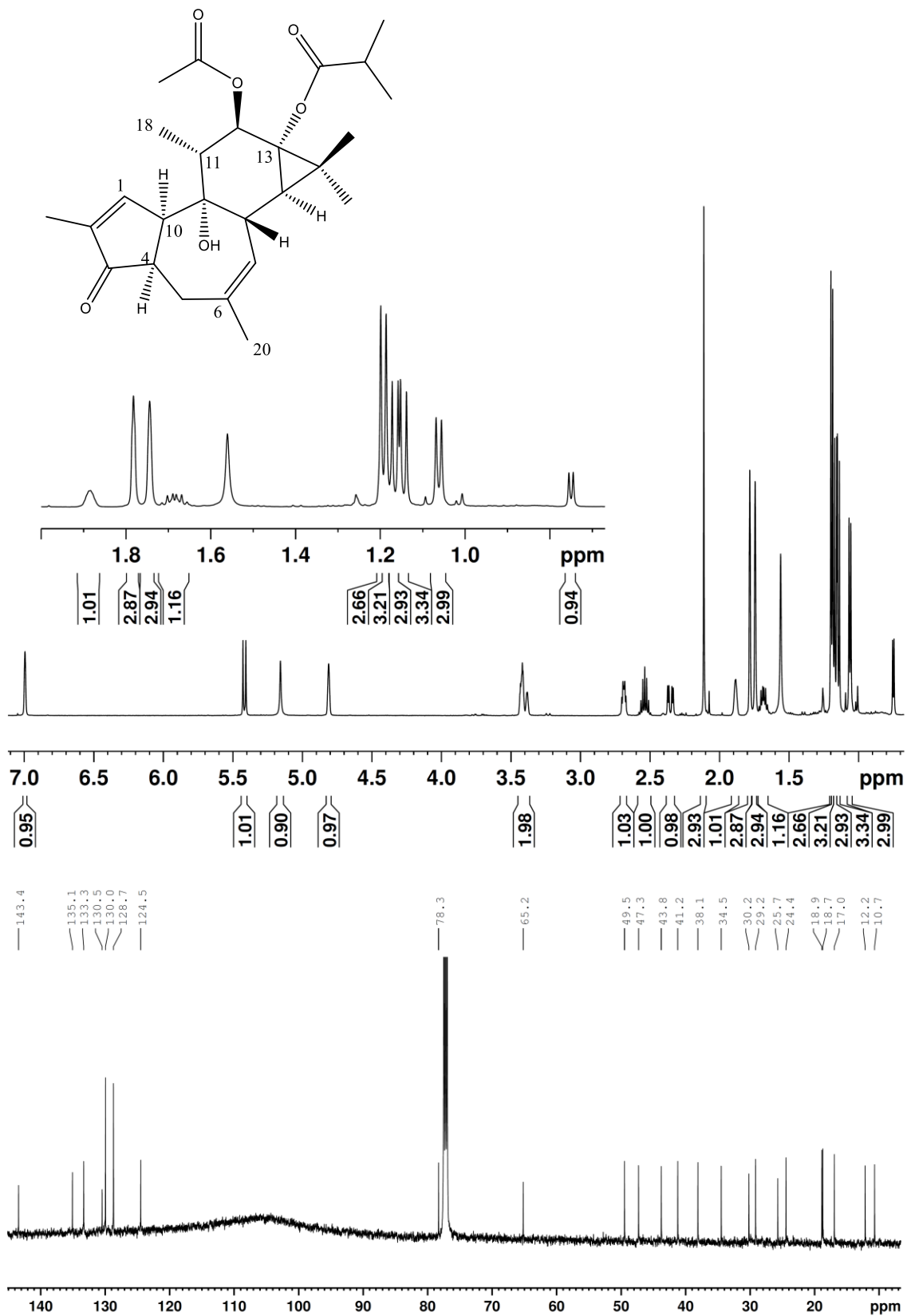
(37)

Jedinjenje **37** izolovano je kao amorfna bezbojna supstanca molekulske formule C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>O<sub>6</sub> (u HRESIMS *m/z* jona [M+H]<sup>+</sup> iznosi 445,2581). Analizom <sup>1</sup>H NMR (**Slika 74, Tabela 27**) i <sup>13</sup>C NMR spektra (**Tabela 27**) utvrđeno je da u izolovanom jedinjenju postoje dve estarske grupa i to jedan acetat i jedan izobutirat. Pretragom literature po molekulskoj formuli i poređenjem eksperimentalnih i literaturnih spektralnih podataka zaključeno je da je izolovani molekul 12 $\beta$ -acetiloksi-13 $\alpha$ -izobutanoiloksi-4-*epi*-4,20-dideoksiforbol. Ovaj molekul prvi put je izolovan iz biljne vrste *E. clementei* Boiss.<sup>99</sup>



Slika 73.  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri jedinjenja 36

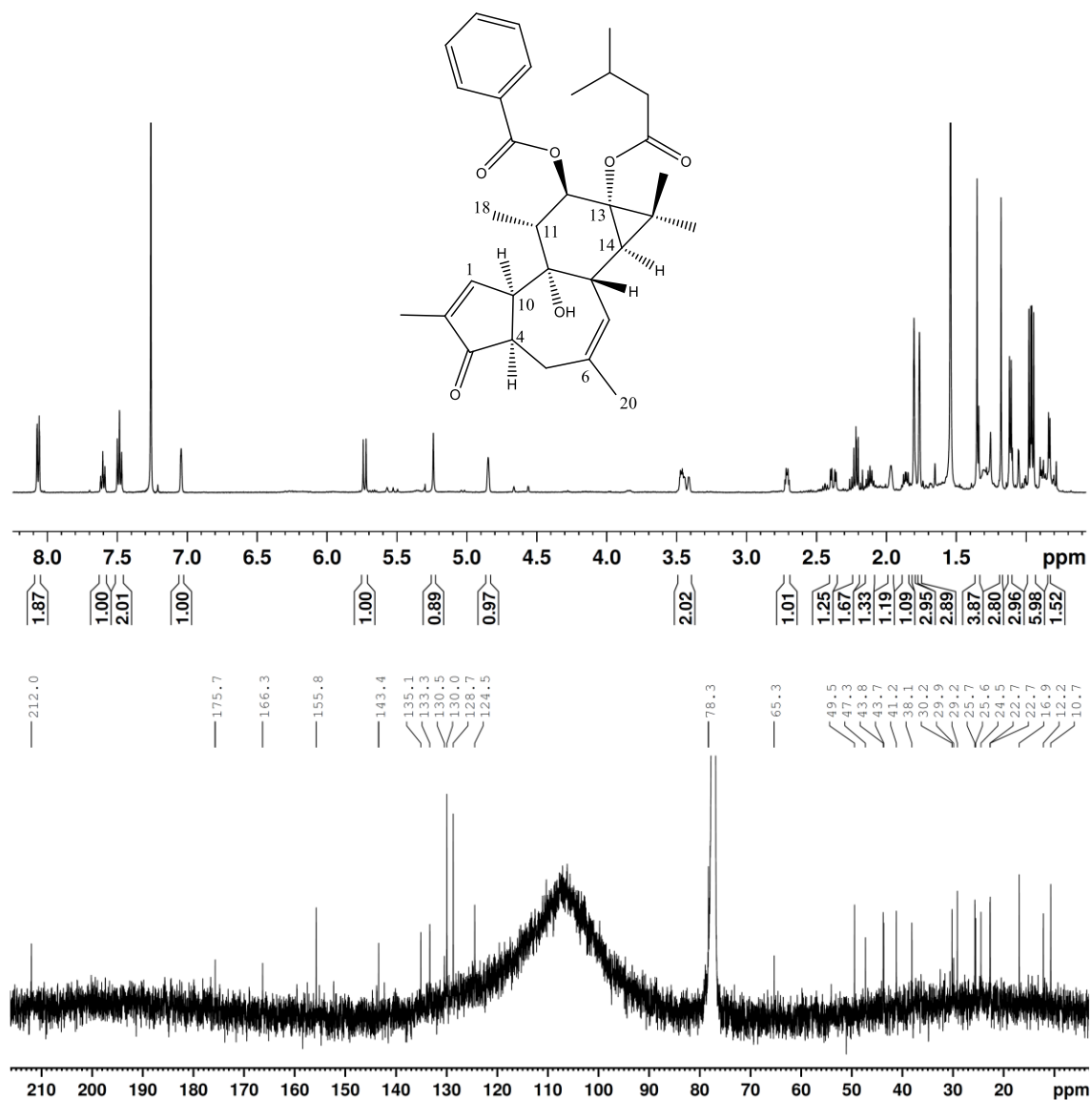




Slika 74. <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektri jedinjenja 37

### 2.4.20. 12 $\beta$ -Benzoiloski-13 $\alpha$ -izovaleriloksi-4-*epi*-4,20-dideoksiforbol (38)

Jedinjenje **38** izolovano je kao amorfna bezbojna supstanca molekulske formule C<sub>32</sub>H<sub>40</sub>O<sub>6</sub> (jon [M+H]<sup>+</sup> u HRESIMS ima *m/z* 521,2889).

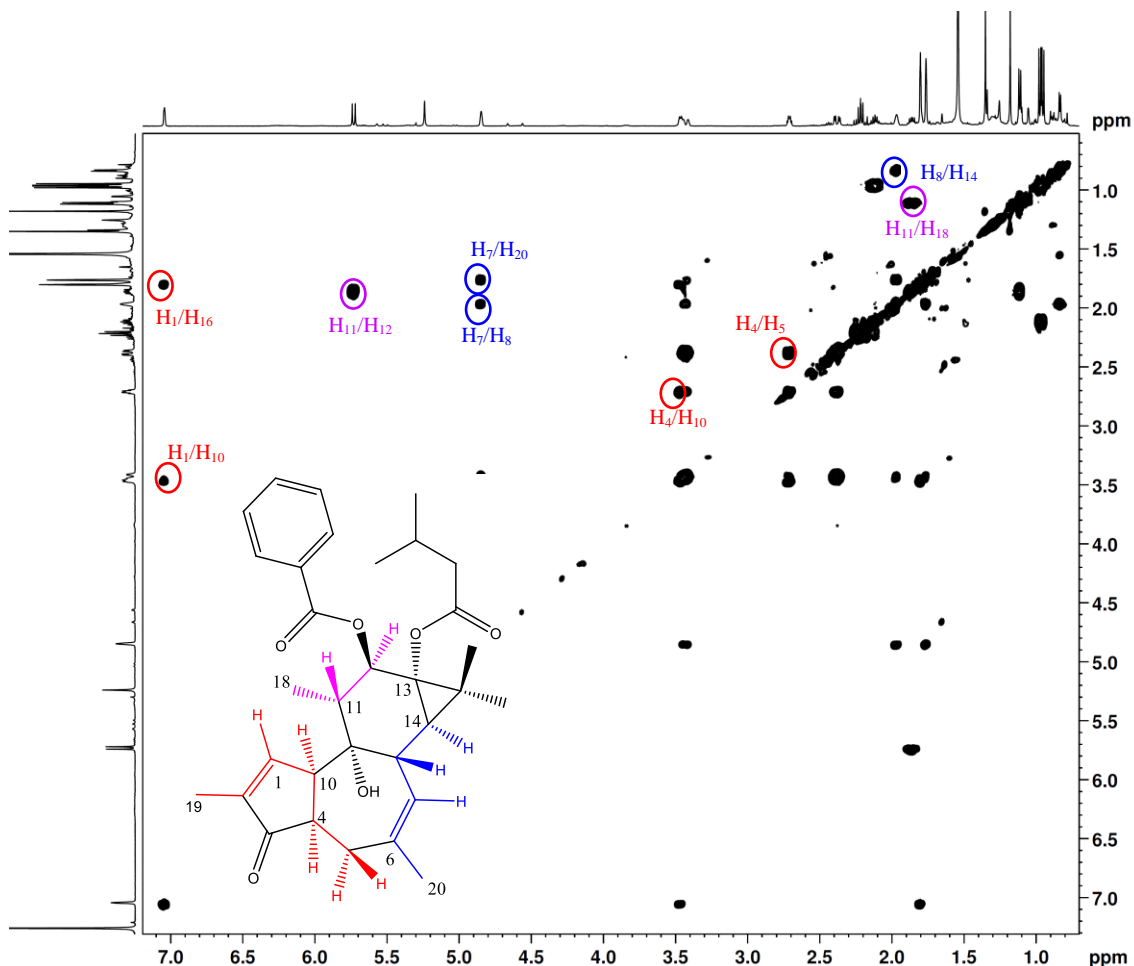


Slika 75. <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektri jedinjenja **38**

Na osnovu podataka dobijenih iz <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR spektara (Slika 75, Tabela 27), u izolovanom jedinjenju postoje dve estarske grupe i to jedan benzoat i jedan

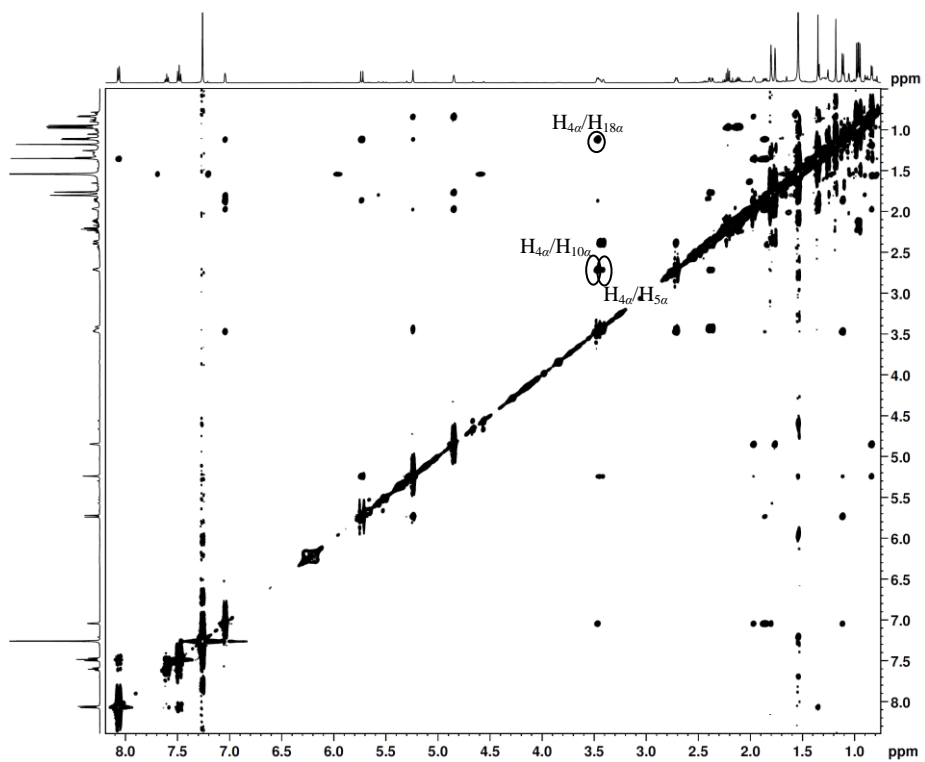
izovalerat. Daljom analizom 2D NMR spektara utvrđeno je da je izolovani molekul  $12\beta$ -benzoiloski- $13\alpha$ -izovaleriloksi-4-*epi*-4,20-dideoksiforbol, molekul koji do sada nije opisan u literaturi.

U COSY spektru ovog jedinjenja uočavaju se tri spinska sistema tiglijanskog jezgra (**Slika 76**).

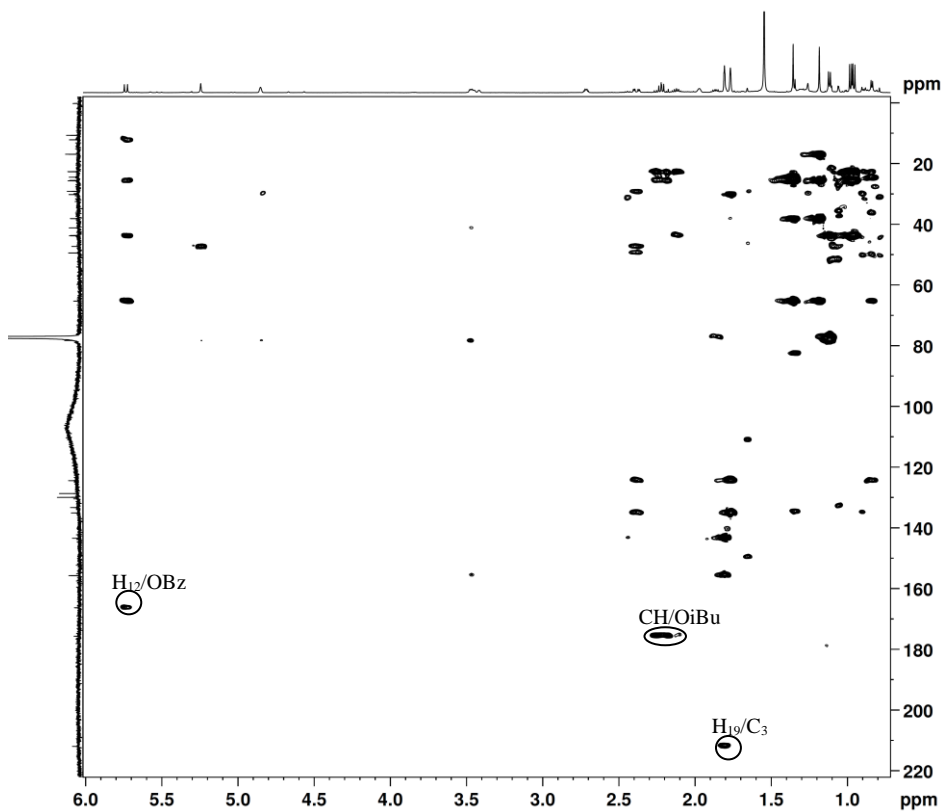


**Slika 76.** Deo COSY spektra jedinjenja **38**

Spinski sistem **A** čine protoni **H<sub>1</sub>**, **H<sub>4</sub>**, **H<sub>5</sub>**, **H<sub>10</sub>** i **H<sub>19</sub>** (korelacije **H<sub>19</sub>/H<sub>1</sub>**, **H<sub>1</sub>/H<sub>10</sub>**, **H<sub>10</sub>/H<sub>4</sub>** i **H<sub>4</sub>/H<sub>5</sub>**), spinski sistem **B** protoni **H<sub>7</sub>**, **H<sub>8</sub>**, **H<sub>14</sub>** i **H<sub>20</sub>** (korelacije **H<sub>20</sub>/H<sub>7</sub>**, **H<sub>7</sub>/H<sub>8</sub>** i **H<sub>8</sub>/H<sub>14</sub>**) i spinski sistem **C** protoni **H<sub>11</sub>**, **H<sub>12</sub>** i **H<sub>18</sub>** (korelacije **H<sub>18</sub>/H<sub>11</sub>** i **H<sub>11</sub>/H<sub>12</sub>**) U  $^1\text{H}$  NMR spektru ovog jedinjenja uočava se prošireni singlet na 7,05 ppm (**H<sub>1</sub>**) koji ukazuje na *cis* povezanost prstenova A i B, što je i potvrđeno u NOESY spektru (**Slika 77**).



Slika 77. NOESY spektar jedinjenja 38



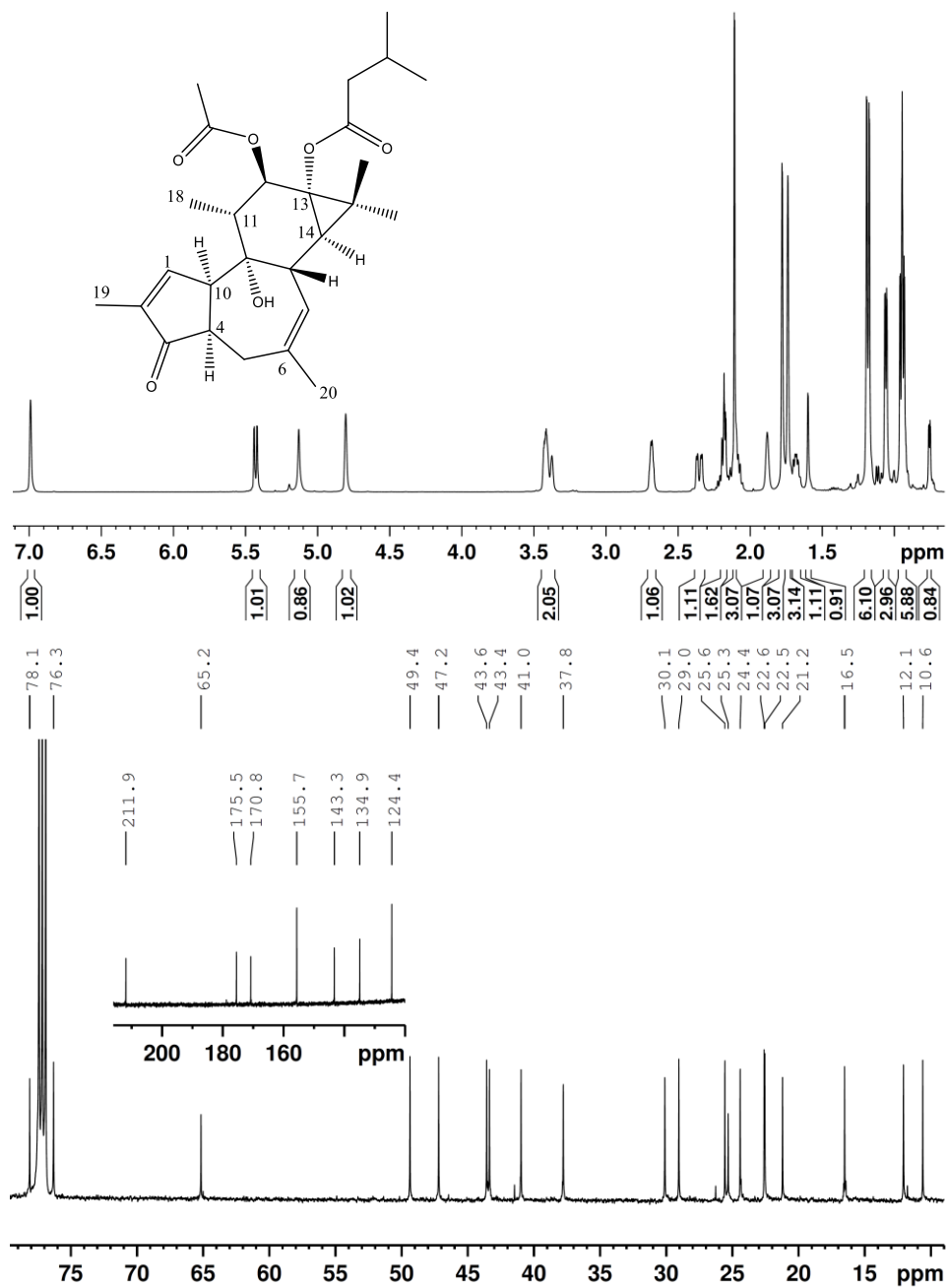
Slika 78. Deo HMBC spektra jedinjenja 38

**Tabela 27.**  $^1\text{H}$  (500 MHz) i  $^{13}\text{C}$  (125MHz) podaci za jedinjenja **36–38** ( $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz))

Položaj	<b>36</b>		<b>37</b>		<b>38</b>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	7,04 brs	155,8	7,00 brs	155,8	7,04 brs	155,7
2	-	143,4	-	143,4	-	143,4
3	-	212,0	-	212,0	-	212,0
4	2,71 m	49,5	2,69 m	49,5	2,71 m	49,5
5 $\alpha$	3,47 m	30,2	3,40 m	30,2	3,47 m	30,2
5 $\beta$	2,38 dd (15; 5)		2,35 dd (15; 5)		2,38 dd (15; 5)	
6	-	135,1	-	135,0	-	135,1
7	4,85 brs	124,5	4,81 brs	124,5	4,85 brs	124,5
8	1,97 brs	41,2	1,89 brs	41,1	1,96 brs	41,2
9-OH	5,26 s	78,3	5,16 s	78,2	5,24 s	78,3
10	3,48 m	47,3	3,42 m	47,3	3,48 m	47,3
11	1,86 m	43,8	1,69 m	43,5	1,86 m	43,8
12	5,72 d (10)	77,0	5,42 d (10)	76,3	5,73 d (11)	77,0
13	-	65,2	-	65,1	-	65,3
14	0,83 d (5)	38,1	0,75 d (5)	37,8	0,84 d (5)	38,1
15	-	25,7	-	25,6	-	25,7
16	1,19 s	24,4	1,19 s	24,4	1,18 s	24,5
17	1,35 s	16,9	1,20 s	16,6	1,35 s	16,9
18	1,11 d (6)	12,2	1,06 d (7)	12,1	1,11 d (7)	12,2
19	1,80 s	10,7	1,78 s	10,7	1,80 s	10,7
20	1,76 s	29,2	1,75 s	29,1	1,76 s	29,2
OR-12						
C=O	-	166,3	-	170,8	-	166,3
1	-	130,5	2,11	21,3	-	130,5
2	8,07 d (7,5)	130,0			8,07 d (8)	130,0
3	7,49 t (7,5)	128,7			7,48 t (8)	128,7
4	7,61 t (7,5)	133,3			7,60 t (8)	133,3
OR-13						
C=O	-	179,3	-	179,2	-	175,7
1	2,57 sept (7)	34,5	2,54 sept (7)	34,5	2,21 m	43,7
2	1,15 d (7)	18,9	1,15 d (7)	18,7	2,11 m	25,6
3	1,20 d (7)	18,7	1,17 d (7)	18,9	0,97 d (7)	22,7
4					0,95 d (7)	22,7

### 2.4.21. 12 $\beta$ -Acetiloksi-13 $\alpha$ -izovaleriloksi-4-*epi*-4,20-dideoksiforbol (39)

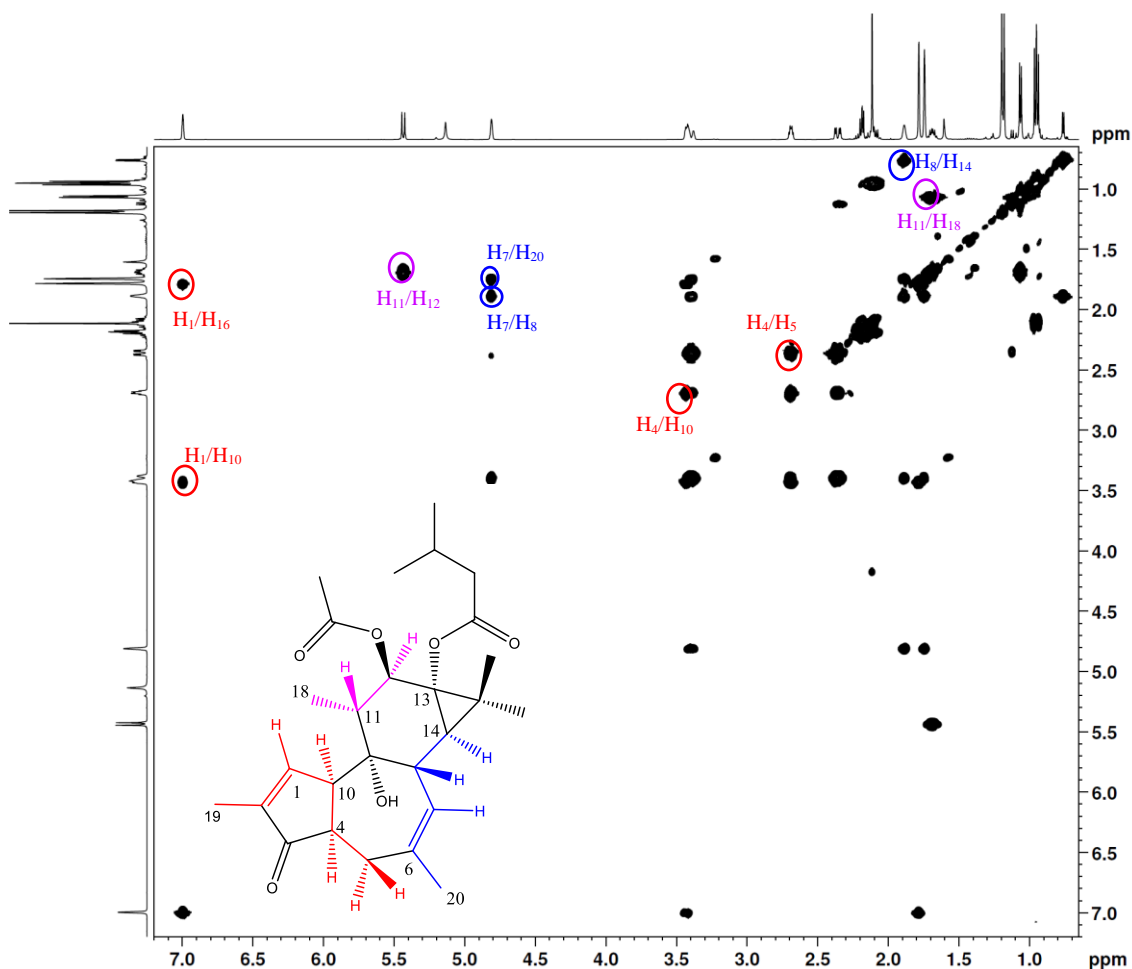
Jedinjenje **39** izolovano je kao amorfna bezbojna supstanca molekulske formule C<sub>27</sub>H<sub>38</sub>O<sub>6</sub> (jon [M+H]<sup>+</sup> u HRESIMS ima *m/z*, 459,2746).



Slika 79. <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektri jedinjenja **39**

Analizom  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR spektra (**Slika 79**, **Tabela 28**) utvrđeno je da u izolovanom jedinjenju postoje dve estarske grupe, po jedan acetat i izovalerat. Dalja analiza 2D NMR spektara pokazala je da je izolovan  $12\beta$ -acetiloksi- $13\alpha$ -izovaleril-4-*epi*-4,20-dideoksi-forbol, molekul koji do sada nije opisan u literaturi.

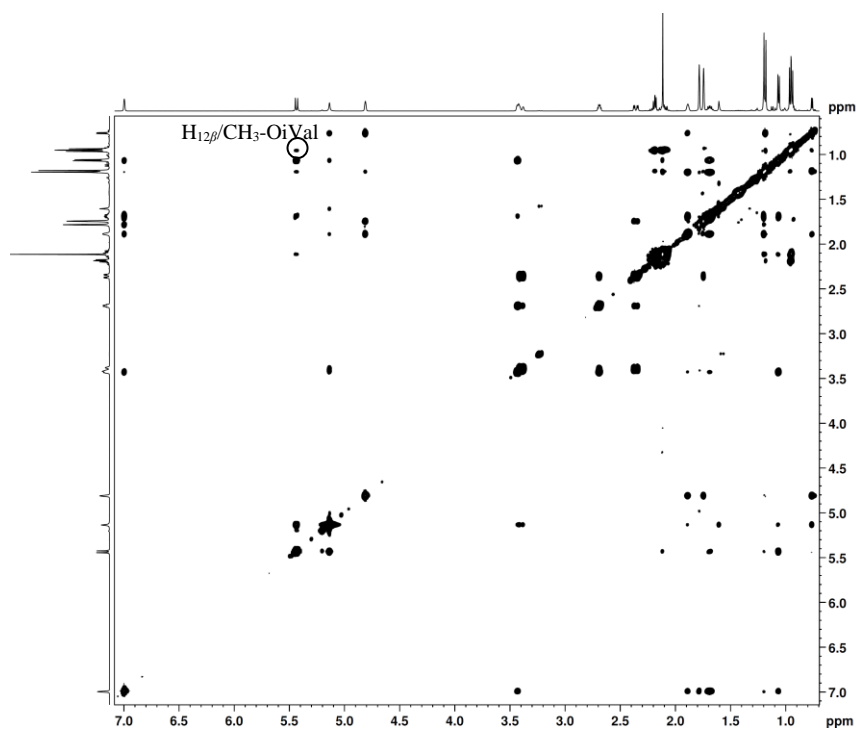
U COSY spektru ovog jedinjenja uočavaju se isti spinski sistemi kao i kod jedinjenja **38** (**Slika 80**).



