



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ



Милица Д. Нешић

**СЕКУНДАРНИ МЕТАБОЛИТИ ОДАБРАНИХ
ВРСТА РОДА *VUPLEURUM* L. (APIACEAE):
ИЗОЛОВАЊЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЈА И
БИОЛОШКА АКТИВНОСТ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ниш, 2025.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS



Milica D. Nešić

**SECONDARY METABOLITES OF SELECTED
TAXA OF THE GENUS *BUPLEURUM* L.
(APIACEAE): ISOLATION, IDENTIFICATION
AND BIOLOGICAL ACTIVITY**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2025.



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ



Милица Д. Нешић

**СЕКУНДАРНИ МЕТАБОЛИТИ
ОДАБРАНИХ ВРСТА РОДА *VURPLEURUM*
L. (ARIACEAE): ИЗОЛОВАЊЕ,
ИДЕНТИФИКАЦИЈА И БИОЛОШКА
АКТИВНОСТ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Текст ове докторске дисертације ставља се на увид јавности,
у складу са чланом 30., став 8. Закона о високом образовању
("Сл. гласник РС", бр. 76/2005, 100/2007 – аутентично тумачење, 97/2008, 44/2010,
93/2012, 89/2013 и 99/2014)

НАПОМЕНА О АУТОРСКИМ ПРАВИМА:

Овај текст сматра се рукописом и само се саопштава јавности (члан 7. Закона о ауторским и сродним правима, "Сл. гласник РС", бр. 104/2009, 99/2011 и 119/2012).

Ниједан део ове докторске дисертације не сме се користити ни у какве сврхе, осим за упознавање са њеним садржајем пре одбране дисертације.

Ниш, 2025.



ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ НИШ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални/графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Милица Нешић
Ментор, МН:	Нико Радуловић
Наслов рада, НР:	Секундарни метаболити одабраних врста рода <i>Bupleurum</i> L. (Apiaceae): изоловање, идентификација и биолошка активност
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	српски
Земља публикација, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2025.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО:	9 поглавља, 276 страна, 296 цитата, 26 табеле, 55 слика, 9 шеме, 72 прилога
Научна област, НО:	Хемија
Научна дисциплина, НД:	Органска хемија и биохемија, органске синтезе
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	<i>Bupleurum</i> , екстракт, етарско уље, полинезасићени естри, лигнани, макролид, флороглуцинол, спинска симулација, NMR, GC-MS, хроматографија, <i>Moshers</i> - ови естри
УДК	(582.794.1 : 577.13) : (54.061 + 615.322)
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	Експериментални део је урађен у Лабораторији за органску анализу и синтезу, Департман за хемију, Природно-математички факултет, Универзитет у Нишу.
Извод, ИЗ:	У овој докторској дисертацији извршена је фитохемијска анализа секундарних метаболита одабраних врста рода <i>Bupleurum</i> L. (Apiaceae), са циљем изоловања, идентификације и евалуације биолошке активности мање поларних метаболита. Истраживање је обухватило детаљну хемијску анализу диетил- етарских екстраката врста <i>B. praealtum</i> , <i>B. veronense</i> , <i>B. falcatum</i> и <i>B. sibthorpiatum</i> , као и етарских уља врста <i>B. praealtum</i> и <i>B. affine</i> . Применом <i>dry-flash</i> хроматографије, GC-MS-анализе и NMR-спектроскопије, изоловано је и структурно окарактерисано шеснаест нових једињења, укључујући велики број полинезасићених метаболита (угљоводоник, естри, γ-бутиролактон и макролид), лигнан и дериват флороглуцинола. У екстракту врсте <i>B. praealtum</i> идентификована су четири нова полинезасићена естра, нови полинезасићени γ-бутиролактон и један нови лигнан – 7-оксоарцитин. Из екстракта врсте <i>B. veronense</i> изолован је нови макролид (хомодихидрофалкаринолд), полиензасићени веронаестар и дериват флороглуцинола, док су у врстама <i>B. falcatum</i> и <i>B. sibthorpiatum</i> детектована три нова полинезасићена алифатична естра и нови полинезасићени угљоводоник. Етарска уља <i>B. praealtum</i> и <i>B. affine</i> анализирани су GC-MS-методом, при чему је идентификовано укупно 230 једињења. У оба уља доминирају сесквитерпенси угљоводоници, док је уље <i>B. affine</i> било окарактерисано и високом концентрацијом алкана. По први пут је идентификован перилл-2-метилбутаноат (чији је идентитет потврђен синтезом), као и два нова природна ацетатна естра (4-децил-ацетат и 4-ундецил-ацетат). За одабрана једињења испитан је њихов ефекат на примарне имуне ћелије пацова (макрофаги и спленоцити), при чему су показала двојаку активност у зависности од концентрације, уз изражену имуномодулаторну селективност. Добијени резултати доприносе разумевању хемијске разноликости рода <i>Bupleurum</i> и потврђују његов таксономски и фармаколошки потенцијал.
Датум прихватања теме, ДП:	16.07.2020.
Датум одбране, ДО:	}
Чланови комисије, КО:	Председник: др Милан Декић, ванредни професор Члан: др Марија Генчић, ванредни професор Члан: др Ирена Раца, научни сарадник Члан: др Павле Ранђеловић, ванредни професор Члан, ментор: др Нико Радуловић, редовни професор



ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ НИШ

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :											
Identification number, INO :											
Document type, DT :	monograph										
Type of record, TR :	textual/graphic										
Contents code, CC :	doctoral dissertation										
Author, AU :	Milica Nešić										
Mentor, MN :	Niko Radulović										
Title, TI :	Secondary metabolites of selected taxa of the genus <i>Bupleurum</i> L. (Apiaceae): isolation, identification and biological activity										
Language of text, LT :	Serbian										
Language of abstract, LA :	English										
Country of publication, CP :	Serbia										
Locality of publication, LP :	Serbia										
Publication year, PY :	2025										
Publisher, PB :	author's reprint										
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.										
Physical description, PD :	9 chapters, 276 pages, 296 references, 55 figures, 26 tables, 9 schemes, 72 appendices										
Scientific field, SF :	Chemistry										
Scientific discipline, SD :	Organic chemistry and biochemistry, organic synthesis										
Subject/Key words, SIKW :	<i>Bupleurum</i> , extract, essential oil, polyunsaturated esters, lignans, macrolide, phloroglucinol, spin simulation, NMR, GC-MS, chromatography, Mosher's esters										
UC	(582.794.1 : 577.13) : (54.061 + 615.322)										
Holding data, HD :	library										
Note, N :	The experimental part of this dissertation was done in the Laboratory of organic analysis and synthesis, Department of Chemistry, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš.										
Abstract, AB :	In this doctoral dissertation, a phytochemical study of the secondary metabolites of selected species of the genus <i>Bupleurum</i> L. (Apiaceae) was undertaken with the goals of isolating, identifying and evaluating the biological activity of the less-polar metabolites. The study encompassed a detailed chemical investigation of diethyl-ether extracts of <i>B. praealtum</i> , <i>B. veronense</i> , <i>B. falcatum</i> and <i>B. sibthorpiatum</i> , as well as the essential oils of <i>B. praealtum</i> and <i>B. affine</i> . Using dry-flash chromatography, GC-MS analysis and NMR spectroscopy, sixteen new compounds were isolated and structurally characterized. These include a large cohort of polyunsaturated metabolites—a hydrocarbon, several esters, a γ -butyrolactone and a macrolide—together with one lignan and one phloroglucinol derivative. In the extract of <i>B. praealtum</i> , four new polyunsaturated esters, a new polyunsaturated γ -butyrolactone and one new lignan, 7-oxoartin, were identified. From <i>B. veronense</i> , a new macrolide (homodihydrofalcarinolide), a polyunsaturated veronaester and a phloroglucinol derivative were obtained. In <i>B. falcatum</i> and <i>B. sibthorpiatum</i> , three new polyunsaturated aliphatic esters and one new polyunsaturated hydrocarbon were detected. The essential oils of <i>B. praealtum</i> and <i>B. affine</i> were analyzed by GC-MS, revealing a total of 230 constituents. Sesquiterpene hydrocarbons predominated in both oils, while the oil of <i>B. affine</i> was also notable for a high content of alkanes. For the first time, perillyl 2-methyl-butanoate (its identity confirmed by synthesis) was detected, along with two new natural acetate esters – 4-decyl acetate and 4-undecyl acetate. Selected compounds were assayed against primary rat immune cells (macrophages and splenocytes). They displayed concentration-dependent, bidirectional activity with marked immunomodulatory selectivity. These findings broaden current knowledge of the chemical diversity within <i>Bupleurum</i> , underscoring its taxonomic and pharmacological potential.										
Accepted by the Scientific Board on,	July 16 th , 2020										
Defended on, DE :											
Defended Board, DB :	<table border="1"> <tr> <td>President:</td> <td>PhD Milan Dekić, Associate Professor</td> </tr> <tr> <td>Member:</td> <td>PhD Marija Genčić, Associate Professor</td> </tr> <tr> <td>Member:</td> <td>PhD Irena Raca, Research Associate</td> </tr> <tr> <td>Member:</td> <td>PhD Pavle Ranđelović, Associate Professor</td> </tr> <tr> <td>Member, Mentor:</td> <td>PhD Niko Radulović, Full Professor</td> </tr> </table>	President:	PhD Milan Dekić, Associate Professor	Member:	PhD Marija Genčić, Associate Professor	Member:	PhD Irena Raca, Research Associate	Member:	PhD Pavle Ranđelović, Associate Professor	Member, Mentor:	PhD Niko Radulović, Full Professor
President:	PhD Milan Dekić, Associate Professor										
Member:	PhD Marija Genčić, Associate Professor										
Member:	PhD Irena Raca, Research Associate										
Member:	PhD Pavle Ranđelović, Associate Professor										
Member, Mentor:	PhD Niko Radulović, Full Professor										

Подаци о докторској дисертацији

Ментор: др Нико Радуловић, редовни професор, Универзитет у Нишу, Природно-математички факултет у Нишу, Департман за хемију

Наслов: Секундарни метаболити одабраних врста рода *Bupleurum* L. (Ariaceae): изоловање, идентификација и биолошка активност

Резиме: У овој докторској дисертацији извршена је фитохемијска анализа секундарних метаболита одабраних врста рода *Bupleurum* L. (Ariaceae), са циљем изоловања, идентификације и евалуације биолошке активности мање поларних метаболита. Истраживање је обухватило детаљну хемијску анализу диетил-етарских екстракта врста *B. praealtum*, *B. veronense*, *B. falcatum* и *B. sibthorpiatum*, као и етарских уља врста *B. praealtum* и *B. affine*. Применом *dry-flash* хроматографије, GC-MS-анализе и NMR-спектроскопије, изоловано је и структурно окарактерисано шеснаест нових једињења, укључујући велики број полинезасићених метаболита (угљоводоник, естри, γ -бутиролактон и макролид), лигнан и дериват флороглуцинола. У екстракту врсте *B. praealtum* идентификована су четири нова полинезасићена естра, нови полинезасићени γ -бутиролактон и један нови лигнан – 7-оксоарцитин. Из екстракта врсте *B. veronense* изолован је нови макролид (хомодихидрофалкаринолид), полиензасићени веронаестар и дериват флороглуцинола, док су у врстама *B. falcatum* и *B. sibthorpiatum* детектована три нова полинезасићена алифатична естра и нови полинезасићени угљоводоник. Етарска уља *B. praealtum* и *B. affine* анализирана су GC-MS-методом, при чему је идентификовано укупно 230 једињења. У оба уља доминирају сесквитерпенски угљоводоници, док је уље *B. affine* било окарактерисано и високом концентрацијом алкана. По први пут је идентификован перилил-2-метилбутаноат (чији је идентитет потврђен синтезом), као и два нова природна ацетатна естра (4-децил-ацетат и 4-ундецил-ацетат). За одабрана једињења испитан је њихов ефекат на примарне имуне ћелије пацова (макрофаги и спленоцити), при чему су показала двојаку активност у зависности од концентрације, уз изражену имуномодулаторну селективност. Добијени резултати доприносе разумевању хемијске разноликости рода *Bupleurum* и потврђују његов таксономски и фармаколошки потенцијал.

Научна област: Хемија
Научна дисциплина: Органска хемија и биохемија, органске синтезе

Кључне речи: *Bupleurum*, екстракт, етарско уље, полинезасићени естри, лигнани, макролид, флороглуцинол, спинска симулација, NMR, GC-MS, хроматографија, Mosher-ови естри

УДК: (582.794.1 : 577.13) : (54.061 + 615.322)

CERIF
класификација:

P 003 Хемија, P 004 Биохемија, метаболизам, P 390 Органска
хемија, P 300 Аналитичка хемија

Тип лиценце
Креативне
заједнице:

Одабрани тип лиценце. Нпр: **CC BY-NC-ND**

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	PhD, Niko Radulović, University of Niš, Faculty of Sciences and Mathematics, Department of Chemistry
Title:	Secondary metabolites of selected taxa of the genus <i>Bupleurum</i> L. (Apiaceae): isolation, identification and biological activity
Abstract:	In this doctoral dissertation, a phytochemical study of the secondary metabolites of selected species of the genus <i>Bupleurum</i> L. (Apiaceae) was undertaken with the goals of isolating, identifying and evaluating the biological activity of the less-polar metabolites. The study encompassed a detailed chemical investigation of diethyl-ether extracts of <i>B. praealtum</i>, <i>B. veronense</i>, <i>B. falcatum</i> and <i>B. sibthorpiatum</i>, as well as the essential oils of <i>B. praealtum</i> and <i>B. affine</i>. Using dry-flash chromatography, GC–MS analysis and NMR spectroscopy, sixteen new compounds were isolated and structurally characterized. These include a large cohort of polyunsaturated metabolites—a hydrocarbon, several esters, a γ-butyrolactone and a macrolide—together with one lignan and one phloroglucinol derivative. In the extract of <i>B. praealtum</i>, four new polyunsaturated esters, a new polyunsaturated γ-butyrolactone and one new lignan, 7-oxoarctin, were identified. From <i>B. veronense</i>, a new macrolide (homodihydrofalcarinolide), a polyunsaturated veronaester and a phloroglucinol derivative were obtained. In <i>B. falcatum</i> and <i>B. sibthorpiatum</i>, three new polyunsaturated aliphatic esters and one new polyunsaturated hydrocarbon were detected. The essential oils of <i>B. praealtum</i> and <i>B. affine</i> were analyzed by GC–MS, revealing a total of 230 constituents. Sesquiterpene hydrocarbons predominated in both oils, while the oil of <i>B. affine</i> was also notable for a high content of alkanes. For the first time, perillyl 2-methyl-butanoate (its identity confirmed by synthesis) was detected, along with two new natural acetate esters—4-decyl acetate and 4-undecyl acetate. Selected compounds were assayed against primary rat immune cells (macrophages and splenocytes). They displayed concentration-dependent, bidirectional activity with marked immunomodulatory selectivity. These findings broaden current knowledge of the chemical diversity within <i>Bupleurum</i>, underscoring its taxonomic and pharmacological potential.
Scientific Field:	Chemistry
Scientific Discipline:	Organic chemistry and biochemistry, organic synthesis
Key Words:	<i>Bupleurum</i> , extract, essential oil, polyunsaturated esters, lignans, macrolide, phloroglucinol, spin simulation, NMR, GC-MS, chromatography, Mosher's esters
UDC:	(582.794.1 : 577.13) : (54.061 + 615.322)

CERIF
Classification: P 003 Chemistry, P 390 Organic chemistry, P 004 Biochemistry,
Metabolism, P 300 Analytical chemistry

Creative
Commons
License Type: Selected License Type. For example: **CC BY-NC-ND**

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije realizovan je u Laboratoriji za organsku analizu i sintezu, na Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, Univerziteta u Nišu.

Zahvaljujem se svom mentoru, profesoru dr Niku Raduloviću, na ukazanom poverenju, stručnom vođstvu, korisnim savetima i podršci tokom izrade disertacije i studija. Njegova posvećenost i spremnost da podeli znanje značajno su doprineli kvalitetu mog rada.

Zahvalna sam članovima komisije – prof. dr Milanu Dekiću, prof. dr Mariji Genčić, prof. dr Pavlu Randeloviću i naučnoj saradnici dr Ireni Raci – na izdvojenom vremenu, konstruktivnim sugestijama i komentarima koji su unapredili ovu disertaciju.

Posebnu zahvalnost dugujem Nikoli Stojanoviću na pomoći u sprovođenju bioloških ispitivanja, kao i pokojnom profesoru Vladimiru Randeloviću na stručnoj determinaciji biljnih vrsta i podršci u ranijim fazama istraživanja. Takođe, zahvalnost dugujem i prof. dr Mihi Bukleskom na prikupljanju biljnog materijala iz Makedonije.

Hvala mojim kolegama iz istraživačke grupe na pomoći, savetima i saradnji, kao i na kolegijalnosti i razumevanju tokom celokupnog rada.

Zahvaljujem se svojoj porodici na stalnoj podršci, razumevanju i strpljenju tokom studija i rada na disertaciji.

Na kraju, posebnu zahvalnost dugujem svom suprugu i kolegi Milanu Nešiću, čija su podrška, pomoć i motivacija bili ključni oslonac u toku izrade ove doktorske disertacije.

Oznake i skraćenice

Nomenklatura

Ac ili CH ₃ CO–	Acetil
Ar	Aril
Ara	Arabinoza
Fuc	Fruktoza
Glc	Glukoza
Me ili CH ₃	Metil-grupa
MeO ili CH ₃ O	Metoksi-grupa
<i>n</i>	Normalni niz
Ph	Fenil
R	Alkil
Rha	Ramnoza

Reagensi i rastvarači

CDCl ₃	Deuterisani hloroform
CD ₃ OD	Deuterisani metanol
(CD ₃) ₂ SO	Deuterisani dimetil-sulfoksid
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamid
Et ₃ N	Trietilamin
Et ₂ O	Dietil-etar
EtOAc	Etil-acetat
HEPES	4-(2-Hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina
MeCN	Acetonitril
MeOH	Metanol
MTPA	α -Metil- α -(trifluormetil)fenilsirćetna kiselina (<i>Mosher</i> -ova kiselina)
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromid
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartat
NR	<i>Netrual red</i> (Neutralno crveno, 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin-hidrohlorid)

Instrumenti i metode razdvajanja

Nuklearno-magnetna-rezonantna spektroskopija; Infracrvena spektroskopija; Ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija

$[\alpha]^{25}_D$	Optička rotacija
$[M]^{+}$	Molekulski jon
¹³ C NMR	<i>C-13 Nuclear Magnetic Resonance</i> (Nuklearna Magnetna Rezonanca ugljenika ¹³ C)
1D	Jednodimenzionalni
2D	Dvodimenzionalni

^1H NMR	<i>Proton Nuclear Magnetic Resonance</i> (Nuklearna Magnetna Rezonanca vodonika)
AMDIS	<i>Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System</i>
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i> (Oslabljenje totalne refleksije)
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
d	Dublet
dd	Dublet dubleta
ddd	Dublet dubleta dubleta
dddd	Dublet dubleta dubleta dubleta
dddddd	Dublet dubleta dubleta dubleta dubleta
ddt	Dublet dubleta tripleta
ddtd	Dublet dubleta tripleta dubleta
dtdd	Dublet tripleta dubleta dubleta
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DFT	<i>Density Functional Theory</i>
DLPNO-CCSD(T)	<i>Domain-based Local Pair Natural Orbital Coupled-Cluster with Single, Double, and Perturbative Triple excitations</i>
EIMS	<i>Electron Ionization Mass Spectrometry</i>
FID	<i>Free Induction Decay</i>
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Gasna hromatografija)
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Gasna hromatografija-masena spektrometrija)
GIAO	<i>Gauge Including Atomic Orbital</i>
gHMBC	<i>gradient Heteronuclear Multiple-bond Correlation spectroscopy</i> (Heteronuklearne korelacije spektroskopije preko više veza)
HREIMS	<i>High Resolution Electron Impact Mass Spectrometry</i> (Masena spektrometrija visokog razlaganja)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IR	<i>InfraRed Spectroscopy</i> (Infracrvena spektroskopija)
<i>J</i>	Konstanta kuplovanja
m	Multiplet
<i>m/z</i>	<i>Mass-to-charge-ratio</i> (Masa/naelektrisanje)
MS	<i>Mass spectrometry</i> (Masena spektrometrija)
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Nuklearna magnetna rezonancija)
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i> (Spektroskopije nuklearnog Overhauzerovog efekta)
q	Kvartet
qqd	Kvartet kvarteta dubleta
quint	Kvintet
RI	Retencioni indeks
s	Singlet
sept	Septet
t	Triplet

td	Triplet dubleta
TLC	<i>Thin-Layer Chromatography</i> (Tankoslojna hromatografija)
UV	<i>UltraViolet</i> (Ultraljubičasto)
UV-Vis	Ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija
δ	Hemijsko pomeranje u NMR-spektrima
δ_c	Hemijsko pomeranje u ^{13}C NMR-spektru
δ_H	Hemijsko pomeranje u ^1H NMR-spektru
$\Delta\delta$	Razlika hemijskih pomeranja
ε	Molarni apsorpcioni koeficijent
$\lambda_{\max}$	Talasna dužina koja odgovara maksimumu apsorpcije u UV-Vis-spektrima
$\nu_{\max}$	Talasni broj trake u infracrvenom spektru

Biološka aktivnost

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CEM	<i>Continuous Erythroleukemia Mononuclear cells</i>
c-JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
COX-2	<i>Cyclooxygenase-2</i> (Cikloksigenaza-2)
CYP716A	Podfamilija citohrom monooksigenaza
ERK 1/2	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2</i>
FAD2	<i>Fatty Acid Desaturase 2</i> (Desaturaza masnih kiselina)
HSP72	<i>Heat Shock Protein 72</i>
IKK	$\text{I}\kappa\text{B Kinase}$
IL	Interleukin
ITS	Interni transkribovani
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
mRNA	<i>messenger RiboNucleic Acid</i> (informaciona ribonukleinska kiselina)
NF- κB	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
PARP	<i>Poly(ADP-ribose) polymerase</i>
PPAR- γ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma</i>
rDNK	ribosomalna DezoksiriboNukleinska Kiselina
TGF- $\beta 1$	<i>Transforming Growth Factor beta 1</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
VEGFR2	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2</i>

Ostalo

et al.	<i>Et alia</i> (i drugi)
HiFSA	^1H <i>iterative Full Spin Analysis</i>
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
c	Koncentracija (g/L)
ppm	<i>Parts per million</i> (delova na milion)

SD	Standardna devijacija
<i>syn.</i>	Sinonim
v/v	<i>Volume/volume</i>
w/w	<i>Weight/weight</i>

Sadržaj:

1. Uvod i ciljevi rada	1
2. Opšti deo	6
2.1. Opšte karakteristike roda <i>Bupleurum</i> L.	7
2.2. Sekundarni metaboliti roda <i>Bupleurum</i>	11
2.2.1. Triterpenski saponini	11
2.2.2. Steroli	25
2.2.3. Poliacetileni	25
2.2.4. Lignani i fenilpropanoidi	31
2.2.5. Flavonoidi i hromoni	32
2.2.6. Kumarini	33
2.2.7. Druga jedinjenja	34
2.2.8. Isparljiva jedinjenja	34
2.3. Opšte karakteristike odabranih vrsta roda <i>Bupleurum</i>	63
2.3.1. <i>Bupleurum falcatum</i> L.	63
2.3.2. <i>Bupleurum affine</i> Sadler	66
2.3.3. <i>Bupleurum veronense</i> Turra	67
2.3.4. <i>Bupleurum praealtum</i> L.	68
2.4. Biološka aktivnost metabolita i ekstrakata vrsta roda <i>Bupleurum</i>	69
2.4.1. Antiinflamatorna aktivnost	69
2.4.2. Antiproliferativna aktivnost	71
2.4.3. Hepatoprotektivni efekat i antidepresivna svojstva	72
2.4.4. Antimikrobna aktivnost	72
2.4.5. Antikonvulzivna aktivnost	73
2.4.6. Smanjenje oštećenja bubrega	73
2.4.7. Antioksidativna aktivnost	74
2.4.8. Toksični efekti	74
2.5. Određivanje apsolutne konfiguracije Mosherov-om metodom u kombinaciji sa NMR- spektroskopijom	74
2.6. ¹ H NMR potpuna spinska simulacija	79
3. Eksperimentalni deo	84
3.1. Hemikalije i rastvarači	85
3.2. Metode analize i razdvajanja	85
3.2.1. Gasna hromatografija-masena spektrometrija (GC-MS)	85
3.2.2. Gasna hromatografija sa plameno-jonizacionim detektorom (GC-FID)	85
3.2.3. Nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija (NMR)	86
3.2.4. ¹ H NMR-potpuna spinska analiza	86

3.2.5. Infracrvena spektroskopija (IR)	86
3.2.6. Ultraljubičasta (UV) spektroskopija	86
3.2.7. Elementna mikroanaliza.....	87
3.2.8. Masena spektrometrija visokog razlaganja (HREIMS)	87
3.2.9. Optička rotacija.....	87
3.2.10. Tankoslojna hromatografija (TLC).....	87
3.2.11. <i>Dry-flash</i> hromatografija	87
3.2.12. Hromatografija na koloni	87
3.3. Biljni materijal i priprema uzoraka	88
3.3.1. Biljni materijal	88
3.3.2. Priprema ekstrakata.....	89
3.3.3. Dobijanje etarskog ulja	98
3.3.4. Opis sintetskih koraka.....	98
3.3.4.1. Identifikacija jedinjenja izolovanih iz ekstrakata vrsta <i>B. praealtum</i> i <i>B. veronense</i>	98
3.3.4.1.1. Konverzija jedinjenja 31 u 34	98
3.3.4.1.2. Metanoliza jedinjenja 31 i sinteza jedinjenja 32	98
3.3.4.1.3. Hidrogenizacija jedinjenja 36	99
3.3.4.1.4. Sinteza hlorida Mosher-ovih kiselina	99
3.3.4.1.5. Sinteza jedinjenja (R)- i (S)- 31a	99
3.3.4.1.6. Sinteza (R)-MTPA estara jedinjenja (R)- i (S)- 31a	99
3.3.4.1.7. Sinteza (R)-MTPA estra jedinjenja 31	100
3.3.4.1.8. Sinteza (R)- i (S)-MTPA estara jedinjenja 39	100
3.3.4.1.9. Sililovanje jedinjenja 39	101
3.3.4.2. Identifikacija jedinjenja izolovanih iz ekstrakata vrste <i>B. falcatum</i>	101
3.3.4.2.1. Sinteza jedinjenja 45 i 52–55	101
3.3.4.2.2. Redukcija tung ulja	102
3.3.4.2.3. Sinteza jedinjenja 44	102
3.3.4.3. Identifikacija jedinjenja detektovanih u etarskom ulju vrste <i>B. affine</i>	102
3.3.4.3.1. Sinteza perila-alkohola.....	102
3.3.4.3.2. Sinteza perilil-2-metilbutanoata i perilil-3-metilbutanoata.....	103
3.4. <i>In vitro</i> testovi na ćelijskim kulturama	104
3.4.1. Korišćeni lekovi i supstance	104
3.4.2. Eksperimentalne životinje.....	104
3.4.3. Priprema i kultura makrofaga i splenocita pacova.....	104
3.4.4. Određivanje ćelijske vijabilnosti.....	104
3.4.5. Funkcija lizozoma u makrofagima.....	105

3.4.6. Određivanje aktivnosti mijeloperoksidaze (MPO)	105
3.4.7. Statistička analiza.....	105
4. Rezultati i diskusija.....	106
4.1. Analiza hemijskog sastava dietil-etarskog ekstrakta vrste <i>B. praealtum</i>	107
4.2. Ispitivanje imunomodulatorne aktivnosti odabranih metabolita izolovanih iz vrste <i>B. praealtum</i>	122
4.3. Analiza hemijskog sastava ekstrakta vrste <i>B. veronense</i>	127
4.4. Analiza hemijskog sastava dietil-etarskog ekstrakta taksona <i>B. falcatum sensu lato</i> .137	
4.5. Analiza hemijskog sastava etarskih ulja vrsta <i>B. praealtum</i> i <i>B. affine</i>	153
5. Zaključak	166
6. Summary.....	170
7. Literatura.....	174
8. Prilog	189
9. Biografija i bibliografija.....	250

1. Uvod i ciljevi rada

Vrste roda *Bupleurum* L. (Apiaceae) koriste se u tradicionalnoj medicini većeg broja naroda, više od 2000 godina (Ashoura & Wink, 2011; Xie et al., 2009). Najpoznatija vrsta u ovom pogledu je *B. falcatum* L. čiji koren je jedan od važnih sastojaka kineskih narodnih lekova za poboljšanje imuniteta (Ashoura & Wink, 2011). Rod *Bupleurum* obuhvata oko 248 jednogodišnjih i višegodišnjih vrsta, podeljenih u dva podroda, rasprostranjenih na severnoj hemisferi. Svakako, u odnosu na *B. falcatum*, ostale vrste su manje ispitivane. Flora Evrope opisuje 33 jednogodišnje vrste ovog roda, koje su podeljene u dve sekcije: *Bupleurum* i *Aristata* (Snogerup & Snogerup, 2001). U Srbiji raste 15 vrsta ovog roda, najčešće u planinskim predelima do 2000 m nadmorske visine, dok se neke vrste Balkanskog poluostrva mogu naći u blizini morske obale (Nikolić, 1973).

Do sada je iz vrsta ovog roda izolovan ili identifikovan veći broj interesantnih jedinjenja, a za koja je pokazano da poseduju širok spektar bioloških aktivnosti (Chen et al., 2017; Fois et al., 2017; Yuan et al., 2017). Među sekundarnim metabolitima najraznovrsniji i najčešće izolovani su terpenoidi – saponini (Pistelli et al., 1993; 2005; Takeda & Kubota, 1958), poliketidi – poliacetileni (Hansen & Boll, 1986; Lin et al., 2016a) i metaboliti šikimatnog puta – lignani i kumarini (Estévez-Braun et al., 1992; 1995). Triterpenski saikosaponini predstavljaju najzastupljeniju klasu sekundarnih metabolita roda *Bupleurum*, čiji sadržaj u korenu može dostići i do 7% mase (Ashoura & Wink, 2011). Najveći broj izolovanih poliacetilena potiče iz biosintetskog puta koji takođe uključuje toksični polinezasićeni alkohol falkarinol prisutan u porodicama Apiaceae i Araliaceae, a što određene vrste ovog roda čini otrovnim (Hansen & Boll, 1986). Lignani su druga najzastupljenija klasa sekundarnih metabolita ovog roda sa oko 50 izolovanih jedinjenja, koja mogu da se svrstaju u četiri glavne podklase: derivati dibenzilbutirolakona, arilnaftaleni, ariltetralinski laktoni i tetrahidrofurofurani (Ashoura & Wink, 2011). Sekundarni metaboliti izolovani iz vrsta roda *Bupleurum* pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti. Najaktivniji su triterpenski saponini saikosaponini, koji ispoljavaju izraženo antiinflamatorno, hepatoprotektivno i imunomodulatorno dejstvo. Takođe, potvrđena je njihova antiproliferativna i antitumorska aktivnost, pre svega indukcijom apoptoze i inhibicijom signalnih puteva rasta tumora. Polisaharidi i etarska ulja nekih vrsta pokazuju antimikrobna, antioksidativna i antidijabetička svojstva, dok su kod pojedinih metabolita potvrđena i antikonvulzivna i antidepresivna dejstva (Teng et al., 2023). Ipak, uz brojne korisne efekte, zabeleženi su i potencijalno toksični efekti, naročito kod neadekvatne ili dugotrajne upotrebe. Ove aktivnosti potvrđuju značajan terapijski

potencijal vrsta roda *Bupleurum*, ali i potrebu za daljim istraživanjem bezbednosti njihove primene.

Do sada je identifikovano više od 200 sastojaka etarskih ulja iz 40 vrsta roda *Bupleurum*. Etarska ulja dobijena iz korena kineskih vrsta ovog roda uglavnom su sadržavala alifatične aldehide i kiseline (Li et al., 2005; 2007). Nasuprot tome, etarska ulja evropskih vrsta karakteriše visoka zastupljenost α - i β -pinena, limonena i 1,8-sineola (Ashoura & Wink, 2011).

Jednogodišnje vrste *B. praealtum* L. i *B. veronense* Turra (syn. *B. aristatum* Bartl. ex Reichenb., *B. odontites* var. *intermedium*) rastu na Balkanskom poluostrvu, na Jadranskoj obali i na planinama do nadmorske visine od 1500 m (Snogerup & Snogerup, 2001). Verovatni evropski endemit *B. veronense* do sada nije fitohemijski proučavan, dok je prethodno, i to samo jedanput, ispitivan hemijski sastav etarskog ulja vrste *B. praealtum* (Kapetanios et al., 2008). Flore Srbije i Bugarske navode (Assenov, 1982; Nikolić, 1973) da na Balkanskom poluostrvu raste i vrsta *B. sibthorpiatum* Sm., dok se u drugim izvorima (Tutin, 1968) pomenuti naziv navodi kao sinonim za vrstu *B. falcatum* L. Za razliku od taksona *B. falcatum*, za koji postoji oko 1000 studija i patenata, *B. sibthorpiatum* se pominje u literaturi samo jedanput, kada je ispitivan sastav njegovog etarskog ulja (Kapetanios et al., 2008). Vrsta *B. affine* Sadler do sada nije bila predmet detaljnijih fitohemijskih istraživanja, osim u kontekstu analize flavonoida (Gevrenova et al., 2015).

Predmet istraživanja predložene doktorske disertacije bio bi izolovanje, identifikacija i spektralna karakterizacija sekundarnih metabolita odbranih biljnih vrsta roda *Bupleurum* (*B. praealtum*, *B. veronense*, *B. sibthorpiatum* i *B. falcatum*) koje rastu na Balkanskom poluostrvu. Konkretno bi bio analiziran sastav dietil-etarskih ekstrakata nadzemnih delova ovih vrsta, u kome bi trebalo da se nalaze neka od gore pomenutih biološki aktivnih jedinjenja (poliketidi, lignani, itd.), karakterističnih za vrste ovog roda. Takođe, ako količina dostupnog biljnog materijala to dozvoli, bila bi izvršena i analiza sastava etarskog ulja pomenutih biljnih vrsta. Za odabrana čista izolovana jedinjenja iz ekstrakata, bila bi testirana imunomodulatorna aktivnost kroz određivanje njihovog dejstva na preživljavanje peritonealnih makrofaga pacova, kao i uticaja na aktivnost mijeloperoksidaze makrofaga. Izvršiće se upoređenje hemijskog sastava ekstrakata *B. sibthorpiatum* i *B. falcatum* u cilju utvrđivanja potencijalnih razlika u sekundarnom metabolizmu i dobijanja dodatnih argumenata za razlikovanje ovih taksona.

Na osnovu prethodnih saznanja, postavljeni su sledeći ciljevi doktorske disertacije:

1. Dobijanje dietil-etarskih ekstrakta nadzemnih delova biljnih vrsta *B. praealtum*, *B. veronense*, *B. sibthorpiatum* i *B. falcatum* i etarskih ulja vrsta dostupnih u dovoljnoj količini;
2. Preparativno hromatografsko razdvajanje ekstrakata na koloni silika-gela i detaljna analiza dobijenih frakcija i etarskog(ih) ulja pomoću gasne hromatografije sa masenom detekcijom (GC-MS);
3. Određivanje strukture jedinjenja kombinacijom većeg broja spektralnih metoda, kao i hemijskim transformacijama;
4. Ako jedinjenja poseduju pogodne hiralne centre, određivanje njihove konfiguracije, npr. sintezom Mosher-ovih estara i njihovom NMR-analizom ili sintezom odgovarajućih model jedinjenja;
5. U slučaju jedinjenja koja ne mogu da se izoluju u dovoljnoj količini da bi se ona u potpunosti okarakterisala i utvrdila njihova struktura, biće sintetisani izomeri koji bi potencijalno mogli da predstavljaju ciljni sekundarni metabolit;
6. Detaljna interpretacija NMR-spektralnih podataka (potpuna asigancija ^1H i ^{13}C NMR-signal) izolovanih ili sintetisanih jedinjenja. U cilju dobijanja svih relevantnih NMR-parametara (hemijsko pomeranje, konstante sprežanja i spektralna širina signala) treba izvršiti potpunu ^1H NMR spinsku simulaciju;
7. Za izolovana ili sintetisana čista jedinjenja dostupna u dovoljnoj količini, testiranje imunomodulatorne aktivnosti (vijabilnost makrofaga i aktivnosti mijeloperoksidaze makrofaga u kulturi sa dodatim jedinjenjima) sa ciljem dobijanja argumenata koji objašnjavaju etnofarmakološku primenu vrsta ovog roda;
8. Upoređenje sastava ekstrakata *B. sibthorpiatum* i *B. falcatum* u cilju utvrđivanja razlika u sekundarnom metabolizmu i dobijanja dodatnih argumenata za potencijalno razlikovanje ovih taksona.

Planirana istraživanja biće sprovedena korišćenjem sledećih metoda:

1. Izolovanje etarskog ulja hidrodestilacijom po *Clevenger*-u i ekstrakcija (maceracija) biljnog materijala dietil-etrom;
2. Analiza sastojaka etarskog(ih) ulja i ekstrakata – gasna hromatografija sa masenom detekcijom (GC-MS);
3. Izolovanje, razdvajanje i prečišćavanje – *dry-flash* hromatografija, hromatografija na koloni, hromatografija na Sefadeksu LH-20, tankoslojna hromatografija;
4. Spektralna i strukturna karakterizacija – nuklearna magnetna spektroskopija ugljenika-13 i vodonika (^1H - i ^{13}C -NMR, jednodimenzionalna i dvodimenzionalna: NOESY, ROESY i gradijentni HSQC, HMBC i ^1H - ^1H COSY, kao i multipulsni DEPT-90, DEPT-135 i eksperimenti selektivnog homonuklearnog dekuplovanja);
5. Određivanje konfiguracije hiralnih centara, *Mosher*-ova metoda;
6. Ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija (UV-Vis), infracrvena spektroskopija (IR), mikroanaliza ugljenika i vodonika;
7. Testiranje imunomodulatorne aktivnosti: MTT (redukcija tetazolijum soli), NR (akumulacija neutralno-crvenog) i MPO (aktivnost mijeloperoksidaze) testovi.

2. Opšti deo

2.1. Opšte karakteristike roda *Bupleurum* L.

Rod *Bupleurum* (Linnaeus, 1735) pripada porodici Apiaceae, podporodici Apioideae i tribusu Bupleureae. Naziv roda *Bupleurum* potiče iz antičkog grčkog jezika, od reči *βουπλεύρον* (*boupleuron*), što doslovno znači „volovsko rebro“ (*bous* = vo, *pleuron* = rebro). Ovaj naziv su koristili antički lekari, uključujući Dioskorida, da označe biljke karakterističnih listova, čija je forma podsećala na oblik rebara. Kasnije je *Linnaeus* ovaj termin preuzeo i formalizovao kao naziv roda u botaničkoj nomenklaturi. Sistematska pripadnost ovog roda, u tradicionalnom smislu, prikazana je u tabeli 1. Rod *Bupleurum* obuhvata jednogodišnje i višegodišnje, ređe dvogodišnje zeljaste biljke sa celim, nedeljenim listovima. Cvetovi su hermafroditni i organizovani u složene štitaste cvasti. Listići involukruma i involuceluma su brojni, dok su zupci čašičnih listića veoma slabo razvijeni i teško uočljivi. Krunični listići su žute boje, zaobljeni i na vrhu povijeni. Plod je uglavnom bočno spljošten, a merikarpije imaju pet jednakih rebara – oštarih, tupih ili slabo izraženih.

Ukupna raznovrsnost roda *Bupleurum* ogleda se u njegovoj izuzetnoj ekološkoj i morfološkoj varijabilnosti i prilagodljivosti, što se jasno reflektuje i kroz sveobuhvatnu sistematsku podelu koju je dao *Wolff* (*Wolff*, 1910). U svojoj monografiji, *Wolff* razvrstava predstavnike roda u pet glavnih sekcija: *Perfoliata* Godr., *Longifolia* Wolff., *Reticulata* Godr. ex pte., *Eubupleura* Briq. i *Coriacea* Godr. Sekcija *Perfoliata*, koja obuhvata jednogodišnje vrste, se dalje deli na tri podsekcije: *Laevia* Briq., *Rugosa* Briq. i *Lophocarpa* Briq. Sekcija *Eubupleura* obuhvata i jednogodišnje i višegodišnje vrste i podeljena je na šest podsekcija: jednogodišnje vrste su raspoređene u podsekcije *Glumacea* Boiss., *Juncea* Briq. i *Trachycarpa* Lange, a višegodišnje u podsekcije *Nervosa* Godr. ex pte., *Marginata* Godr. ex pte. i *Rigida* Drude.

Klasifikacija roda *Bupleurum* tokom vremena pretrpela je značajne promene, pri čemu taksonomski položaj pojedinih vrsta varira u zavisnosti od autora i samog pristupa. U okviru ove disertacije hemijski su analizirane četiri vrste: *B. affine*, *B. falcatum*, *B. praealtum* i *B. veronense*, čiji sistematski položaj u literaturi nije uvek dosledno prikazan. Prema klasifikaciji *Wolff*-a (1910), vrsta *B. affine* je svrstana u sekciju *Eubupleura*, podsekciju *Juncea*, dok je u Flori Evrope (*Tutin*, 1968) predstavljena u okviru sekcije *Isophyllum* (*Hoffm.*) *Dumrot*, zadržavajući istu podsekciju. *Neves* i *Watson* (2004) ovu vrstu nisu obuhvatili svojim istraživanjem. *Bupleurum falcatum* se prema *Wolff*-u (1910) nalazi u sekciji *Eubupleura*, podsekciji *Nervosa*, seriji *Falcata*, dok se u kasnijim izvorima, uključujući Floru Evrope (*Tutin*, 1968) i rad *Neves*-a i *Watson*-a (2004), dosledno klasifikuje u sekciju *Isophyllum*,

podsekciju *Nervosa*. Slična doslednost uočava se i kod vrste *B. praealtum*, koja, prema Wolff-u (1910) pripada sekciji *Eubupleura*, podsekciji *Juncea*, a u savremenijim sistemima biva premeštena u sekciju *Isophyllum*, pri čemu zadržava istu podsekciju (Neves & Watson, 2004; Tutin, 1968). Kada je reč o vrsti *B. veronense*, Wolff (1910) je svrstava u sekciju *Eubupleura*, podsekciju *Glumacea*, seriju *Aristata*. Ova vrsta nije predstavljena u Flori Evrope (Tutin, 1968), dok je prema klasifikaciji Neves-a i Watson-a (2004) uključena u sekciju *Isophyllum*, podsekciju *Aristata*.

Rod *Bupleurum* obuhvata ukupno 248 različitih vrsta (Teng et al., 2023), koje su pretežno rasprostranjene na severnoj hemisferi, uključujući Evropu, Aziju i severnu Afriku. Najveći broj vrsta raste u umerenim zonama severne hemisfere (Mabberley, 2008), dok su u Kini zabeležene 22 endemične vrste (Teng et al., 2023). Na Balkanskom poluostrvu (uključujući i Egejska ostrva) i u Maloj Aziji registrovano je 56 jednogodišnjih vrsta roda *Bupleurum* (Snogerup, 1972; Snogerup & Snogerup, 2001), što čini gotovo 80% svih jednogodišnjih vrsta ovog roda. Nedavne analize ITS regiona rDNK ukazuju na to da je jednogodišnja životna forma sekundarno stečena osobina, koja je verovatno evoluirala više puta unutar roda (Neves & Watson, 2004). Skraćen životni ciklus može doprineti povećanom evolutivnom potencijalu, što može objasniti veću raznovrsnost jednogodišnjih vrsta.

Tabela 1. Sistematska pripadnost roda *Bupleurum* L.

Taksonomska kategorija	Takson
<i>Regnum</i>	Plantae
<i>Divisio</i>	Magnoliophyta
<i>Classis</i>	Magnoliopsida
<i>Ordo</i>	Apiales
<i>Familia</i>	Apiaceae
<i>Tribus</i>	Bupleureae
<i>Genus</i>	<i>Bupleurum</i> L.

Postoje tri glavna centra diverziteta i specijacije, odnosno hibridizacije i evolucije, roda *Bupleurum*. Jedan od najstarijih i ključnih centara nalazi se na zapadnom Mediteranu, obuhvatajući Pirinejsko poluostrvo, severozapadnu Afriku (Maroko, Alžir, Tunis) i Makaroneziju (ostrva u Atlantiku). U ovom regionu raste oko 30 vrsta, uglavnom drvenastih i poludrvenastih, tradicionalno svrstavanih u podrod *Tenoria* (Spreng.) Cauwet (Cauwet-Marc,

1976). Drugi centar nalazi se u jugoistočnoj Aziji i na Himalajima, gde se može naći više od 40 zeljastih višegodišnjih vrsta (Wu & Raven, 2005). Balkansko poluostrvo i Egejska ostrva predstavljaju treći centar diverziteta, posebno značajan zbog velikog broja jednogodišnjih vrsta, od kojih su mnoge endemične (Snogerup & Snogerup, 2003). Grčka ima najveći broj vrsta – 28 taksona, od kojih je 25 jednogodišnjih (Snogerup & Snogerup, 2001). Slično tome, u Anadoliji je zabeleženo 46 vrsta roda *Bupleurum*, od čega su njih 45 jednogodišnje (Snogerup, 1972). Sve jednogodišnje i višegodišnje nedrvenaste vrste ovog roda svrstane su u podrod *Bupleurum*. Pored uzoraka iz Grčke, u ovo istraživanje su uključeni i uzorci prikupljeni na lokalitetima u Srbiji i Severnoj Makedoniji, čime je obuhvaćen deo Balkanskog poluostrva, kao trećeg glavnog centra diverziteta ovog roda. Prema relevantnoj literaturi u Srbiji je zastupljeno 15 (Nikolić, 1973), a u Severnoj Makedoniji 14 (Micevski, 2005) predstavnika ovog roda.

Pod imenom *Chaihu* (*Radix Bupleuri*, *Saiko* na japanskom i *Shiho* na korejskom), koren nekoliko vrsta roda *Bupleurum* često se pominje kao sastojak preparata za lečenje prehlade praćene groznicom, gripa, inflamacija, hepatitisa, malarije, kao i simptoma menopauze. *Chaihu* je prvi put zabeležen u *Shen-Nong*-ovoj knjizi, farmakopeji objavljenoj pre 2000 godina u Kini, u kojoj je *Chaihu* opisan kao najbolji lek za bolesti praćene groznicom. Farmakopeja Narodne Republike Kine (2000) navodi da se vrste *B. chinense* DC. i *B. scorzonnerifolium* Willd. zvanično koriste u medicini Kine. Međutim, kasnija istraživanja pokazuju da mnoge druge vrste ovog roda, takođe, poseduju lekovita svojstva (Pan, 2006). Potražnja u Kini za korenjem različitih vrsta roda *Bupleurum* iznosi oko 8 miliona kg godišnje, pa se danas *B. falcatum* i *B. chinense* intenzivno uzgajaju u Kini, Japanu, Koreji, kao i u nekim delovima Evrope. U nekim regionima Kine (posebno u provinciji *Yunnan*), gaje se i druge vrste i varijeteti kao što su *B. polyclonum* Yin Li & S.L.Pan, *B. marginatum* var. *stenophyllum* Wall. ex DC. i *B. rockii* H.Wolff (Pan, 2006).

Interesantno je da su vrste roda *Bupleurum* koje su često korišćene u tradicionalnoj tibetanskoj medicini zabeležene i u preparatima drugih etničkih grupa u Kini, poput *Yi*, *Bai*, *Yao* i *Tu*. Nasuprot tome, region *Xinjiang* i Unutrašnja Mongolija, gde je narodna medicina nezavisna od Tibeta, takođe koriste vrste roda *Bupleurum* (Teng et al., 2023). Koren je najčešće korišćen deo biljke, dok na primer, u kineskim provincijama *Sichuan* *Yunnan*, osušeni celi biljni primerci *B. candollei* Wall. ex DC. koriste se kao antipruritici i antiflogistici; dok se na

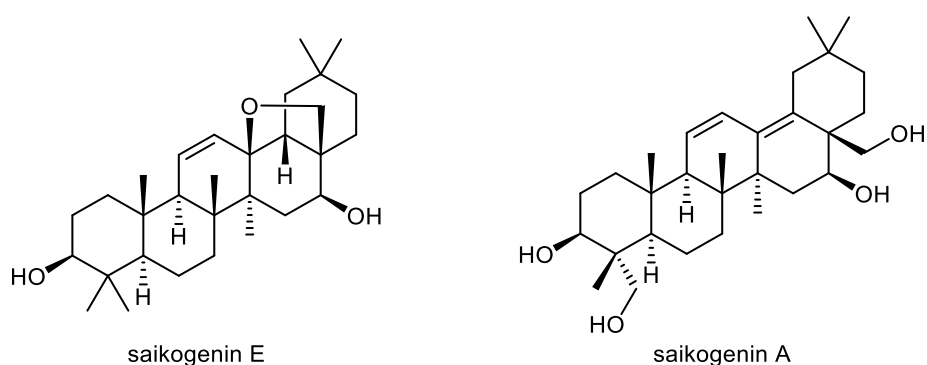
Tibetu sušeni ili sveži plodovi *B. hamiltonii* Balakr. koriste za lečenje stomaknih tegoba (Teng et al., 2023).

Brojna istraživanja su pokazala da su najzastupljenija biološki aktivna jedinjenja ovog roda saikosaponini. Veruje se da je floem ključno mesto biosinteze saikosaponina. Štaviše, potvrđeno je prisustvo etarskog ulja vrsta roda *Bupleurum* u sekretornim kanalima floema i drugih sekundarnih tkiva (Metcalf & Chalk, 1950). Kod vrste *B. chinense*, odnos površine ksilema i floema je drastično smanjen tokom procesa cvetanja, pa je samim tim usporen proces biosinteze saikosaponina. Stoga je potrebno uklanjati cvasti, kako bi se smanjili negativni efekti reproduktivne faze razvoja i povećao nivo saikosaponina u korenu (Sui et al., 2021; Wang et al., 2021a). Drugi glavni problem kultivacije ovih biljaka je nejednakost u prinosu koren/izdanak, pa se sečenje nadzemnog dela biljke u fazi pre cvetanja koristi kao efikasan metod kultivacije. Ipak ključni način za rešavanje ovog problema jeste ukrštanje odgovarajućih primeraka (Yao et al., 2013). Cvetovi vrsta ovog roda su dvopolni i biljke se razmnožavaju semenom. Uglavnom, cvetaju od jula do septembra, a plodonose od avgusta do oktobra. Međutim, stopa klijanja semena kod većine divljih vrsta roda *Bupleurum* je izuzetno niska zbog dugog perioda dormancije, od 20–30% kod vrste *B. chinense* i do 40–50% kod *B. falcatum* (Wei et al., 2003). Zanimljivo je da su putem ukrštanja u genomu *B. chinense* sekretorne genske familije povezane sa biosintezom antocijanina, seskviterpenoida i triterpenoida (Zhang et al., 2022a). Ukratko, poznato je da biosinteza saikosaponina uključuje tri faze: prva faza je formiranje izopentenil-pirofosfata (IPP) i dimetilalil-pirofosfata (DMAPP); druga faza obuhvata formiranje triterpensskog skeleta (β -amirin); a treća faza se javlja tokom i nakon modifikacije ovog skeleta (Sui et al., 2021). Do danas, ukupno 25 ključnih gena, odgovornih za sintezu enzima i transkripcionih faktora uključenih u put biosinteze saikosaponina, je klonirano iz genoma *B. chinense*, *B. falcatum* i endemične vrste iz tajvanske provincije u Kini *B. kaoi* Liu, C.Y.Chao & Chuang, (Han et al., 2022; Sui et al., 2021). Na osnovu analize metaboloma, geni koji se odnose na triterpenoide i geni koji se odnose na metabolizam lipida se pretežno nalaze u genomima *B. chinense* i *B. scorzonrifolium*, što je u skladu sa značajno različitim nivoima saikosaponina i etarskih ulja u ove dve vrste roda *Bupleurum* (Sui et al., 2015). Takođe, pokazano je da mehanička povreda u nadzemnom delu biljke, kao i periodi suše mogu indukovati biosintezu saikosaponina u korenu *B. chinense* (Wang et al., 2021b; Yang et al., 2020).

2.2. Sekundarni metaboliti roda *Bupleurum*

2.2.1. Triterpenski saponini

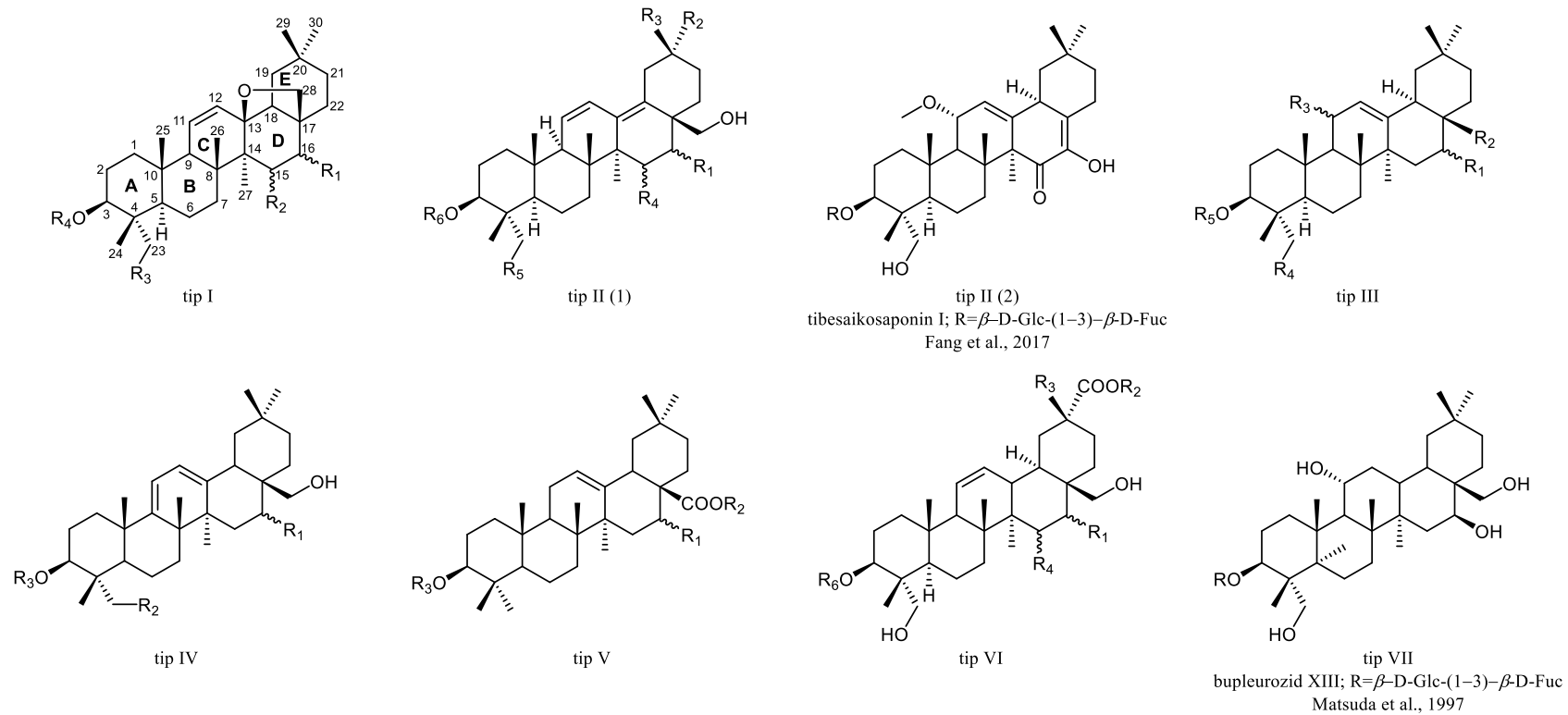
Triterpenski glikozidi iz oleanske serije (oleanani), prisutni u vrstama roda *Bupleurum*, nazivaju se saikosaponini, a njihovo ime potiče od japanske reči *saiko*, što je uobičajeno ime za vrste ovog roda koje se koriste u *kampo* (tradicionalnoj japanskoj) medicini (Pan, 2006). Pokazalo se da ova jedinjenja poseduju interesantna i brojna biološka svojstva, uključujući antiinflamatorna (Benito et al., 1998; Navarro et al., 2001; Takagi & Shibata, 1969b), hepatoprotektivna (Abe et al., 1980; 1982; 1985; Guinea et al., 1994), analgetska i sedativna (Takagi & Shibata, 1969a), antibakterijska i antivirusna (Bermejo et al., 2002; Kumazawa et al., 1990), imunomodulatorna (Hsu et al., 2000; Kato et al., 1995; Kumazawa et al., 1989; Ushio & Abe, 1992) kao i antialergijska svojstva (Park et al., 2002). Istraživanja saikosaponina započela su sa Ezaw-om, koji je 1916. godine prvi uočio prisustvo saponina (Ezawa, 1916). Robate je 1931. godine izolovao glikozid iz vrste *B. rotundifolium* L. i nazvao ga rutozidom (Robate, 1931). Shibata i saradnici (Aimi & Shibata, 1966; Shibata et al., 1965) i Kubota i saradnici (Kubota & Hinoh, 1966; 1968b; Kubota & Tonami, 1967; Kubota et al., 1967) nezavisno su odredili strukture triterpenoidnih saponina, nazvanih saikogenini A-G*. Kubota (Kubota & Hinoh, 1968b) je predložio da su saikogenini E, F i G sapogenini sa etarskom vezom između C-13 i C-28 prisutni u biljkama, dok su saikogenini A, B, C i D artefakti nastali dejstvom kiseline (slika 1). Kubota i Hinoh (1968a) su se bavili određivanjem strukture glavnih saikosaponina, saikosaponina a–d. Kasnije, Shimaoka i saradnici (1975) su ponovo ispitali strukture saikosaponina a i b*, te ukazali da Kubot-in "saponin a" predstavlja smešu saikosaponina b₁ i b₃, dok je "saponin b" zapravo smeša saikosaponina b₂ i b₄.



Slika 1. Strukture saikogenina E i saikogenina A

* U ranim radovima dogovoreno je da se glikozidni saikosaponini označavaju malim slovima (a, b₁, b₂, c ...), a aglikoni – saikogenini – velikim slovima (A, B, C ...), kako bi se odmah znalo da li je reč o saponinu sa šećerima ili „golom“ sapogeninu. Ovo pravilo još važi za klasična jedinjenja, ali je kod novijih saikosaponina (npr. U, V, W) narušeno, pa je najsigurnije uvek navesti i samu strukturu, a ne oslanjati se samo na slovo.

Do sada je identifikovano oko 120 saponina iz različitih vrsta ovog roda, koji mogu da čine otprilike 7% ukupne mase suvog korena (Ding et al., 1986; Ebata et al., 1996; Pistelli et al., 1993). Saikosaponini su saponini oleananskog tipa, koji pripadaju grupi pentacikličnih triterpenoidnih jedinjenja i sastoje se od triterpenoidnog aglikona i jedne ili više šećernih jedinica. Aglikoni se mogu, na osnovu strukture, klasifikovati u sedam grupa: epoksietarski (tip I), izociklodienski (tip II), 12-en (tip III), homociklodienski (tip IV), 12-en-28-karboksilna kiselina (tip V), izociklodien-30-karboksilna kiselina (tip VI) i 18-en (tip VII). Aglikoni ovih jedinjenja su oksigenovani pentaciklični triterpeni, koji se međusobno razlikuju prema broju i položaju dvostrukih veza unutar C i D prstena, kao i prema položaju oksigenacije na C-16, C-23, C-28 i C-30. Strukturu tipa I karakteriše prisustvo 13 β ,28-epoksietarske veze i dvostruke veze na C-11.



Slika 2: Različiti strukturni tipovi saikosaponina i numeracija skeleta (za značenje $R_1 - R_6$ videti tabele 2 – 6)

Tabela 2. Saikosaponini tipa I*

Biljni takson	Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Literatura
<i>B. falcatum</i>	saikosaponin a	β -OH	H	OH	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Ebata et al., 1996
<i>B. falcatum</i>	saikosaponin c	β -OH	H	H	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-Rha-(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-Glc-	Otsuka et al., 1978
<i>B. falcatum</i>	saikosaponin d	α -OH	H	OH	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Otsuka et al., 1978
<i>B. scorzonerifolium</i>	saikosaponin e	β -OH	H	H	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Matsuda et al., 1997
<i>B. chinense</i>	2''-O-acetilsaikosaponin a	β -OH	H	OH	2''-O-acetil- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Li et al., 2015
<i>B. falcatum</i>	3''-O-acetilsaikosaponin a	β -OH	H	OH	3''-O-acetil- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Ebata et al., 1996
<i>B. falcatum</i>	4''-O-acetilsaikosaponin a	β -OH	H	OH	4''-O-acetil- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Ebata et al., 1996
<i>B. falcatum</i>	6''-O-acetilsaikosaponin a	β -OH	H	OH	6''-O-acetil- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Ishii et al., 1980
<i>B. falcatum</i>	23-O-acetilsaikosaponin a	β -OH	H	OAc	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Ishii et al., 1980
<i>B. falcatum</i>	6''-O-malonilsaikosaponin a	β -OH	H	OH	6''-O-malonil- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Ebata et al., 1996
<i>B. marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	6''-O-krotonilsaikosaponin a	β -OH	H	OH	6''-O-krotonil- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc	Fang et al., 2017
<i>B. kunmingense</i>	2'',3''-diacetilsaikosaponin a	β -OH	H	OH	2'',3''-O,O-diacetil- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Seto et al., 1986
<i>B. kunmingense</i>	3'',4''-diacetilsaikosaponin a	β -OH	H	OH	3'',4''-O,O-diacetil- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Seto et al., 1986
<i>B. kunmingense</i>	3'',6''-diacetilsaikosaponin a	β -OH	H	OH	3'',6''-O,O-diacetil- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Seto et al., 1986

* Saikosaponini su navedeni abecednim redom.

<i>B. falcatum</i>	2''-O-acetilsaikosaponin d	α -OH	H	OH	2''-O-acetil- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Ebata et al., 1996
<i>B. falcatum</i>	3''-O-acetilsaikosaponin d	α -OH	H	OH	3''-O-acetil- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Ishii et al., 1980
<i>B. falcatum</i>	4''-O-acetilsaikosaponin d	α -OH	H	OH	4''-O-acetil- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Ebata et al., 1996
<i>B. falcatum</i>	6''-O-acetilsaikosaponin d	α -OH	H	OH	6''-O-acetil- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Ebata et al., 1996
<i>B. falcatum</i>	6''-O-malonilsaikosaponin d	α -OH	H	OH	6''-O-malonil- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Ebata et al., 1996
<i>B. kunmingense</i>	2'',3''-diacetilsaikosaponin d	α -OH	H	OH	2'',3''-O,O-diacetil- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Seto et al., 1986
<i>B. kunmingense</i>	3'',4''-diacetilsaikosaponin d	α -OH	H	OH	3'',4''-O,O-diacetil- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Seto et al., 1986
<i>B. kunmingense</i>	3'',6''-diacetilsaikosaponin d	α -OH	H	OH	3'',6''-O,O-diacetil- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Seto et al., 1986
<i>B. kunmingense</i>	4'',6''-diacetilsaikosaponin d	α -OH	H	OH	4'',6''-O,O-diacetil- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Seto et al., 1986
<i>B. kunmingense</i>	3''-O-acetilsaikosaponin e	β -OH	H	H	3''-O-acetil- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Seto et al., 1986
<i>B. chinense</i>	saikosaponin X	=O	α -OH	OH	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Wang et al., 2017
<i>B. marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	23-hidroksi-13 β , 28 β -epoksiolean-11-en-16-on-3-O- β -D-Glckopiranozil-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-fukopiranozid	=O	H	OH	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Fang et al., 2017; Hu et al., 2013; Wang et al., 2017
<i>B. scorzonerifolium</i>	bupleurozid I	β -OH	H	OH	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Wang et al., 2017

* Saikosaponini su navedeni abecednim redom.

Saikosaponini tipa II (slika 1, tabela 3) sadrže dve dvostruke veze u različitim prstenovima – najčešće su to 11,13(18)-dienska ili 12,16-dienska struktura. Kod tipa IV, obe dvostruke veze nalaze se u istom prstenu, formirajući 9(11),12-dienski sistem. Saponini tipa III (tabela 4) imaju samo jednu dvostruku vezu između C-12 i C-13, dok tip V (tabela 6) pokazuje sličnu 12-en strukturu, ali sa dodatnom karboksilnom grupom na C-28. Tip VI (tabela 7) poseduje 11,13(18)-diensku strukturu i karboksilnu grupu na C-30. Većina saponina tipa II, III i VI sadrži α -OCH₃ supstituent u položaju C-11. Saponini tipa VII su prepoznatljiviji po dvostrukoj vezi u položaju C-18. Među svim navedenim tipovima, saikosaponini tipa I su najzastupljeniji u vrstama roda *Bupleurum*, a najčešće identifikovani predstavnici su saikosaponin a, c i d. Istraživanje Nose i saradnika (1989) pokazalo je da saikosaponini a, c i d mogu formirati 27 metabolita u digestivnom traktu (šema 1).

Tabela 3. Saikosaponini tipa II (1)*

Biljni takson	Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Literatura
<i>B. falcatum</i>	saikosaponin b ₁	β -OH	CH ₃	CH ₃	H	OH	β -D-Glc-(1→3)- β -D-Fuc-	Otsuka et al., 1978
<i>B. falcatum</i>	saikosaponin b ₂	α -OH	CH ₃	CH ₃	H	OH	β -D-Glc-(1→3)- β -D-Fuc-	Otsuka et al., 1978
<i>B. polyclonum</i>	2''-O-acetilsaikosaponin b ₂	α -OH	CH ₃	CH ₃	H	OH	2''-O-acetil- β -D-Glc-(1→3)- β -D-Fuc-	Seto et al., 1986
<i>B. polyclonum</i>	3''-O-acetilsaikosaponin b ₂	α -OH	CH ₃	CH ₃	H	OH	3''-O-acetil- β -D-Glc-(1→3)- β -D-Fuc-	Seto et al., 1986
<i>B. wenchuanense</i>	6''-O-acetilsaikosaponin b ₂	α -OH	CH ₃	CH ₃	H	OH	6''-O-acetil- β -D-Glc-(1→3)- β -D-Fuc-	Luo et al., 1993
<i>B. wenchuanense</i>	3'',6''-diacetilsaikosaponin b ₂	α -OH	CH ₃	CH ₃	H	OH	3'',6''-O,O-diacetil- β -D-Glc-(1→3)- β -D-Fuc-	Luo et al., 1993
<i>B. chinense</i>	23-O-acetilsaikosaponin b ₂	α -OH	CH ₃	CH ₃	H	OAc	β -D-Glc-(1→3)- β -D-Fuc-	Wang et al., 2017
<i>B. longiradiatum</i>	saikosaponin H	β -OH	CH ₃	CH ₃	H	H	β -D-Glc-(1→6)-[α -L-Rha-(1→4)]- β -D-Glc-	Lee et al., 2011b
<i>B. scorzonerifolium</i>	bupleurozid V	α -OH	COOH	CH ₃	H	OH	β -D-Glc-(1→3)- β -D-Fuc-	Matsuda et al., 1997
<i>B. scorzonerifolium</i>	bupleurozid X	α -OH	CH ₃	CH ₃	H	OH	β -D-Glc-(1→6)-[α -L-Rha-(1→4)]- β -D-Glc-	Matsuda et al., 1997
<i>B. scorzonerifolium</i>	bupleurozid XII	α -OH	CH ₃	CH ₂ OH	H	OH	β -D-Glc-(1→6)-[α -L-Rha-(1→4)]- β -D-Glc-	Matsuda et al., 1997
<i>B. smithii</i>	saikosaponin M	H	CH ₃	CH ₃	H	OH	β -D-Glc-(1→3)- β -D-Fuc-	Zhang et al., 1994
<i>B. smithii</i>	saikosaponin N	β -OH	CH ₃	CH ₃	H	OH	β -D-Glc-(1→6)-[α -L-Rha-(1→4)]- β -D-Glc-	Zhang et al., 1994
<i>B. scorzonerifolium</i>	saikosaponin S	α -OH	CH ₃	CH ₃	H	OH	β -D-Glc-(1→6)-[β -L-Rha-(1→4)]- β -D-Glc-	Tan et al., 1998

* Saikosaponini su navedeni abecednim redom.

<i>B. smithii</i>	saikosaponin O	β -OH	CH ₃	CH ₃	H	OH	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 6)-[β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-Glc-	Ma et al., 1996
<i>B. smithii</i>	saikosaponin P	β -OH	CH ₃	CH ₃	H	OH	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 6)-[β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-Glc-	Luo et al., 1996
<i>B. smithii</i>	saikosaponin Q	β -OH	CH ₂ OH	CH ₃	H	OH	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-Rha-(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-Glc-	Luo et al., 1995
<i>B. chinense</i>	saikosaponin Q-1	α -OH	CH ₂ OH	CH ₃	H	OH	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -L-Rha-(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-Glc-	Liang et al., 2001b
<i>B. scorzonerifolium</i>	saikosaponin R	α -OH	CH ₂ OH	CH ₃	H	OH	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Tan et al., 1996
<i>B. chinense</i>	saikosaponin Y-1	α -OH	CH ₃	CH ₃	H	H	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Wang et al., 2017
<i>B. chinense</i>	saikosaponin Y-2	β -OH	CH ₃	CH ₃	H	H	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Wang et al., 2017
<i>B. marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	tibesaikosaponin II	=O	CH ₃	CH ₃	α -OH	OH	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Fang et al., 2017
<i>B. marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	tibesaikosaponin IV	β -OH	CH ₃	CH ₂ OH	H	OH	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Fang et al., 2017
<i>B. marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	3 β ,23,28-trihidroksiolean-11,13(18)-dien-16-on-3-O- β -D-glukopiranozil-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-fukopiranozid	=O	CH	CH ₃	H	OH	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Fang et al., 2017; Hu et al., 2013
<i>B. spinosum</i>	3 β ,16 α ,23,28-tetrahidroksiolean-11,13(18)-dien-30-ska kiselina 3-O- β -D-glukopiranozil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glukopiranozil-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-fukopiranozid	α -OH	COOH	CH ₃	H	OH	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Barrero et al., 2000
<i>B. spinosum</i>	3 β ,16 α ,23,28,30-pentahidroksiolean-11,13(18)-dien-3-O- β -D-	α -OH	CH ₂ OH	CH ₃	H	OH	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Barrero et al., 2000

* Saikosaponini su navedeni abecednim redom.

glukopiranozil-(1→2)- β -D-
glukopiranozil-(1→3)- β -D-
fukopiranozid

* Saikosaponini su navedeni abecednim redom.