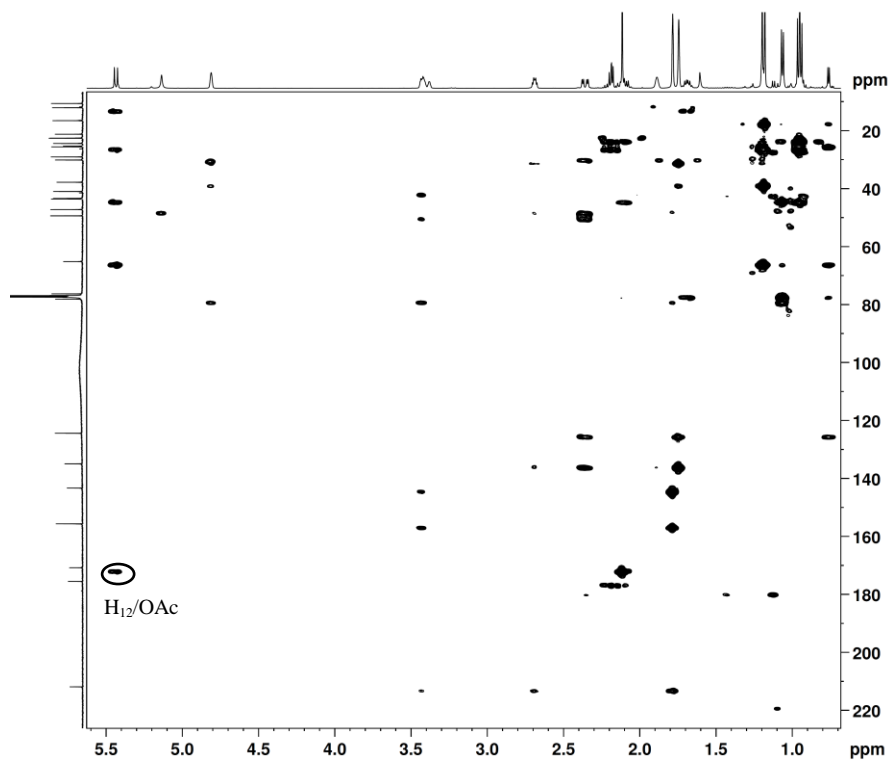
**Slika 80.** COSY spektar jedinjenja **39**

Povezanost petočlanog i sedmočlanog prstena i u ovom molekulu je *cis* i to se dokazuje nižim hemijskim pomeranjem  $\text{H}_1$  i izostankom sprežanja protona  $\text{H}_4$  i  $\text{H}_{11}$  u NOESY spektru (**Slika 81**).

Položaj acetata određen je na osnovu sprežanja protona  $\text{H}_{12}$  sa karbonilom na 170,8 ppm u HMBC spektru, dok je položaj izovalerata potvrđen NOE korelacijama (**Slika 81**) protona metil grupe izovalerata sa protonom  $\text{H}_{12\beta}$ .



Slika 81. NOESY spektar jedinjenja 39



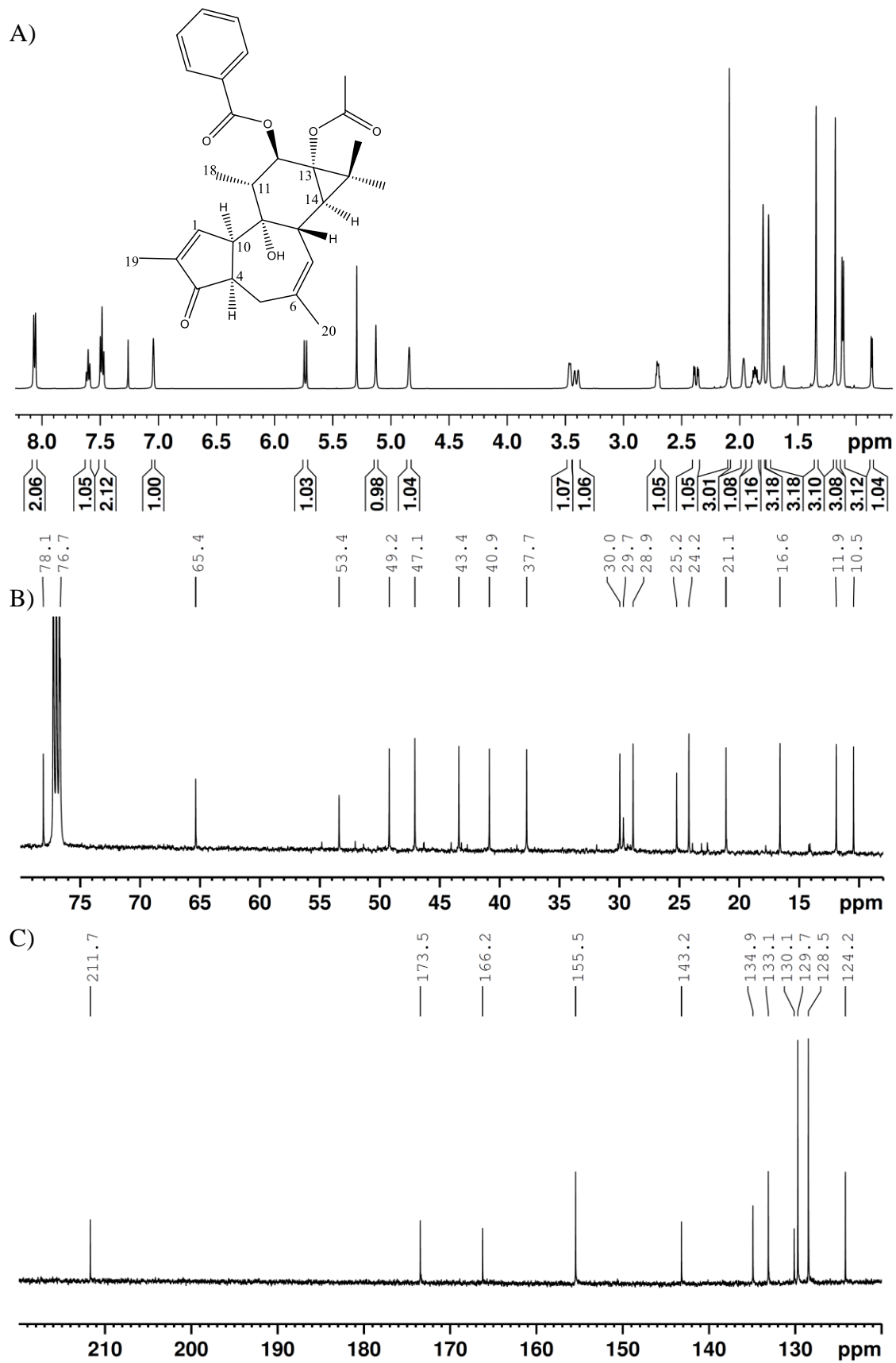
Slika 82. HMBC spektar jedinjenja 39



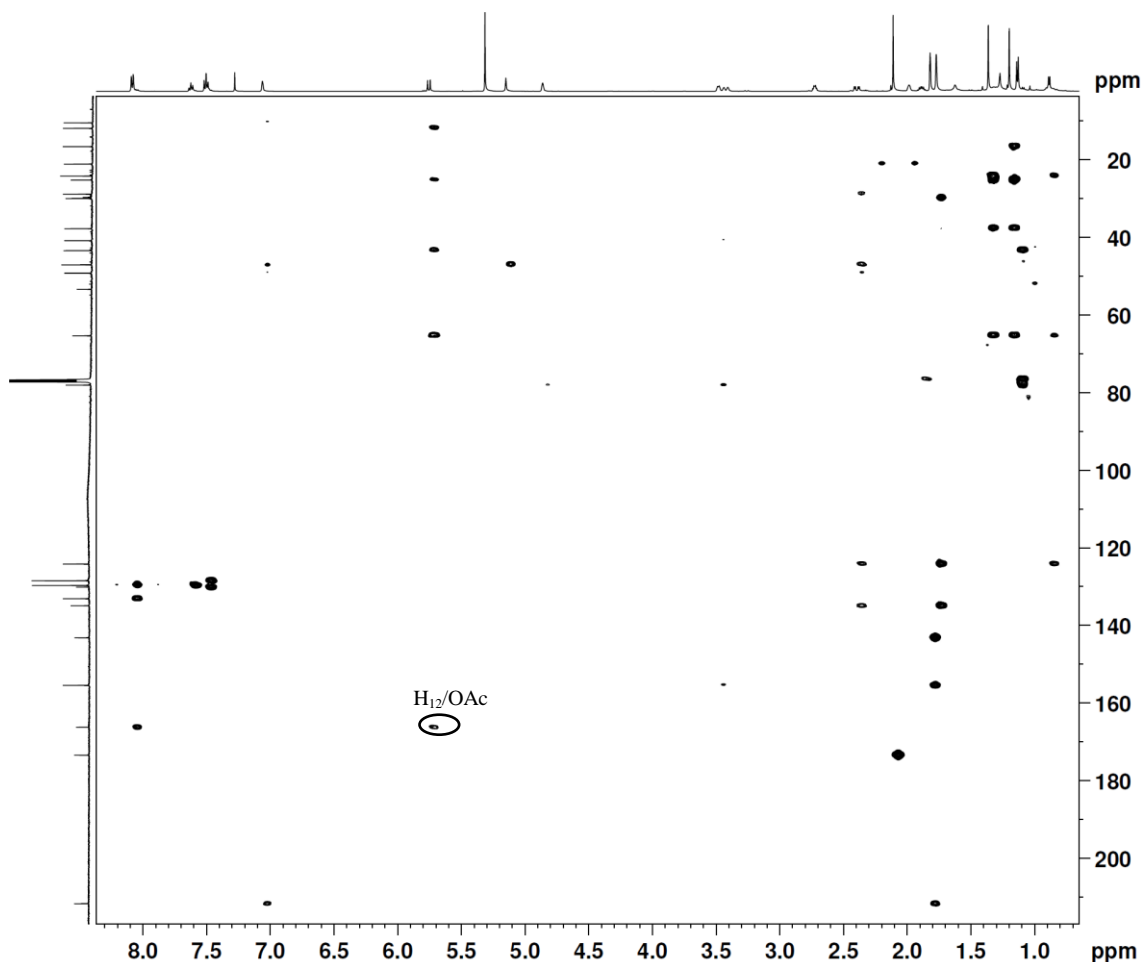
#### 2.4.22. 13 $\alpha$ -Acetiloksi-12 $\beta$ -benzoiloksi-4-*epi*-4,20-dideoksiforbol (40)

Jedinjenje **40** izolovano je kao amorfna bezbojna supstanca molekulske formule C<sub>29</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub> (u HRESIMS *m/z* jona [M+H]<sup>+</sup> je 479,2424). Na osnovu podataka iz <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektara (**Slika 83**, **Tabela 28**), u izolovanom jedinjenju postoje dve estarske grupe, po jedan acetat i benzoat. Daljom analizom 2D NMR spektara utvrđeno je da izolovan 13 $\alpha$ -acetiloksi-12 $\beta$ -benzoiloksi-4-*epi*-4,20-dideoksiforbol, molekul koji do sada nije opisan u literaturi.

COSY spektar jedinjenja **40** pokazuje da ovo jedinjenje ima iste spinske sisteme koji postoje i kod jedinjenja **39** (**Slika 80**). Povezivanje spinskih sistema i određivanje mesta vezivanja benzoata omogućio je HMBC spektar (**Slika 84**). Sprezanje protona H<sub>12</sub> sa karbonilom sa hemijskim pomeranjem od 166,2 ppm odredilo je mesto vezivanja benzoata, dok je acetat vezan u položaj C<sub>13</sub>.



Slika 83.  $^1\text{H}$  (A) i  $^{13}\text{C}$  NMR (B i C) spektri jedinjenja **40**

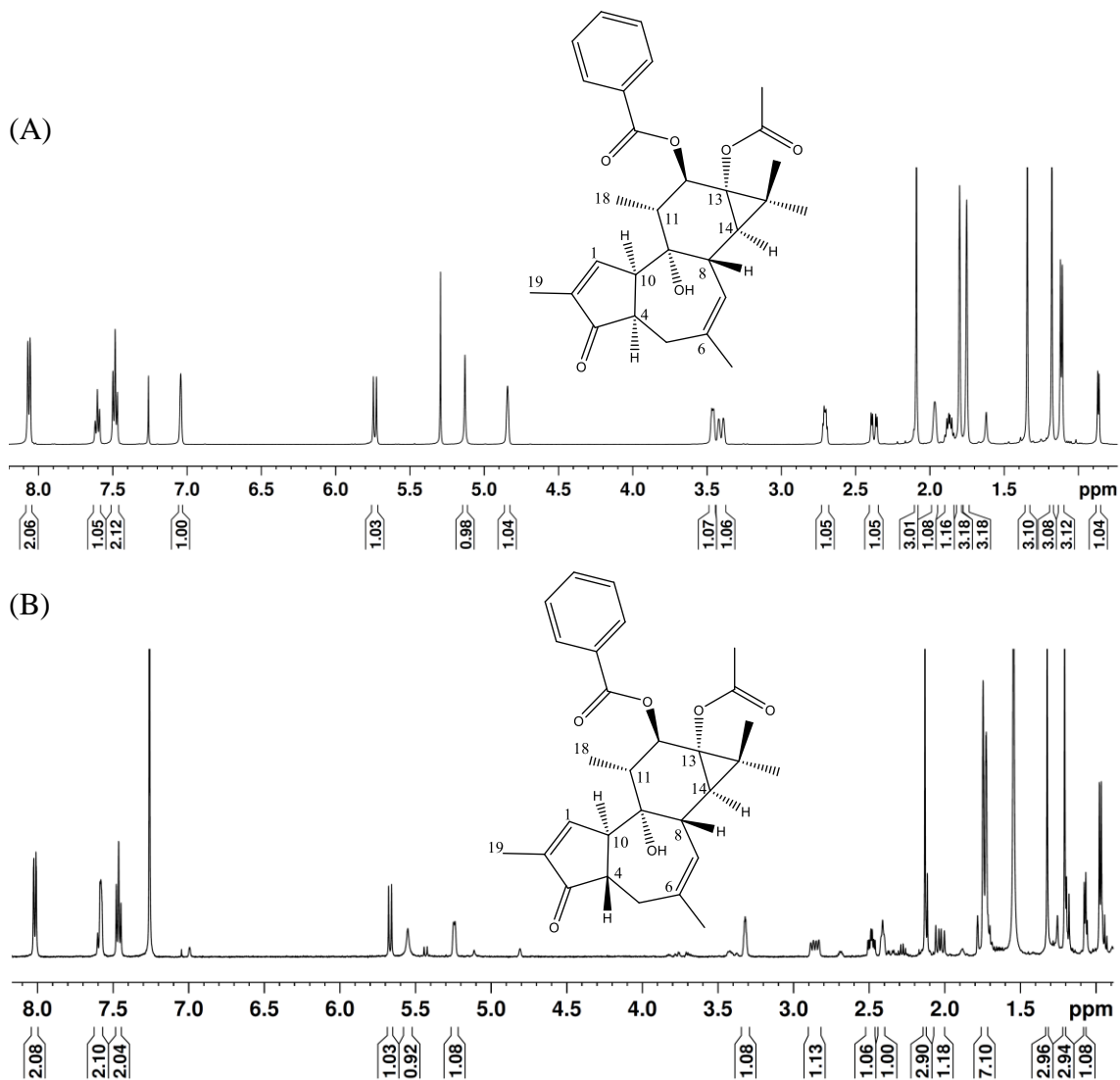


Slika 84. HMBC spektar jedinjenja 40

#### 2.4.23. 13 $\alpha$ -Acetiloksi-12 $\beta$ -benzoiloksi-4,20-dideoksiforbol (41)

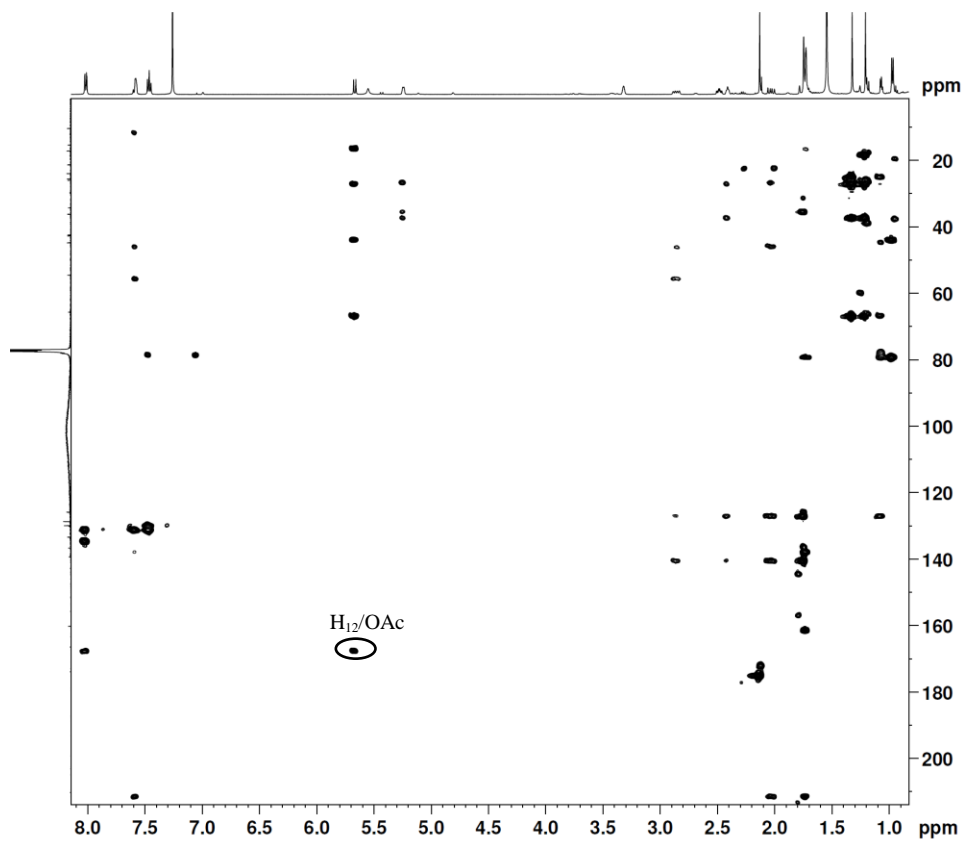
Jedinjenje **41** izolovano je kao amorfna bezbojna supstanca molekulske formule  $C_{29}H_{34}O_6$  (na osnovu jona  $[M+H]^+$  u HRESIMS sa  $m/z$  479,2433). Podaci iz  $^1H$  (Slika 85A) i  $^{13}C$  NMR spektara (Tabela 28) pokazuju da u izolovanom jedinjenju postoje dve estarske grupe: acetat vezan za  $C_{13}$  i benzoat vezan za  $C_{12}$ . Iz korena *E. niceaensis* već je izolovano jedinjenje iste molekulske formule kao i jedinjenje **41** koje ima acetat vezan za  $C_{13}$  i benzoat u položaj  $C_{12}$ . Da su acetat i benzoat u jedinjenju **41** vezani u istim položajima kao kod jedinjenja **40** potvrđuje postojanje korelacije između protona  $H_{12}$  i karbonila sa hemijskim pomeranjem 166,5 ppm u HMBC spektru ovog jedinjenja

(Slika 86). Međutim, poređenjem  $^1\text{H}$  NMR spektara ova dva jedinjenja (Slika 85) uočavaju se značajne razlike u hemijskim pomeranjima protona, pre svega protona  $\text{H}_1$ .

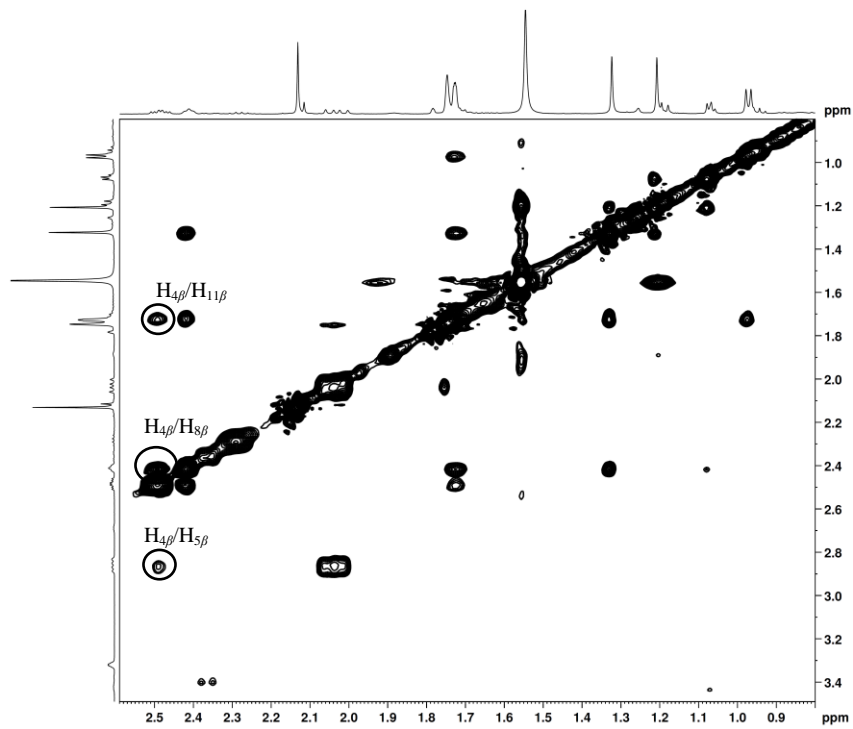


Slika 85. Uporedni prikaz  $^1\text{H}$  NMR spektara jedinjenja **40** (A) i **41** (B)

Analizom NOESY spektra (Slika 87) utvrđeno je da proton  $\text{H}_4$  u jedinjenju **41** zauzima  $\beta$ -orijentaciju (postoje korelacije protona  $\text{H}_{4\beta}$  (2,49 ppm) sa protonima  $\text{H}_{5\beta}$  (2,86 ppm),  $\text{H}_{8\beta}$  (2,41 ppm) i  $\text{H}_{11\beta}$  (1,72 ppm)) i da su prstenovi A i B u ovom jedinjenju povezani *trans*. Jedinjenje **41** (13 $\alpha$ -acetiloksi-12 $\beta$ -benzoiloksi-4,20-dideksiforbol) do sada nije opisano u literaturi.



Slika 86. HMBC spektar jedinjenja 41



Slika 87. Deo NOESY spektar jedinjenja 41

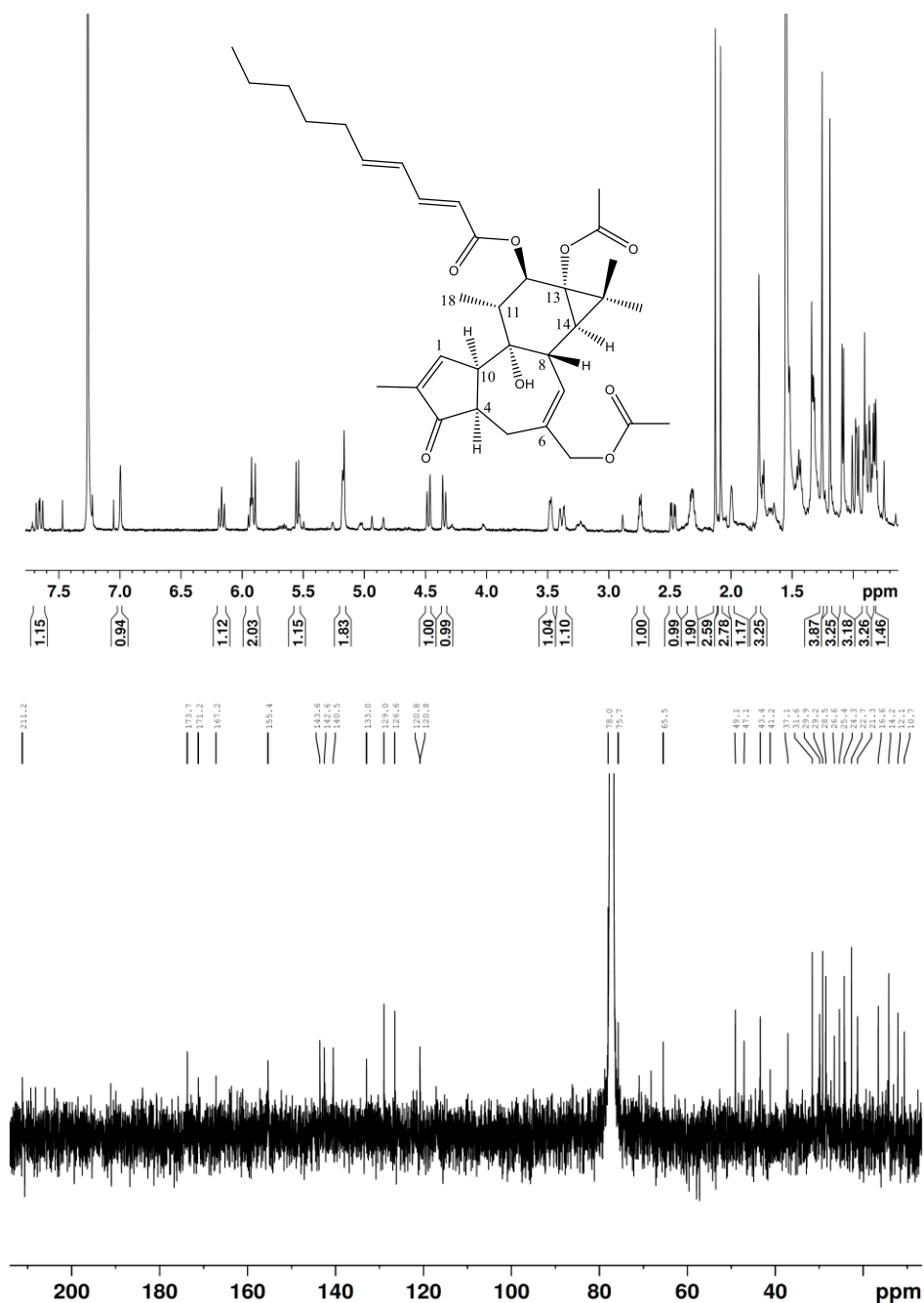
**Tabela 28.**  $^1\text{H}$  (500 MHz) i  $^{13}\text{C}$  (125MHz) podaci za jedinjenja **39–41** ( $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz))

Položaj	<b>39</b>		<b>40</b>		<b>41</b>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	6,99 brs	155,7	7,04 brs	155,5	7,58 brs	160,2
2	-	143,3	-	143,2	-	136,7
3	-	211,9	-	211,7	-	210,2
4	2,68 m	49,4	2,71 m	49,2	2,49 m	44,8
5 $\alpha$	3,39 m	30,1	3,41 d (16)	30,0	2,86 dd (18; 10)	34,3
5 $\beta$	2,35 dd (15; 5)		2,38 dd (16; 5)		2,03 dd (18; 10)	
6	-	134,9	-	134,9	-	139,3
7	4,81 brs	124,4	4,84 brs	124,2	5,24 d (5)	125,9
8	1,88 brs	41,0	1,97 brs	40,9	2,41 m	42,5
9-OH	5,13 s	78,1	5,13 s	78,1	5,55 s	78,2*
10	3,43 m	47,2	3,46 m	47,1	3,32 m	54,6
11	1,68 m	43,4	1,87 m	43,3	1,72 m**	42,8
12	5,43 d (10,5)	76,3	5,74 d (10)	76,7	5,67 d (10)	78,1*
13	-	65,2	-	65,4	-	65,7
14	0,77 d (5)	37,8	0,87 d (5)	37,7	1,07 d (5)	36,2
15	-	25,6	-	25,2	-	25,6
16	1,17 s	24,4	1,18 s	24,2	1,32 s	17,2
17	1,19 s	16,5	1,34 s	16,6	1,20 s	24,0
18	1,06 d (7)	12,1	1,12 d (6)	11,9	0,97 d (7)	15,4
19	1,78 s	10,6	1,80 s	10,5	1,73 brs	10,4
20	1,74 s	29,0	1,75 s	29,7	1,75 brs	26,0
OR-12						
C=O	-	170,8	-	166,2	-	166,5
1	2,11 s	21,2	-	130,1	-	130,2
2			8,06 d (7)	129,7	8,02 d (8)	128,7
3			7,48 t (7)	128,5	7,46 t (8)	129,9
4			7,60 t (7)	133,1	7,60 m	133,4
OR-13						
C=O	-	175,5	-	173,5	-	173,9
1	2,18 m	43,6	2,09 s	21,1	2,13 s	21,4
2	2,10 m	25,3				
3	0,96 d (7)	22,5				
4	0,94 d (7)	22,6				

\*– nesigurna asignacija, \*\*– hemijsko pomeranje očitano iz COSY i HSQC spektra

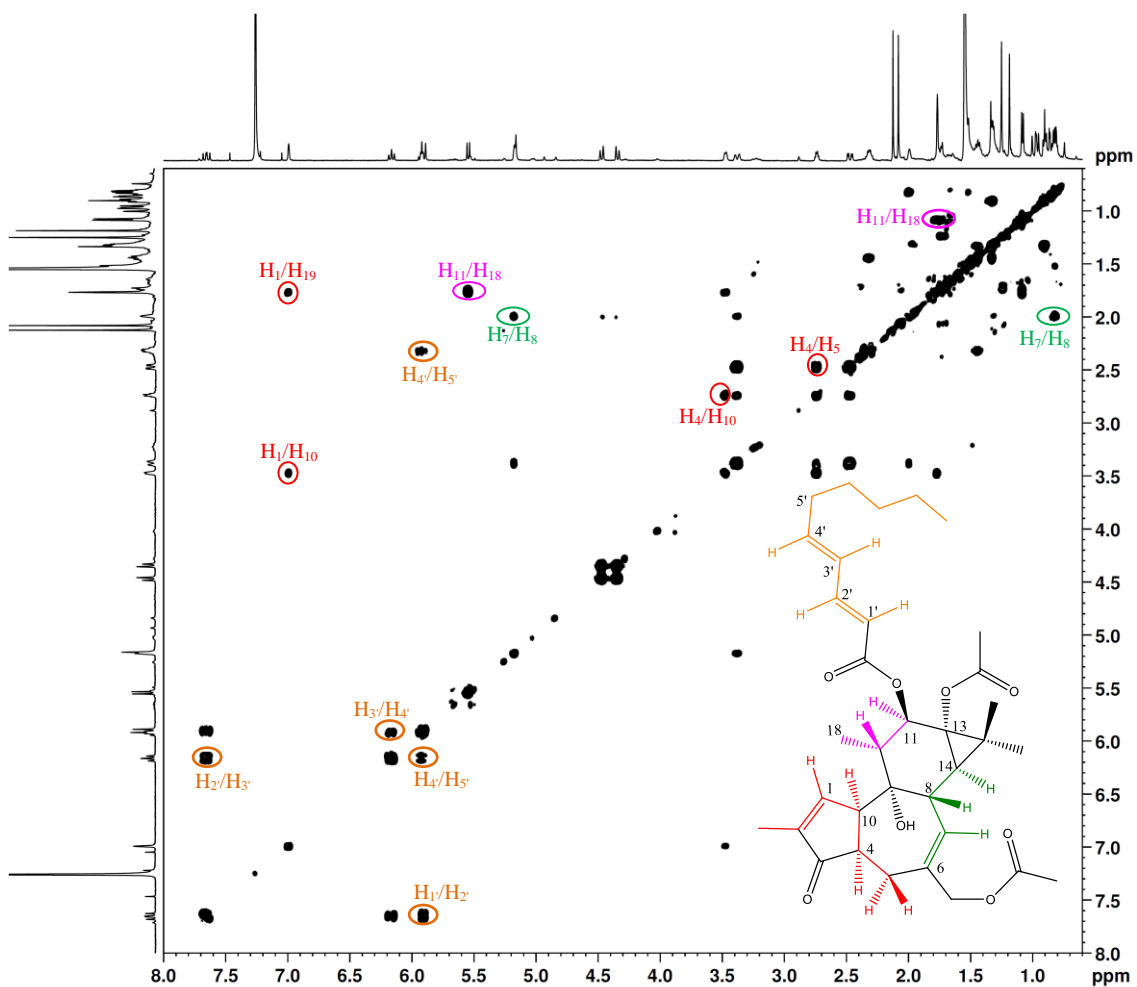
**2.4.24. 13 $\alpha$ ,20-Diacetiloksi-12 $\beta$ -(2'*E*,4'*E*-dekadienoiloksi)-4-*epi*-4-deoksiforbol (42)**

Jedinjenje **42** izolovano je kao amorfna bezbojna supstanca molekulske formule C<sub>34</sub>H<sub>46</sub>O<sub>8</sub> (na osnovu jona [M+H]<sup>+</sup> koji u HRESIMS ima *m/z* 567,3265).