Tabela 4. Saikosaponini tipa III*

Biljni takson	Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Literatura
<i>B. scorzonerifolium</i>	saikosaponin b ₃	β -OH	CH ₂ OH	OCH ₃	OH	β -D-Glc-(1→3)- β -D-Fuc-	Otsuka et al., 1978
<i>B. chinense</i>	saikosaponin b ₄	α -OH	CH ₂ OH	OCH ₃	OH	β -D-Glc-(1→3)- β -D-Fuc-	Otsuka et al., 1978
<i>B. falcatum</i>	6''-O-acetilsaikosaponin b ₄	α -OH	CH ₂ OH	OCH ₃	OH	6''-acetyl- β -D-Glc-(1→3)- β -D-Fuc-	Ishii et al., 1980
<i>B. kunmingense</i>	3'',4''-diacetyl-saikosaponin b ₄	α -OH	CH ₂ OH	OCH ₃	OH	3'',4''-diacetyl- β -D-Glc-(1→3)- β -D-Fuc-	Seto et al., 1986
<i>B. falcatum</i>	saikosaponin F	β -OH	CH ₂ OH	H	H	β -D-Glc-(1→6)-[α -L-Rha-(1→4)]- β -D-Glc-	Ishii et al., 1980
<i>B. marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	11 α -metoksi saikosaponin F	β -OH	CH ₂ OH	α -OCH ₃	H	β -D-Glc-(1→6)-[α -L-Rha-(1→4)]- β -D-Glc-	Fang et al., 2017
<i>B. marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	nepasaikosaponin K	β -OH	CH ₂ OH	H	OH	β -D-Glc-(1→6)-[α -L-Rha-(1→4)]- β -D-Glc	Fang et al., 2017
<i>B. chinense</i>	saikosaponin W	β -OH	CH ₂ OH	NHCONH ₂	OH	β -D-Glc-(1→3)- β -D-Fuc-	Yu et al., 2013
<i>B. chinense</i>	saikosaponin T	β -OH	CH ₂ OH	OCH ₃	H	β -D-Glc-(1→3)- β -D-Fuc-	Liang et al., 1998b
<i>B. falcatum</i>	hidroksil saikosaponin c	β -OH	CH ₂ OH	OH	H	β -D-Glc-(1→6)-[α -L-Rha-(1→4)]- β -D-Glc-	Ebata et al., 1996
<i>B. falcatum</i>	hidroksil saikosaponin d	α -OH	CH ₂ OH	OH	OH	β -D-Glc-(1→3)- β -D-Fuc-	Ebata et al., 1996
<i>B. scorzonerifolium</i>	bupleurozid II	α -OH	CH ₂ OH	OCH ₃	OH	β -D-Glc-(1→2)- β -D-Glc-(1→3)- β -D-Fuc-	Matsuda et al., 1997
<i>B. scorzonerifolium</i>	bupleurozid III	β -OH	CH ₂ OH	OH	OH	β -D-Glc-(1→3)- β -D-Fuc-	Matsuda et al., 1997

* Saikosaponini su navedeni abecednim redom.

<i>B. scorzonerifolium</i>	bupleurozid IV	α -OH	CH ₂ OH	OH	OH	β -D-Glc-(1→3)- β -D-Fuc -	Matsuda et al., 1997
<i>B. scorzonerifolium</i>	bupleurozid VI	β -OH	CH ₂ OH	=O	OH	β -D-Glc-(1→3)- β -D-Fuc-	Matsuda et al., 1997
<i>B. scorzonerifolium</i>	bupleurozid VII	β -OH	CH ₂ OH	=O	H	β -D-Glc-(1→6)-[α -L-Rha-(1→4)]- β -D-Glc-	Matsuda et al., 1997
<i>B. scorzonerifolium</i>	bupleurozid VIII	H	COOH	H	H	β -D-Glc-(1→2)- β -D-Ara-(1→3)- β -D-Glc-	Matsuda et al., 1997
<i>B. scorzonerifolium</i>	bupleurozid IX	α -OH	CH ₂ OH	OCH ₃	OH	β -D-Glc-(1→3)- β -D-Fuc-	Matsuda et al., 1997
<i>B. scorzonerifolium</i>	bupleurozid XI	H	CH ₂ OH	H	H	β -D-Glc-(1→6)-[α -L-Rha-(1→4)]- β -D-Glc-	Matsuda et al., 1997

Tabela 5. Saikosaponini tipa IV*

Biljna vrsta	Jedinjenje	R₁	R₂	R₃	Literatura
<i>B. chinense</i>	saikosaponin G	β -OH	OH	β -D-Glc-(1→3)- β -D-Fuc-	Lee et al., 2011b
<i>B. kanoi</i>	saikosaponin I	β -OH	H	β -D-Glc-(1→6)-[α -L-Rha-(1→4)]- β -D-Glc-	Lee et al., 2011b
<i>B. chinense</i>	saikosaponin Z	α -OH	OH	β -D-Glc-(1→3)- β -D-Fuc-	Wang et al., 2017

* Saikosaponini su navedeni abecednim redom.

Tabela 6. Saikosaponini tipa V*

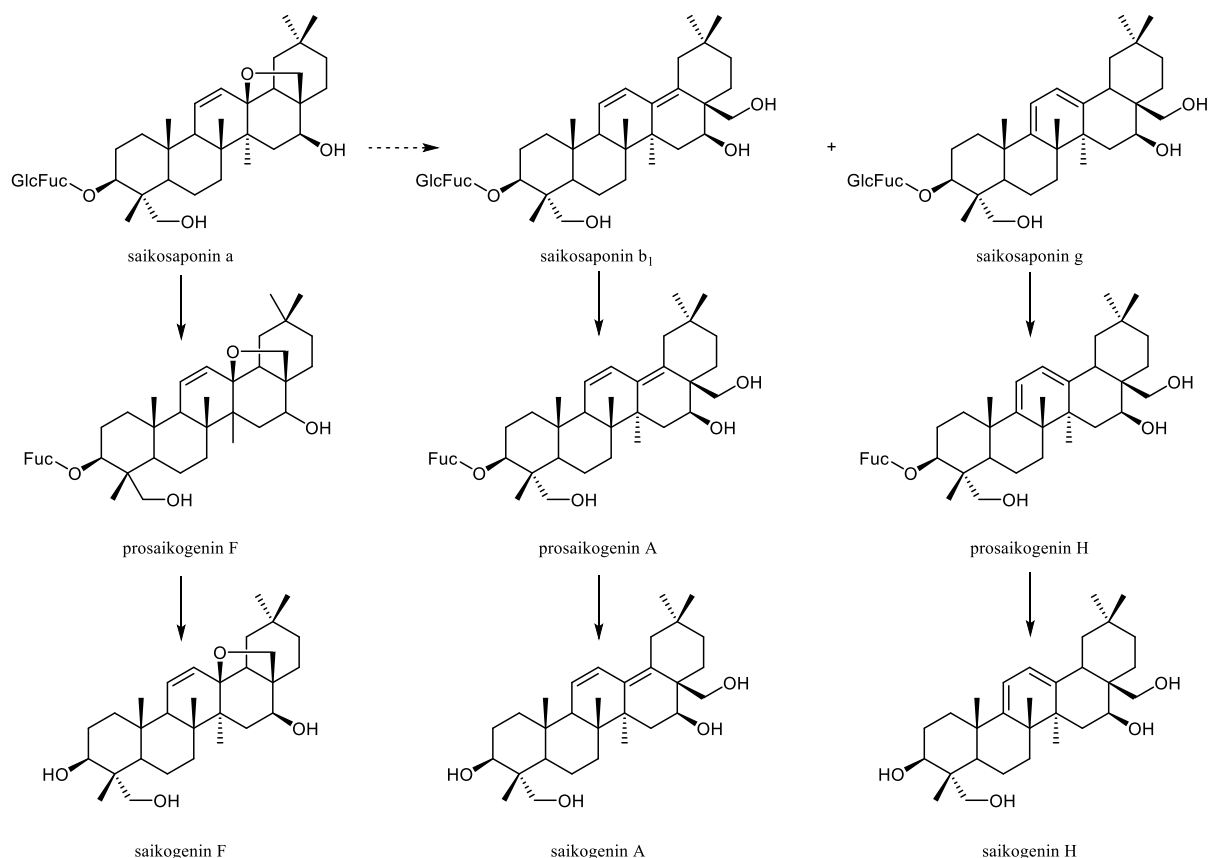
Biljna vrsta	Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃	Reference
<i>B. rotundifolium</i>	rotundiozid A	β -OH	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Glc-	SO ₃ H	Akai et al., 1985
<i>B. rotundifolium</i>	rotundiozid B	H	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Glc-	SO ₃ H	Akai et al., 1985
<i>B. rotundifolium</i>	rotundiozid C	H	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Glc-	SO ₃ H	Akai et al., 1985
<i>B. rigidum</i>	sandrosaponin IX	H	β -D-Glc-	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Glc-	Sánchez-Contreras et al., 2000
<i>B. rigidum</i>	sandrosaponin X	H	H	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Glc-	Sánchez-Contreras et al., 2000

Tabela 7. Saikosaponini tipa VI*

Biljna vrsta	Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Literatura
<i>B. chinense</i>	saikosaponin V-1	α -OH	ksilitol	CH ₃	H	OH	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Liu et al., 2001
<i>B. chinense</i>	saikosaponin V-2	α -OH	ksilitol	CH ₃	H	OH	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Liang et al., 2001b
<i>B. scorzonerifolium</i>	saikosaponin U	α -OH	pentito(1 $\rightarrow$ 1)- β -D-Glc-(6 $\rightarrow$)	CH ₃	H	OH	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Li et al., 1999
<i>B. scorzonerifolium</i>	saikosaponin V	α -OH	pentito ^{**} (1 $\rightarrow$ 1)- β -D-Glc-(6 $\rightarrow$)	CH ₃	H	OH	β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Fuc-	Li et al., 1999

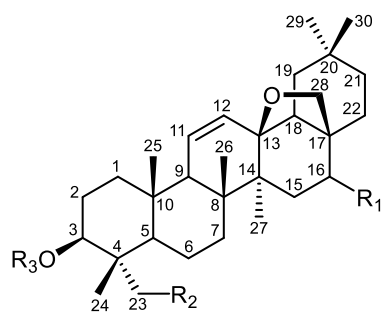
* Saikosaponini su navedeni abecednim redom.

** Pentito označava ostatak šećernog alkohola koji potiče od pentoze (npr. ksilitola, arabitola, ribitola ili liksitola).

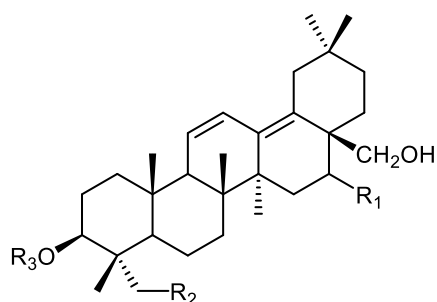


Šema 1: Formiranje metabolita saikosaponina u digestivnom traktu

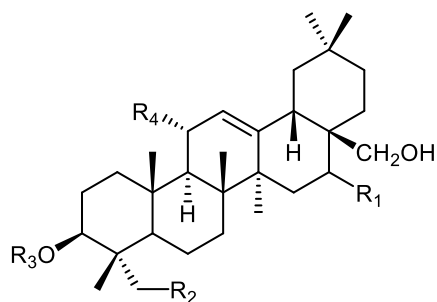
Do danas, više od 120 saponina oleanskog i ursanskog tipa je izolovano iz vrsta roda *Bupleurum* (Contreras et al., 2002; Ding et al, 1986; Ebata et al., 1996; Pistelli et al., 1993). Aglikoni ovih saikosaponina su slične oksigenovane pentaciklične triterpenske strukture, koji se mogu razlikovati samo na osnovu položaja i broja dvogubih veza u prstenovima C i D, i oksigenacije u položajima 16, 23, 28 i 30 (slika 3). Ovi saponini uglavnom sadrže jedan (monodezmozidi), a ređe dva (bidezmozidi), lanca ugljenih hidrata direktno vezanih za alkoholne grupe u položajima 3 i 28 ili 30. Lanci ugljenih hidrata uglavnom se sastoje iz ramnoze, ksiloze, galaktoze i glukoze. Bidezmozidi se skladište u vakuolama i smatraju se za prekursore aktivnih supstanci. Pod dejstvom enzima, koji se oslobađaju prilikom povrede biljnog tkiva, hidrolizuju i daju monodezmozide, koji su farmakološki aktivni (Wink & Van Wyk, 2008). Saikosaponini sa aglikonskom strukturom predstavljaju najzastupljenije triterpenske saponine pronađene u vrstama roda *Bupleurum* (Huang et al., 2008). Među njima, saikosaponini a, c i d, koji su prvi put izolovani iz korena vrste *B. falcatum* (Kubota & Hinoh, 1968a), čine najčešće saponine u vrstama poput *B. kunmingense* Yin Li & S.L.Pan, *B. marginatum* Wall. ex DC. i *B. wenchuanense* R.H.Shan & Yin Li (Kubota & Hinoh, 1968a; Pan, 2006).



	R ₁	R ₂	R ₃
saikosaponin a	β -OH	OH	β -D-Glu-(1-3)- β -D-Fuc
saikosaponin d	α -OH	OH	β -D-Fuc
saikosaponin c	β -OH	H	β -D-Glu-(1-6)-[α -L-Rha-(1-4)]- β -D-Glu



	R ₁	R ₂	R ₃
saikosaponin b ₁	β -OH	OH	β -D-Glu-(1-3)- β -D-Fuc
saikosaponin M	H	OH	β -D-Glu-(1-3)- β -D-Fuc
prosaikogenin A	β -OH	OH	β -D-Fuc



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
bupleurozid III	β -OH	OH	β -D-Glu-(1-3)- β -D-Fuc	OH
bupleurozid IV	α -OH	OH	β -D-Glu-(1-3)- β -D-Fuc	=O
bupleurozid IX	α -OH	OH	β -D-Glu-(1-3)- β -D-Fuc	OCH ₃

Slika 3. Strukture saponina prisutnih u vrstama roda *Bupleurum*

2.2.2. Steroli

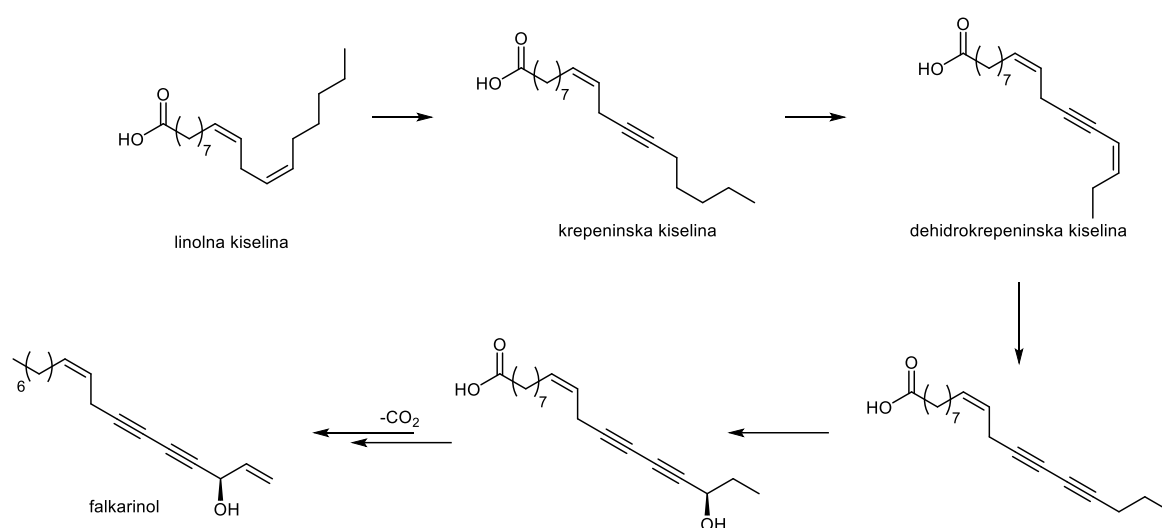
Ova klasa sekundarnih metabolita privukla je najmanje pažnje fitohemičara, zbog čega je do sada iz samo nekoliko vrsta roda *Bupleurum* izolovano svega 14 jedinjenja. Na primer, u vrsti *B. falcatum* identifikovani su β -sitosterol, stigmasterol, Δ^7 -stigmastenol, Δ^{22} -stigmastenol i aspinasterol (Takeda & Kubota, 1958). S druge strane, nadzemni delovi vrste *B. flavum* Forssk. sadrže pretežno betulin, betulinsku kiselinu, epibetulin i jasminol (Pistelli et al., 2005). Utvrđeno je da koren vrste *B. marginatum* sadrži β -sitosterol i α -spinasterol, dok su iz vrste *B. fruticosum* L. izolovani lupeol, cikloeukalenol i eritrodiol (Liang et al., 2003; Pan, 2006). Uopšteno, betulin i α -spinasterol su najčešće prisutni sterolni sastojci u vrstama roda *Bupleurum*.

2.2.3. Poliacetileni

Poliacetileni su široko rasprostranjeni metaboliti u vrstama porodica Apiaceae, Araliaceae i Asteraceae. Oni čine posebnu grupu relativno reaktivnih prirodnih proizvoda, a više od 1400 različitih poliacetilena i srodnih jedinjenja je izolovano iz različitih biljnih vrsta ovih porodica (Christensen & Brandt, 2006). Neki od poliacetilena izolovani iz biljaka koje se koriste u ljudskoj ishrani, kao što su šargarepa, celer i peršun, privukli su značajnu pažnju zbog svoje antiinflamatorne, antibakterijske, antifungalne, antiproliferativne i antitrombotične aktivnosti. Ipak, neki poliacetileni se smatraju nepoželjnim u ishrani zbog izraženih toksičnih svojstava. Poznato je da su određeni poliacetileni snažni senzibilizatori kože i da imaju značajnu citotoksičnu aktivnost (Ahn & Kim, 1988; Dempster, 2000; Machado et al., 2002; Matsunaga et al., 1990; Murdoch & Matsunaga et al., 1989). Međutim, poliacetileni izolovani iz korena vrsta *Conium maculatum* L. i *Oenanthe fistulosa* L. imaju izraženu neurotoksičnost (Anet et al., 1953; Uwai et al., 2000; Wittstock et al., 1995), a pokazalo se i da određeni poliacetileni izolovani iz vrsta roda *Bupleurum* mogu biti neurotoksični u visokim koncentracijama (Vetter, 2004; Wittstock et al., 1997).

Poliacetileni koji se nalaze u biljnim vrstama iz porodice Apiaceae predstavljaju hemijski koherentnu grupu alifatičnih C_{17} lipida koji biosintetski potiču od nezasićenih C_{18} masnih kiselina. Njihovo karakteristično strukturno obeležje čini 1,3-konjugovani endiinski sistem (a ređe entriinski), koji daje izražen maksimum apsorpcije na oko 230 nm u UV-spektru, kao i prepoznatljive signale u ^{13}C NMR-spektru u opsegu od 77 do 85 ppm, što odgovara *sp*-hibridizovanim ugljenicima. Prototip ove klase jedinjenja je falkarinol i gotovo svi acetilenski derivati zadržavaju osnovni skelet sa 17 ugljenikovih atoma i *R*-konfiguraciju na C-3 položaju.

Dalja oksigenacija prvenstveno u položaju C-8 (ponekad i C-9) dovodi do formiranja falkarindiola, njegovog 3-acetatnog estra, 8-*O*-metilfalkarindiola, kao i niza epoksida i ketona. Tragovi prekursora sa 18 ugljenikovih atoma, pre svega krepeninske kiseline (*cis*-oktadeka-9-en-12-inska kiselina) i njenog Δ^{14} -nezasićenog analoga, mogu se detektovati u biljkama, potvrđujući njihovu ulogu kao ključnih biosintetskih međuproizvoda (šema 2, Ahmad et al., 2019). Konjugovane trostruke veze u poliacetilenima odgovorne su za hemijsku reaktivnost ovih jedinjenja koja pod uticajem toplote, svetlosti ili u prisustvu katalitičkih količina prelaznih metala, lako polimerizuju ili se oksiduju (na primer reaktivnost je odgovorna za potamnjivanje soka od šargarepe tokom prerade).

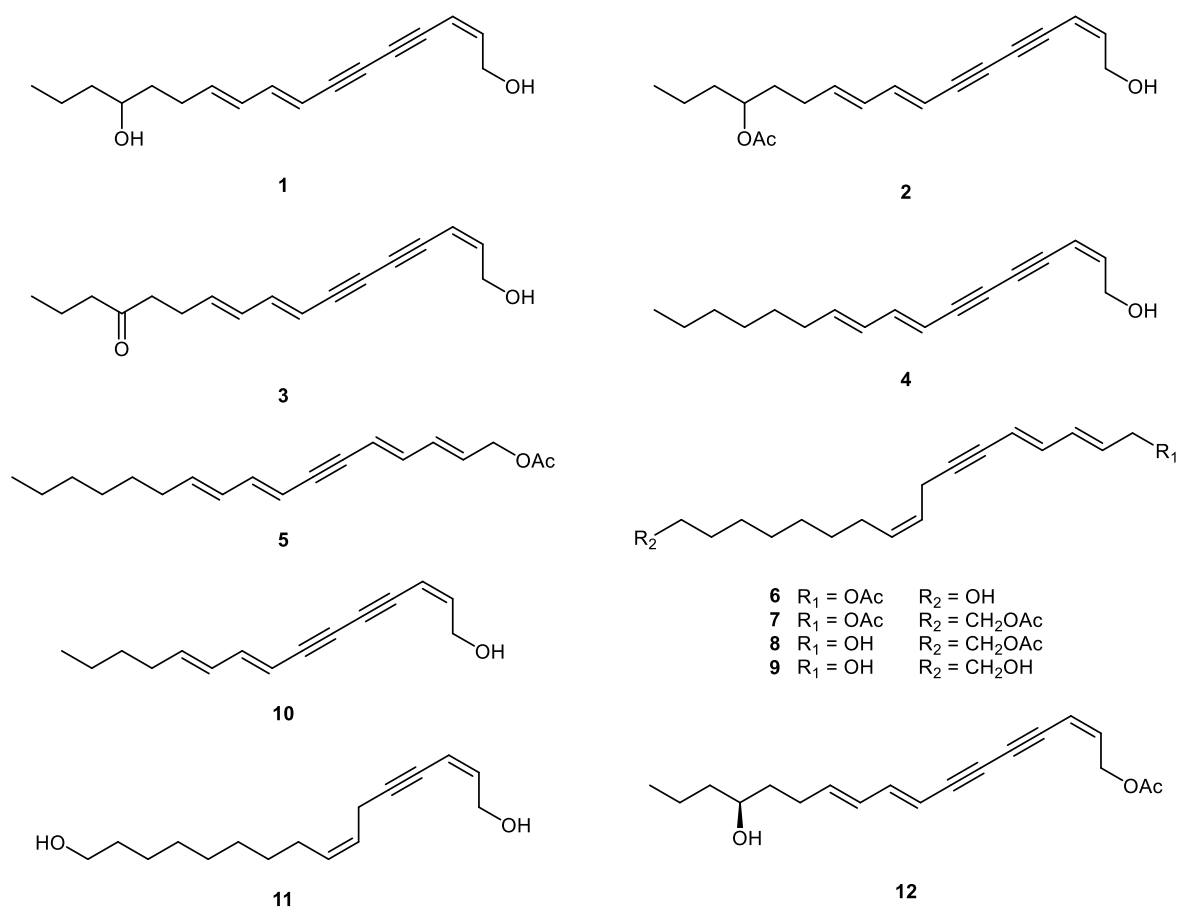


Šema 2. Biosintetski put sinteze falkarinola

Biosintetski put poliacetilena započinje linolnom kiselinom (šema 2). Divergentna Δ^{12} -acetilenaza, koja je evolutivno izvedena iz FAD2 desaturaze, konvertuje *cis*- Δ^{12} -dvostruku vezu u trostruku, čime nastaje krepeninska kiselina. Delovanje Δ^{14} -desaturaze, a zatim i druge, poziciono-specifične acetilenaze proširuje diinski sistem; dodatni ciklus desaturacije i uvođenje trogube veze. U sledećem koraku dekarboksilacija dovodi do formiranja karakterističnog C_{17} lanca. Citohrom-P450 mono-oksigenaze iz CYP716A podfamilije katalizuju ugradnju hidroksilne grupe u položaj C-3 i, gde je potrebno, uvođenje 8,9-diolne ili epoksidne funkcionalne grupe, dok aciltransferaza može dalje acetilovati pomenutu alkoholnu grupu na C-3. U šargarepi, ključni gen za Δ^{12} -acetilenazu, DcFAD2-2, snažno se eksprimuje kao odgovor na infekciju patogenom *Alternaria* spp. Genom biljaka iz familije Apiaceae obično sadrži proširenu FAD2 gensku familiju, čiji su članovi diverzifikovani u pogledu Histitija i signala za ciljanje plastida, čime se obezbeđuje enzimska raznovrsnost, potrebna za biosintezu acetilenskih lipida. Signalni putevi jasmonata i salicilata dodatno regulišu ovaj

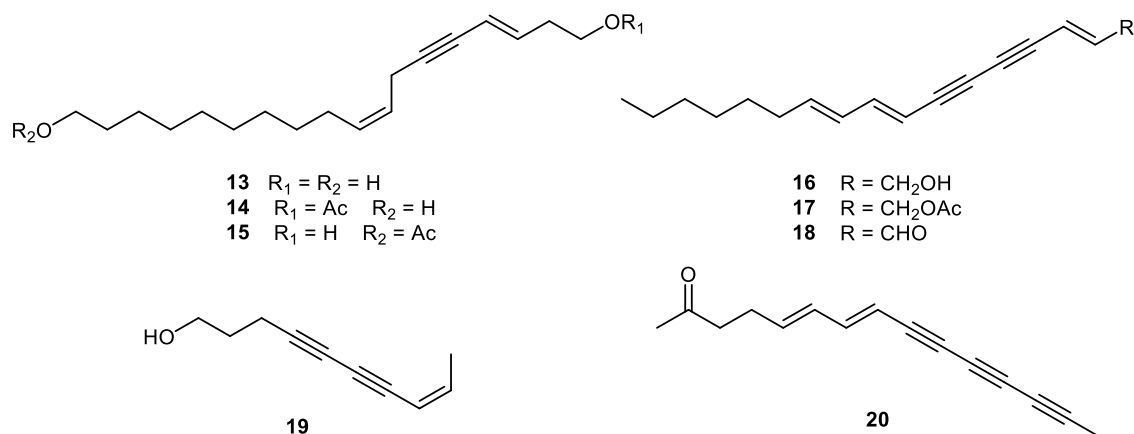
biosintetski put. Na primer, u korenu celera, tretiranje metil-jasmonatom značajno podstiče akumulaciju poliacetilena kao što je falkarinol – slično indukovanim efektima viđenim kod srodnih vrsta porodice Apiaceae, pri čemu se nivo poliacetilena povećava za više od dvostruko u roku od nekoliko dana nakon tretmana metil-jasmonatom (Ho et al., 2020). Ove biohemijske i genetske komponente zajedno objašnjavaju kako taksonomsku rasprostranjenost, tako i strukturnu raznovrsnost poliacetilena unutar ove porodice.

Oko 25 različitih poliacetilena je izolovano iz više različitih vrsta roda *Bupleurum*. Zhao i saradnici su među prvima izolovali četiri nova poliacetilena iz vrste *B. longiradiatum* Turcz., i nazvali ih bupleurotoksin (1), acetil-bupleurotoksin (2), bupleuronol (3) i bupleurinol (4) (Zhao et al., 1987). Iz dihlormetanskog ekstrakta nadzemnih delova iste biljne vrste je kasnije izolovano još osam novih jedinjenja (5–12), čije su strukture prikazane na slici 4 (Huang et al., 2009). Važno je napomenuti da *B. longiradiatum* predstavlja bogat izvor poliacetilena. Strukturno slični prirodni proizvodi izolovani su iz još nekoliko vrsta roda *Bupleurum*. Jedinjenja 5–9 su prvi „poliacetileni“ sa samo jednom acetilenskom vezom koji su izolovani iz roda *Bupleurum*.



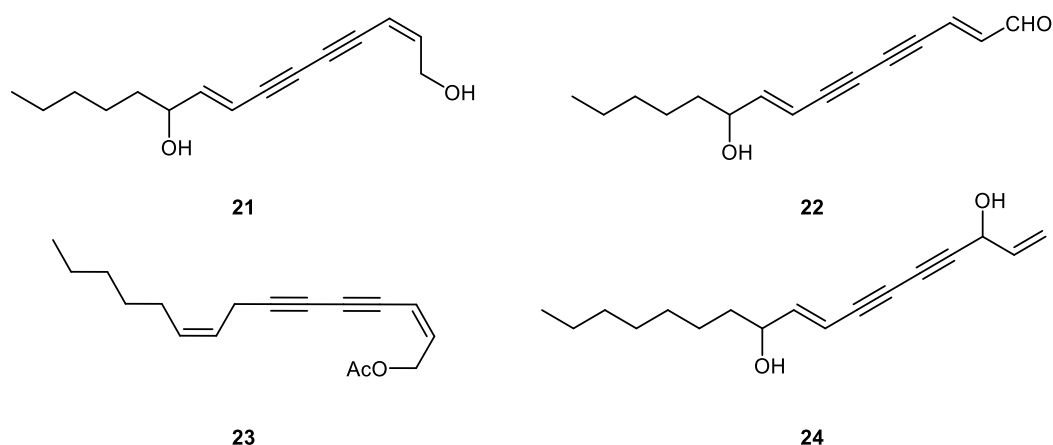
Slika 4. Strukture poliacetilenskih jedinjenja 1–12

U heksanskom ekstraktu vrste *B. acutifolium* Boiss. identificovano je sedam različitih poliacetilena (**4**, **13–18**, slike 4 i 5), od kojih je tri sa potpuno novim skeletom sa 18 ugljenikovih atoma (**13–15**) (Barrero et al., 1999). Jedinjenja **16–18** su prvi put izolovana iz vrste *B. ranunculoides* L. i *Opopanax chironium* Kch. (Bohlmann & Rode, 1968a; Bohlmann et al., 1971b). Iz heksanskog ekstrakta nadzemnog dela vrste *B. spinosum* Gouan izolovana su jedinjenja **19** i **20** (slika 5, Barrero et al., 1998).



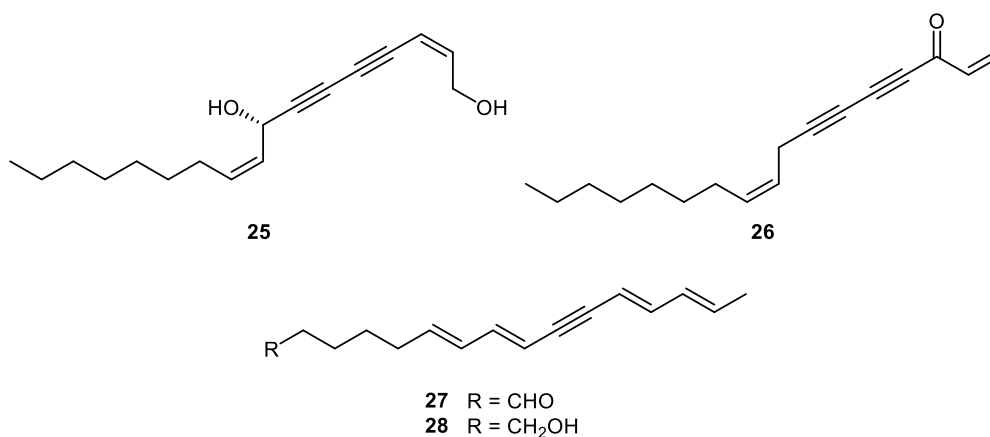
Slika 5. Strukture poliacetilenskih jedinjenja **13–20**

Saikodiini A, B i C (**21–23**, slika 6) su prvi put izolovani iz dietil-etarskog ekstrakta korena biljne vrste *B. falcatum* (Morita et al., 1991). Falkarinol i jedinjenje **24** (prethodno izolovano iz vrsta *Pituranthos tortuosus* Benth. & Hook.f. ex Asch. & Schweinf. i *Aegopodium podagraria* L.; Schulte & Petter, 1977; Schulte & Wulforth, 1977) su izolovani iz acetonskog ekstrakta korena vrste *B. rigidum* L. (Contreras et al., 2002).



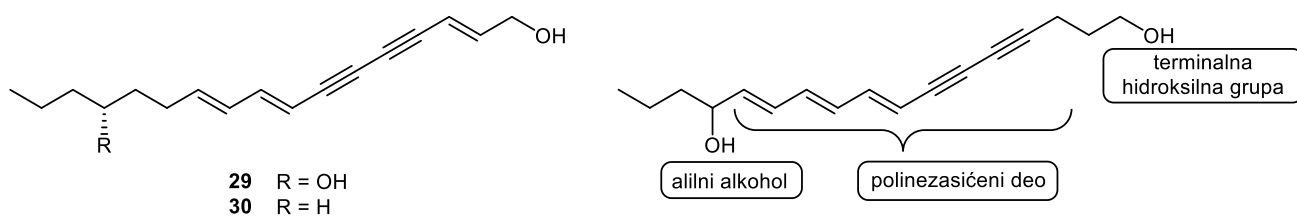
Slika 6. Strukture poliacetilenskih jedinjenja **21–24**

Iz vrste *B. salicifolium* R.Br., endemske vrste Kanarskih ostrva, izolovano je nezasićeno jedinjenje (25, slika 7), koje je prethodno izolovano iz vrste *Azorella trifurcata* Pers. (Apiaceae, Bohlmann et al., 1971a). Apsolutna konfiguracija izolovanog poliacetilena prvobitno nije bila utvrđena, već je određena od strane autora koji su jedinjenje izolovali iz vrste *B. salicifolium*. Bohlmann i saradnici su iz korena vrste *B. gibraltaricum* Lam. izolovali falkarinon (26, Bohlmann et al., 1975), koji je do tada detektovan samo u vrstama porodice Asteraceae, dok su iz nadzemnih delova izolovali dva nova poliacetilena 27 i 28 (slika 7).



Slika 7. Strukture jedinjenja 25–28

Uopšteno govoreći, poliacetileni prisutni u vrstama *B. falcatum*, *B. spinosum*, *B. salicifolium* i *B. acutifolium* ispoljavaju antibakterijsko, antiinflamatorno i antifungalno dejstvo (Alanko et al., 1994; Fujimoto et al., 1998; Kobaisy et al., 1997). Zloupotreba *B. longiradiatum* u sastavu kineskog tradicionalnog leka *Chaihu* izazvala je nekoliko slučajeva trovanja kod ljudi, a najmanje tri osobe su preminule nakon primene ove biljke (Pan, 2006; Zhao et al., 1987). Poliacetileni zastupljeni u korenu ove biljke su odgovorni za toksičnost ove vrste, a kao sastojci odgovorni za toksičnost navode se bupleurotoksin, acetilbupleurotoksin i enantotoksin (29, slika 8). Enantetol (30, slika 8), koji je detektovan u ekstraktima vrsta *B. longiradiatum*, *B. acutifolium* i *B. ranunculoides*, strukturno je blisko povezan sa enantotoksinom, međutim, uporedna studija o mehanizmu konvulzivnog dejstva pokazala je da se toksični efekti ispoljavaju tek kada su dve OH-grupe u molekulu na tačno određenoj udaljenosti (Wittstock et al., 1997). Da bi se razumela aktivnost/toksičnost poliacetilenskih jedinjenja, ispitana je povezanost strukture i aktivnosti i pokazano je da su dužina konjugovanih π -sistema, geometrija dvostrukih veza, prisustvo terminalne i alilne OH-grupe odgovorni za toksičnost ovih jedinjenja (Anet et al., 1953; Starreveld & Hope, 1975; Uwai et al., 1999).



Slika 8. Preduslovi neophodni za toksičnost poliacetilena

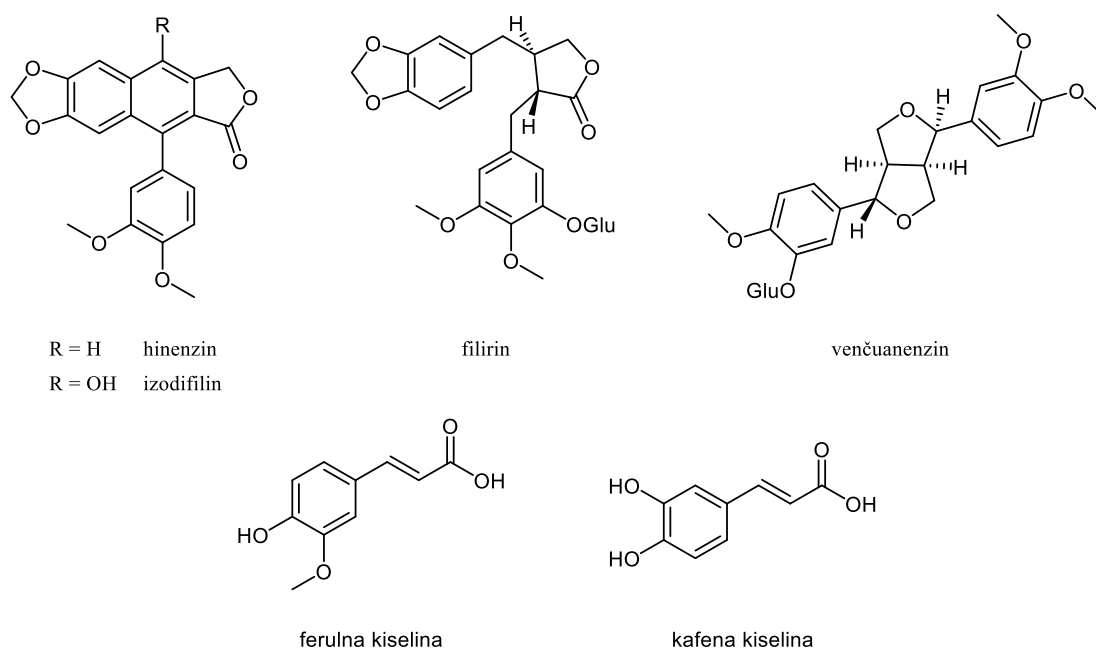
2.2.4. Lignani i fenilpropanoidi

Lignani su druga najzastupljenija klasa sekundarnih metabolita u ovom rodu, sa do sada gotovo 50 izolovanih jedinjenja. Postoje četiri glavne podklase lignana koje se razlikuju prema načinu povezivanja dve fenilpropanoidne jedinice. Najčešći su derivati dibenzilbutirolaktona (slika 9), ali su prisutni i arilnaftaleni, ariltetralinski laktoni i tetrahidrofurofurani. Ova grupa sekundarnih metabolita detaljno je proučavana kod vrste *B. salicifolium*, iz koje je izolovano oko 30 jedinjenja iz različitih delova biljke (Estévez-Braun et al., 1995; 1996; 1992; 1994; 1993; Gonzalez et al., 1989, slika 9).



Slika 9: Strukture nekih od lignana izolovanih iz vrste *B. salicifolium*

Derivati arilnaftalena (kao što su hinezin i izodifilin, slika 10) karakteristični su za vrste *B. frutescens* L., *B. handiense* (Bolle) G.Kunkel i *B. marginatum* (Gonzalez et al., 1975; Liu et al., 2008; Lopez et al., 1996), dok se derivati tetrahidrofurofurana nalaze isključivo u vrstama *B. salicifolium* i *B. wenchuanense* (Gonzalez et al., 1989; Luo et al., 1993). Većina izolovanih lignana javlja se u neglikozilovanom obliku, dok su do sada identifikovana samo dva glikozida – filirin i venčuanenzin (slika 10), oba izolovana iz vrste *B. wenchuanense* (Luo et al., 1993).

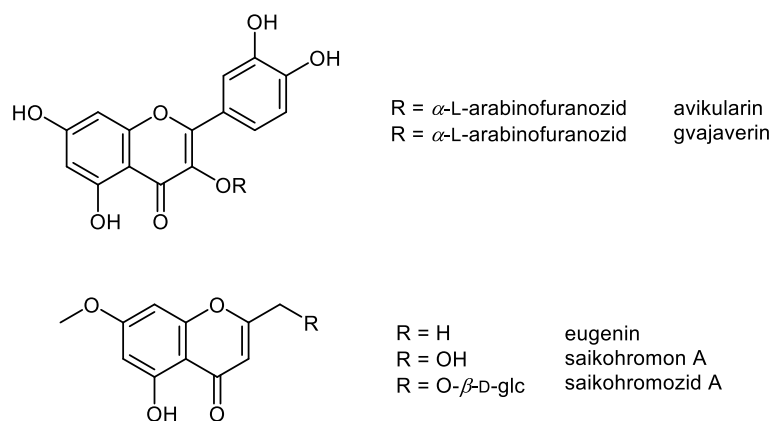


Slika 10: Strukture nekih lignana izolovanih iz vrsta roda *Bupleurum*

U ekstraktima vrsta roda *Bupleurum* prisutni su i drugi sastojci, u mnogo manjim koncentracijama, poput derivata fenilpropanoida. Generalno, među prisutnim fenilpropanskim kiselinama dominiraju kafena kiselina (slika 10) i njeni derivati. Do sada je izolovano 14 različitih fenilpropanoida iz nadzemnih delova vrste *B. fruticosum*, od kojih su najzastupljeniji ferulna kiselina i njeni derivati (Massanet et al., 1997; Pistelli et al., 1995).

2.2.5. Flavonoidi i hromoni

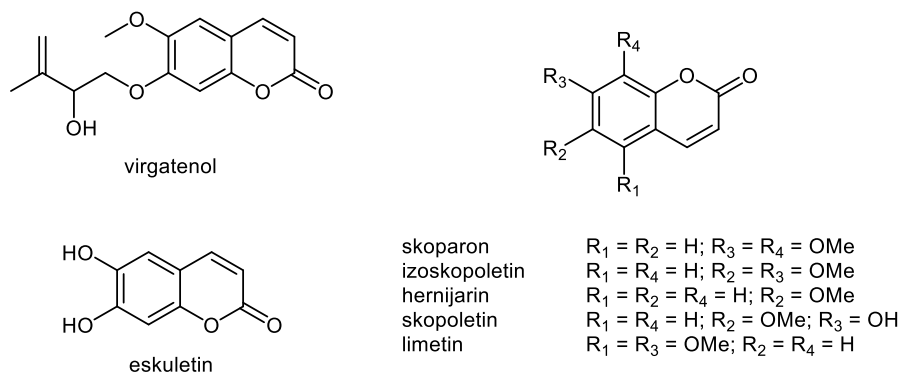
Ranije se verovalo da većina flavonoida u vrstama ovog roda predstavlja derivate kampferola, izoramnetina ili kvercetina. Nedavno su, međutim, okarakterisani neki drugi aglikoni kao što su apigenin, akacetin, krizin, luteolin i tamariksetin (Barrero et al., 1998; Pistelli et al., 2005; Zhang et al., 2007; 2008). Do danas je izolovano oko 30 različitih flavonoida, od kojih je najčešći diglikozid rutin. Pored toga, narcisin (drugi diglikozid izoramnetina) detektovan je u vrstama *B. flavum* i *B. fruticosum* (Pan, 2006; Pistelli et al., 2005). Flavonoidi, uključujući i neka manje zastupljena jedinjenja, kao što su srodni hromoni, koriste se kao hemotaksonomski markeri za razlikovanje vrsta roda *Bupleurum* (Zhang et al., 2007). Eugenin (Chang et al., 2003), saikohromon A (Kobayashi et al., 1990) i saikohromozid A (Liang et al., 1998a) su izolovani iz vrsta *B. scorzonifolium*, *B. falcatum* i *B. chinense* (slika 11).



Slika 11. Strukture nekih od flavonoida i hromona izolovanih iz vrsta roda *Bupleurum*

2.2.6. Kumarini

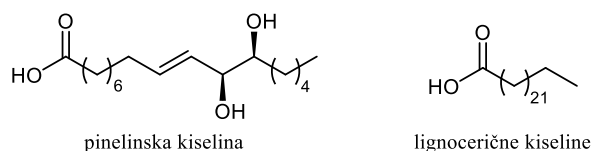
Kumarini su karakteristični sekundarni metaboliti vrsta porodice Apiaceae. Do sada je identifikovano 14 različitih kumarina u vrstama roda *Bupleurum*, od kojih su najznačajniji α -ketobenzopirani (slika 12) iz vrste *B. fruticescens* i *B. fruticosum*. Iz nadzemnih delova vrste *B. fruticescens* izolovani su hernijarin, skopoletin, izoskopoletin, skoparon i limetin (Gonzalez et al., 1975; Pan, 2006), a iz vrste *B. fruticosum* virgatenol, kapensin, fraksetin, preniletin i eskuletin (Estévez-Braun & González, 1997; Pistelli et al., 1996). Derivati piranokumarina, kao što su anomalin i preerutorin A, izolovani su iz korena vrsta *B. falcatum* i *B. marginatum* (Banreji et al., 1977; Liang et al., 2003).



Slika 12: Strukture nekih kumarina izolovanih iz vrsta roda *Bupleurum*

2.2.7. Druga jedinjenja

U ekstraktima vrsta ovog roda prisutni su i različiti saharidi i slobodne kiseline. Monosaharidi, kao što su ribitol, ksiloza i arabinoza, kao i pektinski polisaharidi, poput bupleurana 2IIb i bupleurana 2IIC, izolovani su iz vrste *B. falcatum*. Takođe, u mnogim vrstama su identifikovane slobodne kiseline, poput pinelinske, angelika, petroselinčne i lignocerične kiseline (Pan, 2006).

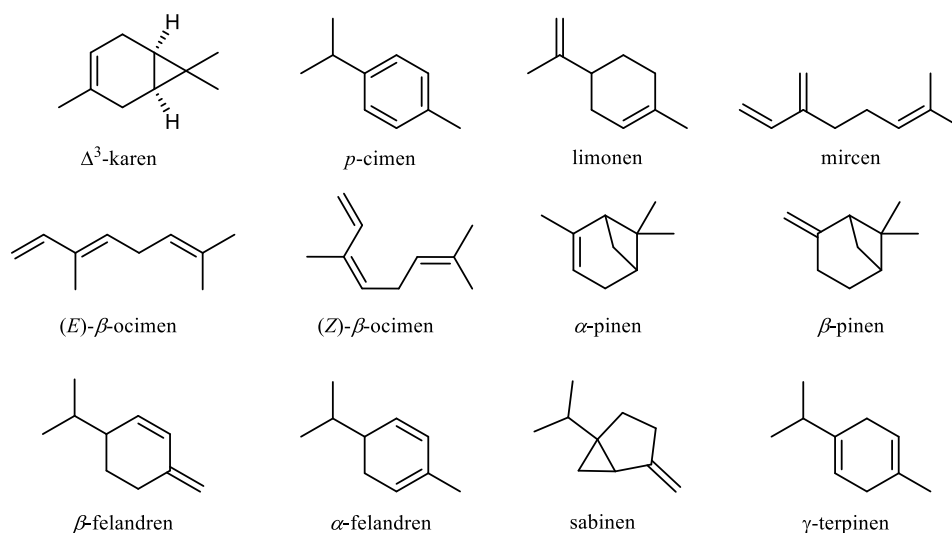


Slika 13: Strukture nekih slobodnih kiselina pronađenih u vrstama roda *Bupleurum*

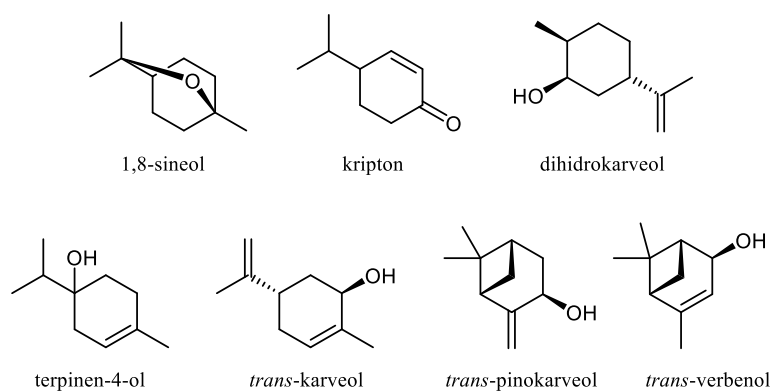
2.2.8. Isparljiva jedinjenja

Do sada je ispitan hemijski sastav etarskih ulja više od 20 različitih vrsta roda *Bupleurum*, i identifikovano je preko 200 sastojaka. Važno je napomenuti da se prinos etarskog ulja i njegov hemijski sastav razlikuje u zavisnosti od biljne vrste, biljnih organa iz kojih je ulje izolovano, kao i metode ekstrakcije, a svi dostupni rezultati su predstavljeni u tabeli 8. Etarska ulja su izolovana različitim metodama, kao što su hidrodestilacija, destilacija vodenom parom, mikrodestilacija, mikrotalasna ekstrakcija bez rastvarača i druge.

Glavni sastojci etarskih ulja vrsta roda *Bupleurum*, izolovani iz nadzemnih delova, pripadaju klasi mono- i seskviterpena. Najzastupljeniji monoterpeni ugljovodoni identifikovani u etarskim uljima vrsta ovog roda su: α - i β -pinen, *p*-cimen, limonen, sabinen, α - i β -felandren, γ -terpinen, itd. (slika 14), dok su najzastupljeniji oksigenovani monoterpeni 1,8-sineol, terpinen-4-ol, kripton, dihidrokarveol, itd. (slika 15).

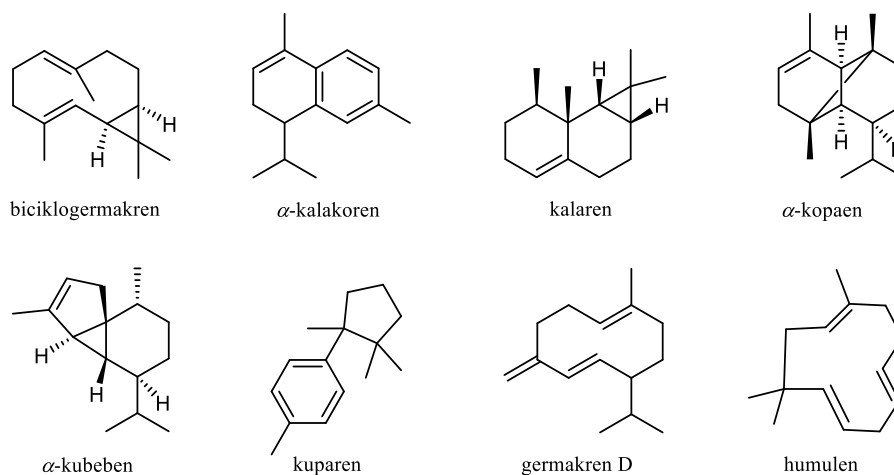


Slika 14. Najzastupljeniji monoterpenski ugljovodonici identifikovani u etarskim uljima vrsta roda *Bupleurum*

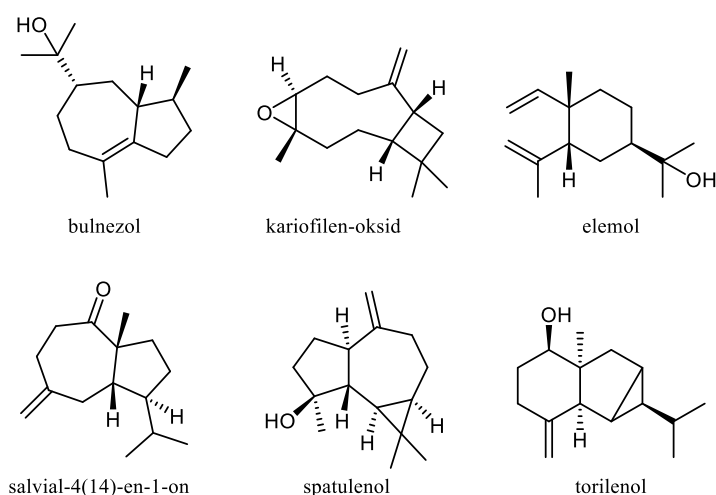


Slika 15. Najzastupljeniji oksigenovani monoterpeni identifikovani u etarskim uljima vrsta roda *Bupleurum*

Od seskviterpena i oksigenovanih seskviterpena u ovim etarskim uljima najčešće su detektovani: germakren D, biciklogermakren, kalaren, α -kopaen, bulnezol, elemol, kariofilen-oksidi, torilenol, itd. (slike 16 i 17).

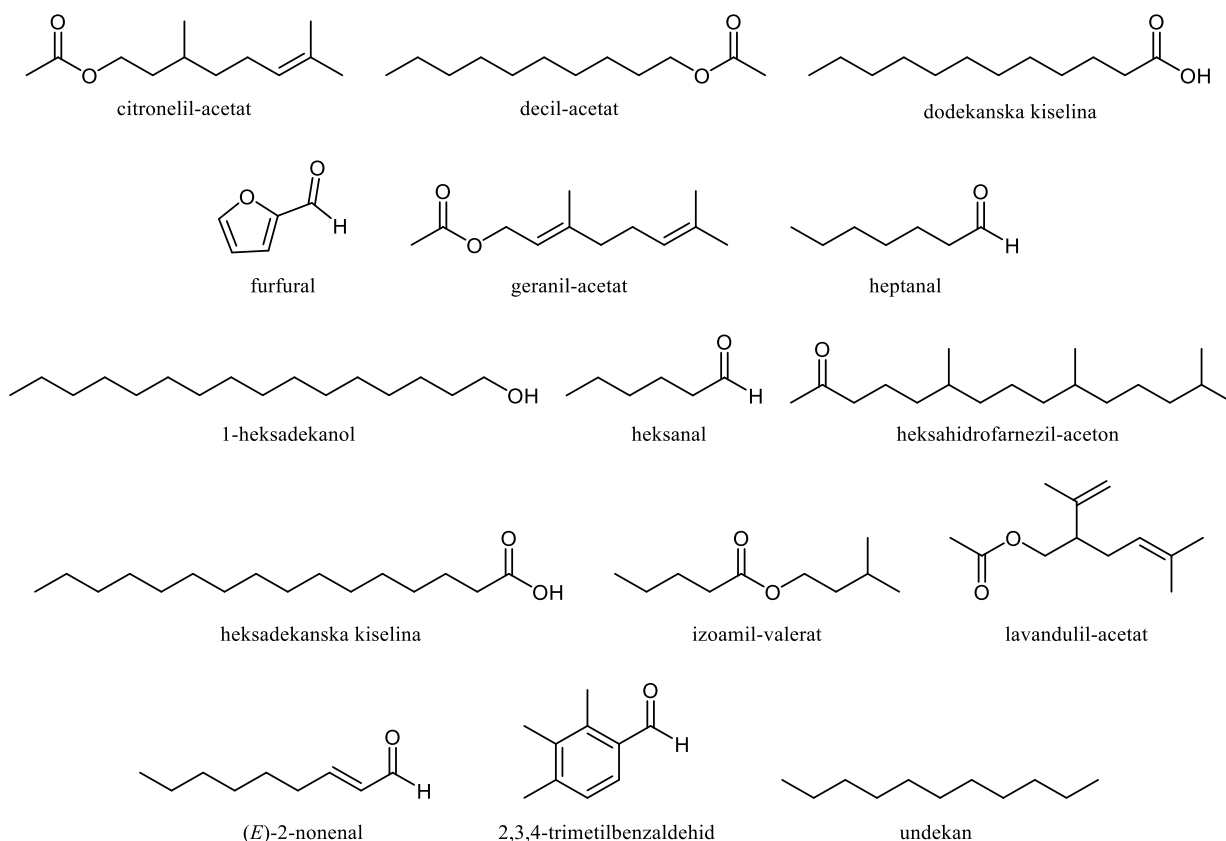


Slika 16. Najzastupljeniji seskviterpensi ugljovodonici identifikovani u etarskim uljima vrsta roda *Bupleurum*

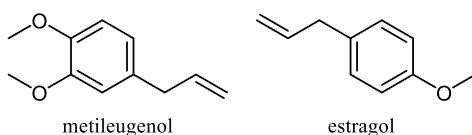


Slika 17. Najzastupljeniji oksigenovani seskviterpeni identifikovani u etarskim uljima vrsta roda *Bupleurum*

S druge strane, etarska ulja izolovana iz korena su bogata aldehydima (heksanal, heptanal, furfural), alkanima (undekan), dugolančanim alkoholima (1-heksadekanol) i kiselinama (dodekanska i heksadekanska kiselina), kao i estrima (geranil-acetat, citronelil-acetat, izoamil-valerat, slika 18). Fenilpropanoidi su takođe detektovani u etarskim uljima, ali u znatno manjim koncentracijama, pri čemu su najzastupljeniji metileugenol i estragol (slika 19).



Slika 18. Najzastupljeniji aldehidi, alkoholi, ugljovodonici i estri identifikovani u etarskim uljima vrsta roda *Bupleurum*



Slika 19. Strukture fenilpropanoida iz etarskih ulja roda *Bupleurum*: metileugenola i estragola

Prema Neves & Watson (2004), objavljeno je deset infrageneričkih sistema klasifikacije: Grenier & Godron (1848), Boissier (1872), Briquet (1897), Drude (1898), Calestani (1905), Wolff (1910), Koso-Poljanski (1913), Cerceau-Larrival (1962), Tutin (1968), i Cauwet-Mark (1976). Prva sveobuhvatna i temeljna revizija od strane Wolff-a (1910) (uključujući sekcije, podsekcije i serije) je i dalje među najčešće korišćenim (Neves & Watson, 2004). Dakle, tabela 8 prati Wolff-ov infragenerički sistem klasifikacije roda *Bupleurum*, dok za vrste opisane nakon ove publikacije, infrageneričke kategorije odražavaju sistem

klasifikacije predložen u relevantnoj literaturi (označene zvezdicom u tabeli 8). Kategorija podroda je označena za vrste uključene u nedavne revizije od strane *Neves & Watson* (2004) i *Wang et al.* (2011).

Tabela 8. Podaci o taksonima roda *Bupleurum* istraživanim u vezi sa sadržajem etarskih ulja

Biljna vrsta ^a	Podrod ^b Seksija ^c Podsekcija Serija	Deo biljke	Lokacija	Vreme prikupljanja	Prinos (%)	Ident. Sast. ^d (%)	Literatura
<i>B. aureum</i> Fisch. ex Hoffm.	<i>Bupleurum</i>	Stabljike ^e	Krasnoyarsk,	Faza cvetanja	0,07	99,0	Zykova et al., 2013
	<i>Longifolia</i> Wolff.	Listovi ^e	Rusija	2013.	0,12	96,0	
	-	Cvasti ^e			0,22	99,6	
	-	Plodovi ^e			-	77,3	
		Koren ^e			-	82,7	
<i>B. bicaule</i> Helm	<i>Bupleurum</i>	Koren ^f	Hailar, Kina	avgust 2016.	0,04 (v/w)	85,5	Wei et al., 2018
	<i>Eubupleura</i> Briq.						
	<i>Nervosa</i> Godr. ex pte. <i>Falcata</i> Wolff.	Koren ^e	Neimeng, Mongolija	oktobar 2003.	0,081 (w/w)	-	Li et al., 2007
<i>B. candollei</i> Wall. ex DC.	<i>Bupleurum</i> <i>Eubupleura</i> Briq. <i>Nervosa</i> Godr. ex pte. <i>Falcata</i> Wolff.	Nadzemni delovi ^f	Nainital, Indija	-	0,2 (v/w)	91,8	Joshi & Pande, 2008
<i>B. cappadocicum</i> Boiss.	-	Cvasti ^g	Karaman,	maj-avgust	-	96,8	Saraçoğlu et al., 2012
	<i>Eubupleura</i> Briq.	Plodovi ^e	Turska	2009.	-	94,3	
	<i>Juncea</i> Briq.	Koren ^e			-	96,6	
	-						
<i>B. chinense</i> DC.	<i>Bupleurum</i> <i>Eubupleura</i> Briq.	Koren ^e	Liaoning, Kina	oktobar 2003.	0,055 (w/w)	-	Li et al., 2007
<i>Radix Bupleuri</i> <i>Chinensis</i>	<i>Nervosa</i> Godr. ex pte. <i>Falcata</i> Wolff.	Listovi ^f	Provincija	-	-	-	Meng et al., 2014
		Cvasti ^f	Sichuan, Kina		-	-	
		Stabljike ^f			-	-	
		Koren ^f			-	-	
		Plodovi ^f			-	-	

<i>B. chinense</i> DC. f. vanheurckii (Muell.-Arg.) Shan et Y.Li (syn. <i>B. chinense</i> DC.)	<i>Bupleurum Eubupleura</i> Briq. <i>Nervosa</i> Godr. ex pte. <i>Falcata</i> Wolff.	Delovi biljke koji se koriste za pripremu dekokta ^f	Planina Kunyu, Kina	avgust 2010.	-	93,3	Ze-Kun & Haixia, 2012
<i>B. croceum</i> Fenzl	- <i>Perfoliata</i> Godr. <i>Laevia</i> Briq. -	Cvasti ^e Plodovi ^e Korenovi ^e	Konya, Turska	maj–avgust 2009.	- - -	96,3 84,1 93,6	Saraçoğlu et al., 2012
<i>B. falcatum</i> L.	<i>Bupleurum Eubupleura</i> Briq. <i>Nervosa</i> Godr. ex pte. <i>Falcata</i> Wolff.	Nadzemni delovi ^e	Semnan Fullad Mahaleh, Iran	april–jun 2011.	-	98,8	Abolfazl et al., 2013, 2014
		Nadzemni delovi ^e	Oblast Talaghan, Iran	jun 2007.	0,2 (w/w)	90	Rustaiyan et al., 2010
		Cvasti ^e	Semnan, Fullad mahaleh, Iran	april–jun 2011.	-	98,8	Mohammadi et al., 2014
<i>B. falcatum</i> L. subsp. <i>cernuum</i> (Nyman) Arcang.	<i>Bupleurum Eubupleura</i> Briq. <i>Nervosa</i> Godr. ex pte. <i>Falcata</i> Wolff.	Cvasti ^g Plodovi ^g Korenovi ^e	Konya, Turska	maj–avgust 2009.	- - -	85,2 89,5 88,8	Saraçoğlu et al., 2012
		Nadzemni delovi ^e	Provincija Khorasan, Iran	maj 2004.	0,1	97,3	Sajjadi, 2008
<i>B. fruticosum</i> L.	<i>Penninervia</i> S.S.Neves & M.F.Watson <i>Coriacea</i> Godr. - -	Stabljike, listovi i cvasti ^f	Planina Parnon, Grčka	-	14,91 ml/kg	-	Evergetis & Haroutounian, 2014
		Listovi i štitovi u cvetu ^e	Cerca de Santa Comba, Portugal	Faza cvetanja	0,8	99,0	Maxia et al., 2011
		Listovi i štitovi koji su sadržavali plodove ^e		Faza cvetanja	1,1	96,9	

Listovi ^e	Baunei, Italija	Pre cvetanja	1,0	96,3	
Listovi i štitovi u cvetu ^e		Faza cvetanja	1,8	92,3	
Listovi i štitovi koji su sadržavali plodove ^e		Faza plodova	2,6	96,1	
Nadzemni delovi ^f	Korzika,	-	-	97,8	Liu et al., 2009
Cvasti ^e	Francuska	-	1,1	95,9-97,9	
Listovi i stabljike ^e		-	1,6		
Cvasti ^e		-	1,3		
Listovi i stabljike ^e		-	2,2		
Nadzemni delovi ^e		-	1,71	92,6-96,6	
Nadzemni delovi ^h		-	0,21		
Nadzemni delovi ^e		-	1,86		
Nadzemni delovi ^h		-	0,25		
Nadzemni delovi ^e		maj 2005.	1,2		
Nadzemni delovi ^e		jul/septembar 2005.	2,9		
Nadzemni delovi ^e		novembar 2005.	2,6		
Nadzemni delovi ^e		maj 2005.	0,8		
Nadzemni delovi ^e		jul/septembar 2005.	2,4		
Nadzemni delovi ^e		novembar 2005	2,4		
Plodovi ^e	Villeneuve les Corbieres, Francuska	avgust 2000.	2,5 (v/w)	98,2	Chizzola, 2008
Stabljike ^e	Botanička bašta Univerziteta u	april 2000.	1,8 (v/w)	90,0	Bertoli et al., 2004
Listovi ^e	Urbino, Farmaceutski		3,0 (v/w)	98,4	
Biljke dobijene mikropropagacijom ^e	fakultet, Italija		0,1 (v/w)	99,3	

		Vršni delovi u cvetu ^e	Oblast Ras-el-Hylal, Libija	april 1993.	3 ml/120 g	-	Giamperi et al., 1998
		Stabljike ^e	Botanička bašta Univerziteta u	avgust 1991.	3,6 (v/w)	-	Manunta et al., 1992
		Listovi ^e	Urbinu, Institut za botaniku, Italija		2,3 (v/w)	-	
		Štitovi koji su sadržavali plodove ^e	Planine Sierra Cogollos, Španija	septembar 1985.	1,85 (v/w)	-	Lorente et al., 1989
		Listovi ^e	Toskana, Italija	zima 2019.	0,52	100	Roma-Marzio et al., 2020
		Stabljike ^e			0,07	99,9	
		Plodovi ^e			0,26	100	
		Listovi ^e		leto 2019.	0,82	100	
		Stabljike ^e			veoma mali prinos	100	
		Plodovi ^e			veoma mali prinos	99,3	
		Plodovi ^e			0,10 (w/w)	81,2	
<i>B. frutescens</i> L.	<i>Bupleurum Eubupleura</i> Briq. <i>Rigida</i> Drude. -	Štitovi koji su sadržavali plodove ^e	Sierra Baza mountains, Španija	maj 1989.	0,055 (w/w)	-	Martin et al., 1993
<i>B. gerardi</i> All.	<i>Bupleurum Eubupleura</i> Briq. <i>Juncea</i> Briq. -	Cvasti ^g	Konya, Turska	maj–avgust 2009.	-	81,2	Saraçoğlu et al., 2012
		Plodovi ^g			-	83,0	
		Korenovi ^g			-	83,2	
		Nadzemni delovi ^e	Bojnourd, Iran	jun 2006.	0,25 (w/w)	96,2	Rustaiyan et al., 2010

		Nadzemni delovi ⁱ	Selo Šaban, Turska	jun 2013.	-	91,7	Kiliç, 2014
<i>B. gibraltaricum</i> Lam.	<i>Penninervia</i> <i>S.S.Neves &</i> <i>M.F.Watson</i> <i>Coriacea</i> Godr. - -	Listovi ^f	Oblast El Zumbel, Jaén, Španija	maj 1996.	1,2	-	Fernández- Ocaña et al., 2006
		Stabljike ^f			0,3	-	
		Nadzemni delovi ^f			1,0	-	
		Listovi ^f		jul 1996.	0,8	-	
		Stabljike ^f			0,5	-	
		Štitovi ^f			3,7	-	
		Nadzemni delovi ^f		septembar 1996.	0,9	-	
		Listovi ^f			1,8	-	
		Stabljike ^f			0,7	-	
		Štitovi ^f			2,2	-	
		Nadzemni deo ^f		novembar 1995.	1,9	-	
		Listovi ^f			1,1	-	
		Stabljike ^f			0,5	-	
		Štitovi ^f			3,4	-	
		Plodovi ^f			4,0	-	
		Nadzemni delovi ^f			0,8	-	
		Nadzemni delovi ^f	Jaén, Španija	septembar 1996.	1,91	93,6	Fernández- Ocaña et al., 2004
		Nadzemni deo ^e	Puente de la Sierra, Jaén, Španija	novembar 1995.	1,3 (w/w)	95,9	Velasco- Negueruela et al., 1998
		Štitovi ^e			2,0 (w/w)	95,8	
		Stabljike ^e			0,4 (w/w)	96,8	
		Listovi ^e			1,6 (w/w)	98,3	
		Plodovi ^e			2,2 (w/w)	98,9	
		Nadzemni delovi ^e	Sierra Cazulas, Španija	avgust 1985.	2,8 (w/w)	-	Ocete et al., 1989
<i>B. hamiltonii</i> N.P.Balacr.	<i>Bupleurum</i> <i>Eubupleura</i> Briq. <i>Nervosa</i> Godr. ex pte.	Nadzemni delovi ^f	Nainital, Uttarakhand, Indija	avgust 2009.	0,2–0,3 (v/w)	92,8	Pande et al., 2012

	<i>Falcata</i> Wolff.						
<i>B. heldreichii</i> Boiss. & Balansa	- <i>Perfoliata</i> Godr. <i>Rugosa</i> Briq. -	Cvasti ^e Plodovi ^e Korenovi ^e	Konya, Turska	-	- - -	97,5 96,1 98,2	Saraçoğlu, 2011
<i>B. intermedium</i> Steud. (syn. <i>B. subovatum</i> Link ex Spreng.)	- <i>Perfoliata</i> Godr. <i>Rugosa</i> Briq. -	Cvasti ^g Plodovi ^e Korenovi ^g	Karaman, Turska	maj–avgust in 2009.	- - -	93,6 94,0 89,1	Saraçoğlu et al., 2012
<i>B. lancifolium</i> Hornem.	<i>Bupleurum</i> * <i>Bupleurum</i> * <i>Bupleurum</i> -	Cvasti ^e Plodovi ^e Korenovi ^e	Karaman, Turska	maj–avgust 2009.	- - -	89,8 90,4 91,2	Saraçoğlu et al., 2012
<i>B. longicaule</i> Wall. & DC. var. <i>giraldii</i> H.Wolff	<i>Bupleurum</i> <i>Eubupleura</i> Briq. <i>Nervosa</i> Godr. ex pte. <i>Ranunculoidea</i> Wolff.	Korenovi ^e	Qinghai, Kina	oktobar 2003.	0,049 (w/w)	-	Li et al., 2007
<i>B. longiradiatum</i> Turcz.	<i>Bupleurum</i> <i>Longifolia</i> Wolff. - -	Korenovi ^e	biljna pijaca u Xi'an Shaanxi Provinciji u Kini	-	0,02 (w/w)	99,3	Shi et al., 2010
<i>B. lycaonicum</i> Snogerup	* <i>Agostana</i> ^j - - -	Cvasti ^g Plodovi ^e Korenovi ^e	Konya, Turska	-	- - -	88,4 88,2 81,2	Saraçoğlu, 2011
<i>B. malconense</i> R.H.Shan & Yin Li	<i>Bupleurum</i> ^k - - -	Korenovi ^e	Sichuan, Kina	oktobar 2003.	0,014 (w/w)	-	Li et al., 2007

<i>B. marginatum</i> Wall. ex DC.	<i>Bupleurum</i>	Korenovi ^e	Anhui, Kina	oktobar 2003.	0,020 (w/w)	-	Li et al., 2007
	<i>Eubupleura</i> Briq.						
	<i>Nervosa</i> Godr. ex pte. <i>Falcata</i> Wolff.	Nadzemni delovi ^e Nadzemni delovi ^e	Komercijalno dostupni	- -	0,053 0,094	94,29 -	Ashour et al., 2009
<i>B. microcephalum</i> Diels	<i>Bupleurum</i> <i>Eubupleura</i> Briq. <i>Nervosa</i> Godr. ex pte. <i>Falcata</i> Wolff.	Korenovi ^e	Sichuan, Kina	oktobar 2003.	0,010 (w/w)	-	Li et al., 2007
<i>B. montanum</i> Coss. & Durieu	<i>Bupleurum</i> <i>Eubupleura</i> Briq. <i>Rigida</i> Drude. -	Nadzemni delovi ^e	Megress planina, Alžir	maj 2008.	0,3	98,6	Laouer et al., 2009
<i>B. multinerve</i> DC.	<i>Bupleurum</i> <i>Eubupleura</i> Briq. <i>Nervosa</i> Godr. ex pte. <i>Ranunculoidea</i> Wolff.	Nadzemni delovi ^e	Terelj, Planine Hentii, Mongolija	avgust– septembar 2010.	0,35 (w/w)	-	Altantsetseg et al., 2012
<i>B. odontites</i> L.	<i>Bupleurum</i> <i>Eubupleura</i> Briq. <i>Glumacea</i> Boiss. <i>Fenestrata</i> Wolff.	Cvasti ^e Plodovi ^e	Accia, Sicilija, Italija	jun 2014.	0,12 (w/w) 0,10 (w/w)	96,6 81,2	Casiglia et al., 2016
<i>B. pauciradiatum</i> Fenzl	- * <i>Bupleurum</i> ¹ * <i>Juncea</i> -	Cvasti ^e Plodovi ^e Korenovi ^e	Karaman, Turska	-	- - -	94,9 92,8 93,0	Saraçoğlu, 2011
<i>B. plantagineum</i> Desf.	<i>Bupleurum</i> <i>Eubupleura</i> Briq. <i>Rigida</i> Drude. -	Listovi ⁱ Stabljike ⁱ Korenovi ⁱ Nadzemni delovi ^e	-	decembar 2016.	- - - 0,18	91,12 76,01 87,97 98,78	Mékaoui et al., 2020