**Slika 88.** <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektri jedinjenja **42**

Analizom  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektara (Slika 88, Tabela 29) utvrđeno je da u izolovanom jedinjenju postoje tri estarske grupe: dva acetata i jedan nezasićen alkanoil ostatak. Daljom analizom 2D NMR spektara utvrđeno je da izolovani molekul 4-*epi*-12,13,20-triestar forbola. U COSY spektru jedinjenja 42 (Slika 89) uočavaju se tri spinska sistema tigljanskog jezgra (identična spinskim sistemima prethodno izolovanih tigljana) i jedan dodatni spinski sistem estarske grupe vezane u položaj  $\text{C}_{12}$ .

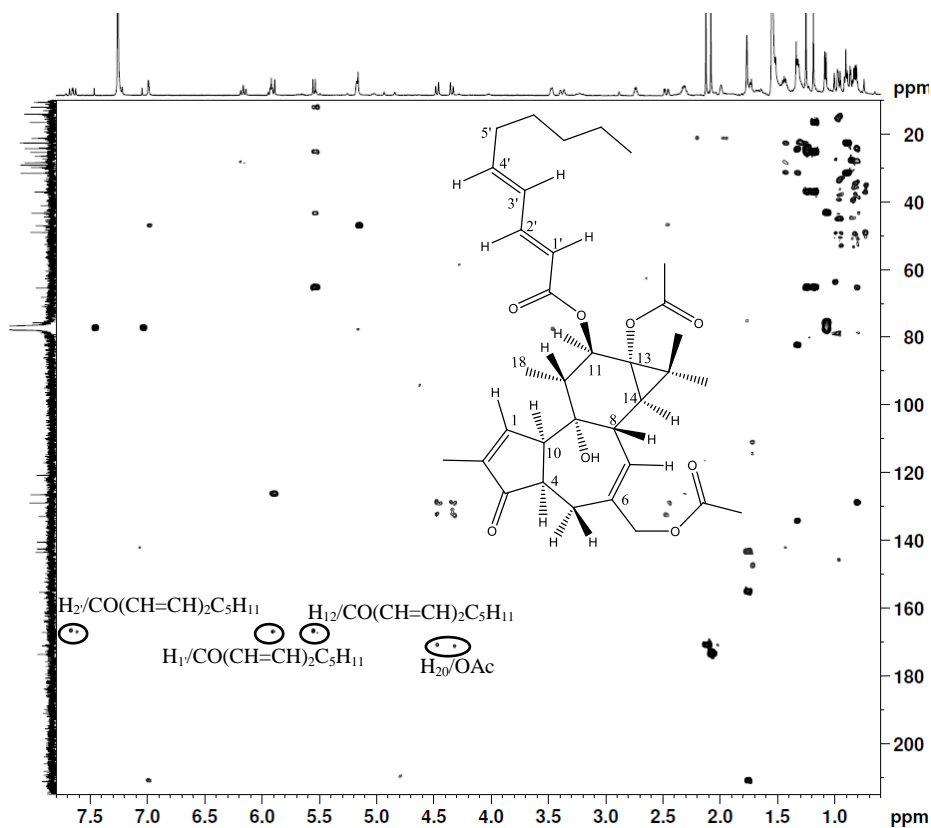


Slika 89. COSY spektar jedinjenja 42

Na osnovu HMBC korelacija (Slika 90) protona  $\text{H}_{12}$  sa karbonilom na 167,2 ppm i korelacija ovog karbonila sa protonima sa dvostruke veze (5,91 i 7,66 ppm) utvrđeno je da je u položaju  $\text{C}_{12}$  vezan ostatak 2*E*,4*E*-dekadienske kiseline. Zahvaljujući postojanju HMBC korelacija protona  $\text{H}_{20}$  sa karbonilom na 173,7 ppm i korelacija ovog karbonila sa protonima metil grupe na 2,09 ppm utvrđeno je mesto vezivanja jednog



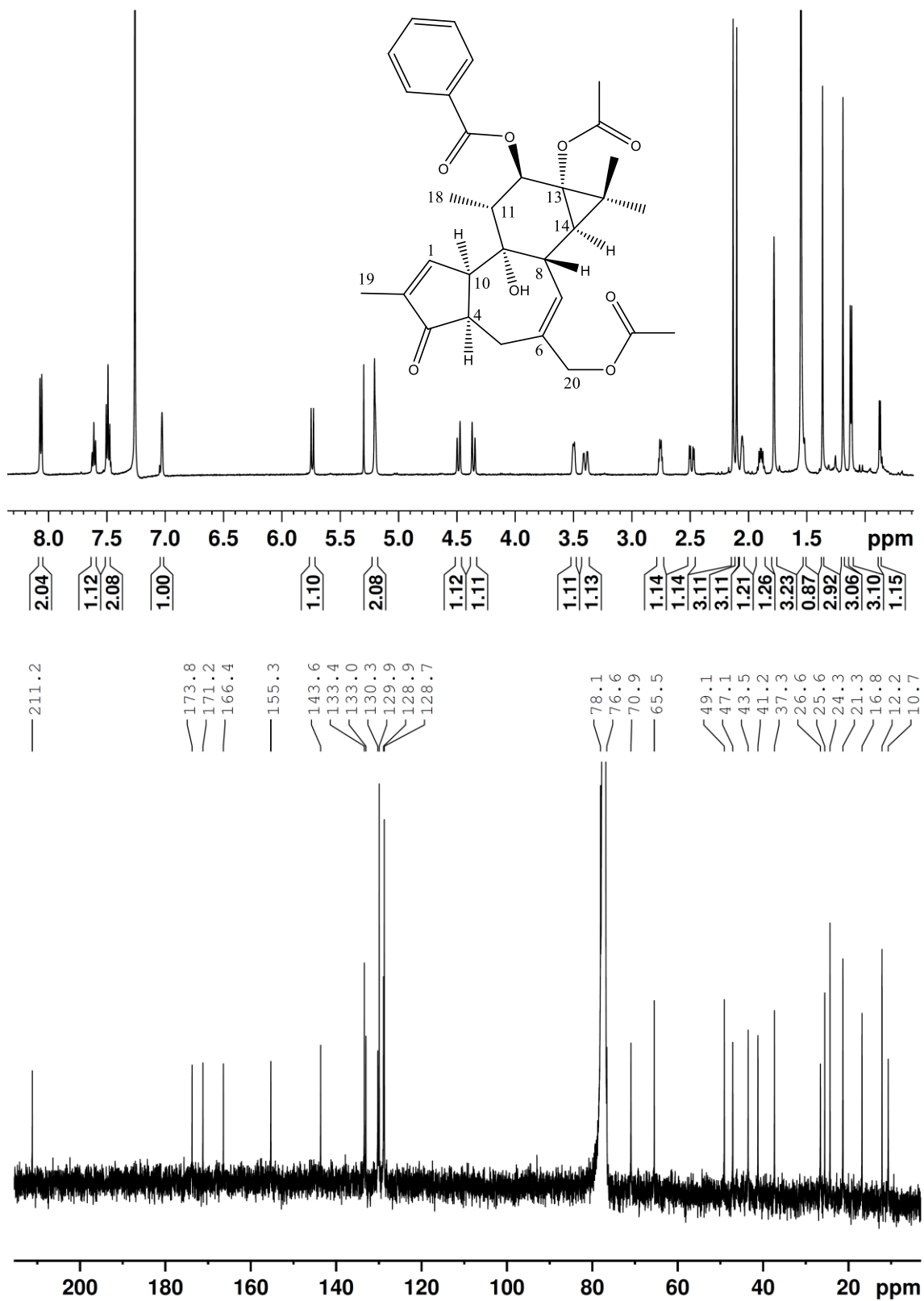
acetata (C<sub>20</sub>). Preostali acetat vezan je u položaj C<sub>13</sub>. Izolovani molekul je 13 $\alpha$ ,20-*O*-diacetoksi-12 $\beta$ -(2'*E*,4'*E*-dekadienoiloksi)-4-*epi*-4-deoksiforbol, molekul koji do sada nije opisan u literaturi.



Slika 90. HMBC spektar jedinjenja 42

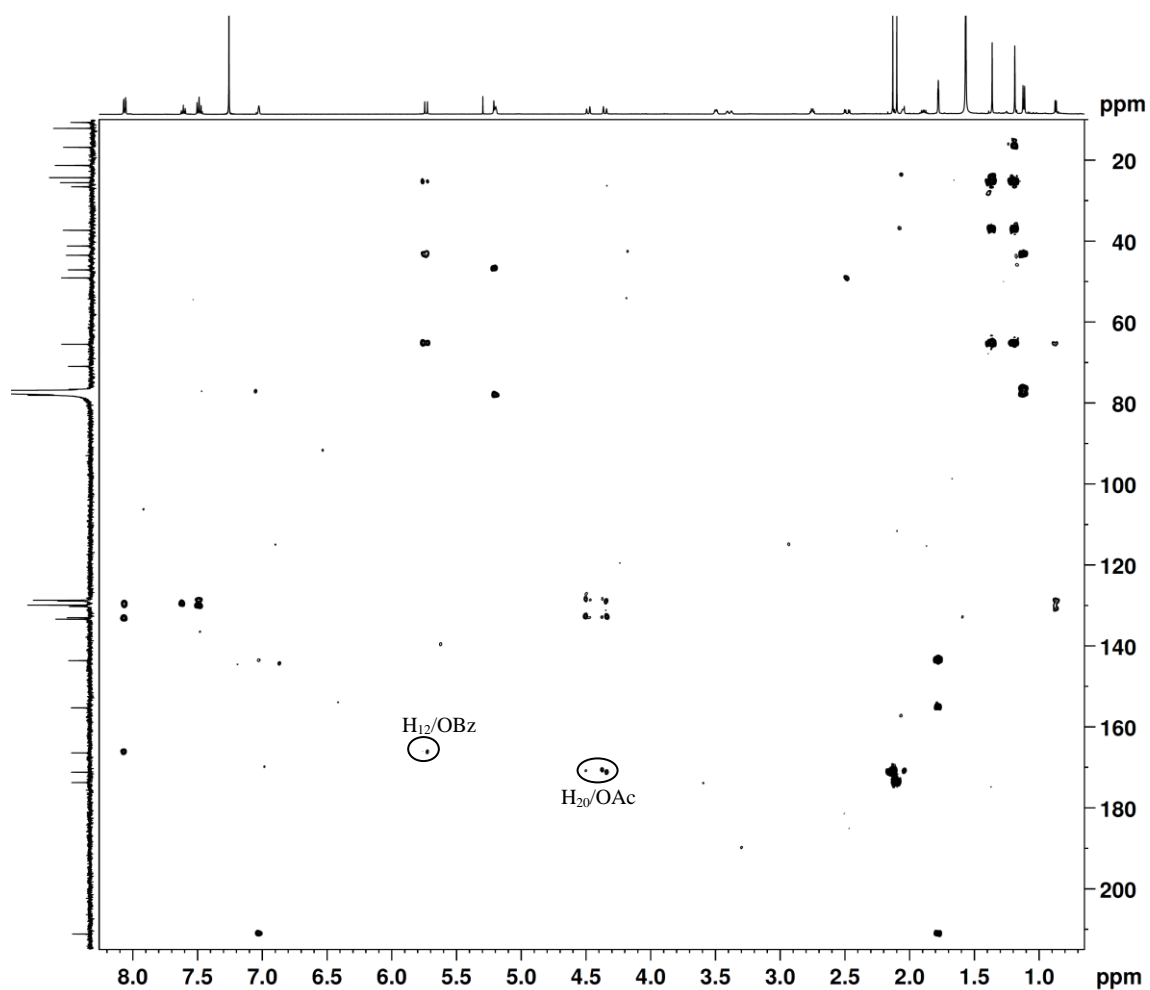
#### 2.4.25. 13 $\alpha$ ,20-Diacetiloksi-12 $\beta$ -benzoiloksi-4-*epi*-4-deoksiforbol (43)

Jedinjenje **43** izolovano je kao amorfna bezbojna supstanca molekulske formule C<sub>31</sub>H<sub>36</sub>O<sub>8</sub> (za jon [M+Na]<sup>+</sup> u HRESIMS izmereni *m/z* je 559,2297). Na osnovu podataka iz <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektara (Slika 91, Tabela 29), izolovano jedinjenje u svojoj strukturi ima tri estarske grupe, jedan benzoat i dva acetata.



Slika 91. <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektri jedinjenja 43

Analizom HMBC spektra (**Slika 92**) utvrđena su mesta vezivanja estarskih grupa. Sprezanje protona H<sub>12</sub> sa karbonilom na 166,2 ppm dokazuje da je u ovom položaju vezan benzoat, dok je korelacija između protona H<sub>20</sub> i karbonila na 171,0 ppm odredila položaj vezivanja jednog acetata (C<sub>20</sub>). Preostali acetat vezan je za C<sub>13</sub> (jedini preostali oksigenovan ugljenik). Na ovaj način određeno je da je izolovani molekul 13 $\alpha$ ,20-diacetiloksi-12 $\beta$ -benzoiloksi-4-*epi*-4-deoksiforbol koji do sada nije opisan u literaturi.



**Slika 92.** HMBC spektar jedinjenja 43

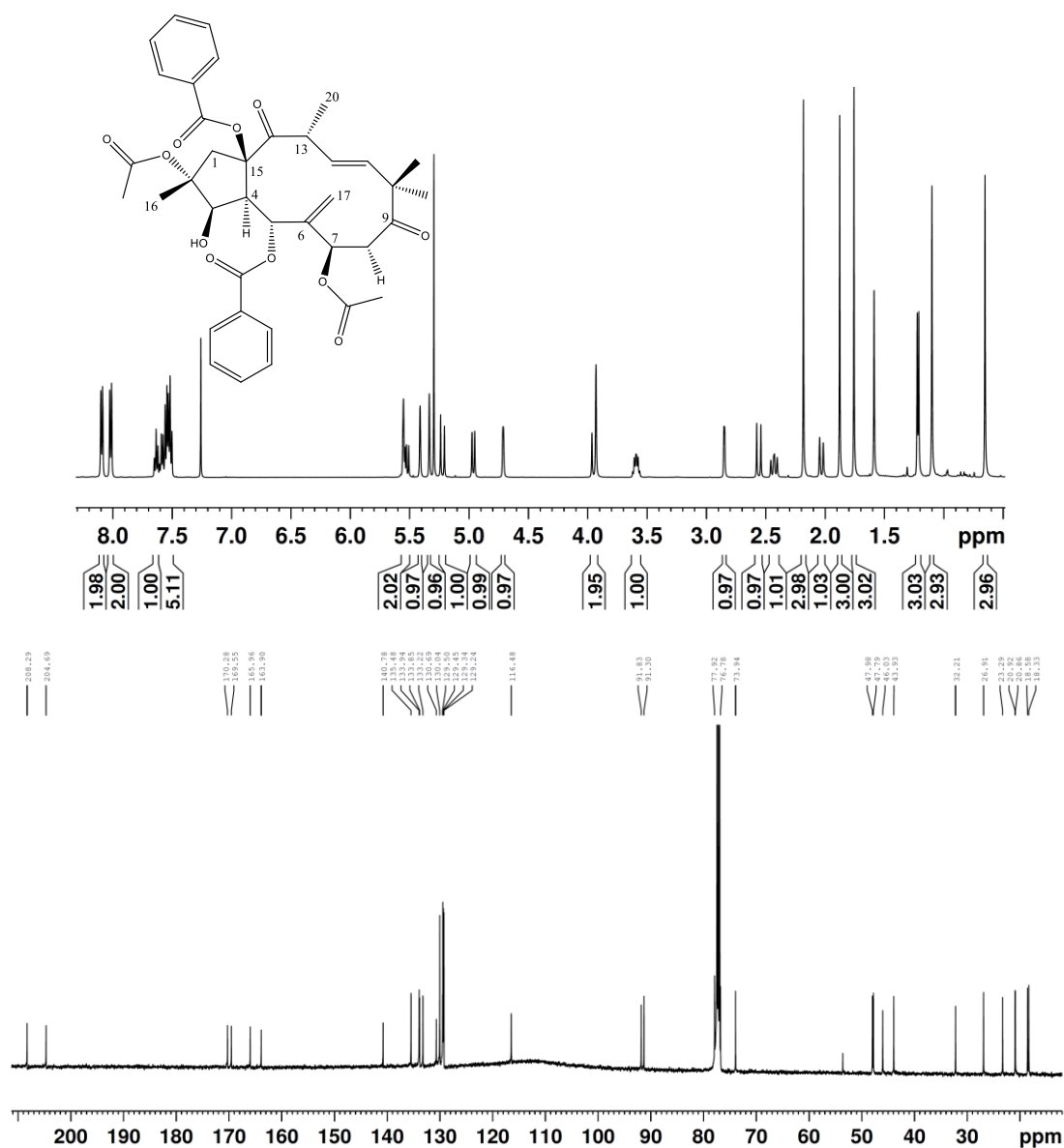
**Tabela 29.**  $^1\text{H}$  (500 MHz) i  $^{13}\text{C}$  (125MHz) podaci za jedinjenja **42** i **43** ( $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz))

Položaj	<b>42</b>		<b>43</b>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	7,00 brs	155,4	7,03 brs	155,3
2	-	143,6	-	143,6
3	-	211,2	-	211,2
4	2,75 m	49,1	2,75 m	49,1
5 $\alpha$	3,38 brd (16)	26,6	3,40 d (16)	26,6
5 $\beta$	2,47 dd (16;5)		2,48 dd (16;5)	
6	-	133,0	-	133,0
7	5,18 brs	129,0	5,20 brs	128,7
8	1,99 brs	41,2	2,05 brs	41,2
9-OH	5,17 brs	78,0	5,21 s	78,1
10	3,47 m	47,1	3,49 m	47,1
11	1,75 m	43,4	1,89 m	43,5
12	5,55 d (10)	75,7	5,74 d (11)	76,6
13	-	65,5	-	65,5
14	0,82 d (5)	37,1	0,87 d (5)	37,3
15	-	25,4	-	25,6
16	1,25 s	16,6	1,37 s	16,8
17	1,19 s	24,3	1,19 s	24,3
18	1,08 d (6)	12,1	1,12 d (6)	12,1
19	1,77 s	10,7	1,78 s	10,7
20	4,41 ABq (12)	70,4*	4,42 ABq (13)	70,9
12-OR1				
C=O	-	167,2	-	166,2
1	5,91 d (15)	120,8	-	130,3
2	7,66 dd (15;11)	140,5	8,07 d (7,5)	129,9
3	6,17 t (11)	126,6	7,49 t (7,5)	128,9
4	5,92 m	142,6	7,61 t (7,5)	133,4
5	2,32 m	28,5		
6	1,44 m	29,2		
7	1,33 m	31,6		
8	1,32 m	22,7		
9	0,91 t (7)	14,2		
13-OR2				
C=O	-	171,0	-	173,5
1	2,13 s	21,3	2,10 s	21,3
20-OR3				
C=O	-	173,7	-	171,0
1	2,09 s	21,3	2,13	21,3

\*– hemijsko poreranje očitano iz HSQC spektra

**2.4.26. 2 $\alpha$ ,7 $\beta$ -Diacetiloksi-5 $\alpha$ ,15 $\beta$ -dibenzoiloksi-3 $\beta$ -hidroksijatropa-6(17),11*E*-dien-9,14-dion (44)**

Jedinjenje **44** izolovano je kao amorfna bezbojna supstanca molekulske formule C<sub>38</sub>H<sub>42</sub>O<sub>11</sub> (u HRESIMS za jon [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* je 697,2612). Analizom <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektara (**Slika 93**, **Tabela 30**) utvrđeno je da u izolovanom jedinjenju postoje četiri

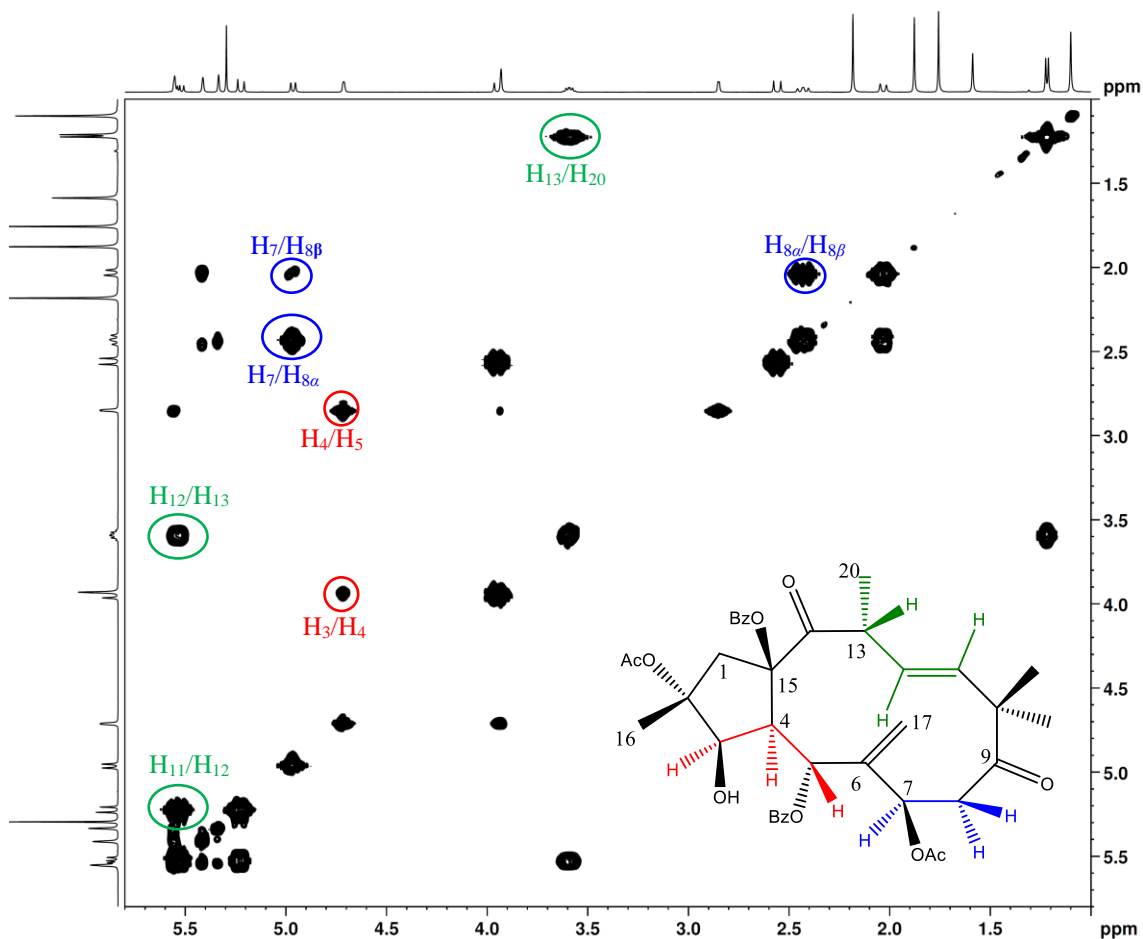


**Slika 93.** <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektri jedinjenja **44**

estarske grupe, po dva benzoata i acetata. Na osnovu  $^{13}\text{C}$  NMR, u izolovanom molekulu postoje dve keto grupe i dve ugljenik-ugljenik dvostruke veze, obe disupstituisane, s tim da je jedna *trans*, a druga geminalno supstituisana. Na osnovu ovih i podataka iz 2D NMR spektara, izolovani molekul pripada grupi jatrofanskih diterpena i po strukturi je  $2\alpha,7\beta$ -diacetoksi- $5\alpha,15\beta$ -dibenzoiloksi- $3\beta$ -hidroksijatrofa-6(17),11*E*-dien-9,14-dion.

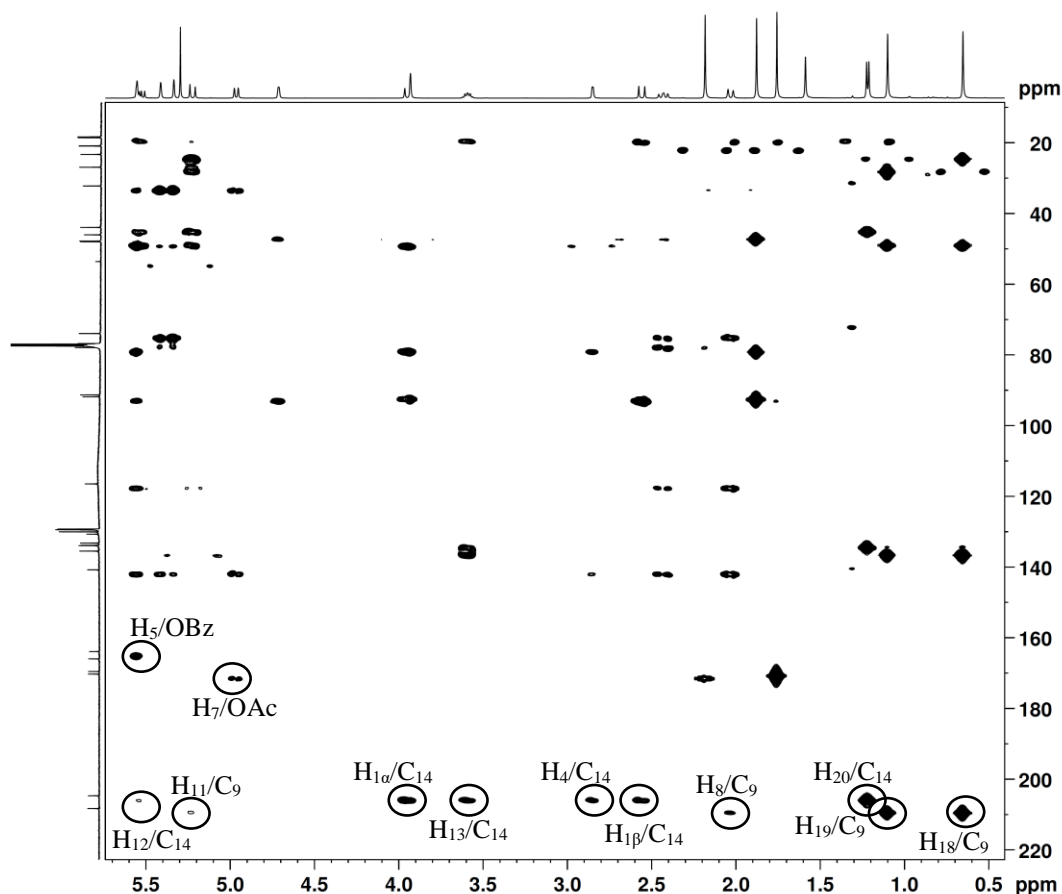
Ovaj molekul do sada nije opisan u literaturi.

U COSY spektru (Slika 94) ovog jedinjenja uočavaju se tri spinska sistema jatrofanskog jezgra. Spinski sistem A čine protoni  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_4$  i  $\text{H}_5$  (korelacije  $\text{H}_3/\text{H}_4$  i  $\text{H}_4/\text{H}_5$ ), spinski sistem B protoni  $\text{H}_7$  i  $\text{H}_8$  (korelacije  $\text{H}_7/\text{H}_8$ ) i spinski sistem C protoni  $\text{H}_{11}$ ,  $\text{H}_{12}$ ,  $\text{H}_{13}$  i  $\text{H}_{20}$  (korelacije  $\text{H}_{11}/\text{H}_{12}$ ,  $\text{H}_{12}/\text{H}_{13}$  i  $\text{H}_{13}/\text{H}_{20}$ ).



Slika 94. COSY spektar jedinjenja 44

Na osnovu HMBC spektra određen je položaja keto grupa i dva estra. Ugljenik keto grupe čije je hemijsko pomeranje 208,3 ppm spreže se sa protonima H<sub>8</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>18</sub> i H<sub>19</sub>, što ukazuje da se on nalazi u položaju C<sub>9</sub>. Ugljenik druge keto grupe (204,7 ppm) spreže se sa protonima H<sub>1</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>12</sub>, H<sub>13</sub> i H<sub>20</sub>, što ukazuje da se ovaj ugljenik nalazi u položaju C<sub>14</sub> (**Slika 95**).