		Nadzemni delovi ^e	Cap Carbon, Alžir	maj 2008.	0,21	99,8	Laouer et al., 2009
<i>B. praealtum</i> L.	<i>Bupleurum</i> <i>Eubupleura</i> Briq. <i>Juncea</i> Briq. -	Osušeni biljni materijal ^f	Sokobanja- Ozren, Srbija	jun 2003.	-	86,5	Kapetanos et al., 2008
<i>B. rigidum</i> L. subsp. <i>paniculatum</i> (Brot.) H. Wolff.	<i>Penninervia</i> <i>S.S.Neves &</i> <i>M.F.Watson</i> <i>Eubupleura</i> Briq. <i>Marginata</i> Godr. ex pte. -	Nadzemni delovi ^e	Montes de Toledo, Španija	jun 1996.	0,94	97,6	Pala-Paul et al., 1999
<i>B. rotundifolium</i> L.	<i>Bupleurum</i> <i>Perfoliata</i> Godr. <i>Laevia</i> Briq. -	Nadzemni delovi ⁱ	Plato Dikme, Turska	jun 2013.	-	90,8	Kiliç, 2014
		Korenovi ^e	-	-	-	74,2	Nageswara et al., 2012
		Cvasti ^e			-	81,5	
		Plodovi ^e			-	83,6	
		Korenovi ^e	Konya, Tursku	jun i jul 2009.	-	74,2	Akin et al., 2012
		Cvasti ^e			-	81,9	
		Plodovi ^e			-	83,8	
<i>B. scorzonifolium</i> Willd.	<i>Bupleurum</i> <i>Eubupleura</i> Briq. <i>Nervosa</i> Godr. ex pte. <i>Falcata</i> Wolff.	Nadzemni delovi ^e	Selo Sotnikovo, Rusija	jun 2014–avgust 2017.	1,66 (v/w)	-	Tykheev et al., 2018
					0,3	-	
					0,62	-	
			Selo Ivolga, Rusija		0,38	-	
			Zagustay, Rusija		0,80	-	
			Selo Georgievka, Rusija		0,18	-	

			Selo Oninoborsk, Rusija		0,33	-	
			Selo Shiringa, Rusija		0,31	-	
			Selo Nyzhniy Tsasuchey, Rusija		0,32	-	
			Planina Bayan Ulaan Uul, Rusija		0,31	-	
			Oblast Berkh, Rusija		0,51	-	
			Oblast Berkh, Rusija		0,38	-	
			Oblast Berkh, Rusija		0,51	-	
			Oblast Berkh, Rusija		0,33	-	
			Jezero Huh nuur, Rusija		0,34	-	
		Korenovi ^e	Dongbei, Kina	oktobar 2003.	0,068 (w/w)	-	Li et al., 2007
		Nadzemni delovi ^e	Terelj, Planine Hentii, Mongolija	avgust–septembar 2010.	0,15 (w/w)	-	Altantsetseg et al., 2012
<i>B. sibiricum</i> Vest ex Roem. & Schult.	<i>Bupleurum Eubupleura</i> Briq. <i>Nervosa</i> Godr. ex pte. <i>Ranunculoidea</i> Wolff.	Nadzemni delovi ^e	Zuunharaa, Turska	avgust–septembar 2010.	0,24 (w/w)	-	Altantsetseg et al., 2012
<i>B. sibthorpi</i> anum S. S. var. <i>diversifolium</i> (Roch.) Hay	- <i>Eubupleura</i> Briq. <i>Nervosa</i> Godr. ex pte. <i>Falcata</i> Wolff.	Osušeni biljni materijal ^f	Kopaonik, Srbija	jun 2003.	-	91,2	Kapetanios et al., 2008

<i>B. smithii</i> H.Wolff. var. <i>parvifolium</i> R.H.Shan & Yin Li	<i>Bupleurum</i> ^k - - -	Korenovi ^e	Neimeng, Kina	oktobar 2003.	0,052 (w/w)	-	Li et al., 2007
<i>B. sulphureum</i> Boiss. & Balansa	- <i>Eubupleura</i> Briq. <i>Glumacea</i> Boiss. <i>Aristata</i> Godr.	Cvasti ^e Plodovi ^e Korenovi ^e	Konya, Turska	-	- - -	91,0 77,3 82,7	Saraçoğlu, 2011
<i>B. turcicum</i> Snogerup	- <i>Eubupleura</i> Briq. <i>Trachycarpa</i> Lange. -	Cvasti ^e Plodovi ^e Korenovi ^e	Konya, Turska	-	- - -	93,8 94,9 93,0	Saraçoğlu, 2011
<i>B. wenchuanense</i> R.H.Shan & Yin Li	<i>Bupleurum</i> ^k - - -	Korenovi ^e	Sichuan, Kina	oktobar 2003.	0,015 (w/w)	-	Li et al., 2007
<i>B. yinchowense</i> R.H.Shan & Yin Li	<i>Bupleurum</i> ^k - - -	Korenovi ^e	Shanxi, Kina	oktobar 2003.	0,050 (w/w)	-	Li et al., 2007

^a Imena su usklađena sa *World Flora Online* (worldfloraonline.org); ^b Neves & Watson, 2004; ^c Wolff, 1910; ^d identifikovani sastojci; ^e etarsko ulje dobijeno hidrodestilacijom; ^f etarsko ulje dobijeno destilacijom vodenom parom; ^g etarsko ulje dobijeno mikrodestilacijom; ^h etarsko ulje dobijeno ekstrakcijom mikrotalasima bez rastvarača; ⁱ etarsko ulje dobijeno mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi; ^j Tykheev et al., 2020; ^k Wang et al., 2011; ^l Snogerup & Snogerup, 2001.

Pokazano je da se etarsko ulje listova i cvasti vrste *B. aureum* u fazi cvetanja pretežno sastoji od seskviterpenskih ugljovodonika, dok su najzastupljenija jedinjenja u etarskom ulju stabljike bili terpenški ugljovodonici i alkani (Zykova et al., 2013), konkretno glavni sastojci etarskog ulja stabljike su β -pinen (9,0%), kariofilen (18,7%) i undekan (12,4%), a u etarskom ulju listova kariofilen (19,6%) i bicikloseskvifelandren (8,5%). Kariofilen (28,0%), β -pinen (10,6%) i undekan (8,4%) su bili glavni sastojci etarskog ulja cvetova vrste *B. aureum*.

Etarsko ulje vrste *B. bicaule* analizirano je dva puta do sada, sa različitih lokaliteta, iz Kine i Mongolije (Li et al., 2007; Wei et al., 2018). Wei i saradnici navode da su glavni sastojci ulja bili *trans*-2-izopropilbiciklo[4.3.0]non-3-en-8-on (25,9%) i 4,5-dimetil-1,2,3,6,7,8,8a,8b-oktahidrobifenilen* (23,5%). Najzastupljeniji sastojak etarskog ulja uzorka ove vrste iz Mongolije bio je 4-tridecen-6-in** (42,6%, Li et al., 2007), koji je bio prisutan u vrlo malo količini u ulju vrste iz Kine (Wei et al., 2018).

Saraçoğlu i saradnici su ispitivali hemijski sastav etarskog ulja plodova, cvasti i korenova vrste *B. cappadocicum* (Saraçoğlu et al., 2012). Heptanal (46,5%) i undekan (36,6%) su bili glavni sastojci ulja cvasti vrste *B. cappadocicum*, dok su u ulju plodova najzastupljeniji bili undekan (50,3%) i spatulenol (7,4%). U etarskom ulju izolovanom iz korena, glavni sastojci su bili undekan (23,1%) i heksadekanska kiselina (14,2%).

Etarsko ulje vrste *B. chinense*, izolovano iz korena, sadržavalo je uglavnom heksanal (29,5%), furfural (7,3%) i heksansku kiselinu (7,4%) (Li et al., 2007), dok su dominantni sastojci etarskog ulja izolovanog iz cele biljke bili metil-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-dokozaheksaenoat*** (19,1%), germakren D (14,8%) i retinil-acetat (7,3%) (Ze-Kun & Haixia, 2012).

Ukupno, 38 (u cvastima), 29 (u plodovima) i 12 (u korenovima) sastojaka je identifikovano i kvantifikovano u etarskim uljima različitih delova vrste *B. croceum* (Saraçoğlu et al., 2012). U etarskom ulju cvetova, glavni sastojci su bili germakren D (12,7%) i α -pinen (9,0%). Glavni sastojci etarskog ulja plodova su bili undekan (13,0%) i tetradekanska kiselina (11,9%), dok su u ulju korena ove vrste, najzastupljeniji sastojci bili heksadekanska kiselina (34,8%) i heptakozan (19,8%).

* Navedena jedinjenja ne predstavljaju prirodne proizvode, niti su u bliskoj vezi sa do sada poznatim klasama prirodnih proizvoda, a kako je identifikacija izvršena samo poređenjem masenih spektara sa literaturnim, smatramo da je njihova identifikacija možda pogrešna. Za bifenilenski sastojak možemo da pretpostavimo da usled visokog broja nezasićenja prisutnih u ugljovodoniku on bi mogao da predstavlja neki poliacetilen koji su do sada već identifikovani u vrstama roda *Bupleurum*.

** Slično razmatranje može da se odnosi i na ovaj sastojak kao i prethodnoj fusnoti.

*** Videti prethodne fusnote.

Poređenje hemijskog sastava etarskog ulja izolovanog iz nadzemnih delova (Abolfazl et al., 2013, 2014; Rustaiyan et al., 2010) i cvasti (Mohammadi et al., 2014) vrste *B. falcatum* iz Irana prikazano je u tabeli 9. *Abolfazl* i saradnici navode torilenol (39,1%), spatulenol (19,6%) i α -kubeben (8,10%), kao glavne sastojke etarskog ulja nadzemnih delova, dok su najzastupljenija jedinjenja u etarskom ulju koje je analizirao *Rustaiyan* α -pinen (29,4%) i spatulenol (27,7%), iako je procenat identifikovanih sastojaka manji (tabela 3). Hemijski sastav etarskog ulja cvetova je bio isti (Mohammadi et al., 2014) kao i sastav ulja koji je opisao *Abolfazl*.

Tabela 9. Glavni sastojci etarskog ulja vrste *B. falcatum**

Jedinjenje	Nadzemni delovi		Cvasti	Plodovi	Korenovi	Cvasti
α -Kalakoren	2,4	0,8	2	1,9	5,4	2,4
Kariofilen-oksidi	-	6,1	-	-	-	-
α -Kopaen	-	0,6	-	6,8	3,9	-
α -Kubeben	8,1	-	4,3	0,3	-	8,1
Kuparen	2,8	-	2,2	2,9	0	2,8
(E,E)-2,4-Dekadienal	-	-	-	-	6,9	-
Heksanal	-	-	-	2,9	7,1	-
3-(Z)-Heksenilbenzoat	-	4,8	-	-	-	-
Heptanal	4,2	-	4,3	7,3	2,1	4,2
Lavandulil-acetat	-	6,7	-	-	-	-
2-Pentilfuran	-	-	-	0,8	23,1	-
α -Pinen	3,5	29,4	41,2	42,4	1,7	3,5
trans-Pinokarveol	4,1	-	2,8	1,2	-	4,1
Spatulenol	19,6	27,7	10,4	8,5	7,2	19,6
Torilenol	39,1	-	-	-	-	39,1
Literatura	Abolfazl et al., 2013, 2014	Rustaiyan et al., 2010	Saraçoğlu et al., 2012		Mohammadi et al., 2014	

Etarsko ulje vrste *B. fruticosum* je analizirano više puta do sada (tabela 10). *Liu* i saradnici su ispitivali uticaj vegetativne faze razvoja biljke na sastav ulja (*Liu* et al., 2009). Nisu primećene značajne varijacije u hemijskom sastavu; sva etarska ulja su bila bogata β -felandrenom (preko 70%) i sadržavala su značajne količine α -felandrena, limonena i α -pinena.

* Iz svake studije navedeno je deset najzastupljenijih sastojaka; ako su se ovi sastojci pojavljivali i u drugim navedenim uzorcima, njihov procenat je naveden takođe.

Etarska ulja vrste *B. fruticosum* poreklom iz Italije su se odlikovala visokim sadržajem β -felandrena (57,8-71,4%) i sabinena (12,1-13,9%). Za razliku od rada Liu i saradnika uočene su značajne varijacije u sadržaju ova dva jedinjenja u različitim vegetativnim fazama (tabela 10, Maxia et al., 2011). Pored toga, hemijski sastav ulja vrste *B. fruticosum* poreklom iz Portugalije se značajno razlikovao od prethodna dva, pri čemu su α -pinen i β -pinen činili preko 70% ukupnog sadržaja ulja. Utvrđeno je da portugalski i italijanski uzorci *B. fruticosum* pripadaju različitim hemotipovima, pri čemu je tip I više nalik na hemotipove poreklom iz Španije, dok tip II pokazuje sličnosti sa uljima iz ostalih mediteranskih regiona (Lorente et al., 1989).

Tabela 10. Glavni sastojci etarskog ulja vrste *B. fruticosum**

Uzorak ^a	α -Pinen	α -Tujen	β -Felandren	α -Felandren	Sabinen	β -Pinen	Limonen	γ -Terpinen	(Z)- β -Ocimen	p-Cimen	1,8-Sineol	Mircen	Kripton	trans-Karveol	Geranil-acetat	Citronelil-acetat	Estragol
A ^b	1,4	-	57,8	1,0	12,1	0,1	-	0,4	-	1,7	-	1,8	4,3	0,6	3,0	-	0,2
B ^b	1,5-	0-	7,8-	0,1-	1,0-	0-	-	0-	0,9-	0,9-	-	2,2-2,6	0-2	-	-	-	0-tr
	37,3	1,3	68,5	1,2	12,2	33,0	-	1,7	1,0	2,7	-	-	-	-	-	-	-
C ^b	1,4-	-	6,2-	0,1-	2,5-	0-	-	0,5-	-	0,7-	-	1,6-2,4	-	-	-	-	-
	42,7	-	71,4	1,7	13,9	33,5	-	1,4	-	2,7	-	-	-	-	-	-	-
D ^c	1,5-	-	71,3-	3,0	1,0-	-	5,5	-	-	-	-	2,0	-	-	1,7-2,3	-	4,8-
	1,6	-	71,8	-	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,6
E ^c	1,9-	-	77,3-	3,3-	1,1-	-	5,7-	-	-	-	-	2,3	-	-	1,2-2,4	-	tr
	2,0	-	79,1	3,4	1,5	-	6,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F ^c	-	-	79,1-	3,3-	-	0,3-	-	-	-	0,2-	-	-	-	-	-	-	-
	2,1	-	79,7	3,4	1,0	0,4	6,1	-	-	0,3	-	2,3-2,4	-	-	0,8-1,6	-	-
G ^c	1,1-	-	76,8-	2,8-	0,7-	0,2-	5,9-	-	-	2,8-	-	-	-	-	-	-	-
	1,3	-	77,5	3,5	0,9	0,3	6,1	-	-	3,5	-	2,0	-	-	1,2-2,5	-	-
H ^c	1,9-	-	72,8-	2,6-	1,5-	-	5,6-	0,1-	-	-	-	-	0,3-	-	-	-	-
	2,0	-	75,7	3,0	7,3	-	5,8	0,3	-	0,3	-	2,1-2,3	0,8	-	1,2-1,8	-	-
I ^c	1,8-	-	73,6-	3,0-	1,2-	-	5,4-	0,1-	-	0,1-	-	-	-	-	-	-	-
	2,0	-	78,3	3,5	6,0	-	5,8	0,3	-	0,2	-	2,1-2,3	-	-	1,5-1,6	-	-
J ^c	1,8-	-	70,4-	2,3-	1,2-	-	5,4-	0,2-	-	0,5-	-	-	0,2-	-	-	-	-
	1,9	-	71,6	2,5	8,2	-	5,9	1,4	-	0,6	-	2,0-2,2	2,1	-	1,9-2,1	-	-
K ^d	35,4	2,3	7,4	0,2	-	39,1	-	0,6	0,3	0,9	-	1,9	tr	-	-	-	-

* Iz svake studije navedeno je deset najzastupljenijih sastojaka; ako su se ovi sastojci pojavljivali i u drugim navedenim uzorcima, njihov procenat je naveden takođe.

L ^e	0,3	tr	1,6	18,3	7,1	-	tr	49,8	0,75	0,86	-	tr	-	2,67	tr	3,8	-
M ^e	1,9	tr	41,7	2,9	35,7	0,6	3,0	0,8	0,1	0,9	-	2,9	-	tr	0,3	0,3	-
N ^e	0,1	0,1	60,9	2,6	12,8	0,5	tr	1,4	0,8	2,9	-	2,1	-	tr	0,7	0,8	-
O ^f	-	-	-	12,2	12,0	-	-	48,8	1,3	2,0	-	-	-	-	-	4,2	-
P ^f	2,5	-	38,7	-	39,7	0,4	5,0	-	-	-	-	2,5	-	-	-	-	-
Q ^g	41,2	-	-	3,1	-	35,9	4,1	2,5		2,9	4,1	3,1	-	-	-	-	tr
R ^h	35,6-	1,2-	7,9-	0,1-	2,1-	35,1-	0-tr	0,5-	2,4-	0,2	-	1,0-1,1	-	-	-	-	-
	41,4	1,3	11,2	0,2	2,2	37,5		0,8	3,9								
S ^h	30,7-	0,9-	8,9-	0-0,4	2,8-	35,4-	0-tr	0,8	0-tr	0,8-	-	0,8-1,1	-	-	-	-	-
	33,6	1,0	20,6		2,9	39,9											
T ^h	15,9-	0,7-	15,4-	0,5-	2,1-	18,4-	0-tr	1,7-	13,5-	1,2-	-	1,1-1,4	0-0,7	0-0,1	-	-	-
	22,2	0,9	19,3	0,7	2,2	22,0		3,0	19,2	2,9							

^a A-Listovi; B-Listovi i štitovi u cvetu; C-Listovi i štitovi koji su sadržavali plodove; D-Cvasti; E-Listovi i stabljike; F-Nadzemni deo (hidrodestilacija); G-Nadzemni deo (mikroekstrakcija na čvrstoj fazi); H-Nadzemni delovi (pre cvetanja); I-Nadzemni delovi (u toku cvetanja); J-Nadzemni delovi (nakon cvetanja); K-Plodovi; L-Stabljike; M-Listovi; N-Nadzemni delovi; O-Stabljike; P-Listovi; Q-Štitovi koji su sadržavali plodove; R-Listovi; S-Plodovi; T-Stabljike; ^b Maxia et al., 2011; ^c Liu et al., 2009; ^d Chizzola, 2008; ^e Bertoli et al., 2004; ^f Giamperi et al., 1998; ^g Lorente et al., 1989; ^h Roma-Marzio et al., 2020; tr-<0,05%, trag.

* Iz svake studije navedeno je deset najzastupljenijih sastojaka; ako su se ovi sastojci pojavljivali i u drugim navedenim uzorcima, njihov procenat je naveden takođe.

Etarsko ulje vrste *B. frutescens* je samo jednom prethodno analizirano (Martin et al., 1993), a utvrđeno je da su glavni sastojci β -kariofilen (30,5%) i α -pinen (16,9%). Sva etarska ulja vrste *B. gerardii*, bilo da su izolovana iz kompletnih nadzemnih delova ili iz pojedinačnih biljnih organa, odlikuju se visokim sadržajem undekana (tabela 11). Kada se uporedi sastav ulja iz različitih delova biljaka, najznačajnija razlika se uočava u sadržaju heksanala, koji je bio zastupljeniji u korenovima u odnosu na cvasti i plodove, u kojima, takođe, nije detektovan α -pinen (Saraçoğlu et al., 2012). Štaviše, postoji značajna razlika u sadržaju α -pinena, heksanala i germakrena D između ulja poreklom iz Irana (Rustaiyan et al., 2010) i Turske (Kiliç, 2014).

Tabela 11. Glavni sastojci etarskog ulja vrste *B. gerardii**

Jedinjenje	Cvasti	Plodovi	Korenovi	Nadzemni delovi	Nadzemni delovi
Biciklogermakren	-	-	-	5,3	-
Kalaren	2,0	-	3,9	-	-
Kariofilen-oksidi	5,8	3,8	-	-	1,7
Germakren D	-	-	-	11,1	2,7
Heksahidrofarnezil-aceton	8,8	9,6	-	-	-
Heksanal	8,2	6,1	21,7	-	19,9
Limonen	5,4	1,8	1,0	0,8	2,5
α -Pinen	-	-	17,9	0,7	15,8
β -Pinen				2,3	-
Spatulenol	2,5	2,3	2,9	3,9	0,4
Undekan	36,9	49,2	16,6	62,9	38,3
<i>trans</i> -Verbenol	-	-	3,3	-	-
Literatura	Saraçoğlu et al., 2012			Rustaiyan et al., 2010	Kiliç, 2014

Fernández-Ocaña i saradnici određivali su prinose i sastav etarskih ulja dobijenih iz različitih delova vrste *B. gibraltarium*** u različitim vegetativnim fazama, pre cvetanja, u toku cvetanja, u periodu kasnog cvetanja i u periodu formiranja plodova (Fernández-Ocaña et al., 2006, tabela 12). Najveći sadržaj ulja u listovima (0,8–1,8% prinosa) i stabljikama (0,3–0,7%) zabeležen je u kasnom periodu cvetanja, dok je sadržaj ulja u štitovima (2,2–3,7%) dostizao maksimum u punom cvetanju.

* Iz svake studije navedeno je deset najzastupljenijih sastojaka; ako su se ovi sastojci pojavljivali i u drugim navedenim uzorcima, njihov procenat je naveden takođe.

** U originalnom radu autori navode ime vrste kao "*B. gibraltarium* Lam." koje ne može da se pronađe u botaničkoj literaturi, pa je odlučeno da se ovde navodi *B. gibraltarium*, koje je u skladu sa *World Flora Online*.

U etarskim uljima izolovanim iz listova najzastupljeniji sastojci su bili sabinen (12,0–33,9%) i limonen (7,8–23,4%), pri čemu je sadržaj sabinena dostigao minimum tokom punog cvetanja i maksimum u periodu formiranja plodova. Ulja stabljike su sadržavala sabinen (4,7–21,6%) i 2,3,4-trimetilbenzalhid (9,3–13,6%) kao glavne sastojke, pri čemu je najniži sadržaj sabinena uočen pre cvetanja, a dostigao maksimum u periodu punog cvetanja. Ulja štitova su imala konstantan relativni sadržaj sabinena (20,7–43,1%), koji je ujedno bio i najzastupljeniji sastojak u svim fenološkim fazama, a po sadržaju ga je sledio α -pinen (7,3–28,2%). Sadržaj oba monoterpena se povećao u toku kasnog cvetanja i smanjio na najniže vrednosti u fazi formiranja plodova. Najveća razlika u sastavu ulja nadzemnih delova uočena je u sadržaju Δ^3 -karena (0–33%, tabela 12).

Utvrđeno je da su dominantni sastojci u ulju iz nadzemnih delova, koje je analizirao *Velasco-Negueruela*: 2,3,4-trimetilbenzalhid (17,2%), sabinen (9,2%) i limonen (6,5%) (*Velasco-Negueruela et al.*, 1998). Glavni sastojci ulja štitova bili su sabinen (33,8%), α -pinen (17,6%) i 2,3,4-trimetilbenzalhid (8,4%). Ulje stabljike karakteriše prisustvo α -pinena (6,0%), sabinena (21,8%), limonena (7,2%), 2,3,4-trimetilbenzalhida (10,7%), elemola (5,5%), gvajola (5,4%) i njegovog izomera (5,1%). U ulju listova su kao glavni sastojci identifikovani α -pinen (13,0%), sabinen (50,0%) i limonen (10,0%). Ako se uporedi sastav ulja iz različitih delova biljke, vredni napomenuti da je sabinen najčešći sastojak svih etarskih ulja, kao i da stabljike sadrže znatno veću količinu α -pinena u odnosu na druge delove biljke.

Tabela 12. Glavni sastojci etarskog ulja vrste *B. gibraltarium**

Jedinjenje	Listovi	Stabljike	Štitovi	Plodovi	Nadzemni delovi	Nadzemni delovi	Nadzemni delovi	Nadzemni delovi	Štitovi	Stabljike	Listovi	Plodovi
Bulnezol	0,9-4,0	3,2-6,2	0,2-0,9	-	1,3-2,2	1,3	-	2,1	0,3	3,4	0,1	-
Δ^3 -Karen	-	-	-	-	-	0,1	33,0	tr	tr	-	tr	0,2
Elemol	1,8-2,1	1,3-7,2	0,1-1,0	-	1,4-4,3	1,4	-	4,3	0,6	5,5	0,5	0,1
Gvajol	1,1-3,5	2,8-5,8	0,3-1,7	-	3,1-6,2	3,6	-	5,3	0,6	5,4	0,3	0,1
Gvajol izomer	1,1-3,6	2,7-5,5	-	-	-	1,2	-	0,6	0,6	5,1	0,3	tr
Limonen	7,8-23,4	3,3-11,2	4,8-6,7	9,0	5,5-26,8	7,3	8,2	6,5	7,3	7,2	10,0	9,0
Mircen	1,5-3,4	-	-	-	-	2,3	3,5	0,5	1,1	1,6	3,2	1,6
α -Pinen	5,6-11,7	1,0-7,0	7,3-28,2	42,7	4,9-15,6	15,6	10,5	5,9	17,6	6,0	13	42,7
Sabinen	12,0-33,9	4,7-21,6	20,7-43,1	28,3	7,4-31,1	31,1	-	9,2	33,8	21,8	50,0	28,3
Terpinen-4-ol	0,6-3,6	0,9-2,4	2,4-3,8	1,7	0,7-4,6	2,4	9,0	5,1	2,9	2,5	2,3	1,7
2,3,4-Trimetilbenzaldehyd	7,6-14,5	9,3-13,6	3,3-15,3	4,5	10,9-18,1	10,9	-	17,2	8,4	10,7	3,4	4,5
Literatura	Fernández-Ocaña et al., 2006					Fernández-Ocaña et al., 2004	Ocete et al., 1989	Velasco-Negueruela et al., 1998				

tr-<0,05%, trag.

* Iz svake studije navedeno je deset najzastupljenijih sastojaka; ako su se ovi sastojci pojavljivali i u drugim navedenim uzorcima, njihov procenat je naveden takođe.

Etarsko ulje nadzemnih delova vrste *B. hamiltonii* (syn. *B. tenue*) iz Indije sastojalo se pretežno od seskviterpenskih ugljovodonika (61,9%), monoterpenskih ugljovodonika (16,6%), oksigenovanih seskviterpena (7,9%) i oksigenovanih monoterpena (6,2%). Najzastupljeniji sastojci u ovom ulju bili su germakren D (17,8%), *trans*- β -farnezen (14,7%) i *trans*-kariofilen (13,1%) (Pande et al., 2012). Ranija istraživanja pokazala da su u etarskom ulju plodova ove vrste iz Pakistana dominantni sastojci bili α -terpineol (21,0%), geranil-acetat (9,8%) i santen (8,7%) (Ahmad et al., 1987).

Etarsko ulje vrste *B. heldreichii* analizirano je samo jedanput, pri čemu je utvrđeno da je germakren D dominantan sastojak u uljima cvasti i plodova, dok u ulju korenova nije detektovan, i ono je, umesto toga, bilo bogato heksadekanskom i tetradekanskom kiselinom. (Saraçoğlu, 2011). U literaturi takođe postoje podaci o sastavu etarskih ulja izolovanih iz različitih biljnih organa vrste *B. lancifolium* (Saraçoğlu et al., 2012). Ulje cvetova sadržavalo je spatulenol (15,4%) i α -pinen (10,8%) kao glavne sastojke, dok su u ulju plodova najzastupljeniji bili heksakozan (13,0%) i pentakozan (12,0%). Ulje korena sadržavalo je pretežno alkane (43,3%) i estre masnih kiselina (21,2%), pri čemu su najzastupljeniji sastojci bili heksadekanska kiselina (13,9%) i heptakozan (12,0%).

Etarsko ulje cvasti vrste *B. intermedium* bilo je bogato metil-linoleatom (21,2%) i germakrenom D (16,4%), dok su u ulju plodova dominantni bili seskviterpenski ugljovodonici: germakren D (25,9%) i (*E*)-kariofilen (19,1%). Ulje korena sadržavalo je uglavnom undekan (62,8%) i heksanal (8,1%) (Saraçoğlu et al., 2012). U etarskom ulju vrste *B. longicaule* identifikovano je 19 jedinjenja, od kojih su najzastupljeniji heksanal (15,1%), furfural (15,6%) i *p*-tolil-2-propen (7,2%)* (Li et al., 2007). Analiza etarskog ulja korena vrste *B. longiradiatum* pokazala je prisustvo 51 jedinjenja, koja zajedno čine 99,3% ukupnog sastava ulja. Najzastupljeniji sastojci bili su timol (7,0%), butilidenftalid (6,8%)**, 5-indolol (5,6%)***, heptanal (5,3%), 4-hidroksi-2-metilacetofenon (5,3%) i 4,5-dietiloktan (5,3%)*** (Shi et al., 2010).

* Nejednoznačno hemijsko ime, možda *p*-cimenen.

** U radu nije navedena stereochemija.

*** Najverovatnije pogrešno identifikovan sastojak.

Ulje cvasti vrste *B. lycaonicum* sastojalo se od 37 jedinjenja, pri čemu su tridekan (14,9%), spatulenol (8,0%), heksanal (6,3%) i germakren D (6,2%) bili najzastupljeniji. U etarskom ulju plodova identifikovano je 34 sastojaka, od kojih su glavni bili spatulenol (14,4%), 1,5-epoksisalvial-4(14)-en (7,3%), heksahidrofarnesil-aceton (6,2%), tridekan (4,8%) i kariofilen-oksidi (4,8%). Ulje korenova sadržavalo je 12 sastojaka, a najzastupljeniji su bili tridekan (37,3%), heksanal (23,8%), undekan (5,1%) i pentadekan (2,7%). Oksigenovani seskviterpeni su činili 29,3–40,5% ulja cvasti i plodova, dok su alkani bili dominantni u ulju korena (47,6%) (Saraçoğlu, 2011). Etarsko ulje korenova vrste *B. malconense* analizirano je samo jednom, a furfural (13,2%) i *p*-tolil-2-propen* (7,5%) identifikovani su kao glavni sastojci (Li et al., 2007).

U etarskom ulju korena vrste *B. marginatum* porekom iz Kine identifikovano je 17 sastojaka, a najzastupljeniji su bili *p*-tolil-2-propen* (9,2%), *p*-cimen (8,4%) i *cis*-linalool-oksidi (5,4%) (Li et al., 2007). Hidrodestilacijom nadzemnih delova iste biljne vrste dobijena su ulja bogata alkanima, sa undekanom (10,4%), tridekanom (13,2%) i pentadekanom (8,7%) kao glavnim sastojcima (Ashour et al., 2009). Ulje nadzemnih delova vrste *B. montanum* iz Alžira imalo je visok sadržaj monoterpena, pri čemu su dominantna jedinjenja bili (*E*)-megastigma-4,6,8(2)-trien (25,3%), mircen (17,2%), α -pinen (12,1%) i benzil-tiglat (7,7%). Hidrodestilacijom nadzemnih delova vrste *B. multinerve* iz Mongolije dobijeno je ulje u prinosu od 0,35%, bogato monoterpenima, od kojih su najzastupljeniji bili (*E*)- β -ocimen (18,6%), mircen (9,1%) i limonen (7,8%) (Altantsetseg et al., 2012).

Casiglia i saradnici uporedili su sastav ulja cvasti i plodova vrste *B. odontites* (syn. *B. fontanesii*). Ulje cvasti sadržavalo je visok procenat oksigenovanih seskviterpena (55,5%), od kojih su najzastupljeniji bili α -elemol (16,7%) i kariofilen-oksidi (16,4%), dok je ulje plodova imalo veći udeo oksigenovanih seskviterpena (78,0%) i sadržavalo specifična jedinjenja poput kariofiladienola I (13,2%) (Casiglia et al., 2016). Etarsko ulje vrste *B. praelatum* iz Srbije sastojalo se uglavnom od (+)-spatulenola (17,7%), (-)-(*E*)-kariofilen-oksida (6,1%) i oktil-2-metilbutanoata (5,8%) (Kapetanos et al., 2008). Ulje vrste *B. rigidum* subsp. *paniculatum* imalo je visok sadržaj monoterpenskih ugljovodonika, pri čemu su β -pinen (26,7%), α -pinen (26,4%), mircen (26,2%) i limonen (12,2%) bili dominantni sastojci (Pala-Paul et al., 1999).

* Nejednoznačno hemijsko ime, možda *p*-cimenen.

Među ispraljivim sastojcima nadzemnih delova vrste *B. rotundifolium* analiziranih metodom HS-SPME dominirali su spatulenol (25,6%), α -pinen (29,7%) i germakren D (18,4%) (Kilič, 2014), dok su ulja izolovana hidrodestilacijom iz pojedinačnih biljnih organa imala drugačiji sastav (tabela 13). Ulje korenova bilo je bogato alkanima (undekan 26,4%, tridekan 12,3%), dok je u ulju cvasti najzastupjenija bila heksadekanska kiselina (12,2%) (Akin et al., 2012; Nageswara et al., 2012).

Tabela 13. Glavni sastojci etarskog ulja vrste *B. rotundifolium**

Jedinjenje	Nadzemni delovi	Korenovi	Cvasti	Plodovi
Decil-acetat	-	4,4	-	-
1-Heksadekanol	-	7,9	-	2,7
Heksadekanska kiselina	0,2	-	12,2	-
Heksahidrofarnesil-aceton	-	4,2	2,5	2,2
Germakren D	18,4	-	7,4	5
Limonen	2,5	0,6	2,4	5,4
β -Felandren	-	0,4	7,2	6,1
α -Pinen	29,7	-	8,7	11,1
Salvial-4(14)-en-1-on	2,4	-	0,7	1,7
Spatulenol	25,6	0,2	3,9	2,6
Tridekan	-	12,3	1,4	1,6
Undekan	2,5	26,4	4,9	10,4
Literatura	Kilič, 2014	Nageswara et al., 2012, Akin et al., 2012		

Uticaj ekoloških faktora na hemijski sastav etarskog ulja vrste *B. scorzoniferifolium* proučavali su Tykheev i saradnici (tabela 14, Tykheev et al., 2018). Utvrđeno je da uzorci iz Irkutske oblasti ne sadrže seskviterpene germakranskog skeleta, dok u uzorcima iz Republike Burjatije, Zabajkalskog regiona, Krasnojarskog regiona i Mongolije nisu detektovani seskviterpeni gvajanskog skeleta. Etarska ulja ove vrste prikupljene u kontinentalnim regionima bila su bogata seskviterpenima humulanskog, kariofilanskog i murolanskog skeleta.

* Iz svake studije navedeno je deset najzastupljenijih sastojaka; ako su se ovi sastojci pojavljivali i u drugim navedenim uzorcima, njihov procenat je naveden takođe.

Uzorci iz Krasnojarskog regiona isticali su se po visokim koncentracijama kadinanskih i bisabolanskih seskviterpena, uz prisustvo alifatičnih alkohola, fenilpropanoida, kao i acikličnih i tujanskih monoterpena. Nasuprot tome, u uzorcima iz Irkutske oblasti dominirali su seskviterpeni gvajanskog tipa (Tykheev et al., 2018). Sastav etarskog ulja biljaka poreklom iz Mongolije, opisan u radu druge istraživačke grupe, bio je u skladu sa prethodno navedenim rezultatima (tabela 14, Altantsetseg et al., 2012).