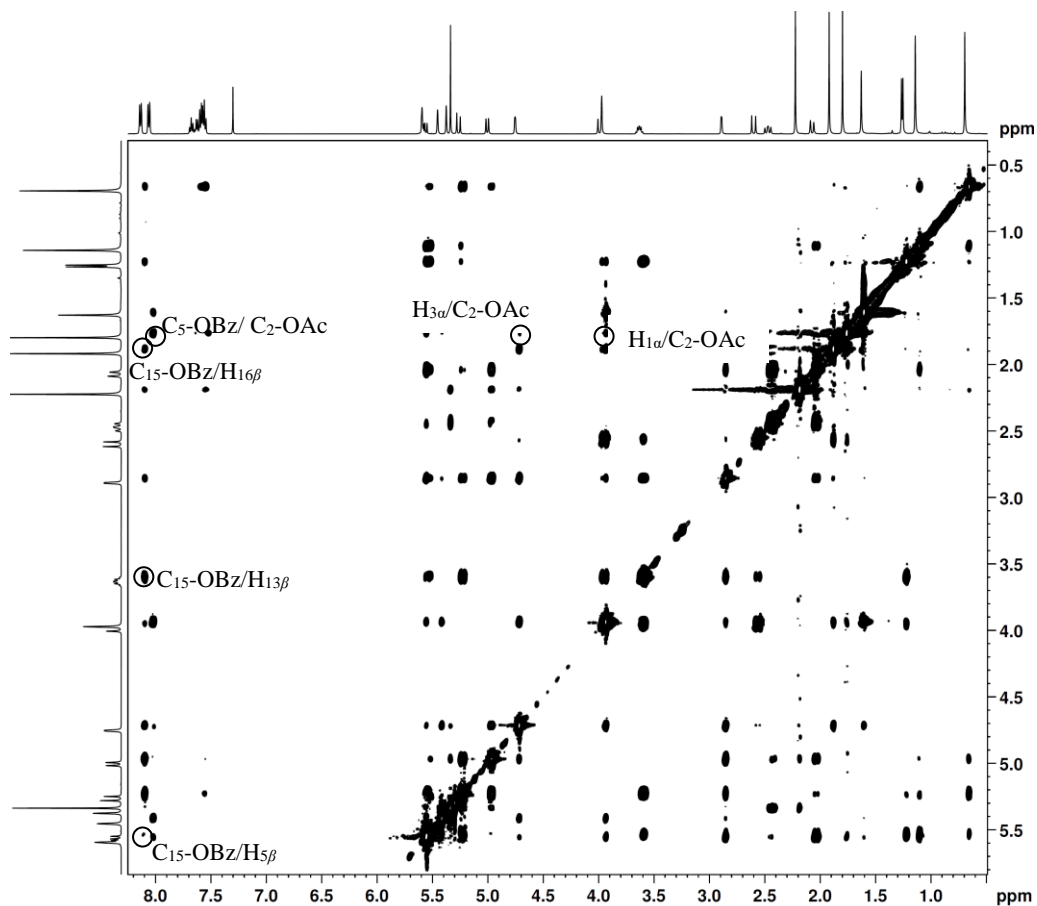


**Slika 95.** HMBC spektar jedinjenja 44

Sprezanje protona H<sub>5</sub> sa karbonilom na 163,9 ppm ukazuje da je jedan benzoat vezan u položaju C<sub>5</sub>, dok sprezanje protona H<sub>7</sub> sa karbonilom na 170,3 ppm ukazuje da je jedan acetat vezan u položaju C<sub>7</sub>.

Položaji preostalih estara određeni su pomoću NOESY spektra i sprezanja protona ovih grupa sa protonima iz jatrofanskog jezgra (**Slika 96**). Proton drugog benzoata (8,10 ppm) spreže se sa protonima H<sub>5β</sub>, H<sub>13β</sub> i H<sub>16β</sub>, kao i sa protonima acetata u položaju C<sub>7</sub>. Da bi benzoat ostvarivao sve navedene korelacije mora biti vezan u

položaju C<sub>15</sub>. Protoni metil grupe (1,75 ppm) drugog acetata sprežu se sa protonima H<sub>1α</sub>, H<sub>3α</sub> i protonom iz benzoata vezanog u položaju C<sub>5</sub>, što ukazuje da je ovaj acetat vezan u položaju C<sub>2</sub>.



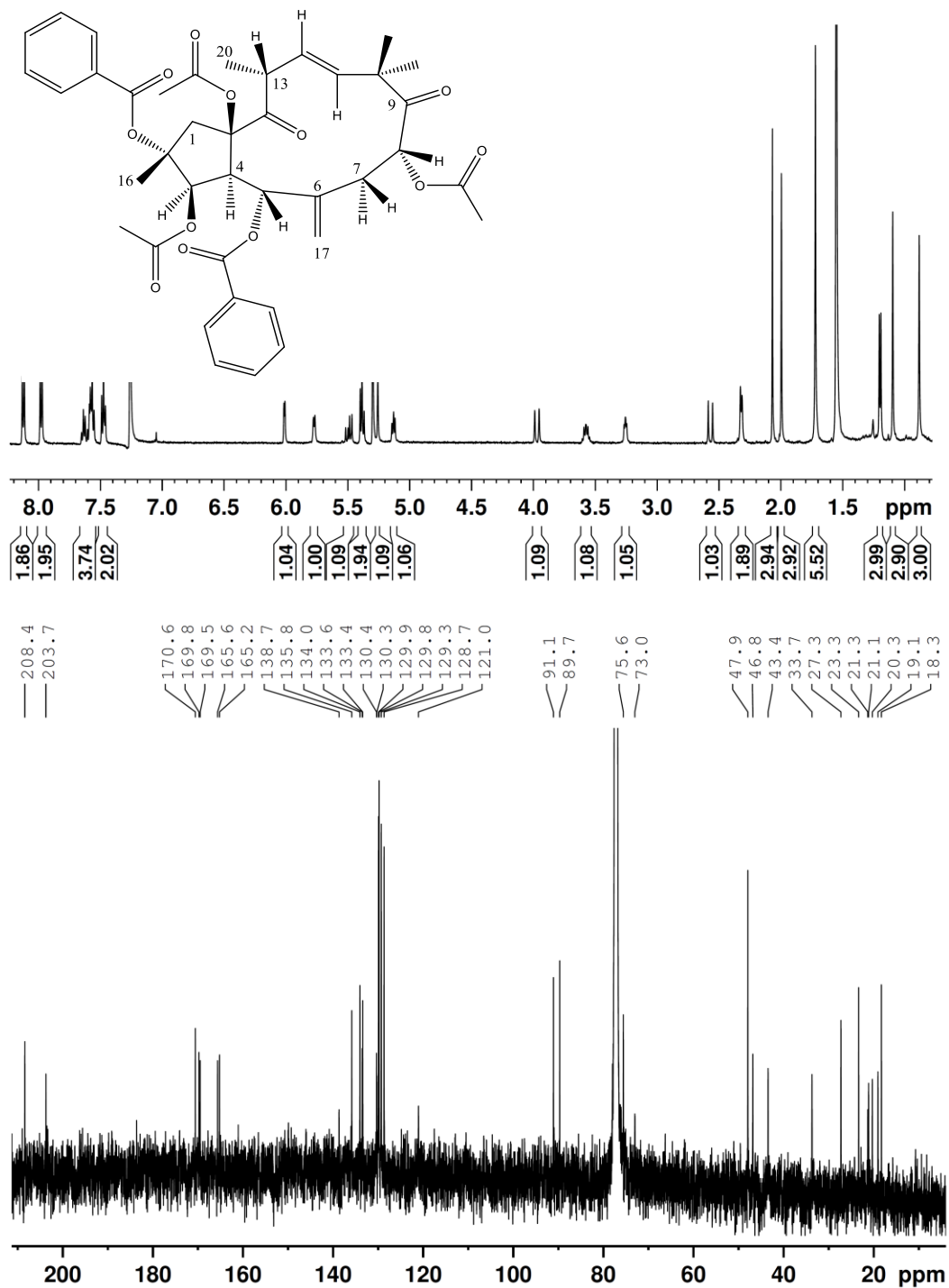
Slika 96. Deo NOESY spektra jedinjenja 44

#### 2.4.27. 3β,8α,15β-Triacetiloksi-2α,5α-dibenzoiloksijatrofa-6(17),11E-dien-9,14-dion (45)

Jedinjenje **45** izolovano je kao amorfna bezbojna supstanca molekulske formule C<sub>40</sub>H<sub>44</sub>O<sub>12</sub> (u HRESIMS jon [M+H]<sup>+</sup> ima *m/z* 717,2904). Analizom <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR spektara (Slika 97, Tabela 30) utvrđeno je da u izolovanom jedinjenju postoji pet estarskih grupa: dva benzoata i tri acetata. Prema podacima iz <sup>13</sup>C NMR utvrđeno je da izolovani molekul sadrži dve keto grupe, dve ugljenik-ugljenik dvostruke veze i pet

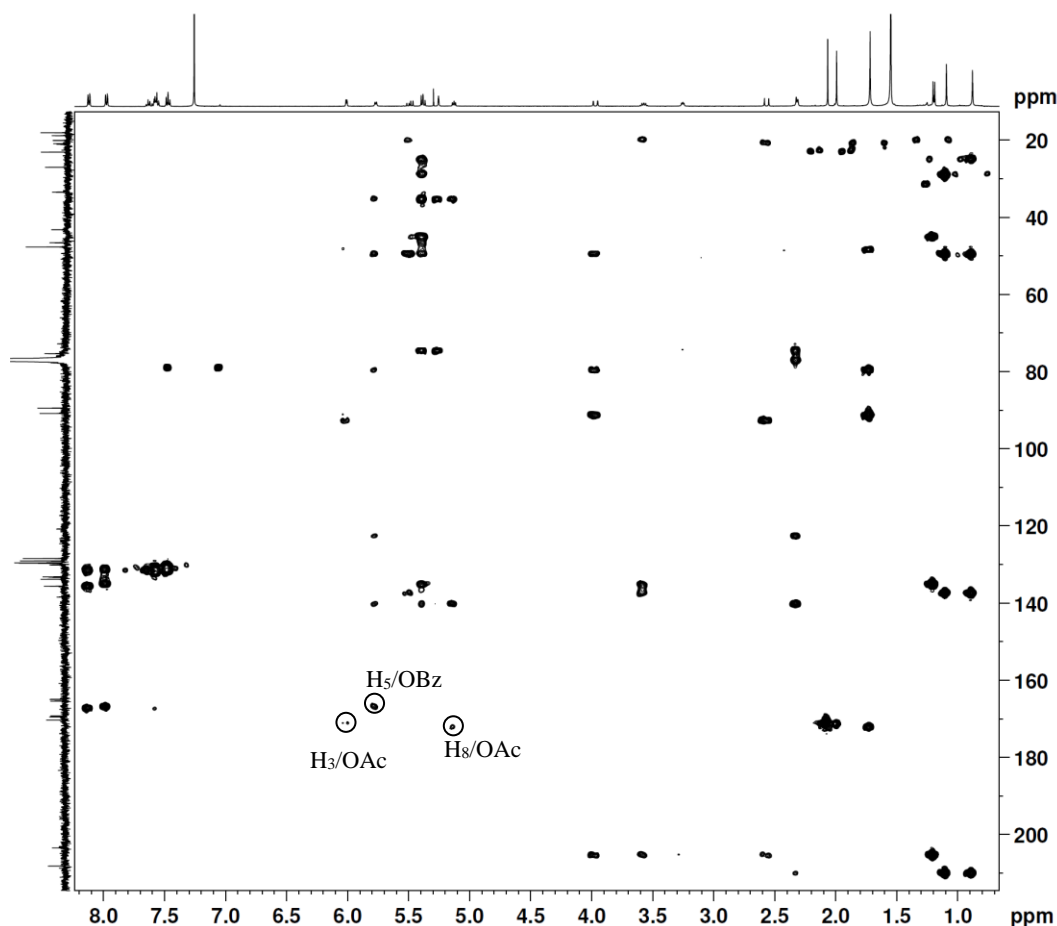


estarskih karbonila. Na osnovu ovih podataka i daljom analizom 2D NMR spektara utvrđeno je da je izolovani molekul  $3\beta,8\alpha,15\beta$ -triacetoksi- $2\alpha,5\alpha$ -dibenzoiloksijatrofa-6(17),11*E*-dien-9,14-dion. Ovaj molekul do sada nije opisan u literaturi.



Slika 97.  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri jedinjenja 45

Položaj estarskih grupa u ovom molekulu određen je na osnovu sprežanja koje ostvaruju protoni H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub> i H<sub>9</sub> sa odgovarajućim karbonilima (**Slika 98**).

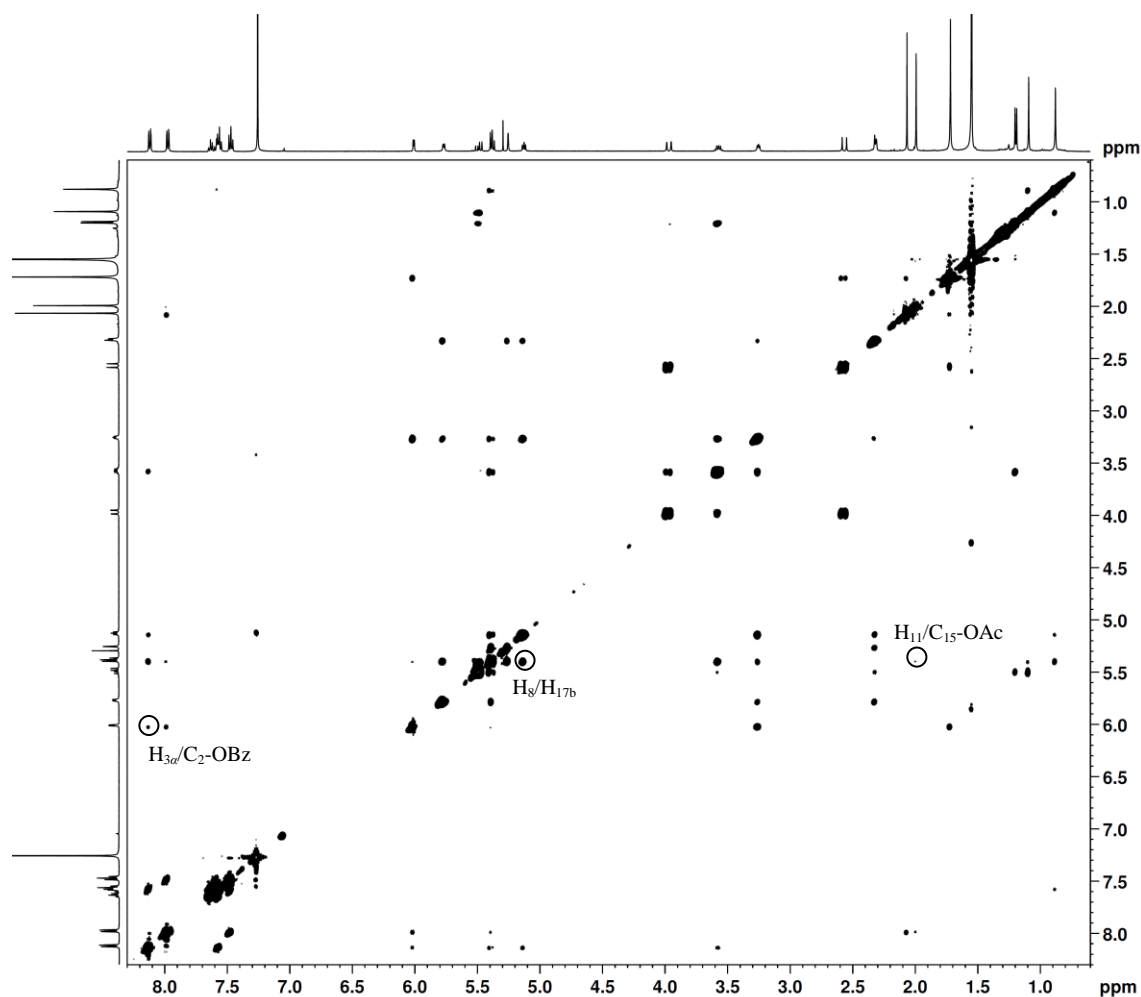


**Slika 98.** HMBC spektar jedinjenja **45**

Stereohemija i konformacija molekula određene su na osnovu NOE korelacija. Velika vrednost konstante kuplovanja  ${}^3J_{4,5}$  (9–11 Hz) i NOE korelacije između protona H<sub>5</sub> i H<sub>17a</sub> i H<sub>8</sub> i H<sub>17b</sub> upućuju na *endo*-konformaciju jatrofanskog jezgra, dok mala vrednost ove konstante (0–3 Hz) i NOE korelacije između H<sub>4</sub> i H<sub>7</sub> i H<sub>5</sub> i H<sub>8</sub> upućuju na *egzo*-konformaciju jatrofanskog jezgra.<sup>95</sup> Vrednost konstante kuplovanja  ${}^3J_{4,5}$  u ovom molekulu je 6 Hz i nije u opsegu predviđenih vrednosti za *endo*-, odnosno *egzo*-konformaciju. Međutim, u NOESY spektru (**Slika 99**) uočava se korelacija H<sub>8</sub>/H<sub>17b</sub> na osnovu koje je zaključeno da jedinjenje **45** ima jatrofanski skelet sa *endo*-

konformacijom sa egzometilenskom 6(17) dvostrukom vezom normalnom na glavnu ravan molekula.

Da je benzoat u položaju C<sub>2</sub> određeno je na osnovu NOE korelacije njegovog protona (8,12 ppm) sa protonom H<sub>3a</sub>, a da je acetat u položaju C<sub>15</sub> određeno je postojanjem NOE korelacije između protona ovog acetata sa protonom H<sub>11</sub>.



Slika 99. NOESY spektar jedinjenja 45

**Tabela 30.**  $^1\text{H}$  (500 MHz) i  $^{13}\text{C}$  (125MHz) podaci za jedinjenja **44** i **45** ( $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz))

Položaj	<b>44</b>		<b>45</b>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1 $\alpha$	3,95 d (17)	46,0	3,97 d (17,7)	46,8
1 $\beta$	2,56 d (17)		2,57 d (17,7)	
2	-	91,3	-	89,7
3	4,71 brs	77,9	6,01 d (4)	77,5**
4	2,85 d (3)	47,58	3,26 t (6)	47,9
5	5,55 brs	73,9	5,77 d (6)	73,0
6	-	140,8	-	138,7
7	4,97 d (11)	76,8	2,32 d (7)	33,7
8 $\alpha$	2,43 dd (15; 11)		-	
8 $\beta$	2,02 d (15)	32,2	5,13 t (7)	75,6
9	-	208,3	-	208,4
10	-	48,0	-	47,9***
11	5,22 d (16)	135,5	5,38 d (16)	135,8
12	5,54 dd (16; 10)	133,2	5,49 dd (16; 10)	133,4***
13	3,60 dq (10; 7)	43,9	3,58 m	43,4
14	-	204,7	-	91,1
15	-	91,8	-	203,7
16	1,88 s	18,6	1,72 s	19,1
17a	5,33 brs		5,26 brs	
17b	5,41 brs	116,5	5,38 brs	121,0
18	0,65 s	26,9	0,88 s	27,3
19	1,10 s	23,3	1,10 s	23,3
20	1,22 d (7)	18,3	1,20 d (7)	18,3
2-OR <sub>1</sub>				
C=O	-	169,5	-	165,2
1	1,75 s	20,9	-	130,2*
2			8,12 d (7,4)	129,9
3			7,56 m	129,3
4			7,62 m	134,0
3-OR <sub>2</sub>				
C=O			-	169,5
1			2,07 s	21,3
5-OR <sub>3</sub>				
C=O	-	163,9	-	165,5
1	-	129,4*	-	130,4*
2	8,02 d (7)	129,5	7,98 d (7,4)	129,8
3	7,52 m	129,2*	7,45 m	128,7
4	7,62 m	129,3*	7,57 m	133,6
7-OR <sub>4</sub>				
C=O	-	170,3		
1	2,18 s	20,8		
8-OR <sub>5</sub>				
C=O			-	170,6
1			1,72 s	20,3
15-OR <sub>6</sub>				
C=O	-	166,0	-	169,8
1	-	130,0*	1,99 s	21,1
2	8,10 d (7)	130,7		
3	7,56 m	133,8*		
4	7,62 m	133,9*		

\*– nesigurna asignacija, \*\*/\*\*– očitano iz HSQC/HMBC spektra

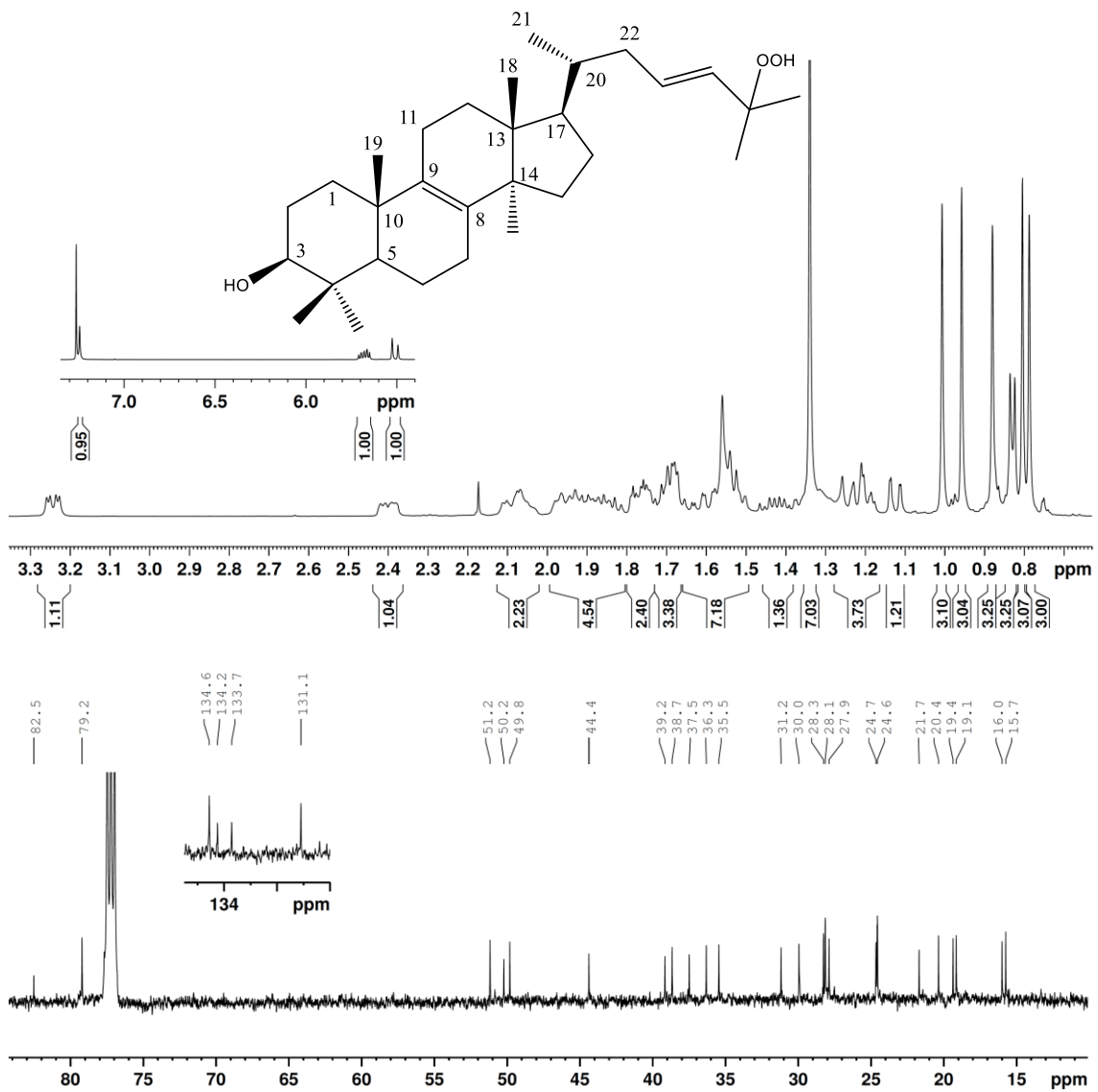
## 2.4.28. Inoterpen C (46)

Jedinjenje **46** izolovano je kao amorfna bezbojna supstanca molekulske formule  $C_{30}H_{50}O_3$ . Analizom  $^1H$  NMR i  $^{13}C$  NMR spektra (**Slika 100**, **Tabela 31**) utvrđeno je da je izolovani molekul tetraciklični triterpen sa hidroksilnom grupom u položaju  $C_3$  i hidroperoksidnom grupom u položaju  $C_{25}$ . Takođe, u molekulu su prisutne i dve ugljenik-uljenik dvostruke veze i to jedna tetrasupstituisana i jedana *trans* disupstituisana. Poređenjem eksperimentalnih podataka sa podacima iz literature zaključeno je da je izolovano jedinjenje inoterpen C, prvi put izolovan iz *Inonotus obliquus*.<sup>100</sup>

**Tabela 31.**  $^1H$  (500 MHz) i  $^{13}C$  (125MHz) podaci za jedinjenje **46** ( $CDCl_3$ , TMS,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz))

Položaj	$\delta_H$	$\delta_C$	Položaj	$\delta_H$	$\delta_C$
1 $\alpha$	1,77 m	35,5	14	-	50,2
1 $\beta$	1,21 m		15 $\alpha$	1,68 m	31,2
2 $\alpha$	1,61 m	28,2	15 $\beta$	1,78 m	28,1
2 $\beta$	1,68 m		16 $\alpha$	1,33 m	
3	3,24 dd (12; 5)	79,2	16 $\beta$	1,55 m	49,8
4	-	39,2	17	1,53 m	
5	1,12 m	51,2	18	0,80 s	16,0
6 $\alpha$	1,42 m	19,1	19	0,96 s	20,4
6 $\beta$	1,69 m		20	1,55 m	36,3
7 $\alpha$	2,07 m	27,9	21	0,83 d (6)	19,4
7 $\beta$	1,97 m		22*	1,84 m; 2,41 m	38,7
8	-	133,7	23	5,68 dt (16; 7)	131,1
9	-	134,6	24	5,51 d (16)	134,3
10	-	37,5	25	-	82,5
11 $\alpha$	1,59 m	21,7	26	1,34 s	24,6
11 $\beta$	1,37 m		27	1,34 s	24,7
12 $\alpha$	1,21 m	30,0	28	1,00 s	28,3
12 $\beta$	1,53 m		29	0,80 s	15,7
13	-	44,4	30	0,88 s	24,6

\*– diastereotopna metilenska grupa



Slika 100.  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri jedinjenja 46

## 2.5. Hemijski sastav epikutikularnih voskova

U okviru ove doktorske disertacije određen je i sastav epikutikularnih voskova ispitivanih biljnih vrsta. Utvrđeno je da kod sve tri ispitivane vrste epikutikularni voskovi predstavljaju smešu dugolančanih alkana (od C23 do C33) i estara dugolančanih alkohola sa višim karboksilnim kiselinama.<sup>101</sup>

Najzastupljeniji alkan kod sve tri biljne vrste je *n*-nonakozan, dok je najmanje zastupljen *n*-dotriakontan koji kod *E. lucida* nije ni detektovan. Od alkohola su prisutni alkoholi sa parnim brojem ugljenikovih atoma od C18 do C26. Najzastupljeniji alkohol *E. palustris* i *E. lucida* je 1-heksakozanol, dok je kod *E. nicaeensis* najzastupljeniji 1-oktakozanol. Kod *E. palustris* nisu detektovani 1-ikozanol i 1-tetrakozanol, dok kod *E. lucida* nisu detektovani 1-heksadekanol i 1-kozanol. Najmanje zastupljen alkohol kod *E. nicaeensis* je 1-kozanol. Najzastupljenija karboksilna kiselina kod sve tri biljne vrste je heksadekanska (palmitinska) kiselina. Eikozanska (arahidonska) kiselina je najmanje zastupljena karboksilna kiselina kod *E. palustris* i *E. lucida*, dok je najmanje zastupljena kiselina kod *E. nicaeensis* tetrakozanska (lignocerinska) kiselina. Relativni procentni sastav ostalih komponenti epikutikularnih voskova prikazan je u **Tabeli 32**.

**Tabela 32.** Hemijski sastav epikutikularnih voskova *E. palustris*, *E. lucida* i *E. nicaeensis* (%)

<b>Alkani</b>	<i>E. palustris</i>	<i>E. lucida</i>	<i>E. nicaeensis</i>
<b>C23</b>	1,58	2,68	1,81
<b>C24</b>	1,57	1,36	0,61
<b>C25</b>	6,17	8,46	4,22
<b>C26</b>	1,50	1,15	0,90
<b>C27</b>	33,61	31,62	28,79
<b>C28</b>	1,04	1,80	1,32
<b>C29</b>	45,30	38,10	48,56
<b>C30</b>	0,35	0,91	1,25
<b>C31</b>	6,40	8,94	8,62
<b>C32</b>	0,03	-	0,14
<b>C33</b>	0,73	1,30	1,21
<b>Alkoholi</b>			
<b>C18</b>	23,50	-	1,70
<b>C20</b>	-	-	0,08
<b>C22</b>	7,71	0,29	2,00
<b>C24</b>	-	1,74	1,52
<b>C26</b>	31,04	95,38	20,45
<b>C28</b>	11,51	1,85	69,38
<b>Karboksilne kiseline</b>			
<b>C14</b>	5,65	4,07	4,90
<b>C16</b>	47,26	43,55	57,41
<b>C18</b>	13,32	27,32	6,82
<b>C20</b>	1,77	2,55	3,23
<b>C22</b>	2,63	10,82	11,42
<b>C24</b>	6,28	6,65	3,18



## **2.8. Biološke aktivnosti odabranih sekundarnih metabolita i heksanskih ekstrakata lateksa ispitivanih biljnih vrsta**

### **2.8.1. Selektivni efekat jedinjenja 3 i 4 na inhibiciju rasta tumorskih ćelijskih linija**

Antitumorski efekat jedinjenja **3** i **4** ispitivan je na pet humanih tumorskih ćelijskih linija: nesitnoćelijski karcinom pluća – NCI-H460 i NCI-H460/R, kolorektalni karcinom – DLD1 i DLD1-TxR i melanom – 518A2. Ćelijske linije NCI-H460/R i DLD1-TxR predstavljaju rezistentne varijante svojih izvornih (senzitivnih) ćelija. Dobijeni rezultati pokazuju različiti stepen efikasnosti jedinjenja **3** i **4** na tumorskim ćelijskim linijama (**Tabela 33**). Najosetljivije ćelije na dejstvo ovih supstanci su melanomi, zatim nesitnoćelijski karcinom pluća, a najveći stepen otpornosti pokazuju ćelije kolorektalnog karcinoma. Dobijene IC<sub>50</sub> vrednosti su u nanomolarnom opsegu kod ćelijskih linija 518A2, NCI-H460 i NCI-H460/R, dok su vrednosti IC<sub>50</sub> za DLD1 i DLD1-TxR pomerene ka mikromolarnom opsegu. Jedinjenje **3** pokazuje jaču antitumorsku aktivnost na svim ćelijskim linijama, a efekat obe supstance je umanjen u prisustvu rezistentnog fenotipa. Tako, IC<sub>50</sub> vrednosti dobijene kod NCI-H460/R i DLD1-TxR znatno prevazilaze IC<sub>50</sub> vrednosti dobijene kod NCI-H460 i DLD1. Uzimajući u obzir da je glavni mehanizam rezistencije kod NCI-H460/R i DLD1-TxR povišena ekspresija P-glikoproteina (membranska transportna pumpa čija aktivnost obezbeđuje zaštitu tumorskih ćelija od napada različitih ksenobiotika), može se pretpostaviti da jedinjenja **3** i **4** predstavljaju supstrate za ovaj protein.

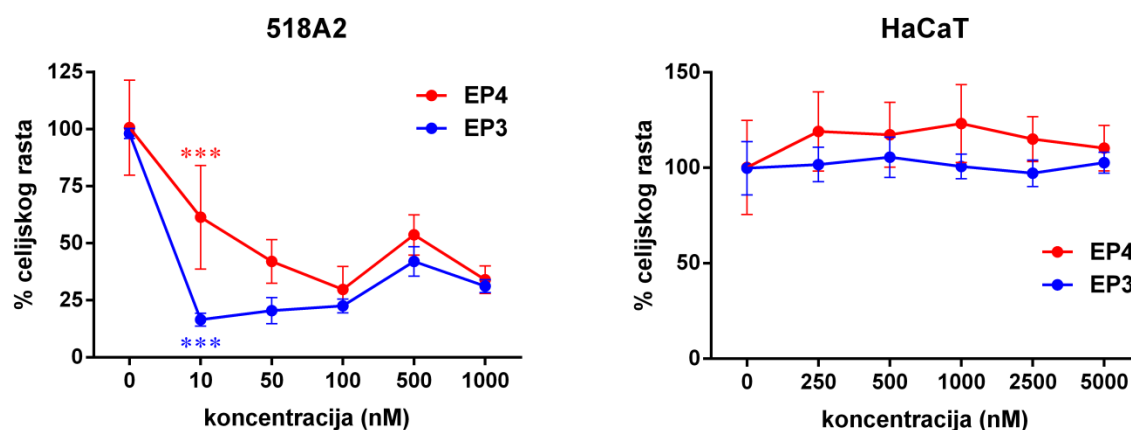
Budući da su prema dejstvu jedinjenja **3** i **4** najosetljiviji melanomi 518A2, ispitan je i uticaj ovih jedinjenja na humane normalne keratinocite HaCaT. Rezultati su dobijeni testom vijabilnosti (MTT) nakon 72 h izlaganja 518A2 i HaCaT ćelija dejstvu različitih koncentracija jedinjenja **3** i **4**. Test vijabilnosti (MTT) je pokazao da HaCaT ćelije nisu osetljive na ispitivana jedinjenja ni pri 5 µM, dok je kod 518A2 ćelija značajno smanjena vijabilnost već pri koncentraciji 10 nM (**Slika 101**).

Da bi se potvrdila selektivnost ka tumorskim ćelijama, tj. ćelijama melanoma, upoređen je efekat jedinjenja **3** i **4** na indukciju ćelijske smrti kod 518A2 i HaCaT

ćelija. Indukcija i tip ćelijske smrti kod 518A2 i HaCaT su analizirani dvojnim bojenjem AV/PI pomoću protočnog citometra nakon 72 h izlaganja dejstvu različitih koncentracija jedinjenja **3** i **4**. Rezultati pokazuju da jedinjenja **3** i **4** dovode do smrti 518A2 ćelija po tipu apoptoze (rana i kasna apoptoza) i ovaj efekat zavisi od koncentracije (**Slika 102**). Prve značajne razlike u odnosu na netretiranu kontrolu se uočavaju već pri koncentraciji 100 nM kod oba ispitivana jedinjenja. HaCaT ćelijska linija daje odgovor na dejstvo jedinjenja **3** i **4** tek pri koncentraciji 50 µM. Ovaj efekat je izraženiji pri tretmanu sa jedinjenjem **3**, za koje je prethodno i utvrđeno da ima jači

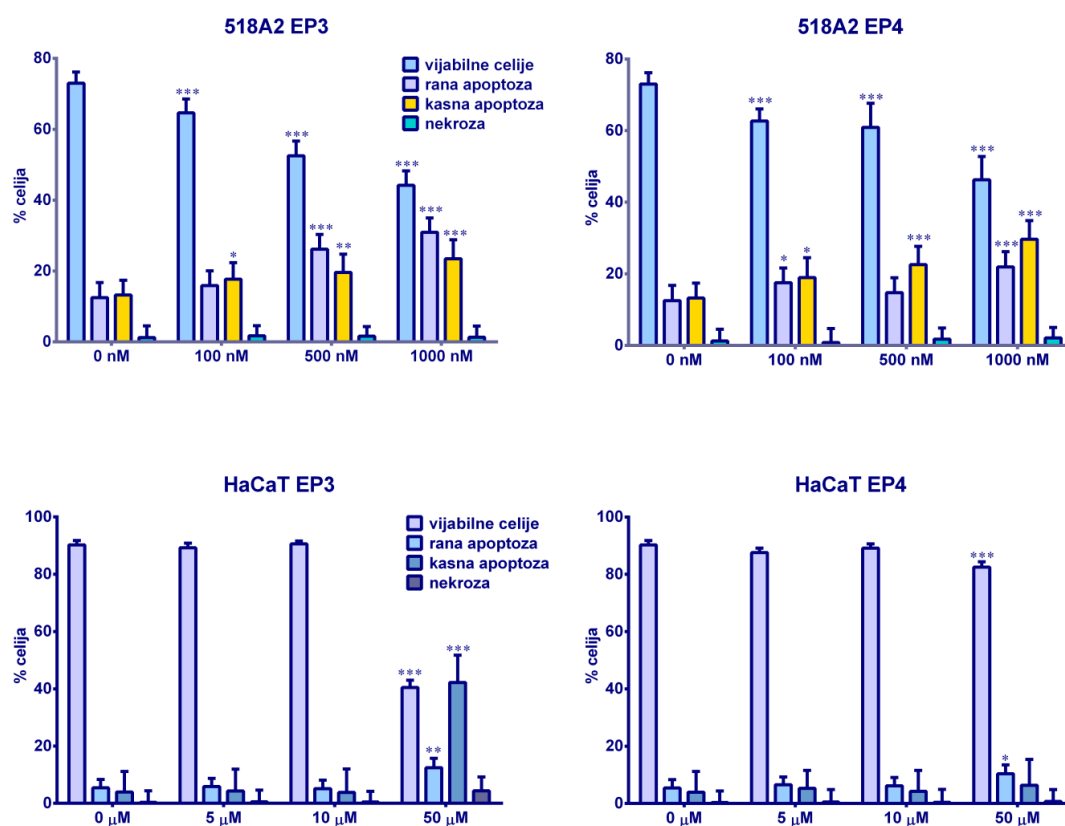
**Tabela 33.** Inhibicija rasta tumorskih ćelija izazvana dejstvom jedinjenja **3** i **4** (IC<sub>50</sub> vrednosti u µM)

Tumorske ćelijske linije	Jedinjenje <b>3</b> (IC <sub>50</sub> )	Jedinjenje <b>4</b> (IC <sub>50</sub> )
NCI-H460	0,021 ± 0,001	0,198 ± 0,010
NCI-H460/R	0,055 ± 0,002	0,401 ± 0,013
DLD1	1,669 ± 0,067	2,300 ± 0,063
DLD1-TxR	4,600 ± 0,275	25,380 ± 6,088
518A2	0,005 ± 0,000	0,045 ± 0,002



**Slika 101.** Selektivno dejstvo jedinjenja **3** i **4** ka humanom melanomu. Prva koncentracija pri kojoj je utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na netretirane ćelije: \*\*\*p < 0,001 (n = 4)

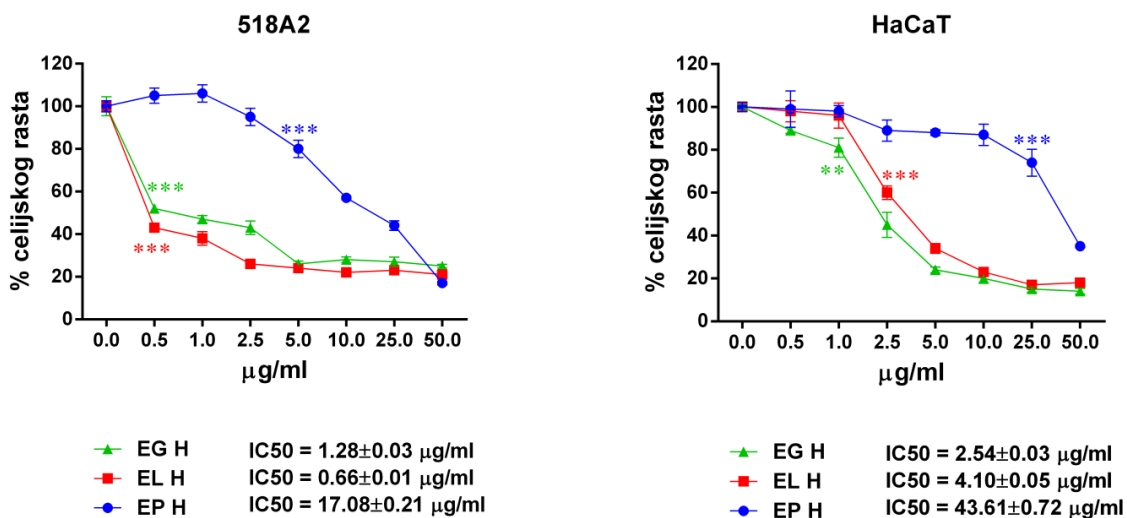
citotoksični efekat. Može se reći da su jedinjenja **3** i **4** selektivna prema ćelijama melanoma (faktor selektivnosti, tj. relativni odnos između 50  $\mu\text{M}$  kod HaCaT i 100 nM kod 518A2 je oko 500), što je veoma značajno, s obzirom da pojedini klinički odobreni citostatici u terapiji različitih tipova tumora imaju faktor selektivnosti neznatno viši od jedinjenja **3**. Prema dobijenim rezultatima, jedinjenja **3** i **4** se mogu smatrati izuzetno potentnim antimelanomnim supstancama i zaslužuju opsežnija mehanistička preklinička ispitivanja.



**Slika 102.** Jedinjenja **3** i **4** indukuju apoptotsku ćelijsku smrt melanoma. Statistička značajnost u odnosu na kontrolne netretirane ćelije je predstavljena: \* $p < 0, 05$ ; \*\*  $p < 0, 01$ ; \*\*\*  $p < 0, 001$  ( $n = 3$ ).

## 2.8.2. Selektivni efekat heksanskih ekstrakata lateksa ispitivanih biljnih vrsta na rast humanog melanoma

U okviru ove doktorske disertacije ispitano je i antitumorsko dejstvo heksanskih ekstrakata lateksa ispitivanih biljnih vrsta. U tu svrhu, upoređen je njihov efekat na ćelije melanoma 518A2 i humanih keratinocita HaCaT pri istovetnom opsegu koncentracija (0,5–50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Rezultati su dobijeni MTT testom nakon 72 h izlaganja 518A2 i HaCaT ćelija dejstvu različitih koncentracija heksanskih ekstrakata. Rezultati su pokazali da su heksanski ekstrakti lateksa biljnih vrsta *E. nicaeensis* i *E. lucida* i više od deset puta efikasniji od heksanskog ekstrakta lateksa *E. palustris*, što je ilustrovano grafički, kao i  $\text{IC}_{50}$  vrednostima (Slika 103). Takođe, utvrđeno je da svi ekstrakti efikasnije deluju na melanome nego na keratinocite, posebno heksanski ekstrakti biljnih vrsta *E. lucida* i *E. palustris*, što ukazuje na njihovu selektivnost ka tumorskim ćelijama.



**Slika 103.** Selektivno dejstvo heksanskih ekstrakata ka humanom melanomu. Prva koncentracija pri kojoj je utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na netretirane ćelije: \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  ( $n = 5$ ).

### 2.8.1. Inhibitorno dejstvo jatrofana na P-gp

U okviru ove doktorske disertacije ispitano je inhibitorno dejstvo jedinjenja **19**, **21–23**, **25**, **29** i **30** na P-gp. Inhibicija P-gp-a ispitana je na MDR ćelijama humanog nesitnoćelijskog karcinoma pluća (NCI-H460/R) i humanog karcinoma debelog creva (DLD-TxR). Šest od sedam jedinjenja je pokazalo jače inhibitorno dejstvo od Dex-Verapamila koji je korišćen kao pozitivna proba (**Tabela 34**).

Najjaču inhibiciju pokazala su jedinjenja **29** i **30**. Samo jedinjenje **19** nije pokazalo značajnu P-gp inhibiciju.

**Tabela 34.** P-gp inhibicija jedinjenja **19**, **21–23**, **25**, **29** i **30** (FAR vrednosti<sup>a</sup>) na dve humane MDR ćelijske linije kancera

Jedinjenje (5 µM)	NCI-H460/R	DLD1-TxR
19	2,19 ± 0,01	1,71 ± 0,02
21	3,23 ± 0,02	4,24 ± 0,03
22	3,67 ± 0,02	3,46 ± 0,03
23	3,75 ± 0,01	3,63 ± 0,03
25	3,80 ± 0,03	3,71 ± 0,03
29	4,52 ± 0,02	5,89 ± 0,04
30	5,02 ± 0,02	4,39 ± 0,03
Dex-Verapamil	2,43 ± 0,02	3,39 ± 0,03

<sup>a</sup> – Odnos florescenske aktivnosti (eng. The fluorescence activity ratio (FAR)) je izračunat prema sledećoj formuli:  $FAR = \frac{MFI_{MDR\ tretiran}}{MFI_{MDR\ kontrola}}$ , gde MFI predstavlja srednji intenzitet fluorescencije.

U prethodnoj studiji koja je obuhvatala ispitivanje dvanaest eufodendrofana,<sup>24</sup> jatrofani sa egzometilenskom 6(17) dvostrukom vezom koji nemaju oksigenovan ugljenik C<sub>2</sub>, značajno jače inhibiraju P-gp u odnosu na ostale ispitivane jatrofane. Takođe je primećeno opadanje aktivnosti promenom benzoatnog estera u položaju C<sub>8</sub> sa nikotinskom, izobutiratom i acetatom kod međusobno identičnih struktura, sem u položaju C<sub>8</sub>. U ovom ispitivanju kao najjači inhibitori P-gp-a pokazala su se jedinjenja **29** i **30**, oba sa deoksigenovanim C<sub>2</sub> i acetatom (**29**), odnosno nikotinskom (**30**) u položaju C<sub>8</sub>.

Takođe, ispitana je i sposobnost izolovanih jedinjenja da sačuvaju (produže) inhibiciju P-gp-a na duži period (72 h, **Tabela 35**). U ovom eksperimentu ćelije NCI-H460/R tretirane su rastvorima jedinjenja **19**, **21–23**, **25**, **29** i **30** koncentracija 5  $\mu$ M i 10  $\mu$ M, kao i rastvorom Dex-Verapamila iste koncentracije. Upoređene su FAR vrednosti koje su dobijene nakon 30 min i 72 h izloženosti. Dobijeni rezultati su pokazali da su sva jedinjenja osim jedinjenja **29** i Dex-Verapamila značajno smanjila svoje aktivnosti. Jedinjenje **29** i Dex-Verapamil u koncentraciji 10  $\mu$ M su i posle 72 h sačuvali svoje inhibitorne aktivnosti na P-gp.

**Tabela 35.** Produžen efekat jatrofana na P-gp inhibiciju (FAR vrednosti) u humanoj ćelijskoj liniji MDR NCI-H460/R

Jedinjenje	5 $\mu$ M, nakon 30 min	10 $\mu$ M, nakon 30 min	5 $\mu$ M, nakon 72 h	10 $\mu$ M, nakon 72 h
19	1,68 $\pm$ 0,02	2,19 $\pm$ 0,01	1,15 $\pm$ 0,01	1,21 $\pm$ 0,01
21	2,48 $\pm$ 0,02	3,23 $\pm$ 0,02	2,03 $\pm$ 0,02	2,33 $\pm$ 0,02
22	2,59 $\pm$ 0,02	5,02 $\pm$ 0,02	1,96 $\pm$ 0,02	3,35 $\pm$ 0,02
23	4,31 $\pm$ 0,03	3,75 $\pm$ 0,01	1,96 $\pm$ 0,02	2,81 $\pm$ 0,02
25	3,79 $\pm$ 0,03	3,80 $\pm$ 0,03	2,14 $\pm$ 0,02	3,08 $\pm$ 0,02
29	6,36 $\pm$ 0,05	4,52 $\pm$ 0,02	2,23 $\pm$ 0,02	3,05 $\pm$ 0,02
30	5,17 $\pm$ 0,04	5,02 $\pm$ 0,02	3,23 $\pm$ 0,02	5,22 $\pm$ 0,03
Dex-Verapamil	6,55 $\pm$ 0,04	2,43 $\pm$ 0,02	4,63 $\pm$ 0,02	3,95 $\pm$ 0,03

## 2.8.2. Kombinovano dejstvo jatrofana sa hemioterapeuticima

Prilikom tretmana MDR ćelijske linije humanog nesitnoćelijskog karcinoma pluća, proučen je i hemosenzitivišući potencijal jedinjenja **29** i **30** u kombinaciji sa doksorubicinom (DOX) i upoređen je njihov efekat sa kombinacijom DOX-Dex-Verapamil (**Tabela 36**). Rezistentne NCI-H460/R ćelije izlagane su 72 h dejstvu rastvora navedenih jedinjenja u koncentracijama 5  $\mu$ M i 10  $\mu$ M. Jedinjenja **29** i **30** izabrana su za ispitivanje zbog toga što jako inhibiraju P-gp, ali i zbog razlika u inhibiciji koju pokazuju posle 72 h (inhibitorno dejstvo jedinjenja **30** se smanjuje, dok se inhibitorno dejstvo jedinjenja **29** u koncentraciji 10  $\mu$ M zadržava i posle 72 h).

Prethodne studije su pokazale da su jatrofani izolovani iz *E. dendroides* umereno do visoko citotoksični prema NCI-H460/R i njihovim roditeljskim NCI-H460 ćelijskim linijama.<sup>24</sup> U ovom istraživanju ispitana je sposobnost jedinjenja **29** i **30** da smanje održivost ćelija karcinoma. Međutim, nijedno od ova dva jedinjenja nije ispoljilo citotoksično dejstvo u opsegu koncentracija 2,5–50 µM. Na osnovu toga može se zaključiti da tretman NCI-H460/R ćelija jedinjenjem **29**, odnosno **30** ne menja njihovu održivost i da je njihov uticaj u potpunosti usmeren na inhibiciju P-gp-a. Prema tome, jedinjenja **29** i **30** ne ometaju citotoksični efekat sekundarno primenjenog leka, u ovom slučaju DOX-a.

**Tabela 36.** Potencijal jedinjenja **29** i **30** na revezibilnu rezistenciju doksorubicina na MDR NCI-H460/R ćelijske linije

Jedinjenje	IC <sub>50</sub> (µM)	Relativna reverzija
DOX	2,49 ± 0,18	
Dex-Ver (5 µM) + DOX	0,14 ± 0,01	17,79
Dex-Ver (10 µM) + DOX	0,11 ± 0,01	22,64
29 (5 µM) + DOX	0,13 ± 0,01	19,15
29 (10 µM) + DOX	0,11 ± 0,01	22,64
30 (5 µM) + DOX	0,07 ± 0,01	35,75
30 (10 µM) + DOX	0,04 ± 0,01	62,25

Mehanizam delovanja jedinjenja **29** i **30** zasniva se na inhibiciji P-gp-a, čime omogućavaju ulazak DOX-a u citosol i njegovu akumulaciju unutar MDR karcinoma. Potencijal jedinjenja **30** je sličan potencijalu Dex-Verapamila, dok jedinjenje **29** značajno jače povećava osetljivost NCI-H460/R ćelija na DOX. Moguć uzrok ove razlike je produženo dejstvo jedinjenja **29** na inhibiciju P-gp-a.

### 2.8.3. Protektivni efekat na DNK humanih limfocita

Za izolovane eufodendrofane, ali i za sam heksanski ekstrakt lateksa *E. nicaeensis*, ispitana je zaštitni uticaj na DNK humanih limfocita u poređenju sa alkilujućim agensom mitomicinom C (negativna kontrola) i amifostinom WR-2721 (pozitivna kontrola) (**Tabela 37**).<sup>102</sup> Prema strukturi jatrofanskog jezgra, razlikuju se

dve grupe ispitivanih eufodendrofana: penta- ili heksaesterifikovani jatrofani sa keto grupom u položaju C<sub>14</sub>, egzometilenskom C<sub>6</sub>(17) dvostrukom vezom, kao i endocikličnom (E) dvostrukom vezom u položaju C<sub>11</sub> (jedinjenja **20**, **24**, **26–28**) i jatrofani koji umesto egzociklične C<sub>6</sub>(17) dvostruke veze imaju endocikličnu dvostruku vezu u položaju C<sub>5</sub>(6).

Na osnovu dobijenih rezultata, svi ispitivani eufodendrofani imaju protektivni efekat na DNK humanih limfocita. Najslabiji protektivni efekat ispoljilo je jedinjenje **28** koje smanjuje zastupljenost mikronukleusa u odnosu na kontrolnu probu za 1,61 (pri koncentraciji 1,0 µg/mL) do 8,42% (za koncentraciju 4,0 µg/mL), dok su najveći protektivni efekat pokazala jedinjenja **20** i **26**. Ova dva jatrofana za najnižu ispitivanu koncentraciju (1 µg/mL) smanjuju broj mikronukleusa u odnosu na kontrolnu probu za 44,86% (jedinjenje **26**), tj. 43,53% (jedinjenje **20**). Sa povećanjem koncentracija raste i zaštitni efekat ovih jedinjenja, ali ne previše. Zaštitni efekat jedinjenja **26** povećava se 3,93% sa promenom koncentracije od 1 µg/mL na 4 µg/mL, dok je ta promena kod jedinjenja **20** 4,83%. Slabiji zaštitni efekat na DNK humanih limfocita ispoljilo je i jedinjenje **27** koje je u ispitivanim koncentracijama smanjivalo broj mikronukleusa za 7,97–16,8%. Zaštitno dejstvo jedinjenja **24** je slabije u odnosu na jedinjenja **20** i **26**, ali daleko veće od amifostina za istu ispitivanu koncentraciju.

Jedinjenje **32** u koncentraciji 1 µg/mL ima slabije zaštitno dejstvo od amifostina, dok jedinjenje **31** ima sličnu protektivnu aktivnost kao amifostin. Od svih jatrofana ove grupe jedinjenje **33** ispoljava najjači zaštitni efekat: za koncentraciju 1 µg/mL smanjenje broja mikronukleusa je 31,05%, a 38,65% za koncentraciju 4 µg/mL.

Zaštitni efekat heksanskog ekstrakta liofilizovanog lateksa *E. nicaeensis* je, za koncentraciju 1 µg/mL, 32,29%, dok kod koncentracije 4 µg/mL smanjenje broja mikronukleusa iznosi 36,12%. Rezultati koji su dobijeni za ekstrakt lateksa u saglasnosti su sa ostalim rezultatima budući da se u ekstraktu lateksa nalaze sva ispitivana, ali i veliki broj drugih jedinjenja od kojih neka imaju veći, a neka manji zaštitni efekat na DNK humanih limfocita.

Na osnovu ovih podataka ne može se doći do informacije o zavisnosti strukture i aktivnosti molekula i za ovaj zaključak potrebno je uraditi dodatna istraživanja.



**Tabela 37.** Učestalost MN\*, raspodela MN po ćelijama, CBPI\* i učestalost MN merenih u ćelijskim kulturama humanih limfocita tretiranih različitim koncentracijama odabranih jatrofana i heksanskog ekstrakta *E. nicaeensis*

Jedinjenje	Koncentracija (mg/mL)	MN/1000 BN ćelija	% BN* ćelija sa MN	MN/BN ćelije	CBPI*	Učestalost MN (%)
Kontrola		27,62±0,55	2,29±0,08	1,21±0,03	1,62±0,04	100
Amifostin	1,0	22,64±0,78	1,89±0,10	1,23±0,06	1,65±0,01	82,06
MMC	0,2	37,42±1,78	3,26±0,15	1,12±0,04	1,76±0,08	136,46
<b>20</b>	1,0	16,08±0,57	1,42±0,11	1,21±0,07	1,57±0,02	56,47
	2,0	15,92±0,61	1,29±0,08	1,19±0,06	1,58±0,03	55,78
	4,0	14,74±0,39	1,31±0,08	1,22±0,07	1,63±0,04	51,64
<b>24</b>	1,0	17,57±1,12	1,49±0,12	1,19±0,06	1,70±0,05	65,71
	2,0	16,21±1,67	1,38±0,08	1,17±0,06	2,02±0,03	60,64
	4,0	15,56±0,84	1,27±0,11	1,23±0,05	1,61±0,01	58,21
<b>26</b>	1,0	14,74±1,21	1,18±0,17	1,258±0,09	1,73±0,07	55,14
	2,0	14,03±1,26	1,25±0,14	1,12±0,03	1,77±0,07	52,49
	4,0	13,69±2,11	1,25±0,13	1,08±0,06	1,58±0,05	51,21
<b>27</b>	1,0	24,60±0,86	1,93±0,08	1,28±0,04	1,72±0,04	92,03
	2,0	23,75±0,39	1,86±0,09	1,28±0,05	1,67±0,02	88,85
	4,0	22,24±0,63	1,64±0,13	1,32±0,11	1,66±0,01	83,20
<b>28</b>	1,0	26,30±1,66	2,17±0,14	1,21±0,02	1,66±0,06	98,39
	2,0	25,25±1,26	2,09±0,13	1,14±0,04	1,64±0,02	94,46
	4,0	24,48±0,81	1,94±0,10	1,21±0,03	1,67±0,01	91,58
<b>31</b>	1,0	21,30±0,95	1,71±0,12	1,25±0,05	1,71±0,05	79,69
	2,0	20,70±0,84	1,68±0,05	1,23±0,06	1,68±0,06	77,44
	4,0	19,37±0,34	1,66±0,04	1,12±0,04	1,65±0,01	72,46
<b>32</b>	1,0	24,03±0,61	1,92±0,09	1,20±0,03	1,68±0,02	89,90
	2,0	23,43±0,67	1,83±0,08	1,24±0,05	1,67±0,02	87,65
	4,0	21,56±0,71	1,79±0,09	1,21±0,06	1,70±0,05	80,66
<b>33</b>	1,0	18,43±0,46	1,56±0,04	1,14±0,05	1,64±0,01	68,95
	2,0	17,69±0,83	1,56±0,04	1,08±0,02	1,61±0,02	66,18
	4,0	16,40±1,59	1,34±0,17	1,32±0,06	1,62±0,02	61,35
Heksanski ekstrakt lateksa <i>E. nicaeensis</i>	1,0	19,31±1,07	1,64±0,09	1,18±0,07	1,56±0,02	67,71
	2,0	19,08±1,19	1,68±0,09	1,21±0,09	1,58±0,02	67,04
	4,0	18,19±0,56	1,52±0,08	1,16±0,06	1,60±0,02	63,88

\*MN – mikronukleus, CBPI – proliferacioni indeks blokirane citokineze BN – binuklearne ćelije

### **3. EKSPERIMENTALNI DEO**

### 3.1. Instrumenti i rastvarači

Za izolovanje i karakterizaciju jedinjenja korišćene su sledeće tehnike i instrumenti:

1. *Brza hromatografija na koloni (DF)* na silika gelu kao stacionarnoj fazi (Silica gel less than 0,08 mm for column chromatography, Merck) – za grubo frakcionisanje ekstrakta biljnog materijala.
2. *Hromatografija na koloni (CC)* na silika gelu kao stacionarnoj fazi (Silica gel 60, particle size 0.200 mm for column chromatography, 63-200 µm, ASTM Merck) – za dalje prečišćavanje odabranih frakcija nakon DF hromatografije.
3. *Analitička tankoslojna hromatografija (TLC)* na gotovim aluminijumskim pločama (Al TLC Silica gel 60 F254 Layer thickness 175–225 µm) – za praćenje toka *dry-column flash* hromatografije i hromatografije na koloni.
4. *Preparativna tankoslojna hromatografija (pTLC)* na gotovim aluminijumskim pločama (Al TLC Silica gel 60 F254 Layer thickness 175–225 µm) – za izolovanje jedinjenja **2**.
5. *Preparativna tečna hromatografija na reverznoj fazi (RP LC)* – za finalna prečišćavanja odabranih frakcija nakon hromatografije na koloni i preparativne normalno fazne tečne hromatografije. U tu svrhu korišćen je tečni hromatograf Agilent Technologies 1100 Series opremljen autosemplerom, kolonom Zorbax XDB C18 dimenzija 250 × 9,4 mm sa česticama od 5 µm, DAD detektorom i kolektorom. Uslovi razdvajanja prikazani su u delovima teksta (**3.2.1**, **3.2.3** i **3.2.4**) koji se odnose na izolovanje jedinjenja.
6. *Preparativna tečna hromatografija na normalnoj fazi (NP LC)* korišćena je za finalna prečišćavanja odabranih frakcija nakon hromatografije na koloni. U tu svrhu korišćen je tečni hromatograf Agilent Technologies 1260 Series opremljen autosemplerom, kolonom Zorbax RX-Sil dimenzija 250 × 9,4 mm sa česticama od 5 µm, DAD detektorom i kolektorom. Uslovi razdvajanja prikazani su u delovima teksta (poglavlja **3.2.1**, **3.2.3** i **3.2.4**) koji se odnose na izolovanje jedinjenja.

7. *Polarimetrija* – za merenje optičke rotacije jedinjenja. Korišćen je Automatic Polarimeter AUTOPOL<sup>®</sup> IV, Rudolph Research Analytical, sa natrijumovom lampom (589 nm) i ćelijom za merenje od 10 cm.
8. *Ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija (UV-Vis)* – za određivanje apsorpcionih maksimuma i molarne apsorptivnosti izolovanih jedinjenja. Za merenja je korišćen spektrofotometar GBC Cintra 40 UV-Visible sa kvarcnom kivetom od 1 cm.
9. *Infracrvena spektroskopija (IR)* – za snimanje IR spektara izolovanih jedinjenja. Spektri su snimani na Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR spektrometru ATR tehnikom (eng. *Attenuated total reflection*).
10. *Nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija (NMR)* – za snimanje 1D i 2D NMR spektara izolovanih jedinjenja i metabolomičku studiju (poglavlje 2.2). Svi spektri snimani su na NMR spektrometru Bruker 500 Avance III (500,26 MHz za <sup>1</sup>H i 125,80 MHz za <sup>13</sup>C), na 5 mm sondama širokog opsega, direktnoj (BBO) i inverznoj (BBI). Kao rastvarači korišćeni su deuterisani hloroform sa 1% TMS (V/V), deuterisani metanol i deuterisani benzen. Prilikom snimanja heteronuklearnih 2D spektara primenjena je konstanta od 145 Hz (<sup>1</sup>J<sub>C,H</sub>) za HSQC spektre i 8 Hz za HMBC spektre (<sup>2-4</sup>J<sub>C,H</sub>). Svi spektri snimani su na 298 K, ukoliko drugačije nije naznačeno.
11. *Tečna hromatografija-masena spektrometrija (LC-MS)* – za izračunavanje molekulske formule i merenje precizne mase izolovanih jedinjenja. U tu svrhu korišćen je Agilent Technologies 6210 Time-of-Flight LC/MS maseni spektrometar povezan sa analitičkim tečnim hromatografom (Agilent Technologies 1200 Series opremljen autosemplerom, Zorbax Eclipse Plus C18 kolonom (150 × 4,6 mm; 1,8 μm) i DAD detektorom). LC uslovi: temperatura kolone 40 °C; mobilna faza A (5 mM amonijum-formijat u MilliQ vodi) i B (acetonitril) u gradijentnom modu 55–90% B (0–25 min), 90–55% B (25–26 min), 55% B (26–27 min); brzina protoka mobilne faze 1 mL/min; spektralni opseg DAD detektora 190–450 nm. MS uslovi za snimanje masenih ESI spektara visoke rezolucije: pozitivni mod; napon kapilare 4000 V; temperatura nebulizacionog gasa 350 °C; brzina protoka gasa za sušenje 12 L/min; pritisak nebulajzera 45 psig; napon na fragmentoru 140 V; napon na skimeru 60 V; radiofrekventni napon oktopola 250 V; opseg *m/z* 100–2000.