Tabela 14. Glavni sastojci etarskog ulja vrste *B. scorzoniferifolium**

Jedinjenje	Nadzemni delovi											Nadzemni delovi	Korenovi
	1 ^a	2 ^b	3 ^c	4 ^d	5 ^e	6 ^f	7 ^g	8 ^h	9 ⁱ	10 ^j	11 ^k		
Biciklogermakren	1,6-3,5	3,6	4,9	1,8	1,2	1,1	0,5	3,6-6,0	3,5-5,2	-	7,6	-	-
Kariofilen	5,1-5,8	11,4	9,6	4,3	3,6	5,6	2,5	7,4-8,1	3,9-10,6	12,8	8,3	2,0	-
Kariofilen-oksidi	0-1,5	5,2	1,6	1,0	6,9	5,8	0,9	0,7-0,9	1,2-7,3	1,1	2,2	2,5	-
<i>p</i> -Cimen	0,5-1,6	0,4	-	5,3	21,7	20,4	12,8	1,5-10,6	0,2-7,8	6,3	2,0	11,5	0,8
Dodekanska kiselina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,7
Furfural	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,1
Germakren D	26,8-36,8	35,7	41,8	17,9	11,4	9,5	5,1	15,8-31,6	15,6-24,7	41,3	25,7	4,1	-
Heptanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	9,3
Heksanal	0-0,2	0,6	-	-	-	-	1,4	0-0,1	-	-	-	0,6	12,4
Humulen	0,9-1,4	2,9	1,8	1,7	2,3	1,7	1,6	2,6-5,7	1,7-14,7	2,5	3,2	0,8	-
Limonen	6,1-8,4	2,9	2,1	10,8	9,7	7,7	6,3	2,6-4,4	6,2-7,1	6,1	5,6	15,2	-
Mircen	10,9-13,8	2,6	3,6	14,2	13,8	13,1	3,5	0,6-5,3	3,0-8,5	8,0	8,4	8,1	-
2-(<i>E</i>)-Nonenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,9
<i>cis</i> - β -Ocimen	2,5-18,6	2,3	1,1	2,0	0,6	1,1	1,6	7,7-12,3	0,4-3,3	8,5	9,2	1,0	-
<i>trans</i> - β -Ocimen	2,1-14,8	-	11,3	12,6	5,9	7,0	0,4	1,4-2,3	0,5-3,1	0,6	0,9	10,5	-
α -Pinen	0,8-4,5	-	0,5	1,2	1,9	4,7	5,9	0,1-1,2	2,7-3,7	1,7	5,6	6,3	-
β -Pinen	1,1-2	0,4	0,5	1,2	2,5	3,6	1,6	1,5-8,1	1,9-3,1	0,9	1,1	3,1	-
Sabinen	1,8-4,1	0,9	1,7	4,8	2,1	1,8	0,3	0,9-3,9	0-0,6	-	0,2	6,6	-
Spatulenol	0,5-1,3	6,6	1,2	0,9	4,4	3,0	10,4	0,9-1,0	0,6-7,4	-	1,1	2,7	-
γ -Terpinen	1,2-2,3	-	0,5	5,4	2,5	5,7	1,3	0,1-2,5	0-1,6	2,3	1,7	0,1	-
Literatura	Tykheev et al., 2018											Altantsetseg et al., 2012	Li et al., 2007

* Iz svake studije navedeno je deset najzastupljenijih sastojaka; ako su se ovi sastojci pojavljivali i u drugim navedenim uzorcima, njihov procenat je naveden takođe.

^a Uzorci prikupljeni u blizini sela *Sotnikovo* (nadmorska visina 490 m); ^b Uzorak prikupljen u blizini sela *Ivolga* (nadmorska visina 645 m); ^c Uzorak sakupljen u blizini mesta *Zagustay* (nadmorska visina 572 m); ^d Uzorak sakupljen u blizini sela *Georgievka* (nadmorska visina 769 m); ^e Uzorak prikupljen u blizini sela *Oninoborsk* (nadmorska visina 772 m); ^f Uzorak sakupljen u blizini sela *Shiringa* (nadmorska visina 926 m); ^g Uzorci prikupljeni u blizini sela *Nyzhniy Tsasuchey* (nadmorska visina 811 m); ^h Uzorci sakupljeni na planini *Bayan Ulaan Uul* (visina 1327 m); ⁱ Uzorci prikupljeni na teritoriji *Berkh* (visina 1091 m); ^j Uzorak sakupljen 20 km severoistočno od teritorije *Berkh* (nadmorska visina 1015 m); ^k Uzorak sakupljen u blizini jezera *Huh Nuur* (nadmorska visina 1670 m); tr:<0,05%, tragovi.

* Iz svake studije navedeno je deset najzastupljenijih sastojaka; ako su se ovi sastojci pojavljivali i u drugim navedenim uzorcima, njihov procenat je naveden takođe.

U etarskom ulju dobijenom iz cvasti vrste *B. sulphureum* identifikovano je 39 jedinjenja (Saračoglu, 2011). Među njima su kao glavni sastojci pronađeni undekan (14,0%), spatulenol (9,9%), α -pinen (9,3%) i 1,5-epoksisalvial-4(14)-en (8,7%). U etarskom ulju ekstrahovanom iz plodova identifikovano je 37 jedinjenja, pri čemu su dominantni sastojci undekan (20,2%), spatulenol (6,0%), α -pinen (5,8%) i heksahidrofarnezil-aceton (4,5%). Etarsko ulje korenova sadržavalo je 19 jedinjenja, sa kalarenom (26,9%), undekanom (23,8%), bornil-acetatom (8,2%) i aristolenom (3,7%) kao glavnim sastojcima. U etarskom ulju dobijenom iz cvasti vrste *B. turcicum* najzastupljeniji su bili heptanal (33,2%), pentadekan (19,6%) i undekan (6,6%), dok je ulje plodova sadržavalo heptanal (23,5%), pentadekan (13,4%), undekan (8,9%) i (*E*)-geranil-aceton (7,7%). Ulje korenova se razlikuje po većem udelu pentakozana (9,0%), 1-undekanola (8,8%), heksakozana (8,0%), 1-dodekanola (6,3%) i spatulenola (6,3%).

Vrsta *B. sibthorpiatum* var. *diversifolium* do sada je u literaturi pomenuta samo jedanput u kontekstu analize hemijskog sastava etarskog ulja i biljnih ekstrakata uopšte (Kapetanović et al., 2008). Biljni materijal je sakupljen na planini Kopaonik, a etarsko ulje dobijeno iz biljke bilo je složenog sastava. Među dominantnim jedinjenjima identifikovani su heptanal (22,8%), 2-pentilfuran (4,7%), (–)-oksokariofilen (4,9%), (+)- β -pinen (3,6%), (*E,E*)- β -damascenon (2,9%).

2.3. Opšte karakteristike odabranih vrsta roda *Bupleurum*

2.3.1. *Bupleurum falcatum* L.

Bupleurum falcatum (slika 20), poznat kao srpasti zvinčac, višegodišnja je zeljasta biljka poreklom iz istočne Azije (Kina, Japan i Koreja), s dugom tradicijom upotrebe u narodnoj medicini, naročito u kineskoj fitoterapiji. Ova biljka poseduje dobro razvijen rizom, dok su stabljike pojedinačne ili brojne, visoke preko 1 m, često zakrivljene, obrasle listovima i najčešće razgranate. Listovi su čvrsti, varirajabilni u obliku i boji – od zaobljenih do linearnih. Donji listovi su na drškama, dok su gornji sedeći, pri osnovi suženi, sa 5–7 nerava. Cvasti su štitaste, sastoje se od 3 do 15 zrakova. Involukrum čini 1–3 nejednaka listića, dok involucelum sadrži pet linearno-lancetastih ili šiljatih listića sa 3–5 nerava. Plodovi su različitog oblika i veličine, sa pet končastih rebara i tri kanala sa etarskim uljem. Biljka cveta od juna do jula. Najčešće raste na krečnjačkim terenima, kamenjarima i peščanim nanosima. Rasprostranjena je u južnoj i srednjoj Evropi, delimično u subarktičkim oblastima, kao i u umerenim predelima Azije do Japana. U Srbiji je prisutna u zapadnim krajevima (npr. Zlatibor), severoistočnoj Srbiji (Berdačka klisura), kao i na jugoistoku (Pirot, Suva planina) i u Vojvodini (Fruška gora).

Taksonomski status i nomenklatura vrste *B. falcatum* u širem i užem smislu (*sensu lato/sensu stricto*), pre svega njena sporna sinonimija i odnos prema taksonu *B. sibthorpiatum*, predstavljaju značajan izazov usled neslaganja u regionalnim florama (Nikolić, 1973; Micevski, 2005; Tutin, 1968).



Slika 20. Izgled biljne vrste *B. falcatum* (autor: Niko Radulović, lokacija: Šar planina, Ošljak)

U Flori Socijalističke Republike Srbije (Nikolić, 1973), *B. falcatum* i *B. sibthorpiatum* Smith in Sibth. & Sm. priznate su kao odvojene vrste. *Bupleurum falcatum* dodatno je opisan kroz specifičan oblik *B. falcatum* f. *latifolium* Schur, dok se *B. sibthorpiatum* karakteriše velikom varijabilnošću i obuhvata sledeće varijetete: *B. sibthorpiatum* var. *sibthorpiatum*, *B. sibthorpiatum* var. *orbelicum* (Vel. Hayek) i *B. sibthorpiatum* var. *diversifolium* (Roch.) Hayek. Prema ovoj Flori, glavne morfološke razlike između ove dve vrste ogledaju se u izgledu bazalnih listova – *B. falcatum* ima bazalne listove na dugačkim drškama, eliptičnog ili duguljastog oblika, dok je za *B. sibthorpiatum* karakteristično prisustvo bazalnih listova bez lisne drške, uzano linearno-lancetasti (Nikolić, 1973). U Flori Republike Makedonije (Micevski, 2005), *B. falcatum* obuhvata dve podvrste: *B. falcatum* subsp. *falcatum* i *B. falcatum* subsp. *cernuum* (Ten.) Arcangeli (syn. *B. sibthorpiatum*). Prva podvrsta je okarakterisana eliptičnim do izduženim bazalnim listovima sa dugačkim drškama, dok druga poseduje uglavnom linearne bazalne listove bez lisne drške ili je ona, ukoliko je prisutna, veoma skraćena. Takođe se pominju i varijeteti kao što su *B. falcatum* var. *orbelicum* Vel. i *B. falcatum*

var. *montenegrinum* (Wollf.) Hay, iako detaljni morfološki opisi ovih varijeteta nedostaju (Micevski, 2005). U Flori Evrope (*Flora Europaea*, Tutin, 1968), iste dve podvrste *B. falcatum* su opisane sa istovetnim ključnim morfološkim razlikama: *B. falcatum* subsp. *falcatum* okarakterisan jasno definisanim eliptičnim do izduženim listovima sa jasno definisanim lisnim drškama, dok *B. falcatum* subsp. *cernuum* poseduje sedeće, linearne listove. Varijabilnost u infraspecijskoj klasifikaciji ovog taksona odražava, ne samo morfološku raznolikost, već i istorijske taksonomske interpretacije, što ukazuje na potrebu za detaljnom revizijom.

Hemijski profil vrste *B. falcatum* karakterišu raznovrsna bioaktivna jedinjenja, uključujući saponine, polisaharide, etarska ulja, flavonoide i lignane. Među njima, saikosaponini su najdetaljnije proučavani i smatraju se glavnim aktivnim sastojcima. *Kubota* i *Shibata* su nezavisno otkrili prisustvo nekoliko saponinskih jedinjenja, koja su kasnije nazvana saikosaponini a, b, c i d (Kubota & Hinoh, 1968a; Shimaoka et al., 1975). Ovi triterpenski saponini su pokazali strukturnu sličnost sa saponinima izolovanim iz drugih lekovitih biljaka, ali su posedovali jedinstvene modifikacije na steroidnom jezgru i šećernim delovima, što ih je učinilo prepoznatljivim hemotaksonomskim markerima roda *Bupleurum*.

Shimaoka i saradnici su detaljnije istražili saikosaponin b i dokazali da je on smeša saikosaponina b₂ i b₄ (Shimaoka et al., 1975). Takođe, pokazali su da je saikosaponin b₂ derivat saikosaponina d, koji je nastao tokom procesa ekstrakcije pod kiselim uslovima. Ova konverzija se događa usled hemijske nestabilnosti nekih saikosaponina, naročito u prisustvu zakišljenih rastvarača poput metanola sa dodatkom hlorovodonične kiseline.

Nakon početnih istraživanja, izolovano je više novih derivata saikosaponina, uključujući hidroksi-saikosaponine, acetil-saikosaponine i malonil-saikosaponine (Ebata et al., 1996). *Ebata* i saradnici su identifikovali tri nova saponina: 4"-O-acetilsaikosaponin d, hidroksisaikosaponin a, hidroksisaikosaponin c. Ove modifikacije su uključivale dodatak hidroksi- ili acetil-grupa na specifične položaje aglikona ili šećernih jedinica, čime su se menjala farmakološka svojstva ovih jedinjenja. Kvantitativna analiza dekokta *Bupleuri Radix* pokazala je da on sadrži ne samo primarne saikosaponine a, c i d, već i hidroksisaikosaponine, što ukazuje na njihovu spontanu transformaciju tokom pripreme biljnih ekstrakata (Ebata et al., 1996). Iz metanolonog ekstrakta biljne vrste *B. falcatum* subsp. *cernuum* prvi put je izolovan saikosaponin 16 α ,23,28,30-tetrahidroksiolean-11,13(18)-dien-3 β -il-glukopiranozil-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-fukopiranozid, kao i ranije poznati saikosaponini b₂, b₃ i b₄ (Pistelli et al., 1993).

Već pri prvim farmakološkim ispitivanjima, saikosaponini su pokazali značajnu biološku aktivnost. Pokazano je da saikosaponin d ispoljava antiinflamatorno dejstvo slično kortikosteroidima, ali bez izraženih nuspojava koje su tipične za dugotrajnu upotrebu ovih steroida (Abe et al., 1982). Kada je saikosaponin d korišćen zajedno sa deksametazonom, primećeno je sinergističko pojačavanje antiinflamatornog efekta, uz manji gubitak telesne mase i manje izražene promene u težini nadbubrežne žlezde (Abe et al., 1982). Dodatno, istraživanja su pokazala da saikosaponini deluju na stabilizaciju ćelijskih membrana, modulaciju imunološkog odgovora i mogu imati potencijalnu hepatoprotektivnu ulogu (Shimaoka et al., 1975). Saikosaponini takođe utiču na lipidni metabolizam, pri čemu je saikosaponin d blago smanjio nivo triglicerida, ali je istovremeno povećao nivo holesterola u krvi (Abe et al., 1982).

Među izolovanim polisaharidima, bupleuran 2IIb i bupleuran 2IIc su identifikovani kao pektinski polisaharidi sa snažnim efektima na gastrointestinalni trakt (Yamada et al., 1991). Eksperimentalni modeli su pokazali da bupleuran 2IIc inhibira formiranje čireva izazvanih tretanjem HCl/etanolom kod miševa, pri čemu je njegova aktivnost zavisila od strukture poligalakturonskog fragmenta. Takođe, ovaj polisaharid deluje kao T-ćelijski nezavisan B-ćelijski mitogen, podstičući proliferaciju B-ćelija i sekreciju imunoglobulina (Matsumoto et al., 2008). Pored toga, neutralni polisaharid BR-5-1, bogat arabinanom i glukonom, pokazao je izraženu imunomodulatornu aktivnost (Yamada et al., 1988). Poliacetileni identifikovani u ekstraktu ove biljne vrste, kao i detaljna analiza sastava etarskog ulja, opisani su u delu 2.2.

2.3.2. *Bupleurum affine* Sadler

Bupleurum affine (slika 21) je jednogodišnja biljka prepoznatljiva po svom tankom, vretenastom korenu i uspravnoj stabljici, koja može narasti do 75 cm. Najčešće se grana od sredine, ređe od osnove, a grane su kratke i delimično uspravne. Listovi su uglavnom linearni, pri osnovi blago prošireni i obuhvataju stabljiku. Kako se penju ka vrhu, postaju duži i zašiljeni, dostižući dužinu do 15 cm. U gornjem delu stabljike listovi su sitniji i vrlo uski, dok su oni na vrhu stabljike i granama gotovo čekinjasti. Štitovi na vrhovima grana imaju 3–8 nejednako dugih zrakova, koji mogu dostići dužinu do 3 cm. Štitovi na bočnim granama imaju 2–5 zrakova. Listići involukruma su nejednaki, sa 5 nerava, a njihova dužina je 2–3 puta manja od najdužih zrakova štita. Plod je elipsoidno izdužen, veličine 2–2,5 mm, sa vrlo tankim konačnim rebrima. U poprečnom preseku ima petougaooni oblik (Nikolić, 1973). Zid ploda vremenom postaje zadebljan, a unutar njega se nalaze pojedinačni kanali sa etarskim uljem. Ova biljka raste na suvim i sunčanim staništima – često se može naći na obraslim obroncima, pašnjacima,

stepama, pored puteva i u vinogradima. Njeno opšte rasprostranjenje obuhvata Podunavlje, Rumuniju, Balkansko poluostrvo, jugozapadnu Rusiju, Malu Aziju i Kavkaz (Nikolić, 1973).



Slika 21. Izgled biljne vrste *B. affine* (izvor: <https://www.biolib.cz/en/image/id48372/>)

U dostupnoj literaturi postoji, pre radova koji su delovi ovog doktorata, samo jedan naučni rad koji se bavi vrstom *B. affine*, u kome je analiziran njen hemijski sastav i potencijalna biološka aktivnost (Gevrenova et al., 2015). Rezultati istraživanja ukazuju na prisustvo značajnih količina izokvercetina, dok je izoramnetin-3-glukozid detektovan u relativno većim koncentracijama u poređenju sa srodnim vrstama. Pored toga, *B. affine* se izdvaja po najvećem sadržaju aglikona, izraženih kao ekvivalenti kvercetina, što sugerise njegov izražen antioksidativni potencijal.

2.3.3. *Bupleurum veronense* Turra

Bupleurum veronense je jednogodišnja biljka sa uspravnom i razgranatom stabljikom koja može dostići visinu do 75 cm (slika 22). Donji listovi su linearno-lancetasti ili usko linearni, manje-više sa drškama, dok su gornji listovi sedeći, zašiljeni i ispresecani sa 3–5 nerava. Cvasti su zelenkasto-žutkasti do žućkasti, grupisani u štitaste cvasti sa 5–8 zrakova različite dužine, pri čemu najduži može dostići 1,5 cm (Nikolić, 1973). Involukrum čini 4–5 zelenih ili žućkastih listića, lancetastog ili linearno-lancetastog oblika, kratkih i blago izduženih u šiljak. Pri osnovi su suženi, dok im obod krasi uzak opšiv sa nazubljenim ivicama i 3–5 nerava. Po dužini su približno jednaki ili nešto duži od zrakova. Listići involuceluma su žuti, dužine 5–8 mm i širine 4–6 mm, sa žućkastozelenim rebrima. Imaju lancetast ili jajasto-lancetast oblik, pri osnovi suženi, a na vrhu zašiljeni. Duži su od cvetova i ispresecani sa tri

razgranata nerva. Biljka nosi 8–15 cvetova, sa krunicom sastavljenom od sitnih, žutih listića dužine oko 1 mm. Plod je dug 1,3–2 mm, sa končastim rebrima, a sadrži velike kanale sa etarskim uljem (Nikolić, 1973). Biljka cveta u periodu jul–avgust. *Bupleurum veronense* je vrsta koja raste na livadama i kamenjarima, a njen areal obuhvata Balkansko poluostrvo i Kavkaz. Ova biljna vrsta do sada nije bila ispitivana sa aspekta fitohemije.



Slika 22. Izgled biljne vrste *B. veronense* (izvor:

https://dryades.units.it/duino_en/index.php?procedure=taxon_page&id=3570&num=2749)

2.3.4. *Bupleurum praealtum* L.

Bupleurum praealtum (slika 23) je jednogodišnja zeljasta biljka zelene do plavičastozelene boje, sa tankim, vretenastim korenom. Stabljika je uspravna, dostiže do 1,5 m visine, a od sredine ili u gornjem delu se grana (Nikolić, 1973). Najčešće je izdužena, blago zakrivljena, sa tankim granama koje se ponovo granaju. Listovi su zeleni, često srpasto oblikovani, uža ili širi linearni, pri osnovi naglo suženi i kratkim rukavcem obuhvataju stabljiku. Srednji listovi imaju 5–9 nerava, dok su prizemni obično širi od srednjih. Štitaste cvasti se nalaze na kratkim drškama i sastoje se od 3 do 5 zrakova, dok su bočne cvasti manje, sa 2–3 zraka. Zraci su nejednaki, tanki i četvorouglasti. Listići involukruma su nejednaki, usko linearno-lancetasti, zašiljeni, sa 3–5 nerava, i do deset puta kraći od zrakova. Listići involuceluma su nešto kraći od ovih, a tokom cvetanja duži od štitića (Nikolić, 1973). Plodovi su zreli okruglasti ili izduženi, sa istaknutim končastim rebrima. Presekom pokazuju zvezdasto

petougaoni oblik sa širokim brazdama (Nikolić, 1973). Biljka cveta od juna do avgusta. Naseljava svetle šume, šikare, makije, kamenjare, obrasle padine, puteve, vinograde i pašnjake. Rasprostranjena je u južnoj i jugoistočnoj Evropi, na Krimu, u Maloj Aziji i na Kavkazu, pripadajući mediteranskom (sredozemnom) florističkom elementu (Nikolić, 1973). Ova biljna vrsta je do sada sa aspekta fitohemije istraživana samo jednom, a sastav njenog etarskog ulja detaljno je opisan u odeljku 2.2.8.



Slika 23. Izgled biljne vrste *B. praealtum* (izvor: https://www.actaplantarum.org/flora/flora_info.php?id=503552)

2.4. Biološka aktivnost metabolita i ekstrakata vrsta roda *Bupleurum*

U poslednjih nekoliko decenija, biološka svojstva vrsta roda *Bupleurum* postala su predmet mnogobrojnih istraživanja. Pored saikosaponina koji su poznati po svojoj raznovrsnoj i izraženoj biološkoj aktivnosti, ukupnoj aktivnosti doprinose i drugi sastojci. Iako se većina istraživanja fokusirala na dve najčešće korišćene vrste u tradicionalnoj medicini (*B. chinense* i *B. scorzonifolium*), druge vrste, poput *B. smithii* var. *parvifolium* i *B. falcatum*, takođe su pokazale terapijski potencijal, posebno u pogledu antioksidativnih, antibakterijskih, imunomodulatornih i antidepresivnih svojstava.

2.4.1. Antiinflamatorna aktivnost

Jedno od najvažnijih svojstava metabolita i ekstrakata vrsta roda *Bupleurum* je njihova izražena antiinflamatorna aktivnost, a u poslednjih nekoliko decenija intenzivno su istraživane vrste poput *B. chinense*, *B. marginatum*, *B. falcatum*, *B. frutescens*, *B. gibraltaricum*, *B. rigidum* i *B. rotundifolium* (Bremner et al., 2004; Wang et al., 2020; Yamamoto et al., 1975).

Na primer, etanolni ekstrakt suvog korena vrste *B. falcatum* smanjio je ekspresiju mRNA inflamatornih citokina, poput IL-6, IL-1 β i TNF- α , izazvanu lipopolisaharidom (LPS) u mikroglijalnim ćelijama BV2 pacova. Ovo se može pripisati inhibitornom efektu ekstrakta na aktivaciju NF- κ B (Park et al., 2015). Pored toga, metanolni ekstrakt korena *B. rotundifolium* može podstaći polarizaciju makrofaga i limfocita ka Th2 antiinflamatornom profilu u uslovima prekomerne inflamacije (Teng et al., 2023).

Pretpostavlja se da su saikosaponin a i saikosaponin d glavne aktivne supstance koje doprinose antiinflamatornim svojstvima vrsta roda *Bupleurum*. Ova dva saikosaponina imaju sličnu strukturu i inhibiraju ekspresiju ključnih citokina i enzima koji regulišu signalne puteve povezane s upalom (Yuan et al., 2016). Konkretno, saikosaponin a deluje antiinflamatorno suzbijajući aktivaciju proinflamatornih citokina i proteina povezanih s inflamacijom (Fu et al., 2015; Han et al., 2011; Wu et al., 2008, 2010; Zhao et al., 2015; Zhu et al., 2013). To uključuje inhibiciju aktivacije NF- κ B putem smanjenja njegove fosforilacije i nuklearne translokacije (Kim et al., 2015; Zhou et al., 2015; Zhu et al., 2013). Osim toga, smanjuje fosforilaciju tri ključne kinaze – p38 MAPK, c-JNK i ERK 1/2, čime inhibira MAPK signalni put (Ahn et al., 2022; Chen et al., 2013; Lim et al., 2021).

Saikosaponin d, takođe, pokazuje sposobnost modulacije upale (Wang et al., 2015) iako njegova povezanost s MAPK signalnim putem još nije potvrđena. Značajno je da se veliki procenat saikosaponina d u vrstama roda *Bupleurum* transformiše u saikosaponin b₂, koji na sličan način inhibira oslobađanje proinflamatornih medijatora izazvanih LPS-om. Osnovni mehanizmi su slični onima kod saikosaponina a, jer saikosaponin b₂ inhibira NF- κ B signalizaciju ometanjem IKK i I κ B posredovane aktivacije (Shin et al., 2019).

Antiinflamatorni efekti ekstrakata vrsta roda *Bupleurum* mogu se, takođe, pripisati polisaharidima. Polisaharidi izolovani iz korena vrste *B. smithii* var. *parvifolium* smanjuju proizvodnju proinflamatornih medijatora izazvanu LPS-om. Takođe, polisaharidi rastvorljivi u vodi izolovani iz vrste *B. chinense* dokazano ublažavaju sistemske i lokalne simptome inflamacije izazvane dijabetičkom nefropatijom, smanjujući pritom proizvodnju TNF- α i IL-6 (Feng et al., 2019). Zanimljivo je da, na primer, etarsko ulje izolovano iz vrste *B. rigidum* subsp. *paniculatum*, takođe pokazuje antiinflamatornu aktivnost inhibirajući proizvodnju azot-monoksida u makrofagima aktiviranim LPS-om (Zuzarte et al., 2021).

Dokazano je da ekstrakt vrste *B. chinense* ublažava simptome alergijskog rinitisa suzbijanjem ekspresije proinflamatornih citokina povezanih s Th2 odgovorom (IL-4, IL-5 i IL-13) i podsticanjem sekrecije antiinflamatornih Th1/Treg ćelija (IL-10, IL-12) (Bui et al., 2019). Studija sprovedena na dendritičnim ćelijama izvedenim iz monocita kod pacijenata sa kondilomima potvrdila je imunomodulatorne efekte saikosaponina d, kroz smanjenje ekspresije molekula CD1a, CD80 i CD86 i indukciju ekspresije CD14 (Ying et al., 2014).

2.4.2. Antiproliferativna aktivnost

Antiproliferativna aktivnost metabolita i ekstrakata vrsta roda *Bupleurum* predstavlja jednu od njegovih najvažnijih svojstava, a saponini su glavni aktivni sastojci odgovorni za ovo delovanje. Nedavna istraživanja su pokazala da ekstrakti vrste *B. chinense* indukuju apoptozu u ćelijama raka debelog creva (Zhang et al., 2022b). Etanolni ekstrakti vrsta *B. kaoi* i *B. chinense* efikasno smanjuju potencijal mitohondrijalne membrane u ćelijama melanoma, što može dovesti do apoptoze. Zanimljivo je da vrsta *B. kaoi*, koja sadrži veće količine saikosaponina u poređenju sa vrstom *B. chinense*, pokazuje izraženiju aktivnost protiv melanoma (Hu et al., 2016). Metanolni i dihlormetanski ekstrakti nadzemnih delova vrste *B. marginatum* mogu inhibirati proliferaciju i indukovati apoptozu u različitim ćelijama raka, pri čemu su ljudske T limfoblastoidne ćelije raka CCRF-CEM pokazale najveću osetljivost na ova dva ekstrakta (Ashour et al., 2014).

Među različitim saponinima, saikosaponin d se ističe kao najznačajniji antiproliferativni/antitumorski agens, što je potvrđeno u različitim *in vitro* i *in vivo* modelima. U modelu raka jetre kod pacova izazvanog dietilnitrozaminom, saikosaponin d je pokazao delovanje putem C/EBP beta i COX-2 (Lu et al., 2012), a ovaj mehanizam je dodatno potvrđen u *in vitro* studijama (Ren et al., 2019). Na osnovu istraživanja na nekoliko ljudskih ćelijskih linija raka, saikosaponin a pokazuje sposobnost ciljanja različitih puteva koji izazivaju apoptozu. Ovi putevi uključuju mitohondrijalno posredovane mehanizme, stres endoplazmatskog retikuluma (Du et al., 2021), kao i inhibiciju PI3K/Akt signalizacije, Bak/Bcl-2/caspase-9/caspase-7/PARP put, te Vegfr2/Src/Akt put.

Pored saikosaponina, i druga biološki aktivna jedinjenja su pokazala antiproliferativni/antitumorski efekat. Polisaharid rastvorljiv u vodi, ekstrahovan iz vrste *B. chinense*, sprečava adhezivnu interakciju između neutrofila i transmembranskog glikoproteinskog receptora tokom metastaza tumora. Ovaj efekat se verovatno ostvaruje

inhibicijom fosforilacije fokalne adhezije kinaze i paksilina (Tong et al., 2017). Pored toga, ovaj polisaharid pokazuje inhibitorne efekte na rast tumora jetre i indukuje apoptozu (Shi et al., 2022). Takođe, lignan iz vrste *B. marginatum*, poznat kao marginatokin, indukuje apoptozu u ćelijama hepatoma ljudi. Manje studija bavilo se ređe korišćenom vrstom *B. bicaule*. Xu i saradnici su iz korena ove biljne vrste izolovali dvanaest saponina, od kojih neki pokazuju sposobnost inhibicije proliferacije mezangijalnih ćelija (Xu et al., 2014).

2.4.3. Hepatoprotektivni efekat i antidepresivna svojstva

Kao što je ranije pomenuto, vrste roda *Bupleurum* se tradicionalno koriste kao sredstva za ublažavanje ćelijskog stresa u jetri, a koriste se i za lečenje depresije u Kini (Yan i Min, 2010). Hepatoprotektivni efekat metabolita i ekstrakata vrsta ovog roda može se objasniti kroz tri glavna mehanizma: smanjenje upale, prevenciju ciroze i poboljšanje funkcije jetre, što se postiže uglavnom inhibicijom proliferacije i migracije zvezdastih ćelija jetre, koje značajno doprinose zapaljenju jetre i fibrogenezi (Teng et al., 2023).

Pokazano je da triterpenski saponini i lignani iz ekstrakta vrste *B. marginatum* imaju jake inhibitorne efekte na zvezdaste ćelije jetre stimulisane TGF- β 1, što ih čini potencijalnim aktivnim jedinjenjima u prevenciji fibroze jetre (Liu et al., 2018). Nedavno je pokazano da lignan kerofilin iz vrste *B. scorzonifolium* inhibira aktivaciju ovih ćelija, pri čemu je laktonski prsten u njegovoj strukturi ključan za ispoljavanje aktivnosti (Liu et al., 2018). Osim toga, kerofilin može povećati nivo PPAR- γ , što doprinosi zaštiti jetre (Lee et al., 2011a; 2012). Oralna primena vođeno rastvorne frakcije polisaharida iz vrste *B. chinense* značajno smanjuje nivoe transaminaza poput aspartat-transaminaze, alanin-transaminaze i alkalne fosfataze, potvrđujući njene hepatoprotektivne efekte (Zhao et al., 2012).

Efekat sličan antidepresivu proučavan je u *in vivo* eksperimentu gde su ukupni saikosaponini iz vrste *B. yinchowense* ublažili apoptozu indukovanu kortikosteronom u neuronskim PC12 ćelijama. Ovaj citoprotektivni efekat je povezan sa smanjenjem stresa endoplazmatskog retikuluma (Li et al., 2013).

2.4.4. Antimikrobna aktivnost

Još uvek nije dovoljno istraženo koja su to specifična jedinjenja odgovorna za antimikrobnu aktivnost vrsta roda *Bupleurum*. Međutim, metanolni i dihlormetanski ekstrakti nadzemnih delova vrste *B. marginatum* pokazali su izraženu antivirusnu aktivnost pri

koncentraciji od 50 mg/mL, sa najsnažnijim efektom protiv virusa hepatitisa A među tri testirana patogena virusa (Ashour et al., 2014).

Sedam novih fenilpropanoida iz listova vrste *B. fruticosum* pokazuje određenu antirinovirusnu aktivnost. Ključno je da su angeloil- i 3-metoksi-grupe od suštinske važnosti za ispoljavanje ove aktivnosti, jer njihova zamena atomom vodonika značajno smanjuje antivirusnu efikasnost. Takođe, estarska funkcionalna grupa se pokazala kao ključna; njeno uklanjanje dovelo je do potpunog gubitka prvobitne funkcije (Fois et al., 2017).

Značajno je da su etarska ulja korena vrsta *B. heldreichii*, *B. sulphureum*, *B. turcicum* i *B. lycaonicum* pokazala izvanredan inhibitorski efekat koji je sličan uobičajeno korišćenom antibiotskom leku hloramfenikolu protiv bakterija kao što su *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 11778 i *Streptococcus salivarius* ATCC 11778. Zanimljivo je da je etarsko ulje vrste *B. rigidum* subsp. *paniculatum* (Brot.), pokazalo izraženo fungicidno dejstvo, posebno protiv gljiva kao što su *Cryptococcus neoformans* i dermatofiti (Zuzarte et al., 2021).

2.4.5. Antikonvulzivna aktivnost

Studije su pokazale da saikosaponin a ispoljava antiepileptičku aktivnost u različitim *in vivo* modelima epilepsije kod životinja, uključujući model indukovani pentilentetrazolom, napade izazvane maksimalnim elektrošokom i refraktornu epilepsiju izazvanu litijum-pilokarpinom (Huang et al., 2004; Xie et al., 2006; 2012). Istraživanje iz 2012. godine ukazalo je da se antikonvulzivna aktivnost saikosaponina a može povezati sa inhibicijom NMDA receptora (Yu et al., 2012). Pokazano je da različiti ekstrakti iz nadzemnih delova vrste *B. chinense*, takođe, pokazuju antikonvulzivna svojstva.

2.4.6. Smanjenje oštećenja bubrega

Polisaharidi ekstrahovani iz vrsta *B. smithii* var. *parvifolium* i *B. chinense*, poboljšali su metabolizam glukoze u celom telu i smanjili oštećenje bubrega kod miševa sa dijabetičkom nefropatijom. U poređenju sa netretiranim životinjama, oralna primena ovih polisaharida značajno je smanjila oštećenje bubrega, što je potvrđeno smanjenjem nivoa serumskog kreatinina, sadržaja albumina u mokraći i odnosa albumina prema kreatininu u mokraći (Feng et al., 2019).

2.4.7. Antioksidativna aktivnost

Ranija istraživanja pokazala su da saikosaponin d može ublažiti oksidativna oštećenja izazvana toplotnim stresom regulacijom ekspresije antioksidativnog enzima HSP72 u LLC-PK1 u epitelnim ćelijama bubrega (Zhang et al., 2014). Pored toga, saikosaponin d je značajno suprimovao apoptozu PC12 ćelija, izazvanu H_2O_2 smanjenjem proizvodnje reaktivnih kiseoničnih vrsta i blokiranjem oksidativnog oštećenja posredovanog MAPK putem (Lin et al., 2016a).

2.4.8. Toksični efekti

Iako se vrste roda *Bupleurum* intenzivno tradicionalno koriste u medicinske svrhe, zabeleženi su i toksični efekti. Na primer, prekomerna upotreba *Radix Bupleuri* (osušenih korenova vrsta *B. chinense* i *B. scorzonifolium*) može izazvati akutni hepatitis i nekrozu jetre (Teo et al., 2016). Dugotrajna nepravilna primena ovog tradicionalnog leka može negativno uticati na funkciju jetre, što se manifestuje povišenim nivoima transaminaza, hepatitisom i pojavom žutice (Teng et al., 2023). Smatra se da su određeni poliacetileni glavni toksični sastojci ovog roda, a pronađeni su, na primer, u vrstama *B. falcatum*, *B. spinosum*, *B. salicifolium* i *B. acutifolium*. Među ovim poliacetilenima, najviše su proučavani bupleurotoksin, acetilbupleurotoksin i enantotoksin (Lin et al., 2016b), pri čemu je poznato da bupleurotoksin može izazvati oštećenje centralnog nervnog sistema kod zdravih miševa (Teng et al., 2023).

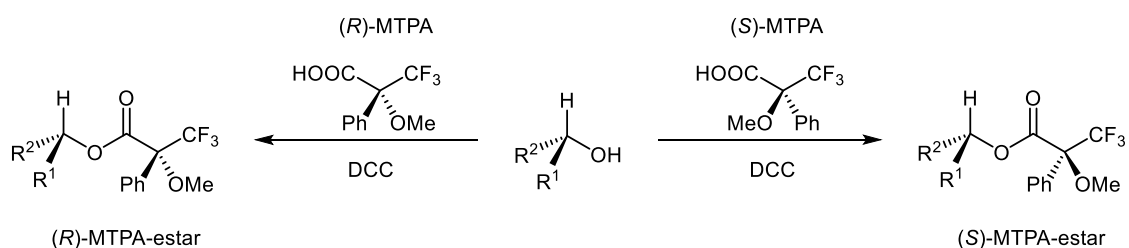
2.5. Određivanje apsolutne konfiguracije Mosherov-om metodom u kombinaciji sa NMR-spektroskopijom

Apsolutna konfiguracija je naročito važna u slučaju biološki aktivnih jedinjenja, bilo da je reč o prirodnim proizvodima ili sintetskim molekulima sa potencijalnim farmakološkim dejstvom. Jedan od najupečatljivijih primera značaja apsolutne konfiguracije jeste slučaj talidomida, kod koga su dva enantiomera izazivala drastično različite biološke efekte ((*R*)-enantiomer delovao je kao sedativ, dok je (*S*)-enantiomer bio teratogen). Određivanje apsolutne konfiguracije moguće je postići različitim metodama. Među najčešće korišćenima su: poređenje sa jedinjenjima poznate konfiguracije putem sintetskih interkonverzija i poređenje optičke rotacije, rendgenska strukturna analiza, optička rotaciona disperzija, i elektronski cirkularni dihroizam. Takođe, postoje i razne empirijske metode koje se zasnivaju na primeni nuklearne magnetne rezonance. Metoda poznata kao analiza pomoću Mosher-ovih estara (ili amida) ističe se kao jedna od najčešće korišćenih tehnika za određivanje apsolutne

konfiguracije hiralnih alkohola i amina. Ova metoda omogućava diferencijaciju enantiomera kroz hemijsku derivatizaciju odgovarajućim enantiomerno čistim reagensima, pri čemu se formiraju diastereomerni derivati čije se hemijsko okruženje može jasno razlikovati korišćenjem NMR-spektroskopije (Hoey et al., 2007).

Godine 1973. *Dale* i *Mosher* su opisali metodu zasnovanu na NMR-spektroskopiji, koja je postala poznata kao analiza *Mosher*-ovih estara, za određivanje apsolutne konfiguracije stereogenog centra sekundarnog alkohola (tj. jedinjenjima tipa R^1CHOHR^2 , gde je $R^1 \neq R^2$, Dale & Mosher, 1973). U tu svrhu koristili su hiralnu, enantiomerno čistu karboksilnu kiselinu za esterifikaciju sekundarnih alkohola, čija je konfiguracija bila nepoznata. Iako je u ovu svrhu ispitivano više različitih kiselina, najčešće se koristi α -metoksi- α -trifluorometilfenilsirćetna kiselina (MTPA), poznata kao *Mosher*-ova kiselina. Po direktnoj analogiji, ova metoda se može primeniti i za određivanje konfiguracije hiralnih amina.

Prvi korak u analizi podrazumeva građenje estara u dva odvojena, analogna eksperimenta, sa svakim od enantiomera *Mosher*-ove kiseline (šema 3). Za aktivaciju karboksilne kiseline najčešće se koristi *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid (DCC). Takođe, mogu se direktno koristiti i hloridi kiseline (MTPA-Cl). Kao rezultat se dobijaju dva diastereomerna *Mosher*-ova estra. Budući da diastereomeri poseduju različita fizička i spektroskopska svojstva, *Dale* i *Mosher* su zaključili da će se njihovi 1H NMR-spektri međusobno razlikovati. Pokazali su da se, poređenjem hemijskih pomeranja signala koji jasno odgovaraju protonima iz supstituenata R^1 i R^2 (ili fluora iz CF_3 -grupe u MTPA-fragmentu), može zaključiti apsolutna konfiguracija karbinolnog centra u polaznom alkoholu.



Šema 3. Sintetska šema dobijanja diastereomernih *Mosher*-ovih estara

Krajem 1980-ih, istraživačka grupa *Kakisawe* sa Univerziteta u Cukubi opisala je značajno unapređenje metode, koja je postala poznata kao modifikovana (ili unapređena) analiza *Mosher*-ovih estara (Ohtani et al., 1989; 1991a; 1991b). Tehnološki napredak u tom

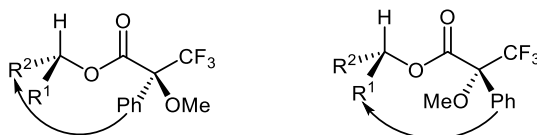
periodu omogućio je širu dostupnost snažnijih superprovodnih magneta u NMR-spektrometrima. Između ostalog, to je značilo da se znatno veći broj protona u malim molekulima (npr. onima sa molekulskom masom manjom od 2000 Da) mogao rutinski asignirati. Suština doprinosa grupe *Kakisawe* jeste u tome što su pokazali da se brojni analogni parovi protona koji se nalaze unutar R¹ i R² fragmenata u diastereomernim estrima mogu sistematski analizirati, što omogućava mnogo viši nivo pouzdanosti pri određivanju apsolutne konfiguracije, čak i za znatno širi spektar karbinolnih supstrata.

Pored određivanja apsolutne konfiguracije, *Mosher*-ovi estri mogu se koristiti i za dobijanje drugih stereochemijskih informacija. *Mosher* je pokazao da se iz spektra može odrediti odnos enantiomera u uzorku (enantiomerni višak) na osnovu relativnih intenziteta analognih signala (¹H i/ili ¹⁹F) u spektrima odgovarajućih diastereoizomera.

Mosher-ova metoda pri određivanju apsolutne konfiguracije sekundarnih alkohola oslanja se na empirijski zasnovan (i eksperimentalno potvrđen) konformacioni model prikazan na slici 24. Ukratko, pretpostavlja se da je za svaki diastereomer dominantna konformacija ona u kojoj estarska veza ima standardnu *s-trans* orijentaciju oko O–CO veze (analogno glavnoj konformaciji acikličnih sekundarnih amida oko C–N veze), a da su trifluormetil-grupa (CF₃) iz MTPA-fragmenta i metinski proton iz alkohola *sin*-koplanarni (dijedralni ugao 0°) sa karbonilnom grupom. Na taj način, svi označeni atomi u jedinjenju R¹R²C(H)–O–C(=O)–C–CF₃ nalaze se u istoj ravni.

Iako molekuli *Mosher*-ovih estara postoje kao smeša više brzo uravnotežavajućih konformera, pretpostavlja se da jedna dominantna konformacija u najvećoj meri doprinosi spektralnim razlikama diastereomernih estara. Ili, kako su *Mosher* i saradnici to jasno saželi: “Ove konformacije predstavljaju model koji uspešno korelira sa dobijenim rezultatima. One nisu zamišljene kao energetski najpovoljnije konformacije analiziranih molekula. Mogu, zapravo, predstavljati efektivni prosek više konformacija ili čak manjinsku konformaciju koja, međutim, ostvaruje nesrazmerno veliki efekat na diferencijalno magnetno okruženje grupa [R¹] i [R²]. Uspešnost ove korelacije, istina, dodatno učvršćuje verovanje da se zaista radi o dominantnim konformacijama datih molekula, ali mora se imati u vidu i mogućnost da je reč o slučajnoj geometriji koja, uprkos tome, služi kao empirijski validan model za tumačenje dobijenih rezultata.” (Dale & Mosher, 1973).

Anizotropne aromatične grupe (fenil-supstituent prisutan u *Mosher*-ovom estru) poznate su po tome što stvaraju magnetno-zaštitni efekat na protone koji se nalaze iznad ili ispod ravni aromatičnog prstena (slika 24). Ovaj efekat dovodi do pomeranja hemijskih signala prostorno bliskih protona u NMR-spektru ka nižim vrednostima. Analiza dominantnih konformacija dijastereomernih estara otkriva ključnu razliku: protoni u R^2 estera *S*-konfiguracije su više zaštićeni, dok su u slučaju *R*-estera više zaštićeni protoni grupe R^1 . Ovo predstavlja osnovu *Mosher*-ove metode za određivanje apsolutne konfiguracije. Štaviše, „doseg“ anizotropnog efekta zaštite, koji potiče od aromatičnog prstena, proteže se daleko unutar molekula, što znači da je veliki broj protona – čak i onih prostorno udaljenijih – u okviru R^1 - i R^2 -grupa, različito magnetno zaštićen u dva dijastereomera.

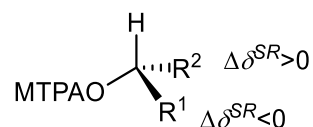


Slika 24. Uobičajeni prikazi konformacija koji se koriste za analizu svakog od dijastereomernih *Mosher*-ovih estara. Anizotropni efekat koji potiče od fenil-grupe označen je strelicama u svakoj konformaciji

Kao posledica svega navedenog, znaci vrednosti $\Delta\delta^{SR}$ (definisane prema konvenciji kao $\delta^S - \delta^R$) biće pozitivni za protone koji pripadaju R^1 , a negativni za protone unutar R^2 . Na osnovu toga, moguće je odrediti koja grupa se nalazi na kojoj strani molekula (R^1 naspram R^2), što direktno vodi do određivanja apsolutne konfiguracije sekundarnog karbinolnog centra u početnom alkoholu. Važno je obratiti pažnju na konvenciju definisanja hemijskog pomeranja: dok se u originalnoj *Mosher*-ovoj analizi koristi oznaka $\Delta\delta^{SR} = \delta^S - \delta^R$, u današnje vreme, neki autori koriste obrnutu konvenciju $\Delta\delta^{RS} = \delta^R - \delta^S$. Iako će u oba slučaja rezultat biti tačan, ključno je jasno navesti koju konvenciju autor koristi pri interpretaciji podataka.

Osim ^1H NMR-spektroskopije, analiza ^{13}C NMR-spektara *Mosher*-ovih estara se može uspešno primeniti radi određivanja apsolutne konfiguracije hiralnih alkohola. Ovaj pristup je analogan prethodno opisanom postupku, koji koristi hemijska pomeranja u ^1H NMR-spektru, ali se zasniva na analizi promena hemijskih pomeranja ugljenikovih-13 atoma u (*S*)- i (*R*)-MTPA estrima. Na osnovu razlika u hemijskim pomeranjima ($\Delta\delta^{SR}$) za supstituente R^1 i R^2 , moguće je odrediti njihovu prostornu orijentaciju. Na primer, u slučaju prikazanom na slici 25,

supstituent koji pokazuje negativne $\Delta\delta^{SR}$ vrednosti odgovara položaju R^1 . Nasuprot tome, supstituent čiji atomi ugljenika daju pozitivne $\Delta\delta^{SR}$ vrednosti odgovara položaju R^2 .



Slika 25. Razlika u hemijskim pomeranjima ugljenika-13 i vodonika u diastereomernim Mosher-ovim estrima

Metod određivanja apsolutne konfiguracije alkohola pomoću MTPA-estara, koji je prvi opisao Mosher, u potpunosti je empirijski. Modeli koji se koriste služe kao praktičan način za povezivanje eksperimentalnih NMR-podataka sa apsolutnom konfiguracijom jedinjenja. To znači da pouzdanost ove metode zavisi od broja i strukturne raznovrsnosti jedinjenja sa poznatom apsolutnom stereohemijom koja su korišćena kao test primeri. Pored toga, NMR-podaci koji se koriste za dodelu konfiguracije moraju ispunjavati nekoliko uslova:

- Vrednosti $\Delta\delta^{SR}$ moraju biti dovoljno velike da premaše granicu eksperimentalne greške,
- Raspored znakova parametra $\Delta\delta^{SR}$ mora biti ujednačen za dati supstituent (tj. svi protoni na istoj strani ravni MTPA-estara moraju imati isti znak), i
- Ako je znak $\Delta\delta^{SR}$ negativan za jedan supstituent (npr. R^1), onda mora biti pozitivan za drugi supstituent (npr. R^2).

Kada je reč o upotrebi ^{19}F NMR-spektroskopije, važno je imati na umu da se određivanje apsolutne konfiguracije hiralnog centra zasniva na samo jednom parametru: $\Delta\delta^{SR}(^{19}\text{F})\text{-CF}_3$, odnosno razlici u hemijskim pomeranjima CF_3 -grupe u dva diastereomera. Nasuprot tome, razmatranje razlike hemijskih pomeranja protona i ugljenika-13 iz dva supstituenta alkohola podrazumeva dobijanje većeg broja signala, što omogućava lakše uočavanje anomalija, jer će se one ispoljiti kao neujednačen raspored znakova $\Delta\delta^{SR}$. Takav unakrsni uvid nije moguć kada se posmatraju ^{19}F NMR-podaci, jer se dobija samo jedan podatak – koji može biti pozitivan ili negativan – i kao takav uvek će „dati“ neku konfiguraciju, ali bez mogućnosti provere pouzdanosti tog rezultata (Hoye et al., 2007).

2.6. ^1H NMR potpuna spinska simulacija

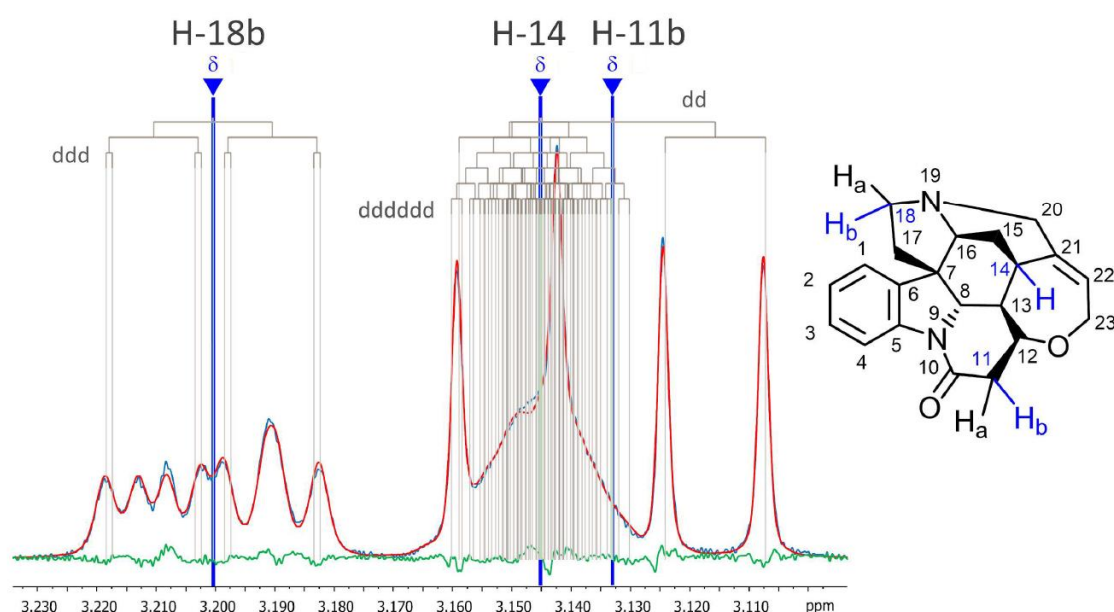
Razvoj i primena simulacije ^1H NMR-spektara predstavlja jedan od važnih alata u savremenoj organskoj hemiji, naročito kada se teži preciznom razjašnjenju struktura prirodnih ili sintetskih jedinjenja, uključujući i određivanje stereochemije (Pauli et al., 2014). Dok kvantno-mehaničke metode i softveri zasnovani na mašinskom učenju sve više zauzimaju mesto u automatizovanim postupcima analize, poseban značaj u praksi i dalje ima manuelna simulacija NMR-spektara – kao moćan pristup koji omogućava hemičaru neposredan uvid u spinska sprežanja i tačna hemijska pomeranja, a zatim i donošenje zaključaka zasnovanih na direktnom poređenju eksperimentalnih i simuliranih podataka, koji nisu bili mogući u slučaju multipleta ili preklopljenih signala.

Simulacija NMR-spektara danas obuhvata tri međusobno zavisna koraka: konformacionu analizu molekula, računanje kvantno-hemijskih parametara (hemijskih pomeranja i konstanti sprežanja) i, konačno, rekonstrukciju spektra sa uzimanjem u obzir relativne zastupljenosti konformera. Greške u bilo kom od ovih koraka prenose se kroz čitav sistem, te zahtevaju pažljivo metodološko planiranje.

Analiza započinje metodama nasumične pretrage konformacija molekula (npr. Monte Karlo ili molekulskim dinamičkim simulacijama), pri čemu se njihov broj smanjuje na reprezentativan skup putem klasterizacije. Konformeri se zatim podvrgavaju proračunima pomoću GIAO (*Gauge-Including Atomic Orbital*) metode, najčešće uz primenu DFT funkcionala kao što su PBE0 u kombinaciji sa odgovarajućim baznim setovima (npr. pcSseg-2). U slučajevima kada je potrebna ekstremna preciznost, koriste se *post-Hartree-Fock* metode poput DLPNO-CCSD(T). Na kraju, parametri određeni prema verovatnoći iz Bolcmanove raspodele unose se u algoritam za simulaciju oblika cele spektralne linije, koji preklapa pojedinačne Lorenc-Gausove komponente u jedinstvenu spektralnu traku koja se može direktno uporediti sa eksperimentalnom.

Pioniri u ovoj oblasti pokazali su da takvi sistemi mogu ispraviti strukture za koje se dugo verovalo da su tačne. Izdvaja se rad *Pauli*-ja i saradnika na malim prirodnim jedinjenjima: iterativnim podešavanjem *J*-konstanti i hemijskih pomeranja da odgovaraju eksperimentalnom spektru strihnina (slika 26, Pauli et al., 2021), smanjili su RMSD sa više od 50 Hz na manje od 3 Hz i reprodukovali suptilna *W*-kuplovanja nevidljiva u rutinskoj 1D analizi. Signali protona H-18b, H-14 i H-11b predstavljaju dva česta, naizgled jednostavna, ali u praksi izazovna

aspekta interpretacije ^1H NMR-spektara: neslaganje vizuelne multipletnosti sa stvarnim spin-spin kuplovanjima i preklapanje signala. Naime, multiplet H-18b ne oslikava očekivan izgled signala prvog reda zasnovanog na realnim konstantama sprežanja, koje su dobijene putem kvantno-mehaničkih proračuna (eksperimentalni spektar prikazan je plavom, simulirani crvenom, a njihova razlika zelenom bojom). Na primer, H-14 se spreže sa H-15a, H-15b, H-16, H-20a, H-20b i H-22. Ova situacija jasno pokazuje da razlike u frekvencijama spektralnih linija ne odgovaraju direktno konstantama sprežanja. Iako se za signal H-11b lako može reći da predstavlja dublet dubleta u oblasti nižih frekvencija, oblik signala H-14 je teško opisati zbog svoje difuzne i slabo definisane forme. Međutim, analiza zasnovana na kvantno-mehaničkim principima razotkriva pravu multipletnu prirodu – iako vizuelno podseća na širok singlet ili nedefinisan multiplet, HiFSA analiza pokazuje da je ovaj signal zapravo sastavljen od najmanje 64 pojedinačne linije.



Slika 26. Signali protona H-18b, H-14 i H-11b u ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) spektru strihnina (preuzeto iz Pauli et al., 2021)

Ipak, računski zahtevi ostaju izazovni za molekule većeg stepena fleksibilnosti i sa više od 40 atoma. Rešenja za ovu situaciju uključuju primenu fragmentacionih DFT metoda (ONIOM, ADMA) i sve češće uvođenje modela mašinskog učenja obučenih na velikim skupovima računskih i eksperimentalnih podataka. Noviji modeli konvolucionih neuronskih mreža (CNN), sposobni su da iz 3D-strukture predvide hemijska pomeranja sa srednjim apsolutnim greškama ispod 0,2 ppm, čime značajno ubrzavaju procese, a bez gubitka tačnosti.

Kombinacija mašinskog učenja i kvantno-hemijskih metoda nudi optimalan balans između tačnosti i brzine, pri čemu kvantno-hemijske metode pružaju fizičku osnovu, a mašinsko učenje omogućava predviđanja u realnom vremenu.

Numerička preciznost je bezvredna bez statističkog konteksta. DP4+, *Bayesian*-ski algoritam koji je razvio *Grimblat*, kvantifikuje koliko dobro dati skup stereoizomera objašnjava posmatrane δ vrednosti kombinujući skalirane i neskaliране ostatke. Ova metodologija je promenila udžbenike prirodnih proizvoda: brojne strukture su revidirane kada su verovatnoće DP4+ pale ispod %. Ipak, DP4+ pretpostavlja nezavisne i identično distribuirane greške i zanemaruje konstante sprežanja. Automatizovani sistemi, kao onaj *Rodriguez-Guere*, kombinuju DP4+ sa logikom zamućenih skupova za prepoznavanje šablona signala, nudeći rangirane grafove kandidata, koji kombinuju ljudsku intuiciju sa mašinskim zaključivanjem. Praktična primena ovih pristupa obuhvata širok spektar zadataka: od stereochemijske analize malih molekula, preko dereplikacije prirodnih proizvoda, do kvantitativne analize smeša i kompleksnih biopolimera. Kod fleksibilnih molekula, neophodno je kombinovati napredno uzorkovanje konformacija (npr. metadinamiku), fragmentacionu računarsku hemiju i modele mašinskog učenja za preciznu i brzu simulaciju.

U praksi, hemičari se suočavaju sa različitim slučajevima primene spinske simulacije:

- Analiza konfiguracije malih, rigidnih molekula: grubo pretraživanje konformera uz GIAO(DFT) je često dovoljno, uz DP4+ ili njegovih varijanti;
- Konformaciono fleksibilni prirodni proizvodi: poboljšano uzorkovanje (MD/metadinamika) u kombinaciji sa fragment DFT-om ili ML prediktorima hemijskih pomeranja je neophodno;
- Analiza smeša i dereplikacija: kvantitativno simuliranje oblika linije pomoću spektralnih biblioteka ubrzanih ML metodama pomaže u visokopropusnoj metabolomici;
- Biopolimeri i sistemi sa unutrašnjom nestruktuiranošću: hibridne QM/MM metode ili grubo modelovani ML prediktori šiltinga omogućuju balans između atomističke tačnosti i pristupačnih računskih zahteva.

Postupak manuelne simulacije najčešće započinje detaljnom analizom eksperimentalnog spektra jedinjenja dobijenog u rastvoru, najčešće u CDCl_3 , CD_3OD ili $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$. Iz spektra se što je moguće preciznije beleže hemijska pomeranja (δ) svih protona, kao i oblik njihovih signala, odnosno multipletnost, i konstante spin-spin sprežanja (J , u Hz),

tamo gde je to moguće. U mnogim slučajevima, naročito kada se radi o strukturno sličnim diastereomerima, određivanje svih J -vrednosti direktno iz spektra nije moguće zbog preklapanja signala, složenih sprežanja ili „širine“ linija. Zbog toga se pribegava simulaciji spektra kao alternativni ili dopuni direktnoj analizi.

U praktičnom radu, jedan od najčešće korišćenih alata za simulaciju je modul za NMR-simulaciju u okviru programa MestReNova. Na osnovu hemijskih pomeranja, izmerenih ili procenjenih iz eksperimentalnog spektra, korisnik kreira „*spin system*“, unoseći broj protona, njihova hemijska pomeranja, kao i inicijalne vrednosti J -konstanti. U početku se mogu koristiti približne vrednosti konstanti, izmerene ili pretpostavljene, odnosno uobičajene za određeni odnos protona (npr. 7 Hz za vicinalne protone na sp^3 -hibridizovanim atomima, 10 Hz za „*cis*“ protone, a 15 Hz za „*trans*“ sprežanje protona na dvostrukoj vezi itd.), koje se zatim manuelno, iterativno podešavaju. Simulirani spektar se prikazuje paralelno sa eksperimentalnim, pri čemu korisnik interaktivno menja vrednosti J - i δ -parametara kako bi se postiglo najbolje poklapanje u položaju i obliku signala. Ovaj proces često zahteva više iteracija.

Kada se postigne vizuelno, a zatim i kvantitativno poklapanje simuliranog i eksperimentalnog spektra, vrednosti J -konstanti koje su unete u simulaciju uzimaju se za stvarne vrednosti za to jedinjenje. Vrednost vicinalne konstante između dva protona na susednim stereogenim centrima može ukazati na relativnu konfiguraciju (kao što je *trans*- ili *cis*- orijentacija u cikličnim jedinjenjima ili na alifatičnom lancu), a na osnovu poznate *Karplus*-ove veze između dijedralnog ugla i J -vrednosti. Takođe, prisustvo ili odsustvo daljinskih sprežanja – na primer W-kuplovanje (preko četiri veze, 4J) ili homoalilno (preko π -sistema, 5J) može biti jasan pokazatelj prostorne orijentacije u okviru molekula, odnosno konformacije.

U slučajevima kada se analiziraju diastereomerni parovi, kao što su *Mosher*-ovi estri, manuelna simulacija omogućava uočavanje suptilnih varijacija u sprežanjima i δ -vrednostima, koje su posledica različitih prostornih odnosa u molekulima. Neretko se tek simulacijom mogu razrešiti preklapanja signala koja su onemogućila direktno određivanje J -vrednosti. Usporedna analiza ovako dobijenih podataka omogućava nedvosmisleno određivanje relativne, a u određenim slučajevima i apsolutne konfiguracije.

Iako vremenski zahtevna i u velikoj meri oslonjena na iskustvo istraživača, manuelna iterativna simulacija ^1H NMR-spektra predstavlja precizan i fleksibilan metod koji pruža

duboko razumevanje strukturnih aspekata analiziranog jedinjenja. U kombinaciji sa drugim metodama, kao što su dvodimenzionalne NMR-tehnike, kvantno-mehanički proračuni i derivatizacija sa hirlanim reagensima, ona ostaje nezamenljiv instrument u arsenalu savremenog hemičara.

3. Eksperimentalni deo

3.1. Hemikalije i rastvarači

Svi korišćeni reagensi i rastvarači nabavljeni su iz komercijalnih izvora (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, Misuri, SAD; *Merck*, Darmštadt, Nemačka; *Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, SAD) i korišćeni su bez ikakvog dodatnog prečišćavanja, osim rastvarača koji su pre upotrebe bili predestilovani i osušeni. Za preparativno prečišćavanje korišćen je silika-gel 60 (0,04–0,063 mm, *Merck*, Darmštadt, Nemačka), dok su gel-filtracije vršene na *Sephadex LH-20* (*GE Healthcare Bio-Sciences AB*, Uppsala, Švedska).

3.2. Metode analize i razdvajanja

3.2.1. Gasna hromatografija-masena spektrometrija (GC-MS)

GC-MS-analiza (3 ponavljanja) vršena je pomoću gasnog hromatografa *Hewlett-Packard* 6890N, opremljenog DB-5MS kapilarnom kolonom (5% difenilsiloksan i 95% dimetilsiloksan, 30 m × 0,25 mm, debljina filma 0,25 µm, *Agilent Technologies*, Palo Alto, Kalifornija, SAD) i povezanim sa masenim detektorom 5975B istog proizvođača. Temperature injektora i interfejsa bile su: 250 °C, odnosno 300 °C. Temperatura u pećnici podizana je od 70 do 290 °C brzinom zagrevanja od 5 °C/min, a program je završen izotermalnim periodom od 10 min. Kao noseći gas korišćen je helijum pri protoku od 1,0 mL/min. Uzorci (1,0 µL rastvora uzorka u odgovarajućem rastvaraču) su injektovani u pulsnom split-režimu (protok je bio 1,5 mL/min prvih 0,5 min, a zatim je podešen na 1,0 mL/min tokom ostatka analize; split-odnos 40 : 1). MS-uslovi su bili sledeći: napon jonizacije 70 eV, beleženi opseg m/z 35–650, vreme skeniranja 0,32 s. Sastojci uzoraka su identifikovani upoređivanjem njihovih linearnih retencionih indeksa (u odnosu na C₈–C₄₀ *n*-alkane na DB-5MS koloni) sa literaturnim vrednostima, gde je to bilo moguće, i njihovim masenim spektrima sa spektrima standarda, kao i spektrima iz baza podataka Wiley 6, NIST11, MassFinder 2.3, i MS-biblioteke formirane u laboratoriji, i u određenim slučajevima, ko-injekcijom sa standardom.

3.2.2. Gasna hromatografija sa plameno-jonizacionim detektorom (GC-FID)

GC-FID-analiza sprovedena je za svaki uzorak u tri ponavljanja, korišćenjem gasnog hromatografa *Agilent* 7890A (*Agilent Technologies*, Palo Alto, Kalifornija, SAD), opremljenog injektorom, plameno-jonizacionim detektorom (FID) i HP-5 kapilarnom kolonom (5% difenilsiloksan i 95% dimetilsiloksan; dužina 30 m, prečnik 0,32 mm, debljina filma 0,25 µm). Temperaturni režim pećnice bio je programiran od 70 °C do 300 °C uz porast od 5 °C/min, nakon čega je održavana izotermalno na 300 °C tokom 5 minuta. Kao nosilac korišćen je azot, protoka 3,0 mL/min. Temperatura injektora bila je podešena na 250 °C, a uzorci (1,0 µL

rastvora) su injektovani u *splitless* režimu. Parametri FID detektora su bili: temperatura grejača od 300 °C, protok vodonika 30 mL/min, protok vazduha 400 mL/min, protok pomoćnog gasa 23,5 mL/min. Signal je beležen pri frekvenciji 20 Hz i obrađivan pomoću softverskog paketa Agilent GC ChemStation.

3.2.3. Nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija (NMR)

Svi jednodimenzionalni (^1H i ^{13}C) i dvodimenzionalni (grHSQC, grHMBC, gr ^1H - ^1H COSY, ROESY i NOESY) NMR-spektri su snimljeni na spektrometru *Bruker Avance III* (Bruker, Felanden, Švajcarska) opremljenim dvojnomo $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ radnom glavom za kivete od 5 mm. Spektri su snimljeni na 25 °C u deuterisanom hloroformu (CDCl_3), deuterisanom dimetil-sulfoksidu ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), i deuterisanom metanolu (CD_3OD). Hemijska pomeranja data su u δ (ppm) jedinicama u odnosu na tetrametilsilan (Me_4Si , TMS) koji je korišćen kao unutrašnji standard. Skalarna sprežanja izražena su u hercima (Hz). 2D NMR-spektri, kao i višepulsni eksperimenti (DEPT90 i DEPT135) i eksperimenti selektivnog ^1H -homonuklearnog dekuplovanja su snimani uz primenu uobičajnih pulsnihi sekvenci, koje su bile dostupne iz Brukerovih biblioteka pulsnihi sekvenci. Snimljeni spektri su obrađivani softverom MestrelNova (verzije 14.1.2-25024 ili 11.0.3-18688, *Mestrelab Research*, Korunja, Španija).

3.2.4. ^1H NMR-potpuna spinska analiza

^1H NMR-potpuna spinska analiza izolovanihi/sintetisanihi jedinjenja vršena je iterativnim podešavanjem vrednosti hemijskih pomeranja i konstanti sprežanja, kako bi se uklopile sa eksperimentalno dobijenim vrednostima korišćenjem MestReNova 14.1.2 softvera. Ovo je rezultiralo sistematskim utičnjavanjem svih izračunatih NMR-parametara, sve dok se rezultat simulacije nije odlično slagao ($\text{NRMSD} < 0,05\%$) sa eksperimentalno dobijenim spektrima jedinjenja.

3.2.5. Infracrvena spektroskopija (IR)

Infracrveni spektri FT-ATR-IR (FT = *Fourier*-ova transformacija, ATR = oslabljena totalna refleksija (*attenuated total reflectance*)) čistih izolovanihi/sintetisanihi jedinjenja snimani su na FT-IR-instrumentu *Thermo Nicolet*, model 6700 (Votam, Masačusets, SAD).

3.2.6. Ultraljubičasta (UV) spektroskopija

UV-Vis spektri čistih izolovanihi supstanci snimani su na *Shimadzu* UV-1800 UV-Vis-spektrofotometru (Kjoto, Japan) koristeći acetonitril kao rastvarač.

3.2.7. Elementna mikroanaliza

Elementna mikroanaliza ugljenika i vodonika čistih izolovanih/sintetisanih jedinjenja je izvršena na *Carlo Erba* 1106 mikroanalizatoru.

3.2.8. Masena spektrometrija visokog razlaganja (HREIMS)

Masena spektrometrija visokog razlaganja (rezolucije) izolovanih/sintetisanih jedinjenja je izvršena na *JEOL Mstation* JMS-700 masenom spektrometru (JEOL Ltd., Tokio, Japan) pri energiji jonizacije od 70 eV, jonskoj zamci (ion trap) od 300 μ A i temperaturi jonskog izvora od 230 °C. Greška dobijenog elementnog sastava izračunata je *MStation* softverom i data je u amu jedinicama.

3.2.9. Optička rotacija

Optička rotacija izolovanih jedinjenja merena je u metanolu na 25 °C na *Autopol IV* polarimetru (*Rudolph Research Analytical, Hackettstown*, Nju Džerzi, SAD), opremljenom natrijumovom lampom (589 nm) i mikrokivtom dužine 10 cm.

3.2.10. Tankoslojna hromatografija (TLC)

TLC (eng. *Thin-Layer Chromatography*) hromatografija je vršena na aluminijumskim pločama sa prethodno nanosenim slojem silika-gela 60 (*Merck*, Darmštat, Nemačka). Mrlje na TLC-u su vizualizovane pomoću UV-lampe (254 i 365 nm) i izazivane 50% rastvorom H₂SO₄, (v/v) nakon čega su ploče zagrevane 2 min na 110 °C.

3.2.11. Dry-flash hromatografija

Za preparativno razdvajanje sastojaka ekstrakta, kao i za prečišćavanje sintetisanih jedinjenja, korišćena je aparatura za *dry-flash* hromatografiju, koja se sastojala od kolone silika-gela 60 (0,04–0,063 mm, *Merck*, Darmštat, Nemačka), napakovane na sinterovanom staklenom levku srednje poroznosti, i standardne boce za vakuum filtraciju. Hromatografija je vršena pod gradijentnim uslovima, počevši sa smešom *n*-heksana i dietil-etra (Et₂O), zatim Et₂O i EtOAc, i završavajući smešama EtOAc i metanola.

3.2.12. Hromatografija na koloni

Za prečišćavanje sintetisanih jedinjenja i dodatno prečišćavanje frakcija sa *dry-falsh* hromatografije korišćene su kolone (od 20 do 70 cm, prečnika 1–3 cm), napakovane silika-gelom (>230 mesh-a, proizvođač *Merck*, Darmštat, Nemačka) ili Sephadex LH-20 (*GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala*, Švedska), i smeše odgovarajućih rastvarača.