12. *Gasna hromatografija-masena spektrometrija (GC-MS)* – za razdvajanje komponenata frakcija epikutikularnih voskova i snimanje EI masenih spektara razdvojenih jedinjenja. U tu svrhu upotrebljen je gasni hromatograf Agilent 7890A opremljen CTC PAL auto-injekcionim sistemom i povezan sa: 5975C inert XL EI/CI maseno-selektivnim (MSD) detektorom i plameno-jonizujućim detektorom (FID). Jedinjenja su razdvajana na *HP-5 MS* kapilarnoj koloni (30 m × 0,25 mm, debljina filma 0,25 µm). Temperatura pećnice je povećavana linearno od 60 °C do 300 °C brzinom od 3°/min, a zatim je 15 min održavana na 315 °C. Temperatura injektora je bila 250 °C, temperatura detektora 300 °C, temperatura izvora 230 °C, temperatura kvadrupola 150 °C. Kao noseći gas korišćen je helijum, sa protokom od 1,5 mL/min, u modu konstantnog pritiska. Maseni detektor je isključen prva 3 min, a zatim su EI-MS (70 eV) spektri snimani u opsegu *m/z* 30–550. Kao reagens za derivatizaciju polarne frakcije epikutikularnih voskova, pre GC/MS analize, korišćen je BSTFA sa 1% TMSC (Supelco), čistoće za derivatizaciju.

Za ekstrakciju biljnog materijala, kao i za *dry-column flash* hromatografiju, hromatografiju na koloni i tankoslojnu hromatografiju korišćeni su rastvarači analitičke čistoće koji su pre upotrebe destilovani i osušeni nad anhidrovanim natrijum-sulfatom. Za prečišćavanje jedinjenja normalno faznom i reverzno faznom tečnom hromatografijom, kao i za snimanje optičke rotacije, UV-Vis i masenih spektara korišćeni su rastvarači HPLC čistoće.

## 3.2. Biljni materijal i postupci izolovanja jedinjenja

### 3.2.1. Biljni materijal i postupak izolovanja jedinjenja iz lateksa *E.*

#### *palustris* L.

Lateks biljne vrste *Euphorbia palustris* prikupljan je u maju 2011. godine (oznaka EPM) i maju 2013. godine (oznaka EPH). Dobijeni lateks najpre je liofilizovan i dalje frakcionisan. Lateks koji je prikupljen 2011. godine direktno je, bez ekstrakcije frakcionisan brzom hromatografijom na koloni. Lateks je suspendovan u 10% etil-acetatu u n-heksanu. Kao stacionarna faza korišćen je silika gel, dok je eluiranje rađeno gradijentno sistemom od 100% n-heksana do 100% etil-acetata. Odabrane frakcije (na osnovu  $^1\text{H}$  NMR spektra) dalje su razdvajane hromatografijom na gravitacionoj koloni (CC). Stacionarna faza za ovu hromatografiju bio je silika gel, a eluiranje je rađeno gradijentno sistemom od 100% n-heksana do 100% etil-acetata.

Preparativna tankoslojna hromatografija (pTLC) korošćena je za izolovanje jedinjenja **2**. Kao stacionarna faza korišćena je komercijalna ploča silika gela na aluminijumu kao nosaču dimenzija  $20 \times 20$  cm. Smeša dihlormetana, acetona i metanola u zapreminskom odnosu 73:18:9 korišćena je kao mobilna faza. Komponenta čija je  $R_f$  vrednost 0,47 je ekstrahovana dihlormetanom i kasnije spektroskopski analizirana.

Reverzno fazna tečna hromatografija (RP LC) korišćena je nakon CC za izolovanje jedinjenja **3** i **4**. Postupak prečišćavanja materijala označenog kao EPM prikazan je na **Šemi 1**.

*RP LC uslovi 1* korišćeni za izolovanje jedinjanja **3**: mobilna faza A (0,2% mravlja kiselina u MilliQ vodi) i B (acetonitril) u gradijentnom modu, 55–90% B (0–25 min), 90% B (25–35 min), 90–100% B (35–40 min), 100% (40–50 min), 100–55% B (50–51 min), 55% B (51–55 min), brzina protoka 4 mL/min, temperatura kolone 25 °C, talasna dužina detektora 235 nm.

*RP LC uslovi 2* korišćeni za izolovanje jedinjenja **3** i **4**: mobilna faza A (0,2% mravlja kiselina u MilliQ vodi) i B (acetonitril) u gradijentnom modu, 80–92% B (0–18 min), 92–100% B (18–20 min), 100% B (20–25 min), 100-80% B (25–26 min),

80% B (26–30 min), brzina protoka 4 mL/min, temperatura kolone 25 °C, talasna dužina detektora 235 nm.

Na sličan način izolovana su jedinjenja iz materijala koji je prikupljen 2013. godine (**Šema 2**): liofilizovani lateks ekstrahovan je smešom etil-acetat i *n*-heksana (1:1), dobijeni ekstrakt prečišćen je brzom hromatografijom na koloni. Kao stacionarna faza korišćen je silika gel, dok je eluiranje rađeno gradijentno sistemom od 100% *n*-heksana do 100% etil-acetata. Odabrane frakcije (na osnovu <sup>1</sup>H NMR spektra) dalje su razdvajane hromatografijom na gravitacionoj koloni. Stacionarna faza za ovu hromatografiju bio je silika gel, a eluiranje je rađeno gradijentno sistemom od 100% *n*-heksana do 100% etil-acetata.

Za finalno prečišćavanje jedinjenja **5–8** korišćena je reverzno fazna tečna hromatografija.

*RP LC uslovi 3* korišćeni za izolovanje jedinjanja **5–7**: mobilna faza A (0,2% mravlja kiselina u MilliQ vodi) i B (acetonitril) u gradijentnom modu, 75–85% B (0–18 min), 85–75% B (18–19 min), 75% B (19–23 min), brzina protoka 4 mL/min, temperatura kolone 25 °C, talasna dužina detektora 235 nm.

*RP LC uslovi 4* korišćeni za izolovanje jedinjanja **8**: mobilna faza: A (0,2% mravlja kiselina u MilliQ vodi) i B (acetonitril) u gradijentnom modu, 30–50% B (0–5 min), 50–100% B (5–15 min), 100% B (15–19 min), 100–30% B (19–21 min), 30% B (21–25 min), brzina protoka 4 mL/min, temperatura kolone 25 °C, talasna dužina detektora 235 nm.

### **3.2.2. Priprema uzorka za metabolomičku studiju**

Biljni materijal (lateks) prikupljan je u aprilu 2014. godine.

Uzorci za NMR snimanje pripremljeni su ekstrakcijom 500 mg lateksa u 1,5 mL deuterisanog hloroforma (CDCl<sub>3</sub>). Suspenzija je ekstrahovana 10 min pod uticajem ultrazvuka. Deutero-hloroformski sloj je prebačen u NMR kivetu i uzorak je snimljen na Bruker Avance III 500 NMR spektrometru. Standardni „zgpr” pulsni program sa

suzbijanjem ostataka vode korišćen je za snimanje. Za svaki uzorak snimana su 64 skana sa vremenom relaksacije od 2 s.

Uzorak za kvantitativnu analizu je pripremljen rastvaranjem 20 mg deuteriohloroformskog ekstrakta sa 1 mg internog standarda (3,5-ditercbutil-4-hidroksitoluen (BHT)) u 0,8 mL  $\text{CDCl}_3$ . Rastvor je podvrgnut uticaju ultrazvuka u trajanju od 10 min. Za svaki uzorak snimljeno je 256 skanova i za ova snimanja korišćen je „zg30” pulsni program sa relaksacijom od 5 s. Za kvantitativnu analizu korišćena je ručna integracija pikova. Kvantifikacija je zasnovana na merenju integrala nepreklopljenih signala jedinjenja koja se prate i signala na hemijskom pomeranju od 6,98 ppm (**Slika24**).

Dobijeni  $^1\text{H}$  NMR spektri obrađeni su koristeći MestReNova 6.0.2 (Mestrelab Research). Spektri su redukovani na integrisane regione jednake širine (0,04 ppm) u opsegu od 0,25–9,00 ppm i snimljeni su kao ASCII datoteke.

Analiza glavnih komponenti (*eng.* Principal component analysis (PCA)) je urađena primenom SIMCA softvera (verzija 14.0, Umetrics, Umeå, Sweden). Podaci su normalizovani na ukupnu površinu i skalirani pareto metodom. Tri regiona su isključena iz ukupne površine (opsezi 2,45–3,14 ppm i 3,38–4,78 ppm (rezidualni signal vode), kao i opseg 7,23–7,31 ppm koji odgovara signalu  $\text{CHCl}_3$  iz  $\text{CDCl}_3$ ).

### **3.2.3. Biljni materijal i postupak izolovanja jedinjenja iz stabla i lateksa *E. lucida* Waldst. & Kit.**

Kod biljne vrste *E. lucida* kao polazni materijal korišćeni su stablo (oznaka EL) i lateks biljke (oznaka LUC). Početak izolovanja jedinjenja iz oba materijala obuhvatao je najpre ekstrakciju samlevenog stabla, odnosno liofilizata lateksa, smešom rastvarača etil-acetat/*n*-heksan (1:1). Nakon toga dobijeni ekstrakt je razdvajan brzom hromatografijom na koloni. Eluiranje je rađeno gradijentno sistemom rastvarača od 100% *n*-heksana do 100% etil-acteta na silika gelu kao stacionarnoj fazi. Odabrane frakcije (na osnovu podataka dobijenih iz  $^1\text{H}$  NMR spektara) razdvajane su hromatografijom na gravitacionoj koloni. Kao stacionarna faza primenjen je silika gel, a eluiranje je rađeno gradijentno sistemom rastvarača od 100% *n*-heksana do 100% etil-acteta.



Posle ovakvog frakcionisanja finalno prečišćavanje dobijenih frakcija iz ekstrakta stabla je izvedeno primenom reverzno fazne preparativne tečne hromatografije. Na opisani način izolovana su jedinjenja **3**, **14–16**.

*RP LC uslovi 5* korišćeni za izolovanje jedinjenja **14**: mobilna faza A (MilliQ voda) i B (acetonitril) u gradijentnom modu, 55–90% B (0–25 min), 90% B (25–35 min), 90–55% B (35–36 min), 55% B (36–40 min), brzina protoka 4 mL/min, temperatura kolone 25 °C, talasne dužine detektora 215, 235, 254 i 270 nm.

*RP LC uslovi 6* korišćeni za izolovanje jedinjenja **3**: mobilna faza: A (MilliQ voda) i B (acetonitril) u gradijentnom modu, 90% B (0–10 min), 90–100% B (10–20 min), 100–90% B (20–21 min), 90% B (21–25 min), brzina protoka 4 mL/min, temperatura kolone 25 °C, talasna dužina detektora 235 nm.

Frakcije dobijene prečišćavanjem ekstrakta lateksa *E. lucida* hromatografijom na gravitacionoj koloni dalje su razdvajane preparativnom normalno faznom tečnom hromatografijom, s tim što je za izolovanje jedinjenja **5** bilo potrebno dodatno prečišćavanje reverzno faznom tečnom hromatografijom (**Šema 4**).

*NP LC uslovi 1* korišćeni za izolovanje jedinjenja **7** i **17**: mobilna faza: A (petrol-etar) i B (aceton) u izokratskom modu, 10% B (0–20 min) min, brzina protoka 3 mL/min, temperatura kolone 25 °C, talasne dužine detektora 192 i 220 nm.

*NP LC uslovi 2* korišćeni za izolovanje jedinjenja **5** i **18**: mobilna faza: A (petrol-etar) i B (aceton) u izokratskom modu, 15% B (0–12 min), brzina protoka 3 mL/min, temperatura kolone 25 °C, talasne dužine detektora 192 i 220 nm,

*RP LC uslovi 7* korišćeni za izolovanje jedinjenja **5** i **19**: mobilna faza: A (MilliQ voda) i B (acetonitril) u gradijentnom modu, 75–86% B (0–18 min), 86–90% B (18–19 min), 75% B (19–21 min), brzina protoka 4 mL/min, temperatura kolone 25 °C, talasna dužina detektora 235 nm.

#### **3.2.4. Biljni materijal i postupak izolovanja jedinjenja iz lateksa i korena *E. nicaeensis* All.**

Lateks biljne vrste *E. nicaeensis* All. prikupljen je na Zagajičkim brdima. Liofilizovani lateks je ekstrahovan smešom rastvarača *n*-heksan/etil-acetat (1/1 V/V), a

zatim grubo frakcionisan „dry-column flash” hromatografijom. Silika gel je korišćen kao stacionarna faza dok je eluiranje rađeno gradijentno od 100% *n*-heksana do 100% etil-acetata. Frakcije koje su eluirane smešom 50% (EG-9), 60% (EG-10) i 80% (EG-11) etil-acetata u *n*-heksanu su dalje frakcionisane. Frakcija EG-9 je direktno frakcionisana reverzno faznom tečnom hromatografijom, dok su frakcije EG-10 i EG-11 pre frakcionisanja normalno faznom tečnom hromatografijom razdvajane hromatografijom na gravitacionoj koloni. Stacionarna faza za ovo razdvajanje je bio silika gel. Frakcija EG-10 eluirana je izokratski smešom *n*-heksana i acetona (8:2), a frakcija EG-11 izokratski smešom *n*-heksana i 2-propanola (9:1). Za pojedine frakcije je posle razdvajanja normalno faznom tečnom hromatografijom bilo potrebno i prečišćavanje reverzno faznom tečnom hromatografijom. Put izolovanja jedinjenja **20–35** prikazan je na **Šemi 5**.

*NP LC uslovi 3* korišćeni za izolovanje jedinjanja **24**: mobilna faza A (petrol-etar) i B (aceton) u gradijentnom modu, 15–27,5% B (0–15 min), 27,5–15% B (15–17 min) brzina protoka 4 mL/min, temperatura kolone 20 °C, talasna dužina detektora 220 nm.

*NP LC uslovi 4* korišćeni za izolovanje jedinjanja **20–21** i **24–26**: mobilna faza: A (petrol-etar) i B (aceton) u izokratskom modu, 20% B (0–25 min), brzina protoka 4 mL/min, temperatura kolone 24 °C, talasna dužina detektora 210 nm.

*NP LC uslovi 5* korišćeni za izolovanje jedinjanja **20**, **22–24** i **27**: mobilna faza A (petrol-etar) i B (aceton) u izokratskom modu, 18% B (0–25 min), brzina protoka 4 mL/min, temperatura kolone 24 °C, talasna dužina detektora 210 nm.

*NP LC uslovi 6* korišćeni za izolovanje jedinjanja **22**, **27–35**: mobilna faza: A (petrol-etar) i B (aceton) u izokratskom modu, 18% B (0–30 min), brzina protoka 4 mL/min, temperatura kolone 24 °C, talasna dužina detektora 210 nm.

*RP LC uslovi 8* korišćeni za izolovanje jedinjanja **20** i **21**: mobilna faza A (0,2% mravlja kiselina u MilliQ vodi) i B (acetonitril) u gradijentnom modu, 50% B (0–4 min), 50–70% B (4–15 min), 70% B (15–22 min), 70–95% B (22–35 min), 95% B (35–37 min), 95–50% B (37–38 min), 50% B (38–40 min), brzina protoka 4 mL/min, temperatura kolone 35 °C talasna dužina detektora 220 nm.

*RP LC uslovi 9* korišćeni za izolovanje jedinjanja **21–23**: mobilna faza A (0,2% mravlja kiselina u MilliQ vodi) i B (acetonitril) u gradijentnom modu, 60–70% B (0–10 min), 70–100% B (10–25 min), 100% B (25–29 min) 100–60% B (29–30 min),

60% B (30–32 min), brzina protoka 4 mL/min, temperatura kolone 25 °C, talasna dužina detektora 220 nm.

*RP LC uslovi 10* korišćeni za izolovanje jedinjenja **24**: mobilna faza A (MilliQ voda) i B (acetonitril) u gradijentnom modu, 55–90% B (0–25 min), 90% B (25–35 min), 90–55% B (35–36 min), 55% B (36–38 min), brzina protoka 4 mL/min, temperatura kolone 25 °C, talasna dužina detektora 235 nm.

Koren ove biljne vrste prikupljen je na istom lokalitetu kao i lateks. Biljni materijal je osušen, samleven i dodatno prosušen. Potpuno suv samleven koren podvrgnut je kontinualnoj ekstrakciji 96%-nim etanolom uz zagrevanje tokom 2 h, a zatim je ostavljen preko noći u rastvaraču. Posle ceđenja i uparavanja rastvarača dobijeni ekstakt je frakcionisan „*dry-column flash*” hromatografijom. Frakcije su eluirane gradijentno od 100% *n*-heksana do 100% acetona. Silika gel je korišćen kao stacionarna faza za ovo razdvajanje. Frakcije koje su dobijene eluiranjem smešom 15% (EGK-3) i 20% (EGK-4) acetona u *n*-heksanu su dalje prečišćavane, najpre brzom hromatografijom na koloni na silika gelu, gradijentno smešom acetona i *n*-heksana (2:98 – 50:50 frakcija EGK-3 i 3:97 – 15:85 frakcija EGK-4), a zatim normalno faznom tečnom hromatografijom (samo frakcije odabrane na osnovu <sup>1</sup>H NMR spektara). Pojedine frakcije dobijene razdvajanjem normalno faznom tečnom hromatografijom dodatno su prečišćene reverzno faznom tečnom hromatografijom. Put izolovanja jedinjenja **36–47** prikazan je na **Šemi 6**.

### **3.3. Određivanje hemijskog sastava epikutikularnih voskova**

Po 1 g listova svake biljne vrste preliveno je sa 20 mL dihlormetana i epikutikularni voskovi ekstrahovani su u toku 1 minuta. Nakon toga je ekstrakt uparen do suva i rastvoren u minimalnoj zapremini *n*-heksana. Tako dobijena smeša naneta je na kolonu sa silika-gelom (70–230 mesh, ASTM, Merck). Eluiranje je najpre vršeno *n*-heksanom (20 mL) kako bi se odvojile najnepolarnije komponente ekstrakta, a zatim sa još jednom porcijom dihlormetana (20 mL), i na kraju 2%-nim metanolom u dihlormetanu (10 mL) kako bi se sa kolone eluirale i najpolarnije komponente.

Heksanska frakcija uparena je do zapremine od 1 mL i analizirana GC/MS tehnikom.

Polarnija, dihlormetanska, frakcija je uparena do suva i rastvorena u 200  $\mu$ L dihlormetana. Dobijenom rastvoru je dodato 100  $\mu$ L rastvora BSTFA i smeša je zagrevana na 70°C u trajanju od 30 min pre GC/MS analize.

Po 1  $\mu$ L uzorka je injektovan u gasni hromatograf u splitless modu. Identifikacija jedinjenja je rađena poređenjem dobijenih masenih spektara sa spektrima iz biblioteke (NIST, verzija 11), kao i metodom zaključanih retencionih vremena i poređenjem dobijenih rezultata sa *Adams*-ovom bibliotekom spektara (verzija 4).

### **3.4. Ispitivanje biološke aktivnosti odabranih sekundarnih metabolita i heksanskih ekstrakata lateksa ispitivanih biljnih vrsta**

#### **3.4.1. Lekovi**

R(+)-Verapamil (Dex-Ver) je komercijalni proizvod (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka). Čuvan je kao 1 mM rastvor na sobnoj temperaturi.

Doksorubicin (DOX) je komercijalni proizvod (EBEWE Arzneimittel GmbH, Beč, Austrija). Rastvoren je u dejonizovanoj vodi i 1 mM rastvor je čuvan na -20 °C.

Flukonazol je komercijalni proizvod (B.Braun Medical S.A., Barselona, Španija).

#### **3.4.2. Hemikalije i reagensi**

Medijumi neophodni za kultivisanje i propagaciju humanih ćelijskih linija (RPMI 1640 i DMEM), kombinacija antibiotika penicilin-streptomycin, rastvor smeše antibiotik-antimikotik, L-glutamin i tripsin/EDTA su komercijalno dostupni proizvodi (PAA, Vien, Austria). Hranljivi fetalni goveđi serum (FBS) koji se koristi za obogaćivanje medijuma, rodamin 123 (Rho 123) i dimetil-sulfoksid (DMSO) su proizvodi Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka. Metabolički osetljiv indikator aktivnosti mitohondrija 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolijum-bromid

(MTT sredstvo) (Sigma, Sent Louis, Missouri, USA). Komplet za detekciju ćelijske smrti koji sadrži aneksin V-FITC (AV) i propidijum-jodid (PI) su proizvodi Abcam (Cambridge, Great Britain). Za spiranje spora korišćen je sterilnim 0,85% fiziološki rastvor koji je sadržao 0,1% Tween 80 (v/v). Malt medijum (MEB) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) korišćen je za rastvaranje ispitivanih jedinjenja i ekstrakata prilikom održavanja antifugalne aktivnosti. Za izolovanje totalne DNK gljivica korišćeni su ZR Fungal/Bacterial DNA Mini Prep KIT (Zymo Research, Irvine, California). Za amplifikaciju četiri genska regiona korišćena je ultra-čista DNase/Rnase voda (Gibco, Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts). Prilikom umnožavanja genskih regiona korišćeni su KAPA Taq pufera (KAPA Biosystems, Roche Company, Basel, Switzerland), dNTPs (10 mM) (KAPA Biosystems), 5U/μL KAPA Taq DNA polimeraze (KAPA Biosystems).

### 3.4.3. Ćelije i ćelijske kulture

Ćelijske linije humanog nesitnoćelijskog karcinoma pluća (NCI-H460) i karcinoma debelog creva (DLD1) su komercijalni proizvodi (American Type Culture Collection, Rokville, Merylend, SAD). Ove parentalne ćelijske linije se smatraju senzitivnim s obzirom na to što su dobijene od pacijenata kod kojih je dijagnostikovan primarni tumor a nisu podvrgnuti lečenju. Odgovarajuće rezistentne ćelijske linije dobijene su selekcijom iz parentalnih ćelijskih linija koje su izlagane lekovima: ćelije NCI-H460/R potiču od NCI-H460 ćelija gajenih u medijumu sa 100 nM doksorubicina;<sup>103</sup> dok su DLD1-TxR ćelije dobijene stalnim izlaganjem DLD1 ćelija sve višim i višim koncentracijama paklitaksela.<sup>104, 105</sup>

Humana ćelijska linija melanoma 518A2 je dobijena od dr Sanje Mijatović, Odeljenje za imunologiju, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu, Srbija, a normalne humane keratinocite HaCaT u CLS – Cell Line Service, Epelhajm, Nemačka kupio je prof. dr. Jörg Andrä, Odeljenje za biofiziku, Istraživački centar, Borstel, Lajbnic-centar za medicinu i bionauke, Borstel, Nemačka.

MDR ćelijske linije (NCI-H460/R i DLD1-TxR) i odgovarajući senzitivni parovi kultivisani su u RPMI 1640 medijumu koji je obogaćen dodavanjem 10% rastvora

toplotno inaktiviranog FTS, 2 mM L-glutamina, 4,4 g/L glukoze i smeše antibiotika i antimikotika (rastvor koji sadrži 10.000 U/mL penicilina, 10 mg/mL streptomcina i 25 µg/mL amfotericina B) u inkubatoru (Sanyo Instruments, Japan) na temperaturi 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% ugljen-dioksida. Čelije 518A2 i HaCaT su kultivisane u DMEM medijumu uz dodatak 10% rastvora toplotno inaktiviranog FTS, L-glutamina, 4,4 g/L glukoze i smeše antibiotika (5.000 U/mL penicilina i 5 mg/mL streptomcina). Čelije su presejavane pomoću 0,25% rastvora tripsin/EDTA na svakih 72 sata i gajene u svežem medijumu tako da je njihova gustina bila 8.000 ćelija/cm<sup>2</sup> za NCI-H460, DLD1 i DLD1-TxR, odnosno 16.000 ćelija/cm<sup>2</sup> za NCI-H460/R, 518A2 i HaCaT.

#### **3.4.4. Jedinjenja i ekstrakti**

Etanolni rastvori jedinjenja **3**, **4**, **19**, **21–23**, **25**, **29** i **30** u alikvotima koncentracije 20 mM čuvani su na -20 °C. Radni rastvori jedinjenja ovih jedinjenja dobijani su razblaživanjem vodom do koncentracija 1 mM, 100 µM i 10 µM neposredno pre upotrebe, a u zavisnosti od koncentracionog opsega koji je korišćen u datom eksperimentu.

Heksanski ekstrakti ispitivanih biljnih vrsta rastvarani su u DMSO i alikvoti koncentracije 10 mg/mL čuvani su na 4 °C. Radni rastvori heksanskih ekstrakata su pravljani razblaživanjem vodom neposredno pre izvođenja eksperimenata.

#### **3.4.5. Merenje citotoksičnosti kolorimetrijskim MTT testom**

Stepen preživljavanja tumorskih i normalnih ćelija određen je kolorimetrijski, MTT testom koji se zasniva na redukciji 3-(4,5-dimetil-2-tizolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolijum bromida u formazan boju dejstvom aktivnih mitohondrija živih ćelija. Čelije su nanete u bunariće mikrotitar ploče sa 96 bunarića tako da je njihova gustina bila 1000 ćelija/bunariću za NCI-H460 i 2000 ćelija/bunariću za NCI-H460/R, DLD1, DLD1-TxR, 518A2 i HaCaT i inkubirane su preko noći u 100 µL RPMI 1640 medijuma koji je sadržavao 5% FTS i antibiotike. Nakon 24 sata od zasejavanja ćelije su tretirane

jedinjenjima **3** i **4** različitih koncentracija: NCI-H460, NCI-H460/R, DLD1, DLD1-TxR i 518A2 (10 – 1000 nM), HaCaT (250 – 5000 nM), heksanskim ekstraktima lateksa ispitivanih biljnih vrsta koncentracija 0,5 – 50  $\mu$ M: 518A2 i HaCaT, kao i jedinjenjima **19**, **21–23**, **25**, **29** i **30** koncentracija 2,5, 5, 10, 25 i 50  $\mu$ M: NCI-H460, NCI-H460/R, DLD1 i DLD1-TxR, i ostavljene da tako stoje narednih 72 sata. Po isteku tog vremena, u svaki bunarić dodato je po 100  $\mu$ L rastvora MTT sredstva (1 mg MTT/mL medijuma za gajenje kultura) i mikrotitar ploča je inkubirana 4 h na 37 °C. Posle toga je medijum sa ostacima MTT odliven, a dodato je 100  $\mu$ L DMSO kako bi se rastvorio formazanski proizvod, čija je količina proporcionalna broju metabolički aktivnih (živih) ćelija. Apsorbancija rastvorene boje merena je na 540 nm pomoću automatskog čitača (LKB 5060-006 Micro Plate Reader, Beč, Austrija).

Relativna brzina rasta ćelija (CG) je određena na osnovu sledeće jedinačine:

$$CG(\%) = (A_{\text{tretiran}}/A_{\text{netretirana kontrola}}) \times 100, \quad \text{gde je } A \text{ – apsorbancija}$$

IC<sub>50</sub> je definisana kao koncentracija svake supstance koja inhibira rast ćelija za 50%. IC<sub>50</sub> vrednosti su izračunate nelinearnom regresionom analizom pomoću GraphPad Prism 6 softvera.

### 3.4.6. Određivanje tipa ćelijske smrti

Tip ćelijske smrti je određivan na osnovu dvojnog bojenja ćelija aneksinom V-FITC (AV) i propidijum-jodidom (PI). Procenat vijabilnih ćelija, ćelija u ranoj i kasnoj apoptozi, kao i nekrozi moguće je odrediti nakon očitavanja na protočnom citometru. Efekat jedinjenja **3** i **4** na ćelije humanog melanoma 518A2 upoređen je sa efektom na normalne humane keratinocite HaCaT. 518A2 i HaCaT ćelije su sejane u ploče sa 6 bunarića i inkubirane tokom noći pri gustini od 50.000 ćelija/bunariću. Zatim su 518A2 ćelije tretirane rastvorima jedinjenja **3** i **4** koncentracija 100, 500 i 1000 nM, dok su na HaCaT ćelije primenjene znatno više koncentracije ovih jedinjenja: 5, 10 i 50  $\mu$ M. Posle 72 h, sve ćelije, uključujući adherentne i plivajuće, sakupljene su i centrifugirane. Ćelije su potom resuspendovane u 100  $\mu$ L vezujućeg pufera koji je

sadržao 5  $\mu$ L AV i 5  $\mu$ L PI prema uputstvu proizvođača. Po završetku preporučenog perioda inkubacije (5–10 minuta na sobnoj temperaturi), dodato je još po 400  $\mu$ L vezujućeg pufera kako bi se zaustavila reakcija vezivanja AV. Tako pripremljene ćelije su analizirane na protočnom citometru u toku 1 h od obeležavanja. Intenzitet fluorescencije je očitavan istovremeno na zelenom FL1 i crvenom FL2 kanalu CyFlow Space protočnog citometra (Partec, Münster, Nemačka). U svakom uzorku, 20.000 ćelija je očitavano, i procenat vijabilnih ćelija (AV–PI–), ćelija u ranoj apoptozi (AV+PI–), apoptozi i nekrozi (AV+PI+), kao i mrtvih ćelija (AV–PI+) analiziran je Summit softverom (Dako, Kolorado, SAD).

### **3.4.7. Određivanje inhibicije aktivnosti P-gp-a testom akumulacije Rho 123**

Uticao jedinjenja **19**, **21–23**, **25**, **29** i **30** na funkciju P-gp-a analiziran je metodom protočne citometrije zasnovanoj na sposobnosti njegovog supstrata Rho 123 da fluorescira. Intenzitet fluorescencije srazmeran je akumulaciji Rho 123. Verapamil (kompetitivni P-gp inhibitor) je korišćen kao pozitivna proba. Ćelije DLD1-TxR i NCI-H460/R su kultivisane u flaskovima površine 75 cm<sup>2</sup> do postizanja 80% konfluentnosti, kada su tretirane tripsinom i prebacivane u kivete za centrifugiranje zapremine 5 mL rastvaranjem u medijumu koji je sadržavao 5  $\mu$ M Rho 123. Nakon toga dodavan je Dex-VER (5 i 10  $\mu$ M), jedinjenja **19**, **21–23**, **25**, **29** i **30** (5 i 10  $\mu$ M), i zatim su inkubirane 30 minuta na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% ugljen-dioksida. Na kraju perioda predviđenog za akumulaciju, ćelije su odvajane centrifugiranjem, dva puta ispirane fosfatnim puferom i ponovo suspendovane u 1,0 mL hladnog rastvora fosfatnog pufera u fiziološkom rastvoru i analizirane na protočnom CyFlow Space citometru (Partec, Münster, Nemačka). Fluorescencija Rho 123 merena je na kanalu 1 (FL2-H) na talasnoj dužini  $\lambda = 530$  nm. Za svaki uzorak prikupljeno je bar 10000 pojedinačnih događaja.



### 3.4.8. Statistička analiza

Za statističku obradu podataka korišćen je GraphPad Prism 6 softver. Pri analizi rezultata dobijenih MTT testom, razlika između grupa utvrđena je Studentovim t-testom, a razlike su smatrane statistički značajnim ako je  $p < 0,05$ .  $IC_{50}$  vrednosti su dobijene nelinearnom regresijom koristeći „log (inhibitor) vs. normalized response”.

Rezultati sa protočnog citometra su analizirani u XY tabela formatu sa srednjim vrednostima i greškama preuzetim iz Summit softvera. Rezultati dobijeni metodom protočne citometrije su ispitani „Two-way ANOVA” testom i „Tukey post-hoc” testom višestrukih poređenja.

### 3.4.9. Protektivno dejstvo na DNK humanih limfocita

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

Za pripremu mikronuleusa (MN) korišćena je metoda blokirane citokineze sa izvesnim modifikacijama.<sup>106</sup> Kulture limfocita su tretirane rastvorima eufodendrofana kojih u koncentracijama od 1,0, 2,0 i 4,0  $\mu\text{g/mL}$  u DMSO. Amifostin (S-2[3-aminopropilamino]-etilfosfotionska kiselina (98%); Marligen-Biosciences, USA), u koncentraciji od 1  $\mu\text{g/mL}$  dodat je u jednu od kultura i to je korišćeno kao pozitivna kontrola, dok je mitomicin C (u fosfatnom puferu) u koncentraciji od 0,1  $\mu\text{g/mL}$  korišćen kao negativna kontrola. Približno  $2 \times 10^6$  limfocita iz krvi je prebačeno u 5 mL RPMI-1640 medijuma sa 15% telećeg seruma i 2,4  $\mu\text{g/mL}$  fitohemaglutinina (Invitrogen-Gibco-BRL, USA). Jedan sat posle inicijacije ćelijske stimulacije ispitivana jedinjenja (u tri koncentracije) su dodavana uzorcima.

Posle inkubacije u termostatu na 37 °C u toku 19 h sve ćelijske kulture su isprane čistim medijumom, prebačene u 5 mL svežeg RPMI 1640 medijuma (RPMI 1640 Medium + GlutaMAX + 25 mM HEPES; Invitrogen-Gibco-BRL, Vienna, Austria) i

inkubirane dodatnih 48 h. Citohalasin B (Invitrogen-Gibco-BRL, Vienna, Austria) finalne koncentracije 6 µg/mL dodat je u uzorke i kulture su inkubirane još 24 h. Čelije su potom isprane 0,9% rastvorom natrijum-hlorida (Merck Sharp&Dohme G.M.B.H, Vienna, Austria), sakupljene centrifugiranjem i tretirane hipotoničnim rastvorom (0,56% KCl + 0,9% NaCl, pomešani u istim zapreminama) na 37 °C. Čelijske suspenzije su fiksirane smešom metanol/sirćetna kiselina 3:1, ispirane tri puta fiksatorom i nanošene na čist slajd.<sup>106</sup> Slajdovi su sušeni na vazduhu i bojeni alkalnom Giemsa bojom (Sigma–Aldrich, Vienna, Austria) (2%). Najmanje 1.000 binuklearnih ćelija (BN) po uzorku je pregledano i pojava mikronukleusa je beležena po kriterijumama Kantrimena i Hedla<sup>107</sup> i Feneka i Morlija.<sup>108</sup>

U analizu mikronukleusa uračunate su samo binuklearne ćelije sa dobro očuvanom citoplazmom (posmatrane pod svetlosnim mikroskopom sa 40 × 10 uvećanjem). Kriterijumi za selekciju binuklearnih ćelija i identifikaciju mikronukleusa uzeti su iz projekta HUMN.<sup>102</sup> Beležen je broj binuklearnih ćelija sa jednim, dva, tri ili više mikronukleusa. Podaci za svaki uzorak su izraženi kao učestalost mikronukleusa na 1000 ćelija.

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

Statistička analiza je urađena pomoću softverskog paketa Origin verzije 7.0. Statistički značaj razlike između parova podataka je određen analizom varijanse (One-way ANOVA) za kojom je sledio Tukey test. Statističke razlike su smatrane značajnim pri  $p < 0,01$  i  $p < 0,05$ .

### **3.4.10. Identifikacija gljiva**

Na osnovu makroskopskih i mikroskopskih karakteristika, korišćeni su dostupni ključevi Samson et al.<sup>109, 110</sup> za identifikaciju izolovanih mikromiceta. Pored tradicionalne identifikacije, oba izolata su identifikovana i na molekularnom nivou. Korišćenjem ZR Fungal/Bacterial DNA Mini Prep KIT (Zymo Research) izvršena je ekstrakcija totalne DNK, iz 7 dana starih monosporičnih kultura, sa kojih je sakupljeno oko 50 mg micelije. Četiri genska regiona su amplifikovana: ITS1 (unutrašnji

transkribovani region 1), ITS2 (parcijalni deo velike subjedinice ribozoma 5.8S + unutrašnji transkribovani spejser 2 + parcijalni deo velike subjedinice 28S), aktinski i  $\beta$ -tubulinski gen. Prajmeri korišćeni za umnožavanje reakcijom lančane polimerizacije (PCR) i njihovi profili predstavljeni su u **Tabeli 14**. Za sve regione, sačinjena je 25  $\mu$ L reakciona smeše prema Six et al.<sup>112</sup> Svaka reakciona smeša, ukupne zapremine 25  $\mu$ L, sadržala je: 17,4  $\mu$ L (za umnožavanje ITS1 i ITS2 regiona i aktinskog gena) i 19,4  $\mu$ L (za umnožavanje  $\beta$ -tubulinskog gena) ultra-čiste DNase/Rnase vode (Gibco), 2,5  $\mu$ L 10  $\times$  KAPA Taq pufera (KAPA Biosystems), 0,25  $\mu$ L dNTPs (10 mM) (KAPA Biosystems), 0,25  $\mu$ L svakog prajmera (10  $\mu$ M), 1,5  $\mu$ L DNK i 0,1  $\mu$ L (5U/ $\mu$ L) KAPA Taq DNA polimeraze (KAPA Biosystems). Za umnožavanje ITS1 i ITS2 regiona, 0,5  $\mu$ L 25 mM MgCl<sub>2</sub> je korišćeno umesto 2,5  $\mu$ L u slučaju umnožavanja aktinskog i  $\beta$ -tubulinskog gena. PCR je sproveden prema sledećem programu: jedan ciklus denaturacije na 94 °C, 4 minuta; 30 ciklusa denaturacije na 94 °C, 30 sekundi; hibridizacija prajmera na 55 °C, 50 sekundi; elongacija na 72 °C, 50 sekundi; i finalna elongacija na 72 °C, 10 minuta. Prečišćeni PCR produkti (QIAquick PCR Purification KIT/250 (Qiagen)) su sekvencirani komercijalno (Macrogen). Homologija sekvenciranih sekvenci sa postojećim referentnim sekvencama deponovanim u NCBI bazi, sprovedena je BLAST $n$  algoritmom. Sekvence referentnih sojeva i sekvenca od interesa su poravnate koristeći ClustalW algoritam za višestruko poravnanje sekvenci. Na osnovu poravnatih sekvenci u programu BioEdit v7.1.3 sekvenca od interesa je manuelno editovana.<sup>111, 112</sup>

### 3.4.11. Antifungalni esej

Modifikovana mikrodiluciona tehnika je korišćena za antifungalni esej.<sup>113</sup> Spore gljiva su isprane sa površine agar ploča sterilnim 0,85% fiziološkim rastvorom koji je sadržao 0,1% Tween 80 (v/v). Da bi se pripremila inokula, suspenzija spora podešena je sterilnim fiziološkim rastvorom do koncentracije  $1,0 \times 10^5$  ćelija/mL u konačnoj zapremini od 100  $\mu$ L koristeći mikrotitarske ploče sa 96 bunarčića. Različite mase ispitivanih ekstrakata lateksa zaraženih i zdravih jedinki i jedinjenja **1** i **3** rastvorene su u Malt medijumu (MEB) sa inokulumom (10  $\mu$ L) do postizanja konačne zapremine u opsegu

0,1–1,0 mg/mL. Mikroploče su zatim inkubirane 72 h na 28 °C. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) ispitivanih ekstrakata i jedinjenja **1** i **3** je određena kao najniža korišćena bez vidljivog rasta koji je detektovan binokularnim mikroskopom. Zatim, minimalne fungicidne koncentracije su određene serijskom reinokulacijom (2 $\mu$ L) u mikrotitarske ploče koje su sadržale 100  $\mu$ L MEB. Najniža koncentracija bez otkrivenog vidljivog rasta gljivica je definisana kao minimalna fungicidna aktivnost (MFC) i ona ukazuje da ta koncentracija uzorka dovodi do 99,5% smrtnosti gljiva u odnosu na početni inokulum. Komercijalno dostupan fungicid flukonazol je korišćen kao pozitivna proba.

### 3.5. Spektralni podaci izolovanih jedinjenja (1–8 i 14–47)

#### 24-Metilencikloartan-3-ol (1)

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20} +31,0$  (c 0,10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  220 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3399, 3034, 2933, 1711, 1642, 1096, 1023  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 10**; EI/MS  $m/z$  (int. %) 440 (26), 425 (55), 407 (87), 216 (100), 203 (91), 201 (74).

#### 24-Metilencikloartan-3,28-diol (2)

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20} +22,2$  (c 0,05, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  221 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3387, 3030, 2938, 1712, 1645, 1100, 1020  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 10**.

#### 3 $\beta$ -Benzoiloksi-13 $\alpha$ -dodekanoiloksiingenol (3)

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20} +6,0$  (c 0,15, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  218, 274 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3021, 2952, 2925, 1739, 1715, 1652, 1261, 1112, 1049  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 11**; HRESIMS  $m/z$  651,3897  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{39}\text{H}_{55}\text{O}_8^+$  651,3891).

#### 3 $\beta$ ,13 $\alpha$ ,17-Tribenzoiloksiingenol (4)

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20} +12,8$  (c 0,14, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  220, 278 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3481, 3068, 2963, 2929, 1739, 1718, 1650, 1273, 1110  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 11**; HRESIMS  $m/z$  693,2682  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{41}\text{H}_{41}\text{O}_{10}^+$  693,2694).

#### 20-Benzoiloksi-13 $\alpha$ -izovaleriloksi-12-deoksiforbol (5)

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20} +29,0$  (c 0,10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  200, 233 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3387, 3,63, 2958, 2929, 1707, 1625, 1234, 1020  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 12**; HRESIMS  $m/z$  537,2854  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{O}_7^+$  537,2847).

### **20-Acetiloksi-13 $\alpha$ -izovaleriloksi-12-deoksiforbol (6)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20} +38,2$  (c 0,11, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  192, 245 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3401, 2958,1 2873, 1734, 1707, 1628, 1234, 1100  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 12**; HRESIMS  $m/z$  497,2510  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_7\text{Na}^+$  497,2510).

### **20-Benzoiloksi-13 $\alpha$ -izovaleriloksi-4,12-dideoksiforbol (7)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20} +13,6$  (c 0,10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  198, 231 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3380, 3065, 2932, 2865, 1705, 1621, 1605, 1264, 1100  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 12**; HRESIMS  $m/z$  521,2911  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{O}_6^+$  521,2898).

### **13 $\alpha$ ,20-Dibenzoiloksi-4,12-dideoksiforbol (8)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20} +10,0$  (c 0,10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  196, 233 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3386, 3063, 2929, 1710, 1630, 1270, 1102  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 12**; HRESIMS  $m/z$  541,2586  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{34}\text{H}_{37}\text{O}_6^+$  541,2585).

### **3 $\beta$ ,5 $\beta$ -Dibenzoiloksi-20-deoksiingenol (14)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20} +12,6$  (c 0,10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  195, 233 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3019, 2950, 1737, 1715, 1650, 1255, 1110, 1045  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 19**; HRESIMS  $m/z$  563,2410  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{O}_7\text{Na}^+$  563,2409).

### **3 $\beta$ ,5 $\beta$ ,20-Tribenzoiloksiingenol (15)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20} +9,6$  (c 0,10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  195, 230 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3023, 2956, 1730, 1710, 1652, 1257, 1115, 1049  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 19**; HRESIMS  $m/z$  683,2410  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{41}\text{H}_{40}\text{O}_8\text{Na}^+$  683,2615).

### **Skoparon (16)**

Amorfna, čvrsta supstanca, blede žute boje;  $[\alpha]_D^{20} +33,0$  (c 0,10, aceton); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  202, 228, 291, 343 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3022, 2994, 1712, 1645, 1463, 1280  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR 7,61 (d; 9,5; 1H), 6,86 (s, 1H), 6,85 (s, 1H), 6,28 (d; 9,5; 1H), 3,96 (s; 3H), 3,92 (s; 3H); EI/MS  $m/z$  (int. %) 206 (100), 191 (40), 178 (13), 163 (18), 135(10).

### **20-Benzoiloksi-13 $\alpha$ -izobutanoiloksi-4,12-dideoksiforbol (17)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20} +5,0$  (c 0,10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  218 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3385, 3062, 2960, 1710, 1628, 1234, 1022  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 20**; HRESIMS  $m/z$  524,3007  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{O}_6\text{N}^+$  524,3007).

### **20-Benzoiloksi-13 $\alpha$ -izobutanoiloksi-4-*epi*-4,12-dideoksiforbol (18)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20} -8,0$  (c 0,10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  218 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3379, 3058, 2964, 1711, 1630, 1601, 1263, 1101  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 20**; HRESIMS  $m/z$  507,2741  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{O}_6^+$  507,2741).

### **3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,15 $\beta$ -Triacetiloksi-2 $\alpha$ -hidroksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksijatropa-6(17),11*E*-dien-14-on (19)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20} -7,1$  (c 0,10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  221, 225 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  2971, 2880, 1733, 1242, 1030  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 23**; HRESIMS  $m/z$  600,2803  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{O}_{10}\text{N}^+$  600,2803).

### **2 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Triacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diizobutanoiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksijatropa-6(17),11*E*-dien-14-on (20)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20} +22,0$  (c 0,10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  219, 264 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  2930, 1736, 1370, 1239, 1154  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 24**; HRESIMS  $m/z$  772,3557  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{O}_{14}\text{N}^+$  772,3557).

**2 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Triacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-9 $\alpha$ -nikotiloksi-3 $\beta$ -propanoiloksijatrofa-6(17),11*E*-dien-14-on (21)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20} +17,5$  (c 0,20, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  219, 261 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  2975, 2932, 1731, 1234, 1150, 1027  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 23** HRESIMS  $m/z$  758,3368  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{39}\text{H}_{52}\text{O}_{14}\text{N}^+$  758,3382).

**5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -Triacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diizobutanoiloksi-2 $\alpha$ -nikotinoiloksijatrofa-6(17),11*E*-dien-14-on (22)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20} -31,8$  (c 0,20, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  219, 261 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  2976, 1737, 1236, 1114, 1032  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 23**; HRESIMS  $m/z$  772,3532  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{O}_{14}\text{N}^+$  772,3539).

**5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -Triacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-2 $\alpha$ -nikotinoiloksi-3 $\beta$ -propanoiloksijatrofa-6(17),11*E*-dien-14-on (23)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20} -42,1$  (c 0,10 MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  219, 261 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  2972, 1738, 1262, 1112, 1031  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 23**; HRESIMS  $m/z$  758,3375  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{39}\text{H}_{52}\text{O}_{14}\text{N}^+$  758,3382).

**5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Diacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksi-3 $\beta$ -propanoiloksijatrofa-6(17),11*E*-dien-14-on (24)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20} +31,0$  (c 0,10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  227, 264 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3445, 2926, 1738, 1278, 1240  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 24**; HRESIMS  $m/z$  700,3335  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izmereno za  $\text{C}_{37}\text{H}_{50}\text{O}_{12}\text{N}^+$  700,3328).

**5 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -Diacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-8 $\alpha$ -nikotinoiloksi-3 $\beta$ -propanoiloksijatrofa-6(17),11*E*-dien-14-on (25)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20} +13,3$  (c 0,10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  221, 261 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  2974, 1735, 1234, 1124, 1026  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 25**; HRESIMS  $m/z$  700,3331  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{37}\text{H}_{50}\text{O}_{12}\text{N}^+$  700,3328).



**5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Diacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diizobutanoiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksijatrofa-6(17),11E-dien-14-on (26)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20}$  +41,6 (c 0,10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  220, 261 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3444, 2971, 1735, 1276, 1241  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 24**; HRESIMS  $m/z$  714,3489  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{38}\text{H}_{52}\text{O}_{12}\text{N}^+$  714,3484).

**5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,15 $\beta$ -Triacetiloksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksi-3 $\beta$ -propanoiloksijatrofa-6(17),11E-dien-14-on (27)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20}$  +10,1 (c 0,10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  228, 272 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  2978, 1735, 1371, 1254, 1188  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 24**; HRESIMS  $m/z$  742,3439  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{39}\text{H}_{52}\text{O}_{13}\text{N}^+$  742,3433).

**3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Triacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksijatrofa-6(17),11E-dien-14-on (28)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20}$  +41,0 (c 0,10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  218, 261 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  2928, 1738, 1373, 1240, 1152  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 25**; HRESIMS  $m/z$  686,3184  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{36}\text{H}_{48}\text{O}_{12}\text{N}^+$  686,3171).

**5 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,15 $\beta$ -Triacetiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksi-3 $\beta$ -propanoiloksijatrofa-6(17),11E-dien-14-on (29)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20}$  -13,0 (c 0,10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  219, 261 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  2974, 1734, 1241, 1131, 1033  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 25**; HRESIMS  $m/z$  656,3063  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{O}_{11}\text{N}^+$  656,3065).

**3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,15 $\beta$ -Tetraacetiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksijatrofa-6(17),11E-dien-14-on (30)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20}$  +3,5 (c 0,30, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  221, 261 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  2972, 1736, 1237, 1140, 1032  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 25**; HRESIMS  $m/z$  728,3271  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{O}_{13}\text{N}^+$  728,3277).

**2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,15 $\beta$ ,17**-Pentaacetiloksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksijatrofa-5*E*,  
11*E*-dien-14-on (31)

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20}$  -8,0 (c 0,10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  218, 261 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3447, 2931, 1737, 1231, 1056  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 26**; HRESIMS  $m/z$  786,3346  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{40}\text{H}_{52}\text{O}_{15}\text{N}^+$  786,3331).

**2 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,15 $\beta$ ,17**-Tetraacetiloksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksijatrofa-3 $\beta$ -propa-  
noiloksi-5*E*,11*E*-dien-14-on (32)

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20}$  -17,0 (c 0,10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  217, 263 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  2976, 1738, 1370, 1240, 1102  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 26**; HRESIMS  $m/z$  822,3316  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{41}\text{H}_{53}\text{O}_{15}\text{NNa}^+$  822,3307).

**2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,15 $\beta$ ,17**-Pentaacetiloksi-8 $\alpha$ -benzoiloksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksijatrofa-5*E*,11*E*-  
dien-14-on (33)

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20}$  -14,0 (c 0,10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  229, 266 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3108, 2924, 1736, 1367, 1243, 1104  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 26**; HRESIMS  $m/z$  807,3196  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{41}\text{H}_{52}\text{O}_{15}\text{Na}^+$  807,3198).

**(3*S*,24*R*)-Tirukal-7-en-3,24,25-triol (34)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20}$  -4,0 (c 0,10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  221 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3397, 3033, 2958, 2930, 2874, 1688, 1459, 1029  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 27**. HRESIMS  $m/z$  461,3980  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{30}\text{H}_{53}\text{O}_3$  461,3989).

**(3*S*,24*S*)-Tirukal-7-en-3,24,25-triol (35)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20}$  -15,0 (c 0,10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  227nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3393, 2957, 2929, 1704, 1658, 1459, 1066, 1029  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 27**. HRESIMS  $m/z$  461,3972  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{30}\text{H}_{53}\text{O}_3$  461,3989).

**12 $\beta$ -Benzoiloksi-13 $\alpha$ -izobutanoiloksi-4-*epi*-4,20-dideoksiforbol (36)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20}$  -38,2 (c 0,27, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  207, 234 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  2974, 1734, 1238, 1121, 1019  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 28**; HRESIMS  $m/z$  507,2737  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{O}_6^+$  507,2741).

**12 $\beta$ -Acetiloksi-13 $\alpha$ -izobutanoiloksi-4-*epi*-4,20-dideoksiforbol (37)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20}$  +7,8 (c 0,18, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  203, 234 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  2968, 1733, 1238, 1127, 1022  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 28**; HRESIMS  $m/z$  445,2581  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{O}_6^+$  445,2590).

**12 $\beta$ -Benzoiloksi-13 $\alpha$ -izovaleriloksi-4-*epi*-4,20-dideoksiforbol (38)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20}$  +9,9 (c 0,07, aceton); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  201, 232 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  2974, 1735, 1230, 1122, 1020  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 28**; HRESIMS  $m/z$  521,2889  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{O}_6^+$  521,2898).

**12 $\beta$ -Acetiloksi-13 $\alpha$ -izovaleriloksi-4-*epi*-4,20-dideoksiforbol (39)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20}$  +7,8 (c 0,28, aceton); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  210, 236 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  2969, 1731, 1233, 1129, 1022  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 29**; HRESIMS  $m/z$  459,2746  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{O}_6^+$  459,2741).

**13 $\alpha$ -Acetiloksi-12 $\beta$ -benzoiloksi-4-*epi*-4,20-dideoksiforbol (40)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20}$  -14,0 (c 0,10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  195, 231 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  2970, 1729, 1244, 1120, 1015  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 29**; HRESIMS  $m/z$  479,2424  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{O}_6^+$  479,2428).

**13 $\alpha$ -Acetiloksi-12 $\beta$ -benzoiloksi-4,20-dideoksiforbol (41)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20}$  +14,0 (c 0,10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  201, 231 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  2981, 1730, 1228, 1124, 1025  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 29**; HRESIMS  $m/z$  479,2433  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{O}_6^+$  479,2428).

**13 $\alpha$ ,20-Diacetiloksi-12 $\beta$ -(2'*E*,4'*E*-nonadienoiloksi)-4-*epi*-deoksiforbol (42)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20}$  -1,3 (c 0,08, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  199, 268 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  2974, 1733, 1235, 1126, 1024  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 30**; HRESIMS  $m/z$  605,3085  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{34}\text{H}_{47}\text{O}_8^+$  605,3085).

**13 $\alpha$ ,20-Diacetiloksi-12 $\beta$ -benzoiloksi-4-*epi*-4-deoksiforbol (43)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20}$  -27,3 (c 0,11, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  209, 237 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  2975, 1732, 1233, 1120, 1025  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 30**, HRESIMS  $m/z$  559,2297  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{O}_8\text{Na}^+$  559,2302).

**2 $\alpha$ ,7 $\beta$ -Diacetiloksi-5 $\alpha$ ,15 $\beta$ -dibenzoiloksi-3 $\beta$ -hidroksijatrofa-6(17),11*E*-dien-9,14-dion (44)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20}$  -266,3 (c 0,08, acetone); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  210, 236, 273 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  2974, 1736, 1230, 1121, 1023  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 31**, HRESIMS  $m/z$  697,2612  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{38}\text{H}_{43}\text{O}_{11}^+$  675,2800).

**3 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,15 $\beta$ -Triacetiloksi-2 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -dibenzoiloksidijatrofa-6(17),11*E*-dien-9,14-dion (45)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20}$  -68,8 (c 0,08, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  210, 234, 272 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  2976, 1734, 1235, 1122, 1021  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 31**, HRESIMS  $m/z$  717,2904  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (izračunato za  $\text{C}_{40}\text{H}_{45}\text{O}_{12}^+$  717,2906).

**Inoterpen C (46)**

Bezbojna, amorfna, čvrsta supstanca;  $[\alpha]_D^{20}$  +10,0 (c 0,23, acetone); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  208, 234, 272 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3450, 2946, 1702, 1666, 1028  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci u **Tabeli 32**.

## 4. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije ispitan je hemijski sastav sekundarnih metabolita biljnih vrsta *E. palustris* L., *E. lucida* Waldst. & Kit. i *E. nicaeensis* All. Za izolovanje sekundarnih metabolita korišćene su klasične i savremene hromatografske tehnike, dok je karakterizacija izolovanih metabolita izvršena primenom spektroskopskih i spektrometrijskih tehnika. Od ukupno četrdeset šest izolovanih metabolita, dvadeset sekundarnih metabolita je po prvi put okarakterisano kao prirodni proizvod u okviru ove doktorske disertacije.

Iz lateksa biljne vrste *E. palustris* izolovano je osam jedinjenja i to dva triperpena cikloartanskog tipa (**1** i **2**), dva diterpena ingenanskog tipa (**3** i **4**) i četiri diterpena tiglijanskog tipa (**5–8**). Od ukupnog broja izolovanih jedinjenja po prvi put su opisani tiglijanski derivati 20-benzoiloksi-13 $\alpha$ -izovaleriloksi-12-deoksiforbol (**5**), 20-acetiloksi-13 $\alpha$ -izovaleriloksi-12-deoksiforbol (**6**) i 13 $\alpha$ ,20-dibenzoiloksi-4,12-dideoksiforbol (**8**).

Iz biljne vrste *E. lucida* izolovano je ukupno devet terpena i jedan kumarin (**16**). Od ukupnog broja terpenskih derivata izolovan je jedan triperpen cikloartanskog tipa (**1**), tri derivata ingenana od kojih je 3 $\beta$ ,5 $\beta$ ,20-tribenzoiloksiingenol (**15**) prvi put opisan kao prirodni proizvod i pet derivata tiglijana od kojih je 20-benzoiloksi-13 $\alpha$ -izobutanoiloksi-4-*epi*-4,12-dideoksiforbol (**18**) po prvi put opisan.

Iz lateksa biljne vrste *E. nicaeensis* izolovana su dva triterpena (**34** i **35**) i petnaest diterpena jatrofanskog tipa. Od ukupnog broja izolovanih jatrofana po prvi put su opisani 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,15 $\beta$ -Triacetiloksi-2 $\alpha$ -hidroksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksijatrofa-6(17),11*E*-dien-14-on (**19**), 2 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -triacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksi-3 $\beta$ -propanoiloksijatrofa-6(17),11*E*-dien-14-on (**21**), 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diizobutanoiloksi-2 $\alpha$ -nikotinoiloksijatrofa-6(17),11*E*-dien-14-on (**22**), 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-2 $\alpha$ -nikotinoiloksi-3 $\beta$ -propanoiloksijatrofa-6(17),11*E*-dien-14-on (**23**), 5 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -diacetiloksi-15 $\beta$ -hidroksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksi-8 $\alpha$ -nikotinoiloksi-3 $\beta$ -propanoiloksijatrofa-6(17),11*E*-dien-14-on (**25**), 5 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,15 $\beta$ -triacetiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksi-3 $\beta$ -propanoiloksijatrofa-6(17),11*E*-dien-14-on (**29**) i 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,15 $\beta$ -tetraacetiloksi-9 $\alpha$ -nikotinoiloksi-7 $\beta$ -izobutanoiloksijatrofa-6(17),11*E*-dien-14-on (**30**).

Iz korena *E. nicaeensis* izolovano je ukupno jedanaest sekundarnih metabolita, od kojih samo jedan pripada triterpenima (**46**), a ostali diterpenima i to dva jatofanskim diterpenima a osam tiglijanskim diterpenima. Od ukupnog broja izolovanih jedinjenja po prvi put su opisani jatrofani *2 $\alpha$ ,7 $\beta$ -Diacetiloksi-5 $\alpha$ ,15 $\beta$ -dibenzoiloksi-3 $\beta$ -hidroksijatrofa-6(17),11*E*-dien-9,14-dion* (**44**) i *3 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,15 $\beta$ -triacetiloksi-2 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -dibenzoiloksi-6(17),11*E*-dien-9,14-dion* (**45**), kao i tiglijani *12 $\beta$ -benzoiloski-13 $\alpha$ -izovaleriloksi-4-*epi*-4,20-dideoksiforbol* (**38**), *12 $\beta$ -acetiloksi-13 $\alpha$ -izovaleriloksi-4-*epi*-4,20-dideoksiforbol* (**39**), *13 $\alpha$ -acetiloksi-12 $\beta$ -benzoiloksi-4-*epi*-4,20-dideoksiforbol* (**40**), *13 $\alpha$ -acetiloksi-12 $\beta$ -benzoiloksi-4,20-dideoksiforbol* (**41**), *13 $\alpha$ ,20-diacetiloksi-12 $\beta$ -(2'*E*,4'*E*-dekadienoiloksi)-4-*epi*-4-deoksiforbol* (**42**) i *13 $\alpha$ ,20-diacetiloksi-12 $\beta$ -benzoiloksi-4-*epi*-4-deoksiforbol* (**43**).

Antitumorski efekat jedinjenja **3** i **4** ispitivan je na pet humanih tumorskih ćelijskih linija: nesitnoćelijski karcinom pluća – NCI-H460 i NCI-H460/R, kolorektalni karcinom – DLD1 i DLD1-TxR i melanom – 518A2. Najosetljivije ćelije na dejstvo ovih supstanci su melanomi, zatim nesitnoćelijski karcinom pluća, a najveći stepen otpornosti pokazuju ćelije kolorektalnog karcinoma.

Inhibitorno dejstvo na P-gp ispitano je za jedinjenja **19**, **21–23**, **25**, **29** i **30**. Inhibicija P-gp-a ispitana je na MDR ćelijama humanog nesitnoćelijskog karcinoma pluća (NCI-H460/R) i humanog karcinoma debelog creva (DLD-TxR). Šest od sedam jedinjenja je pokazalo jače inhibitorno dejstvo od Dex-Verapamila koji je korišćen kao pozitivna proba. Najjaču inhibiciju pokazala su jedinjenja **29** i **30**, dok jedinjenje **19** nije pokazao značajnu P-gp inhibiciju.

Prilikom tretmana MDR ćelijske linije humanog nesitnoćelijskog karcinoma pluća proučen je i hemosenzitivišući potencijal jedinjenja **29** i **30** u kombinaciji sa doksorubicinom (DOX) i upoređen je njihov efekat sa kombinacijom DOX-Dex-Verapamil. Jedinjenja **29** i **30** izabrana su za ispitivanje zbog toga što jako inhibiraju P-gp, ali i zbog razlika u inhibiciji koju pokazuju posle 72 h (inhibitorno dejstvo jedinjenja **30** se smanjuje, dok se inhibitorno dejstvo jedinjenja **29** u koncentraciji 10  $\mu$ M zadržava i posle 72 h). Nijedno od ova dva jedinjenja nije ispoljilo citotoksično dejstvo u opsegu koncentracija 2,5–50  $\mu$ M. Na osnovu toga, može se zaključiti da tretman NCI-H460/R ćelija jedinjenjem **29**, odnosno **30** ne menja njihovu održivost i da

je njihov uticaj u potpunosti usmeren na inhibiciju P-gp-a. Prema tome, jedinjenja **29** i **30** ne ometaju citotoksični efekat sekundarno primenjenog leka, u ovom slučaju DOX-a.

Za izolovane eufodendrofane (**20**, **24**, **26–28**, **31–33**) ispitan je zaštitni uticaj na DNK humanih limfocita u poređenju sa alkilujućim agensom mitomicinom C (negativna kontrola) i amifostinom WR-2721 (pozitivna kontrola). Na osnovu dobijenih rezultata, svi ispitivani eufodendrofani imaju protektivni efekat na DNK humanih limfocita. Najslabiji protektivni efekat ispoljilo je jedinjenje **28** koje smanjuje zastupljenost mikronukleusa u odnosu na kontrolnu probu za 1,61% (pri koncentraciji 1,0 µg/mL) do 8,42% (za koncentraciju 4,0 µg/mL), dok su najveći protektivni efekat pokazala jedinjenja **20** i **26**. Ova dva jatrofana za najnižu ispitivanu koncentraciju (1 µg/mL) smanjuju broj mikronukleusa u odnosu na kontrolnu probu za 44,86% (jedinjenje **26**), tj. 43,53% (jedinjenje **20**).

## 5. LITERATURA

1. Webster GL. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. Ann Missouri Bot Gard. 1994; 81(1):33-144.
2. Heywood VH. Flowering plant families of the world. I izdanje. Oksford: Oxford University Press; 1978. 185-187p.
3. Webster GL. Classification of the Euphorbiaceae. Ann Missouri Bot Gard. 1994; 81(1):3-32.
4. Llamas KA. Tropical flowering plants: a guide to identification and cultivation. Portland, OR: Timber Press; 2003. 217-222p.
5. Mwine JT, Van Damme P. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. J Med Plants Res. 2011; 5(5):652-662.
6. Kojić M. Botanika. IV izdanje. Beograd: Naučna knjiga; 1989. 322-323p.
7. Aworinde DO, Nwoye DV, Jayeola AA, Olagoke AO, Ogundele AA. Taxonomic significant of foliar epidermis in some members of Euphorbiaceae family in Nigeria. Res J Bot. 2009; 4(1):17-28.
8. *Euphorbia* - a global inventory of the spurges [Internet]. PBI Euphorbia Project; c2012. About the genus *Euphorbia* [citirano 2019 sep 28]; [oko 14 ekrana]. Dostupno na: [www.euphorbiaceae.org/pages/about\\_euphorbia.html](http://www.euphorbiaceae.org/pages/about_euphorbia.html).
9. Janković M.M. i Nikolić V. U: Josifović M. (urednik), Flora SR Srbije, III tom, SANU, Beograd, 1972. 537p.
10. BioRas [Internet]. *Euphorbia angulata* Jacq.. [citirano 2019 sep 29]; [oko 3 ekrana]. Dostupno na: <http://www.bioras.petnica.rs/vrsta.php?id=25885>
11. BioRas [Internet]. *Euphorbia nicaeensis* [citirano 2019 sep 29]; [oko 3 ekrana]. Dostupno na: [www.bioras.petnica.rs/vrsta.php?id=25906](http://www.bioras.petnica.rs/vrsta.php?id=25906)
12. Malta Wild Plants [Internet]. *Euphorbia dendroides* (tree spurge) [citirano 2019 sep 6]; [oko 25 ekrana]. Dostupno na: [http://www.maltawildplants.com/EUPH/Euphorbia\\_dendroides.php](http://www.maltawildplants.com/EUPH/Euphorbia_dendroides.php)



13. Wikipedia [Internet]. Wikimedia Foundation; 2018. *Euphorbia trigona*; 2018 mar 22 [citirano 2019 sep 28]; [oko 2 ekrana]. Dostupno na: [http://en.wikipedia.org/wiki/Euphorbia\\_trigona](http://en.wikipedia.org/wiki/Euphorbia_trigona).
14. Jančić R, Lakušić B. Botanika farmaceutika. Beograd: Lento; 2017. 212p.
15. Hegi G. Illustrierte flora von Mittel-Europa. 1 Band. Pteridophyta, Gymnospermae und Monocotyledones. München: Verlag von J. F. Lehmann; 1906-1908. 177-178p.
16. Yakoub Zokian SA. Biosystematics of four species of *Euphorbia* L. grown in Baghdad University Campus - Jadiriya [disertacija]. [Bagdad]: University of Baghdad; 2011. 191p.
17. Simpson MG. Plant systematics. II izdanje. Amsterdam: Elsevier-Academic Press; 2010. 315-317p.
18. Takhtajan A. Flowering plants. II izdanje. Berlin: Springer Science + Business media B.V.; 2009. 288-289p.
19. Castelblanque L, Balaguer B, Marti C, Rodriguez JJ, Orozco M, Vera P. Novel insights into the organization of laticifer cells: a cell comprising a unified whole system. *Plant Physiol*. 2016; 172(2):1032-1044.
20. Fahn A. Plant anatomy. III izdanje. Oksford: Pergamon Press; 1972. 130-136p.
21. Deng YY, Qu B, Zhan ZL, Wang AQ, Zhou W, Jia MY, Hua J, Luo SH. Bioactive tiglane diterpenoids from the latex of *Euphorbia fischeriana*. *Nat Prod Res*. 2019; doi: 10.1080/14786419.2019.1616728
22. AS kaktusi [Internet]. Sukulentne mlečike – uvod [citirano 2019 sep 6]; [oko 4 ekrana]. Dostupno na: <http://www.askaktus.com/sukulentne-mlecike.html>
23. Fakunle CO, Connolly JD, Rycroft DS. The structure of enukokurin, a new jatrophone diterpenoid from the latex of *Euphorbia lateriflora*. *J Nat Prod*. 1989; 52(2):279-283.
24. Jadrantin M, Pešić M, Aljančić IS, Milosavljević SM, Todorović NM, Podolski-Renić A, Banković J, Tanić N, Marković I, Vajs VE, Tešević VV. Jatrophone diterpenoids from the latex of *Euphorbia dendroides* and their anti-P-glycoprotein activity in human multi-drug resistant cancer cell lines. *Phytochemistry*. 2013; 86:208-217.

25. Corea G, Fattorusso E, Lanzotti V, Taglialatela-Scafati O, Appendino G, Ballero M, Simon PN, Dumontet C, Di Pietrio A. Jatrophone diterpenes as P-glycoprotein inhibitors. First insights of structure-activity relationship and discovery of a new, powerful lead. *J Med Chem.* 2003; 46(15):3395-3402.
26. Esposito M, Nothias LF, Nedev H, Gallard JF, Leyssen P, Retailleau P, Costa J, Roussi F, Iorga BI, Paolini J, Litaudon M. *Euphorbia dendroides* latex as a source of jatrophone esters: Isolation, structural analysis, conformational study, and anti-CHIKV activity. *J Nat Prod.* 2016; 79(11):2873-2882.
27. Esposito M, Nim S, Nothias LF, Gallard JF, Rawal MK, Costa J, Roussi F, Prasad R, Di Pietro A, Paolini J, Litaudon M. Evaluation of jatrophone esters from *Euphorbia* spp. as modulators of *Candida albicans* multidrug transporters. *J Nat Prod.* 2017; 80(2):479-487.
28. Hua J, Liu Y, Xiao CJ, Jing SX, Luo SH, Li SH. Chemical profile and defensive function of the latex of *Euphorbia peplus*. *Phytochemistry.* 2017; 136:56-64.
29. Corea G, Fattorusso E, Lanzotti V, Taglialatela-Scafati O, Appendino G, Ballero M, Simon PN, Dumontet C, Di Pietro A. Modified jatrophone diterpenes as modulators of multidrug resistance from *Euphorbia dendroides* L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2003; 11:5221-5227.
30. Hua J, Liu YC, Jing SX, Luo SH, Li SH. Macrocyclic diterpenoids from the latex of *Euphorbia helioscopia*. *Nat Prod Commun.* 2015; 10(12):2037-2039.
31. Marco JA, Sanz-Cervera JF, Checa J, Palomares E, Fraga BM. Jatrophone and tiglane diterpenes from the latex of *Euphorbia obtusifolia*. *Phytochemistry.* 1999; 52: 479-485.
32. Avila L, Perez M, Sanchez-Duffhues G, Hernández-Galán R, Muñoz E, Cabezas F, Quiñones W, Torres F, Echeverri F. Effects of diterpenes from latex of *Euphorbia lactea* and *Euphorbia laurifolia* on human immunodeficiency virus type 1 reactivation. *Phytochemistry.* 2010; 71(2-3):243-248.
33. Daoubi M, Marquez N, Mazoir N, Benharref A, Hernández-Galán R, Muñoz E, Collado IG. Isolation of new phenylacetylglucosyl derivatives that reactivate HIV-1 latency and a novel spirotriterpenoid from *Euphorbia officinarum* latex. *Bioorg Med Chem.* 2007; 15(13):4577-4584.

34. Marco JA, Sanz-Cervera JF, Yuste A. Ingenane and lathyrane diterpenes from the latex of *Euphorbia canariensis*. *Phytochemistry*. 1997; 45(3):563-570.
35. Kinghorn DA. Characterization of an irritant 4-deoxyphorbol diester from *Euphorbia tirucalli*. *J Nat Prod*. 1979; 42(1):112-115.
36. Wang SY, Huang C, Sun RK, Lu LN, Liang HG, Gao L, Huang J, Wang JH, Yang BF. New tirucallane triterpenoids from the dried latex of *Euphorbia resinifera*. *Phytochem. Lett*. 2019; 29:220-224.
37. Seip EH, Hecker E. Lathyrane type diterpenoid esters from *Euphorbia characias*. *Phytochemistry*. 1983; 22(8):1791-1795.
38. Dagang W, Sorg B, Hecker E. Oligo- and macrocyclic diterpenes in Thymelaeaceae and Euphorbiaceae occurring and utilized in Yunnan (Southwest China). 6. Tiglane type diterpene esters from latex of *Euphorbia prolifera*. *Phytother Res*. 1994; 8(2):95-99.
39. El-Sherei MM, Islam WT, El-Dine RS, El-Toumy SA, Ahmed SR. Phytochemical investigation of the cytotoxic latex of *Euphorbia cooperi* N.E.Br. *Aust J Basic & Appl Sci*. 2015; 9(11):488-493.
40. Kinghorn AD, Evans FJ. Skin irritants of *Euphorbia fortissima*. *J Pharm Pharmacol*. 1975; 27:329-333.
41. Fürstenberger G, Hecker E. New highly irritant euphorbia factors from latex of *Euphorbia tirucalli* L. E. *Experientia*. 1977; 33:986-987.
42. González J, Pilar U, Barcala B, Cuadrado MJS, Marcos IS. Diterpenes from the latex of *Euphorbia broteri*. *Phytochemistry*. 1988; 27(1):207-212.
43. Goyal M, Sasmal D, Nagori BP. GCMS analysis and antimicrobial action of latex of *Euphorbia caducifolia*. *J Complement Med Res*. 2012; 1(2):119-123.
44. Zani CL, Marston A, Hamburger M, Hostettmann K. Molluscicidal milliamines from *Euphorbia milii* var. *hislopii*. *Phytochemistry*. 1993; 34(1):89-95.
45. Baloch IB, Baloch MK. Irritant and co-carcinogenic diterpene esters from the latex of *Euphorbia cauducifolia* L. *J Asian Nat Prod Res*. 2010; 12(7):600-613.
46. Baloch IB, Baloch MK, Saqib QN. Tumor-promoting diterpene esters from latex of *Euphorbia cauducifolia* L. *Helv Chim Acta*. 2005; 88(12):3145-3150.
47. Lin LJ, Marshall GT, Kinghorn AD. The dermatitis-producing constituents of *Euphorbia hermentiana* latex. *J Nat Prod*. 1983; 46(5):723-731.

48. Gewali MB, Hattori M, Tezuka Y, Kikuchi T, Namba T. Constituents of the latex *Euphorbia antiquorum*. *Phytochemistry*. 1990; 29(5):1625-1628.
49. Saleem U, Ahmad B, Hussain K, Ahmad M, Bukhari NI. Simultaneous quantification of quercetin, myricetin and kaempferol in extracts and latex of *Euphorbia helioscopia* using RP-HPLC. *Asian J Chem*. 2014; 26(22):7673-7676.
50. Afza N, Khan AQ, Malik A, Badar Y. Cyclocaducinol, a cycloartane type triterpene from *Euphorbia caducifolia*. *Phytochemistry*. 1989; 28(7):1982-1984.
51. Khan AQ, Rasheed T, Kazmi SNUH, Ahmed Z, Malik A. Cycloeuphordenol, a new triterpene from *Euphorbia tirucalli*. *Phytochemistry*. 1988; 27(7):2279-2281.
52. Giner JL, Berkowitz JD, Andersson T. Nonpolar components of the latex of *Euphorbia peplus*. *J Nat Prod*. 2000; 63(2):267-269.
53. Teresa JDP, Urones JG, Marcos IS, Basabe P, Cuadrado MJS, Moro RF. Triterpenes from *Euphorbia broteri*. *Phytochemistry*. 1987; 26(6):1767-1776.
54. Piyas M, Parveen M, Amin KMY. Neriifolione, a triterpene from *Euphorbia neriifolia*. *Phytochemistry*. 1997; 48(3):561-563.
55. Fernandez-Arche A, Saenz MT, Arroyo M, de la Puerta R, Garcia MD. Topical anti-inflammatory effect of tirucallol, a triterpene isolated from *Euphorbia lactea* latex. *Phytomedicine*. 2010; 17(2):146-148.
56. Mazoir N, Benharref A, Bailén M, Reina M, González-Coloma A. Bioactive triterpene derivatives from latex of two *Euphorbia* species. *Phytochemistry*. 2008; 69(6):1328-1338.
57. Geltman DV. Euphorbiaceae. U: Tzvelev NN, urednik. *Flora Europae Orientalis (Флора Восточной Европы)*. St. Petersburg: Mir i Semya-95 (Мир и семья-95);
58. Xu ZH, Sun J, Xu RS, Qin GW. Casbane Diterpenoids from *Euphorbia ebracteolata*. *Phytochemistry*. 1998; 49(1):149-151.
59. Shi QW, Su XH, Kiyota H. Chemical and pharmacological research of the plants in genus *Euphorbia*. *Chem Rev*. 2008; 108(10):4295-4327.
60. Murugan S, Anand R, Uma Devi P, Vidhya N, Rajesh KA. Efficacy of *Euphorbia milli* and *Euphorbia pulcherrima* on aflatoxin producing fungi (*Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*). *Afr J Biotechnol*. 2007; 6(6):718-719.
61. Hazareh M. Prostratin as a new therapeutic agent targeting HIV viral reservoirs. *Drug News Prospect*. 2005; 18(8): 496-500.

62. Fatope MO, Zeng L, Ohayaga JE, Shi G, McLaughlin JL. Selectively cytotoxic diterpenes from *Euphorbia poissonii*. *J Med Chem.* 1996; 39(4):1005-1008.
63. Lage H, Duarte N, Coburger C, Hilgeroth A, Ferreira MJU. Antitumor activity of terpenoids against classical and atypical multidrug resistant cancer cells. *Phytomedicine.* 2010; 17(6):441-448.
64. Berman B. New developments in the treatment of actinic keratosis: focus on ingenol mebutate gel. *Clin Cosmet Invest Dermatol.* 2012; 5:111-122.
65. Abdel-Fattah MR. The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. *Bot J Linn Soc.* 1987; 94(1-2):293-326.
66. Van Damme P.L.J. *Euphorbia tirucalli* for high biomass production. U: Pasternak D, Schlissel A, urednici. *Combating desertification with plants. Combating desertification with plants.* Boston, MA: Springer; 2001. 169-187p.
67. Van Damme P.L.J. *Euphorbia tirucalli* for high biomass production. U: Pasternak D, Schlissel A, urednici. *Combating desertification with plants. Combating desertification with plants.* Boston, MA: Springer; 2001. 169-187p.
68. Hirota M, Suttajit M, Suguri H, Endo Y, Shudo K, Wongchai V, Hecker E, Fujiki H. A new tumor promoter from the seed oil of *Jatropha curcas* L., an intramolecular diester of 12-deoxy-16-hydroxyphorbol. *Cancer Res.* 1988; 48(20):5800-5804.
69. Vogg G, Mattes E, Rothenburger J, Hertkorn N, Achatz S, Sandermann H Jr. Tumor promoting diterpenes from *Euphorbia leuconeura* L. *Phytochemistry.* 1999; 51(2):289-295.
70. Shlamovitz GZ, Gupta M, Diaz JA. A case of acute keratoconjunctivitis from exposure to latex of *Euphorbia tirucalli* (pencil cactus). *J Emerg Med.* 2009; 36(3):239-241.
71. Grujić-Injac B, Lajšić S. Terpeni. U: Nikolić M, urednik. *Hemija prirodnih proizvoda.* Niš: Univerzitet u Nišu; 1983. 325-329p.
72. Cataluña P, Rates SMK. The tradicional use of the latex from *Euphorbia tirucalli* Linnaeus (Euphorbiaceae) in the treatment of cancer in South Brazil. *Acta Hort.* 1999; 501:289-295
73. Gupta B, Srivastava RS, Goyal R. Therapeutic use of *Euphorbia thymifolia*: a review. *Pharmacogn Rev.* 2007; 1(2):299-304.

74. Botanical.com [Internet]. Spurges. [citirano 2019 sep 6]. [oko 8 ekrana]. Dostupno na: <https://botanical.com/botanical/mgmh/s/spurge84.html>.
75. Özbilgin S, Çitoğl GS. Uses of some *Euphorbia* species in traditional medicine in Turkey and their biological activities. Turk J Pharm Sci. 2012; 9(2):241-256.
76. Appendino G, Szallasi A. Euphorbium: modern research on its active principle, resiniferatoxin, review an ancient medicine. Life Sci. 1997; 60(10):681-696.
77. Kumar S, Malhotra R, Kumar D. *Euphorbia hirta*: Its chemistry, traditional and medicinal uses, and pharmacological activities. Pharmacogn Rev. 2010; 4(7):58-61.
78. Kim SJ, Jang YW, Hyung KE, Lee DK, Hyun KH, Park SY, Park ES, Hwang KW. Therapeutic effects of methanol extract from *Euphorbia kansui* Radix on imiquimod-induced psoriasis. Immunol Res. 2017; 2017:7052560, 17 pages.
79. Wärner C, Welk E, Durka W, Wittig B, Diekmann M. Biological flora of Central Europe: *Euphorbia palustris* L. Perspect Plant Ecol Syst. 2011; 13(1):57-71.
80. Rauh W. Die bildung von hypokotyl- und wurzelsprossen und ihre bedeutung für die wuchsformen der pflazen. Nova Act Leopold. 1937; 4:395-553.
81. BioRas [Internet]. *Euphorbia lucida* Waldst. & Kit. [citirano 2018 sep 29]; [oko 3 ekrana]. Dostupno na: [www.bioras.petnica.rs/vrsta.php?id=25902](http://www.bioras.petnica.rs/vrsta.php?id=25902)
82. Flóra [Internet]. *Euphorbia ludica* W. et K. [citirano 2019 sep 6]; [oko 6 ekrana]. Dostupno na: [www.dendeocse.hu/index.php?cl=flowers&task=simple&id=631](http://www.dendeocse.hu/index.php?cl=flowers&task=simple&id=631)
83. Haba H, Lavaud C, Harkat H, Alabdul Magid A, Marcourt L, Benkhaled M. Diterpenoids and triterpenoids from *Euphorbia guyoniana*. Phytochemistry. 2007; 68(9):1255-1260.
84. Wang LY, Wang NL, Yao XS, Miyata S, Kitanaka S. Diterpenes from the roots of *Euphorbia kansui* and their *in vitro* effects on the cell division of *Xenopus*. Chem Pharm Bull. 2003; 51(8):935-941.
85. Lu ZQ, Yang M, Zhang JQ, Chen GT, Huang HL, Guan SH, Ma C, Liu X, Guo DA. Ingenane diterpenoids from *Euphorbia esula*. Phytochemistry. 2008; 69(3):812-819.
86. Wang HB, Wang XY, Liu LP, Qin GW, Kang TG. Tigliane diterpenoids from the Euphorbiaceae and Thymelaeaceae families. Chem. Rev. 2015; 115:2975–3011.

87. Sulyok E, Vassas A, Rédei D, Dombi G, Hohmann J. Isolation and structure determination of new 4,12-dideoxyphorbol esters from *Euphorbia pannonica* Host. *Tetrahedron*. 2009; 65(20):4013-4016.
88. Krstić G, Anđelković B, Choi YH, Vajs V, Stević T, Tešević V, Gođevac D. Metabolic changes in *Euphorbia palustris* latex after fungal infection. *Phytochemistry*. 2016; 13:17-25.
89. Gotta H, Adolf W, Opferkuch HJ, Hecker E. On the active principles of the Euphorbiaceae, IX<sup>a</sup> ingenane type diterpene esters from five *Euphorbia* species. *Z Naturforsch B*. 1984; 39(5):683-694.
90. Opferkuch HJ, Adolf W, Sorg B, Kusumoto S, Hecker E. On the chemistry of ingenol, I ingenol and some of its derivatives. *Z Naturforsch B*. 1981; 36(7):878-887.
91. Adegosam EK. Coumarins and other components of *Afraegle paniculata*. *Phytochemistry*. 1973; 12(9): 2310-2312
92. Krstić G, Jadranin M, Todorović NM, Pešić M, Stanković T, Aljančić IS, Tešević VV. Jatrophone diterpenoids with multidrug-resistance modulating activity from the latex of *Euphorbia nicaeensis*. *Phytochemistry*. 2018; 148: 104-112.
93. Aljančić IS, Pešić MS, Milosavljević SM, Todorović NM, Jadranin MB, Milosavljević G, Povrenović DS, Banković JZ, Tanić NT, Marković ID, Ruzdijić SD, Vajs VE, Tešević VV. Isolation and biological evaluation of jatrophone diterpenoids from *Euphorbia dendroides*. *J Nat Pro*. 2011; 74 (7):1613-1620.
94. Corea G, Fattorusso E, Lanzotti V, Motti R, Simon PN. Structure-Activity Relationships for Euphocharacins A - L, a New Series of Jatrophone Diterpenes, as Inhibitors of Cancer Cell P-Glycoprotein. *Planta Med*. 2004; 70(7): 657-665.
95. Corea G, Fattorusso C, Fattorusso E, Lanzotti V. Amygdaloidins A–L, twelve new 13  $\alpha$ -OH jatrophone diterpenes from *Euphorbia amygdaloides* L. *Tetrahedron*. 2005; 61(18):4485-4494.
96. Sherman MM, Borris RP, Ogura M, Cordell GA, Farnsworth NR. 3S,24S,25-trihydroxytirucall-7-ene from *Ailanthus excelsa*. *Phytochemistry*. 1980; 19:1499-1501.

97. Shan WG, Gao ZL, Ying YM, Xiang JG, Wang FS, Zhan ZJ. Tirucallane-Type Triterpenoids from *Celastrus stylosus* Wall. *Helv. Chim. Acta.* 2014; 97:1526-1530.
98. Aichour S, Habu H, Benkhaled M, Harakat D, Lavaud C. Terpenoids and other constituents from *Euphorbia bupleuroides*. *Phytochemistry Letters.* 2014; 10:198–203.
99. Benmerache A, Alabdul Magid A, Labed A, Kabouche A, Voutquenne-Nazabadioko L, Hubert J, Morjani H, Kabouche Z. Isolation and characterisation of cytotoxic compounds from *Euphorbia clementei* Boiss. *Nat Prod Res.* 2017; 31(18):2091-2098.
100. Nakamura S, Iwami J, Matsuda H, Mizuno S, Yoshikawa M. Absolute stereostructures of inoterpenes A–F from sclerotia of *Inonotus obliquus*. *Tetrahedron.* 2009; 65(12):2443-2450.
101. Krstić G, Aljančić I, Stanković J, Cvetković M, Marin P, Janačković P, Tešević V. Leaf epicuticular waxes of eleven *Euphorbia* species (Euphorbiaceae) from the central Balkans: impact on chemotaxonomy. *Arch Biol Sci.* 2019; 71(1):21-26.
102. Krstić G, Jadranin M, Stanković M, Aljančić I, Vujisić Lj, Mandić B, Tešević V. Jatrophone Diterpenoids With Protective Effect on Human Lymphocytes DNA. *Nat Prod Comm.* 2019; 14(5):1-7.
103. Pešić M, Marković JZ, Janković D, Kanazir S, Marković ID, Rakić L, Ruždijić S. Induced Resistance in the Human Non Small Cell Lung Carcinoma (NCI-H460) Cell Line In Vitro by Anticancer Drugs, *J Chemother.* 2006; 18(1):66-73
104. Podolski-Renić A, Anđelković T, Banković J, Tanić N, Ruždijić S, Pešić M, The role of paclitaxel in the development and treatment of multidrug resistant cancer cell lines. *Biomed Pharmacother.* 2011; 65(5):345-353.
105. Pešić M, Marković JZ, Janković D, Kanazir S, Marković ID, Rakić L, Ruždijić S. Induced resistance in the human non small cell lung carcinoma (NCI-H460) cell line in vitro by anticancer drugs. *J. Chemother.* 2006; 18(1):66-73.
106. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res.* 1993; 285(1):35–44.



107. Countryman PI, Heddle JA. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res.* 1976; 41(2–3):321-32.
108. Fenech M. A mathematical model of the *in vitro* micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not specifically scored in binucleated cells or in cells that have completed one nuclear division. *Mutagenesis.* 2000; 15(4):329-336.
109. Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC. 2004: Introduction to food- and airborne fungi. Ponsé & Looyen, the Netherlands.
110. Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C. and Andersen, B. 2010: Food and Indoor Fungi. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, the Netherlands.
111. Six DL, De Beer ZW, Duong TA, Carroll AL, Wingfield MJ. Fungal associates of the lodgepole pine beetle, *Dendroctonus murrayanae*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2011; 100(2):231–244.
112. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* 1999; 41:95-98.
113. Daouk KD, Dagher MS, Sattout JE. Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. *J Food Protect.* 1995; 58:1147-1149.

## Biografija

Gordana B. Krstić rođena je 22. jula 1988. godine u Vranju. Osnovnu školu „Branko Radičević” i Gimnaziju „Bora Stanković” završila je u Vranju. Školske 2007/2008. upisala se na Hemijski fakultet u Beogradu. Diplomirala je 19. septembra 2011. sa prosečnom ocenom tokom studiranja 9,19 i ocenom 10 na završnom radu. Master studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je u oktobru 2011. godine i završila ih 20. septembra 2012. godine sa ocenom 10. Doktorske studije na Hemijskom fakultetu u Beogradu, pri Katedri za organsku hemiju, upisala je oktobra 2012. godine pod mentorstvom prof. dr Veleta Teševića i dr Milke Jadranin.

Od aprila 2013. godine bila je zaposlena je u Centru za hemiju NU IHTM kao istraživač pripravnik, a od marta 2014. godine zaposlena je na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao saradnik u nastavi. Od 2015. godine zaposlena je kao asistent na Katedri za organsku hemiju. Od 2013. godine angažovana je na projektu br. 172053 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja „Bioaktivni prirodni proizvodi samoniklih, gajenih i jestivih biljaka: određivanje strukture i aktivnosti” (2011– ). Od 2015–2020. godine angažovana je na projektu međuakademijske saradnje između Bugarske akademije nauka (BAN) i Srpske akademije nauka i umetnosti (SANU) „Sekundarni metaboliti divlje-rastućih i kultivisanih biljaka sa potencijalnom biološkom aktivnošću”. Učesnik je na međunarodnom OPCW projektu pod nazivom „Razvoj automatizovanih GC-MS i LC-MS metoda zasnovanih na mikroekstrakciji na pakovanom sorbentu (MEPS) za potrebe OPCW testova stručnosti laboratorija, kao i terenskih analiza”.

Dobitnik je nagrade „Fonda za mlade talente“ 2005. godine, za osvojeno 2. mesto na međunarodnoj Bios Olimpijadi u Sankt Petersburgu 2005. godine. Bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja od 2005-2012. godine. Dobitnik je specijalnog priznanja Srpskog hemijskog društva za izuzetan uspeh tokom studiranja na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Stručni saradnik je u Istraživačkoj stanici Petnica od 2011 godine do danas.

U okviru svog dosadašnjeg naučnoistraživačkog rada bavila se hemijom sekundarnih metabolita biljaka, spektroskopskim i hromatografskim tehnikama analize organskih jedinjenja.

## Objavljeni radovi i saopštenja koja čine deo disertacije

### 1) Objavljeni radovi:

1. **Gordana Krstić**, Boban Anđelković, Young Hae Choi, Vlatka Vajs, Tatjana Stević, Vele Tešević, Dejan Gođevac, Metabolic changes in *Euphorbia palustris* latex after fungal infection, *Phytochemistry* (2016), 131, 17-25; (M21) IF2016=3,205; <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.08.005>

2. **Gordana Krstić**, Milka Jadranin, Nina M. Todorović, Milica Pešić, Tijana Stanković, Ivana S. Aljančić, Vele V. Tešević, Jatrophone diterpenoids with multidrug-resistance modulating activity from the latex of *Euphorbia nicaeensis*. *Phytochemistry* (2018), 148, 104-112; (M21) IF2016=3,205; <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.01.016>

3. **Gordana Krstić**, Ivana Aljančić, Jovana Stanković, Mirjana Cvetković, Petar Marin, Peđa Janačković, Vele Tešević, Leaf epicuticular waxes of eleven *Euphorbia* species (Euphorbiaceae) from the central Balkans: impact on chemotaxonomy. *Archives of Biological Sciences* (2019), 71 (1), 21-26; (M23) IF2017=0,648; <https://doi.org/10.2298/ABS180608041K>

4. **Gordana Krstić**, Milka Jadranin, Miroslava Stanković, Ivana Aljančić, Ljubodrag Vujisić, Boris Mandić, Vele Tešević, Jatrophone Diterpenoids With Protective Effect on Human Lymphocytes DNA. *Natural Product Communications* (2019) 14(5), (M23) IF2017=0,809 <https://doi.org/10.1177/1934578X19848168>

### 2) Saopštenja:

1. **Gordana B. Krstić**, Ivana V. Sofrenić, Mirjana T. Cvetković, Jovana M. Stanković, Izolovanje i određivanje strukture diterpena jatrofanskog tipa iz biljne vrste *Euphorbia glareosa* L., III Konferencija mladih hemičara, postersko saopštenje, 24.10.2015., Beograd (M34).

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Гордана Б. Крстић

Број индекса ДХ36/2012

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Испитивање хемијског састава секундарних метаболита одабраних биљних врста  
рода *Euphorbia*”.

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

### Потпис аутора

У Београду, 18.11.2019.

Гордана Крстић

Образац 6.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Гордана Б. Крстић

Број индекса ДХ36/2012

Студијски програм доктор хемијских наука

Наслов рада Испитивање хемијског састава секундарних метаболита одабраних биљних врста рода *Euphorbia*

Ментор проф. др. Веле Тешевић и др Милка Јадранин

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

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

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

**Потпис аутора**

У Београду, 18.11.2019.

Гордана Крстић

## Изјава о коришћењу

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

Испитивање хемијског састава секундарних метаболита одабраних

---

биљних врста рода *Euphorbia*

---

која је моје ауторско дело.

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

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

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, 18.11.2019.

Ђордана Крајић

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

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

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

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

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

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