3.3. Biljni materijal i priprema uzoraka

3.3.1. Biljni materijal

Biljni materijal analiziranih taksona roda *Bupleurum* sakupljen je na teritoriji Srbije (lokaliteti Suva planina i Šar-planina), Severne Makedonije (planina Galičica), Hrvatske (poluostrvu Pelješac, u blizini Malog Stona) i Grčke (planina Olimp). Nadzemni delovi biljke u cvetu/fazi plodonošenja sakupljeni su u periodu od septembra 2016. do avgusta 2023. godine. Nomenklatura je usklađena sa bazom podataka *World Flora Online* (2025). Herbarski primerici deponovani su u herbarijumu Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, *Herbarium Moesiacum* Niš (HMN). U tabeli 15 prikazani su podaci o lokalitetima i datumu sakupljanja biljnog materijala, kao i vaučer brojevi herbarskih primeraka. Identifikacija biljnog materijala izvršena je prema Flori Socijalističke Republike Srbije (Nikolić, 1973), Flori Republike Makedonije (Micevski, 2005) i Flori Evrope (Tutin, 1968). Identifikaciju biljnog materijala izvršili su prof. dr Vladimir Randelović i dr Irena Raca, botaničari sa Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu.

Tabela 15. Lokalitet, datum sakupljanja i vaučer brojevi herbarskih primeraka analiziranih taksona

Oznake uzoraka	Takson	Lokalitet	Datum sakupljanja	Vaučer broj
BA	<i>Bupleurum affine</i> Sadler	Devojački grob, Suva planina, Srbija	13. septembar 2020.	HMN14397
BFK	<i>B. falcatum</i> L.	Šar-planina, Kosovo, Srbija	20. avgust 2022.	HMN18290
BFS	<i>B. falcatum</i> L.	Devojački grob prema Tremu, Suva planina, Srbija	27. avgust 2023.	HMN18293
BFG	<i>B. falcatum</i> L.	planina Galičica, Severna Makedonija	8. avgust 2023.	HMN18292
BS	<i>B. falcatum</i> subsp. <i>cernuum</i> (syn. <i>B. sibthorpium</i> L.)	planina Olimp, Grčka	10. avgust 2022.	HMN16265
BV	<i>B. veronense</i> Turra	poluostrvo Pelješac, Mali Ston, Dalmacija, Hrvatska	17. jun 2018.	HMN13669
BP-1	<i>B. praealtum</i> L.	Devojački grob, Suva planina, Srbija	31. avgust 2016.	HMN12112
BP-2	<i>B. praealtum</i> L.	selo Sićevo, Niš, Srbija	19. septembar 2023.	HMN18286

3.3.2. Priprema ekstrakata

Za pripremu ekstrakta korišćen je svež ili na vazduhu sušen biljni materijal. U zavisnosti od uzorka, ekstrakciji su podvrgnuti ili ceo nadzemni deo biljke ili isključivo šizokarpijumi. Pre sušenja do konstantne mase, šizokarpijumi su pažljivo odvajani od ostatka nadzemnih delova; zreli šizokarpijumi su potom oslobođani blagim protresanjem i dodatno prosejani. Nadzemni delovi biljke su seckani na sitne delove, dok su šizokarpijumi mehanički usitnjavani. Ekstrakcija je sprovedena odvojeno za svaki biljni deo, maceracijom u dietil-eteru tokom deset dana, uz povremeno mućkanje, na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svetlosti. Dobijeni ekstrakti su sušeni pomoću anhidrovanog $MgSO_4$ i filtrirani radi uklanjanja nerastvornog materijala, nakon čega je rastvarač uklonjen na rotacionom vakuum-uparivaču na

sobnoj temperaturi. U tabeli 16 prikazani su prinosi dobijenih ekstrakata, kao i biljni delovi korišćeni u postupku ekstrakcije.

Tabela 16. Prinos ekstrakata vrsta roda *Bupleurum*

Oznake uzoraka	Deo biljke	Prinos (w/w, %)
BFK	nadzemni delovi	2,9
BFS	nadzemni delovi	2,1
BFG	nadzemni delovi	2,0
BS	nadzemni delovi	1,8
BV	nadzemni delovi	2,5
BP-1	nadzemni delovi	2,3
BP-1	šizokarpijumi	1,9

Ekstrakti uzoraka taksona **BFS**, **BFG**, **BV** i **BP-1** su podvrgnuti *dry-flash* hromatografiji na silika-gelu, pod gradijentnim uslovima, korišćenjem smeše rastvarača rastuće polarnosti – počevši od čistog *n*-heksana, preko smeše *n*-heksana i dietil-etra, dietil-etra i etil-acetata, do smeše etil-acetata i metanola. Sakupljano je po 50 ml eluenta. S obzirom na ograničene količine dobijenih ekstrakata, uzorci ekstrakta **BFK** i **BS** analizirani su direktno GC-MS-metodom. Dobijene hromatografske frakcije su spojene na osnovu TLC i/ili GC-MS-analize. Sve dobijene frakcije na kraju su analizirane pomoću GC-MS-a, a neke od njih i NMR-spektroskopijom.

Biljni materijal vrste *B. praealtum* prikupljen je na padinama Suve planine i osušen na vazduhu do postizanja konstantne mase. Nakon sušenja, materijal je podvrgnut ekstrakciji sa dietil-etrom u skladu sa protokolom opisanim u odeljku 3.3.2. Dietil-etarski ekstrakti šizokarpijuma i nadzemnih delova vrste **BP-1**, neovisno, podvrgnuti su *dry-flash* hromatografiji pod gradijentnim uslovima, što je rezultiralo sa po 30 frakcija. Frakcija 19 (heksan : Et₂O = 2:3, v/v, 97 mg) ekstrakta šizokarpijuma vrste **BP-1** predstavljala je čisto jedinjenje **31**, dok je frakcija 18 (heksan : Et₂O = 2:3, v/v) bila smeša koja se pretežno sastojala od jedinjenja **31**, **33** i **34**. Frakcija 25, eluirana smešom Et₂O : EtOAc = 1:1, v/v, 20 mg), sadržala je čisto jedinjenje **36**. Frakcije 18 i 19 ekstrakta nadzemnih delova vrste **BP-1**, zajedno sa frakcijom **18** iz ekstrakta šizokarpijuma iste vrste, su objedinjene i podvrgnute dodatnom razdvajanju – najpre na Sephadex LH-20 koloni (izokratski uslovi, CHCl₃–MeOH = 1:1, v/v), a zatim hromatografijom na koloni silika-gela (heksan : Et₂O = 2:3, v/v). Ovo je rezultovalo

dodatnim količinama čistog jedinjenja **31** i smešom jedinjenja **31** i **33**, značajno obogaćenom jedinjenjem **33**. Jedinjenje **35** (23 mg) izolovano je iz ekstrakta nadzemnih delova vrste **BP-1** u toku prve *dry-flash* hromatografije, iz frakcije 25 eluirane smešom heksana i Et₂O (1:3, v/v). Frakcija 30 (EtOAc : MeOH = 3:1, v/v), mase 12 mg, predstavljala je čist (+)-arcitin (*syn.* dimetilmatairesinol, Davidson et al., 2018). Frakcije 11 i 12 početne *dry-flash* hromatografije ekstrakta šizokarpijuma (5, odnosno 10 mg), prema GC-MS-analizi sadržavale su jedinjenje **32**, ali kao jednog od sastojaka složene smeše.

(5*Z*,7*E*,9*E*,11*E*)-Tetradeka-5,7,9,11-tetraen-1-il-(*R*)-2-hidroksi-3-metilbutanoat (praealtaestar A, **31**): žuta uljasta supstanca; $[\alpha]_D^{25} +64,3$ (c 1, MeOH); UV (CH₃CN) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 289, (4,28), 302 (4,54), 316 (4,51), 341 (2,95) nm; IR (čisto) $\nu_{\max} \sim 3500, 2961, 2916, 2848, 1727, 1462, 1138, 996 \text{ cm}^{-1}$; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) i ¹³C NMR (CDCl₃, 100,6 MHz) spektralni podaci su dati u tabelama 18 i 17; EIMS (70 eV) *m/z* (%): 306 [M]⁺ (99), 159 (42), 131 (58), 119 (36), 117 (70), 105 (49), 91 (100), 79 (51), 73 (34), 55 (39); HREIMS *m/z* 306,4459 [M]⁺ (izračunato za C₁₉H₃₀O₃, 306,4460); RI (DB-5MS) 2365.

(5*Z*,7*E*,9*E*,11*E*)-Tetradeka-5,7,9,11-tetraen-1-il-3-metilbutanoat (praealtaestar B, **32**): bezbojna uljasta supstanca; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 6,44 (1H, dddd, *J* = 14,5, 11,3, 1,0, 0,7 Hz, H-7'), 6,224 (1H, ddt, *J* = 14,5, 11,2, 0,7 Hz, H-8'), 6,217 (1H, ddd, *J* = 15,5, 10,8, 0,7 Hz, H-10'), 6,18 (1H, ddt, *J* = 15,5, 11,2, 0,7 Hz, H-9'), 6,09 (1H, ddtd, *J* = 15,0, 10,8, 1,4, 0,7 Hz, H-11'), 6,05 (1H, ddtd, *J* = 11,3, 10,3, 1,4, 0,7 Hz, H-6'), 5,76 (1H, dt, *J* = 15,0, 6,8 Hz, H-12'), 5,38 (1H, dtd, *J* = 10,3, 7,4, 1,0 Hz, H-5'), 4,07 (2H, t, *J* = 6,6 Hz, H-1'), 2,33 (2H, d, *J* = 6,7 Hz, H-2), 2,24 (2H, tdd, *J* = 7,6, 7,4, 1,4 Hz, H-4'), 2,15 (2H, qdd, *J* = 7,5, 6,8, 1,4 Hz, H-13'), 2,08 (1H, t sept, *J* = 6,7, 6,6 Hz, H-3), 1,64 (2H, tt, *J* = 7,6, 6,6 Hz, H-2'), 1,46 (2H, pseudo quint, *J* = 7,6, 7,6 Hz, H-3'), 1,01 (3H, t, *J* = 7,5 Hz, H-14'), 0,95 (6H, d, *J* = 6,6 Hz, H-4 i H-5); ¹³C NMR (CDCl₃, 100,6 MHz) δ 173,5 (C, C-1), 137,4 (CH, C-12'), 133,5 (CH, C-10'), 133,3 (CH, C-8'), 131,6 (CH, C-5'), 130,9 (CH, C-9'), 129,6 (CH, C-11'), 129,4 (CH, C-6'), 127,4 (CH, C-7'), 64,2 (CH₂, C-1'), 43,6 (CH₂, C-2), 28,4 (CH₂, C-2'), 27,6 (CH₂, C-4'), 26,1 (CH, C-3), 26,0 (CH₂, C-3'), 25,8 (CH₂, C-13'), 22,6 (CH₃, C-4 and C-5), 13,7 (CH₃, C-14'); EIMS (70 eV) *m/z* (%): 290 [M]⁺ (58), 131 (53), 117 (63), 105 (45), 91 (100), 85 (55), 79 (50), 67 (34), 57 (59), 41 (52); HREIMS *m/z* 290,2250 [M]⁺ (izračunato za C₁₉H₃₀O₂, 290,2246); RI (DB-5MS) 2227.

(5*E*,7*E*,9*E*,11*E*)-Tetradeka-5,7,9,11-tetraen-1-il-(*R*)-2-hidroksi-3-metilbutanoat (praealtaestar C, **33**): bezbojna uljasta supstanca; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) i ¹³C NMR

(CDCl₃, 100,6 MHz) spektralni podaci su dati u tabelama 18 i 17; EIMS (70 eV) *m/z* (%): 306 [M]⁺ (52), 131 (47), 117 (62), 105 (42), 91 (100), 79 (51), 73 (40), 67 (34), 55 (43), 41 (37); HREIMS *m/z* 306,4456 [M]⁺ (izračunato za C₁₉H₃₀O₃, 306,4460); RI (DB-5MS) 2403.

(5*Z*,7*E*,9*E*,11*E*)-Tetradeka-5,7,9,11-tetraen-1-il-(*R*)-2-acetoksi-3-metilbutanoat (praealtaestar D, **34**): žućkasta uljasta supstanca [α]_D²⁵ +80,0 (*c* 1, MeOH); UV (CH₃CN) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 288 (4,81), 301 (4,97), 316 (4,92), 342 (3,84) nm; IR (čisto) $\nu_{\max}$ ~3500, 2961, 2916, 2848, 1727, 1462, 1138, 996 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) i ¹³C NMR (CDCl₃, 100,6 MHz) spektralni podaci su dati u tabelama 18 i 17; EIMS (70 eV) *m/z* (%): 348 [M]⁺ (21), 131 (17), 117 (26), 115 (52), 105 (19), 91 (37), 79 (19), 55 (14), 43 (100), 41 (22); HREIMS *m/z* 348,4829 [M]⁺ (izračunato za C₂₁H₃₂O₄, 348,4830); RI (DB-5MS) 2485.

(*S*)-5-((1*E*,3*E*,5*E*,7*E*)-Deka-1,3,5,7-tetraen-1-il)dihidrofuran-2(3*H*)-on (praealtalakton, **35**): bezbojna uljasta supstanca; [α]_D²⁵ +70,1 (*c* 1, MeOH); UV (CH₃CN) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 288 (2,64), 301 (2,80), 316 (2,74), 342 (2,07), 410 (2,64) nm; IR (čisto) $\nu_{\max}$ 2923, 2853, 2360, 2342, 1771, 1169, 1053, 1007 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) i ¹³C NMR (CDCl₃, 100,6 MHz) spektralni podaci su dati u tabelama 18 i 17; EIMS (70 eV) *m/z* (%): 218 [M]⁺ (30), 117 (34), 105 (52), 91 (100), 79 (65), 77 (56), 66 (38), 65 (34), 55 (37), 41 (58), 39 (56); HREIMS *m/z* 218,2957 [M]⁺ (izračunato za C₁₄H₁₈O₂, 218,2960); RI (DB-5MS) 2107.

7-Oksoarcitin ((3*S*,4*R*)-3-(3,4-dimetoksibenzoil)-4-(3,4-dimetoksifenil)dihidrofuran-2(3*H*)-on, *O*-metilkonikaol B, **36**): amorfna čvrsta supstanca; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 231 (4,08), 279 (3,90), 313 (3,69), 398 (3,41), 419 (3,42), 442 (3,42), 470 (3,32) nm; IR (čisto) $\nu_{\max}$ 2924, 2853, 1732, 1021 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,46 (1H, d, *J* = 2,1 Hz, H-2), 7,34 (1H, dd, *J* = 8,5, 2,1 Hz, H-6), 6,84 (1H, d, *J* = 8,5, H-5), 6,76 (1H, d, *J* = 8,1, H-5'), 6,69 (1H, dd, *J* = 8,1, 2,1 Hz, H-6'), 6,63 (1H, d, *J* = 2,1 Hz, H-2'), 4,54 (1H, dd, *J* = 9,0, 7,0, H-9'a), 4,27 (1H, d, *J* = 6,0, H-8), 4,15 (1H, dd, *J* = 9,0, 5,7, H-9'b), 3,95 (1H, s, OMe-4), 3,91 (1H, s, OMe-3), 3,85 (1H, s, OMe-4'), 3,80 (1H, s, OMe-3'), 3,41 (1H, m, H-8'), 2,84 (1H, dd, *J* = 13,7, 7,7, H-7'a), 2,78 (1H, dd, *J* = 13,7, 8,0, H-7'b); ¹³C NMR (CDCl₃, 100,6 MHz) δ 191,5 (C, C-7), 173,1 (C, C-9), 154,3 (C, C-4), 149,3 (C, C-3'), 149,3 (C, C-3), 148,2 (C, C-4'), 130,0 (C, C-1'), 128,8 (C, C-1), 124,7 (C, C-6), 121,2 (C, C-6'), 112,0 (C, C-2'), 111,4 (C, C-5'), 110,9 (C, C-2), 110,1 (C, C-5), 72,1 (CH₂, C-9'), 56,3 (CH₃, OMe-4), 56,1 (CH₃, OMe-3), 56,0 (CH₃, OMe-4'), 55,9 (CH₃, OMe-3'), 53,7 (CH, C-8), 41,4 (CH, C-8'), 38,0 (CH₂, C-7'); EIMS (70 eV) *m/z* (%): 400 [M]⁺ (17), 178 (12), 177 (100), 165 (41), 151 (19), 146 (7),

137 (7), 107 (9), 79 (7), 77 (8); HREIMS m/z 400,4272 $[M]^+$ (izračunato za $C_{22}H_{24}O_7$, 400,4270); RI (DB-5MS) 3310.

Nadzemni delovi vrste *B. veronense*, prikupljeni su na poluostrvu Pelješac i osušeni na vazduhu do konstantne mase, podvrgnuti su ekstrakciji sa dietil-etrom u skladu sa protokolom opisanim u odeljku 3.3.2. Dietil-etarski ekstrakt nadzemnih delova vrste *B. veronense* (**BV**) podvrgnut je *dry-flash* hromatografiji pod gradijentnim uslovima, kao u slučaju **BP-1**. Frakcije 11 i 12 (heksan : Et_2O = 6:1, v/v, ukupno 99 mg) su spojene a zatim izokratski (heksan : Et_2O = 7:1, v/v) hromatografisane na dužoj koloni silika-gela dajući čista jedinjenja **37** (19 mg) i **38** (5 mg). Frakcija 25 ($EtOAc$: $MeOH$ = 9:1, v/v) originalne *dry-flash* hromatografije predstavljala je čisto jedinjenje **39** (58 mg), dok je rehromatografijom frakcije 24 na koloni *Sephadex LH-20* (izokratski, $CHCl_3$: $MeOH$ = 1:1, v/v) dobijena mala količina (manje od miligrama) jedinjenja **39a** i **39b**, kao i lignani izojatein (11 mg, Badheka et al., 1986), i laricirezinol (3 mg, Xie et al., 2003).

(*Z*)-17-Etiloksacikloheptadeka-10-en-13,15-diin-2-on (homodihidrofalkarinolid, **37**): bezbojna uljasta supstanca; UV (CH_3CN) λ_{max} (log ϵ) 216 (3,11), 252 (2,86), 266 (2,83), 281 (2,74) nm; IR (čisto) ν_{max} 2930, 2858, 1728 cm^{-1} ; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) i ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz) spektralni podaci dati su u tabeli 20; EIMS (70 eV) m/z (%): 272 $[M]^+$ (100), 129 (62), 128 (78), 117 (38), 115 (67), 105 (38), 91 (79), 77 (57), 55 (53), 41 (54); HREIMS m/z 272,3877 $[M]^+$ (izračunato za $C_{18}H_{24}O_2$, 272,3880); RI (DB-5MS) 2185.

(5*Z*,7*E*,9*E*,11*Z*)-Tetradeka-5,7,9,11-tetraen-1-il-izobutirat (veronaestar, **38**): bezbojna uljasta supstanca; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) i ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz) spektralni podaci dati su u tabelama 18 i 17; EIMS (70 eV) m/z (%): 276 $[M]^+$ (59), 131 (58), 145 (35), 117 (69), 105 (46), 91 (100), 79 (48), 71 (45), 43 (66), 41 (38); HREIMS m/z 276,4198 $[M]^+$ (izračunato za $C_{18}H_{28}O_2$, 276,4200); RI (DB-5MS) 2127.

3-Hidroksi-1-(2,4,6-trihidroksifenil)butan-1-on (veroglucinol, **39**): bezbojna uljasta supstanca; UV ($MeOH$) λ_{max} (log ϵ) 225 (4,25), 288 (4,35), 331 (3,59) μm ; IR (čisto) ν_{max} 3311, 2943, 2832, 1021 cm^{-1} , 1H NMR ($(CD_3)_2SO$ i CD_3OD , 400 MHz) i ^{13}C NMR ($(CD_3)_2SO$ i CD_3OD , 100,6 MHz) spektralni podaci dati su u tabeli 21.

Tri uzorka nadzemnih delova taksona *B. falcatum* subsp. *falcatum* (*B. falcatum*) sakupljena su tokom perioda cvetanja na sledećim lokalitetima: obronci Šar-planine (oznaka uzorka: **BFK**), Suve planine (**BFS**) i Galičice (**BFG**). Pored toga, jedan uzorak nadzemnih

delova taksona *B. falcatum* subsp. *cernuum* (syn. *B. sibthorpiatum*) sakupljen je na planini Olimp (**BS**), takođe iz jedne populacije.

Nadzemni delovi svih biljnih uzoraka isečeni su na sitne komade i pojedinačno ekstrahovani maceracijom u dietil-etru. Ekstrakti uzoraka **BFS** i **BFG** dalje su podvrgnuti *dry-flash* hromatografiji na koloni silika-gela pod gradijentnim uslovima, korišćenjem smeša rastvarača rastuće polarnosti – počevši od smeše heksan–dietil-etar, preko smeše dietil-etar–etil-acetata, do smeša etil-acetata i metanola. Hromatografsko razdvajanje rezultovalo je dobijanjem 30 frakcija, koje su spojene na osnovu tankoslojnih hromatograma (TLC) i/ili GC-MS-analiza.

Frakcija 10 (eluirana smešom heksan : Et₂O = 12:1, v/v, 510 mg) uglavnom je sadržavala dugolonačane aldehide i metil-estre masnih kiselina. Frakcija 11 (heksan : Et₂O = 6:1, v/v, 415 mg) sadržavala je jedinjenja **40** i **41**, 10-nonakozanon, kao i druge sastojke. Frakcija 13 (heksan : Et₂O = 4:1, v/v, 306 mg) sadržavala je acetate alkohola **48–51**, koji odgovaraju jedinjenjima **52–55**. U frakciji 18 identifikovano je jedinjenje **45** (258 mg). Frakcija 19 (heksan : Et₂O = 3:2, v/v, 340 mg) predstavljala je smešu jedinjenja **48** i **49** (pentadekatriendin-1-oli), zajedno sa bupleurinolom i njegovim stereoizomerom (jedinjenja **51** i **50**). Frakcija 20 (heksan : Et₂O = 1:4, v/v, 168 mg) predstavljala je čisto jedinjenje **48** ((2*E*,8*E*,10*E*)-pentadekatrien-4,6-diin-1-ol). Frakcija 23 (eluirana čistim Et₂O, 170 mg) sadržavala je jedinjenje **46** kao sastojak složene smeše. Frakcija 26 (eluirana čistim EtOAc, 20 mg) sadržavala je čisto jedinjenje **56**.

Frakcija 11 je dodatno razdvajana hromatografijom na koloni silicijum-dioksida. Eluiranje je vršeno gradijentno, povećanjem polarnosti smeša heksana i dietil-etra, pri čemu su sakupljane frakcije od po 10 mL. Frakcije sličnog hemijskog sastava (praćeno pomoću TLC-a) su spojene. Jedna od takvih objedinjenih frakcija, koja je sadržavala jedinjenja **40** i **41**, dodatno je prečišćena kolonskom hromatografijom na silika-gelu impregniranom srebro-nitratom (10%, w/w), pod gradijentnim uslovima. Impregnirani silika-gel je pripremljen mešanjem silika-gela sa 10% (w/w) acetonitrilnim rastvorom AgNO₃, a zatim sušenjem na 50 °C preko noći pod sniženim pritiskom. Ova hromatografija je omogućila dobijanje frakcije obogaćene jedinjenjem **41**.

(5*Z*,7*E*,9*E*,11*Z*)-Tetradeka-5,7,9,11-tetraen-1-il-(*E*)-2-metilbut-2-enoat (**40**): bezbojna uljasta supstanca; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) i ¹³C-NMR (100,6 MHz, CDCl₃) spektralni podaci dati su u tabeli 22; EIMS (70 eV) *m/z* (%): 288 [M]⁺ (39), 131 (54), 117 (63), 105 (41),

91 (89), 83 (95), 79 (44), 67 (31), 55 (100), 41 (30); HREIMS m/z 288,2094 $[M]^+$ (izračunato za $C_{19}H_{28}O_2$, 288,2089); RI (DB-5MS) 2331.

(5*Z*,7*E*,9*E*)-Tetradeka-5,7,9-trien-1-il-(*E*)-2-metilbut-2-enoat (**41**): 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) i ^{13}C -NMR (100,6 MHz, $CDCl_3$) spektralni podaci dati su u tabeli 22; EIMS (70 eV) m/z (%): 290 $[M]^+$ (17), 119 (25), 105 (37), 93 (21), 91 (58), 80 (21), 79 (34), 77 (20), 83 (100), 55 (51); HREIMS m/z 290,2251 $[M]^+$ (izračunato za $C_{19}H_{30}O_2$, 290,2246); RI (DB-5MS) 2253.

(2*E*,8*E*,10*E*)-14-Oksoheptadeka-2,8,10-trien-4,6-diin-1-il-acetat (**45**): 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6,67 (1H, dd, $J = 15,4, 11,0$ Hz, H-9'), 6,28 (1H, dt, $J = 15,9, 5,8$ Hz, H-2'), 6,12 (1H, dddt, $J = 15,0, 10,7, 1,4, 0,7$ Hz, H-10'), 5,87–5,80 (2H, m, H-3' i H-11'), 5,56 (1H, d, $J = 15,6$ Hz, H-8'), 4,62 (2H, dd, $J = 5,8, 1,7$ Hz, CH_2 , H-1'), 2,51 (2H, t, $J = 7,1$ Hz, CH_2 , H-13'), 2,41–2,35 (4H, m, CH_2 , H-12' i H-15'), 2,08 (3H, s, CH_3 , H-2), 1,62–1,55 (2H, m, CH_2 , H-16'), 0,91 (3H, t, $J = 7,4$ Hz, CH_3 , H-17'); ^{13}C NMR (100,6 MHz, $CDCl_3$) δ 209,7 (C-4'), 170,6 (C-1), 145,2 (C-9'), 139,6 (C-2'), 138,1 (C-11'), 130,3 (C-10'), 112,4 (C-3'), 108,1 (C-8'), 81,8 (C-7'), 79,8 (C-4'), 75,8 (C-6'), 75,7 (C-5'), 63,8 (C-1'), 45,0 (C-12'), 41,8 (C-13'), 27,0 (C-15'), 20,9 (C-2), 17,4 (C-16'), 13,8 (C-17'), NMR-podaci se u potpunosti slažu sa podacima objavljenim u *Sommerwerk et al.* (2015); EIMS (70 eV) m/z (%): 298 (2), 169 (25), 167 (31), 165 (23), 153 (21), 152 (38), 141 (26), 115 (26), 71 (45), 43 (100); HREIMS m/z 298,1574 $[M]^+$ (izračunato za $C_{19}H_{22}O_3$, 298,1569); RI (DB-5MS) 2730.

(8*E*,10*E*)-Heptadeka-8,10-dien-2,4,6-triin (**47**): 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) i ^{13}C -NMR (100,6 MHz, $CDCl_3$) spektralni podaci dati su u tabeli 23; EIMS (70 eV) m/z (%): 224 $[M]^+$ (53), 165 (46), 153 (94), 152 (100), 151 (29), 140 (60), 139 (68), 127 (26), 115 (27), 41 (21); RI (DB-5MS) 2210.

(2*E*,8*E*,10*E*)-Pentadeka-2,8,10-trien-4,6-diin-1-ol (**48**): EIMS (70 eV) m/z (%): 214 $[M]^+$ (51), 141 (33), 129 (62), 128 (100), 127 (51), 116 (21), 115 (84), 91 (26), 77 (28), 41 (23); RI (DB-5MS) 2196.

(2*Z*,8*E*,10*E*)-Pentadeka-2,8,10-trien-4,6-diin-1-ol (**49**): EIMS (70 eV) m/z (%): 214 $[M]^+$ (43), 152 (19), 141 (27), 129 (57), 128 (100), 127 (40), 115 (72), 91 (28), 77 (23), 41 (19); RI (DB-5MS) 2116.

(2*E*,8*E*,10*E*)-Heptadeka-2,8,10-trien-4,6-diin-1-ol (enantetol, **50**): EIMS (70 eV) *m/z* (%): 242 [M]⁺ (70), 141 (37), 129 (81), 128 (100), 127 (51), 116 (28), 115 (86), 91 (27), 77 (27), 41(25); RI (DB-5MS) 2416.

(2*Z*,8*E*,10*E*)-Heptadeka-2,8,10-trien-4,6-diin-1-ol (bupleurinol, **51**): EIMS (70 eV) *m/z* (%): 242 [M]⁺ (44), 157 (27), 141 (30), 129 (71), 128 (100), 127 (39), 115 (79), 91 (28), 77 (24), 41(24); RI (DB-5MS) 2338.

(2*E*,8*E*,10*E*)-Pentadeka-2,8,10-trien-4,6-diin-1-il-acetat (**52**): EIMS (70 eV) *m/z* (%): 256 [M]⁺ (80), 157 (32), 153 (41), 152 (42), 141 (31), 129 (43), 128 (65), 127 (31), 115 (51), 43 (100); RI (DB-5MS) 2310.

(2*Z*,8*E*,10*E*)-Pentadeka-2,8,10-trien-4,6-diin-1-il-acetat (**53**): EIMS (70 eV) *m/z* (%): 256 [M]⁺ (67), 157 (29), 153 (34), 152 (35), 141 (30), 129 (41), 128 (65), 127 (28), 115 (50), 43 (100); RI (DB-5MS) 2245.

(2*E*,8*E*,10*E*)-Heptadeka-2,8,10-trien-4,6-diin-1-il-acetat (**54**): EIMS (70 eV) *m/z* (%): 284 [M]⁺ (50), 241 (22), 157 (30), 153 (29), 152 (28), 141 (23), 129 (30), 128 (43), 115 (36), 43 (100); RI (DB-5MS) 2532.

(2*Z*,8*E*,10*E*)-Heptadeka-2,8,10-trien-4,6-diin-1-il-acetat (**55**): EIMS (70 eV) *m/z* (%): 284 [M]⁺ (22), 157 (17), 153 (15), 152 (15), 141 (114), 129 (18), 128 (28), 115 (26), 41 (17), 43 (100); RI (DB-5MS) 2463.

9-(3,4-Dimetoksifenil)-5,9-dihidro-8*H*-furo[3',4':6,7]nafto[2,3-*d*][1,3]dioksol-6-on (**56**): EIMS (70 eV) *m/z* (%): 367 [M]⁺ (22), 366 (100), 321 (22), 291 (18), 290 (13), 199 (14), 185 (34), 165 (11), 139 (11), 138 (62); RI (DB-5MS) 3357.

Stereoizomer jedinjenja **52**: EIMS (70 eV) *m/z* (%): 256 (10), 213 (76), 157 (50), 153 (57), 152 (51), 129 (51), 128 (77), 141 (40), 115 (63), 43 (100); RI (DB-5MS) 2219.

Stereoizomer 1 prealtaestra B: EIMS (70 eV) *m/z* (%): 290 [M]⁺ (47), 145 (59), 131 (66), 119 (47), 117 (55), 105 (55), 91 (100), 85 (68), 79 (53), 41 (33); RI (DB-5MS) 2232.

Stereoizomer 2 prealtaestra B : EIMS (70 eV) *m/z* (%): 290 [M]⁺ (77), 159 (37), 145 (40), 131 (65), 117 (67), 105 (46), 91 (100), 79 (46), 57 (97), 41 (45); RI (DB-5MS) 2236.

Stereoizomer 3 prealtaestra B: EIMS (70 eV) *m/z* (%): 290 [M]⁺ (86), 145 (40), 131 (61), 117 (69), 105 (48), 91 (100), 85 (56), 79 (50), 57 (52), 41 (45); RI (DB-5MS) 2240.

Stereoizomer 4 prealtaestra B: EIMS (70 eV) m/z (%): 290 $[M]^+$ (22), 119 (24), 105 (35), 93 (18), 91 (55), 83 (100), 80 (19), 79 (30), 77 (18), 55 (47); RI (DB-5MS) 2250.

Stereoizomer 5 prealtaestra B: EIMS (70 eV) m/z (%): 290 $[M]^+$ (88), 159 (40), 131 (64), 117 (73), 105 (42), 91 (100), 85 (41), 79 (45), 57 (94), 41 (47); RI (DB-5MS) 2270.

Stereoizomer 1 jedinjenja **40**: EIMS (70 eV) m/z (%): 288 $[M]^+$ (59), 145 (29), 131 (54), 117 (57), 105 (36), 91 (76), 83 (100), 79 (39), 67 (26), 55 (69); RI (DB-5MS) 2341.

Stereoizomer 2 jedinjenja **40**: EIMS (70 eV) m/z (%): 288 $[M]^+$ (47), 159 (20), 145 (25), 131 (45), 117 (52), 91 (68), 83 (100), 79 (34), 67 (21), 55 (57); RI (DB-5MS) 2371.

Stereoizomer 3 jedinjenja **40**: EIMS (70 eV) m/z (%): 288 $[M]^+$ (60), 145 (28), 131 (52), 117 (55), 105 (34), 91 (74), 83 (100), 79 (38), 67 (25), 55 (69); RI (DB-5MS) 2378.

Stereoizomer 1 jedinjenja **50**: EIMS (70 eV) m/z (%): 242 $[M]^+$ (64), 157 (34), 141 (42), 129 (74), 128 (100), 127 (38), 115 (75), 91 (31), 77 (23), 43 (23); RI (DB-5MS) 2358.

Stereoizomer 2 jedinjenja **50**: EIMS (70 eV) m/z (%): 242 $[M]^+$ (93), 157 (26), 141 (36), 129 (87), 128 (100), 127 (54), 116 (29), 115 (86), 91 (30), 77 (26); RI (DB-5MS) 2434.

3.3.3. Dobijanje etarskog ulja

Osušeni nadzemni delovi vrste *B. affine* (**BA**) i šizokarpijuma vrste *B. praealtum* (**BP-2**) podvrgnuti su hidrodestilaciji u trajanju od 2,5 sata, korišćenjem originalnog Klevendžerovog (*Clevenger*) aparata. Prinosi etarskog ulja iznosili su 0,06% (w/w, za **BA**) i 0,01% (w/w, za **BP-2**). Proces hidrodestilacije je sproveden u tri ponavljanja. Dobijena ulja su rastvorena u 2 ml dietil-etra, sušena preko anhidrovanog Na₂SO₄ i odmah analizirana.

3.3.4. Opis sintetskih koraka

3.3.4.1. Identifikacija jedinjenja izolovanih iz ekstrakata vrsta *B. praealtum* i *B. veronense*

3.3.4.1.1. Konverzija jedinjenja **31** u **34**

Rastvor jedinjenja **31** (16 mg, 0,05 mmol), sirćetne kiseline (9 mg, 0,15 mmol), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP, 4 mg, 0,03 mmol) i *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimida (DCC, 31 mg, 0,15 mmol) u 1 mL suvog CH₂Cl₂ mešan je u vijali od 2 mL preko noći, na sobnoj temperaturi, pod argonom. Nakon toga, rastvarač je uklonjen na rotacionom vakuum-uparivaču, zatim je ostatku dodato 3 mL hladnog pentana, i izdvojena *N,N'*-dicikloheksilurea je uklonjena filtracijom. Filtrat je zatim ukoncentrovan na vakuumu, a dobijeni ostatak je prečišćen kolonskom hromatografijom na silicijum-dioksidu, čime je dobijeno 7 mg (prinos 40%) jedinjenja **34**.

3.3.4.1.2. Metanoliza jedinjenja **31** i sinteza jedinjenja **32**

Rastvor jedinjenja **31** (18 mg) u metanolu (1 mL) dodat je na sobnoj temperaturi u višak sveže pripremljenog rastvora natrijum-metoksida (približno 1 g Na u višku anhidrovanog MeOH), zaštićenog od svetlosti. Smeša je zagrejana do refluksa, a zatim odmah ohlađena u smeši leda i vode. Metanol je uklonjen pod sniženim pritiskom na 30 °C, a ostatak je dodat u smešu Et₂O i zasićenog rastvora natrijum-hidrogenkarbonata. Etarski sloj je više puta ispran zasićenim rastvorom natrijum-hlorida, i nakon uklanjanja Et₂O, dobijen je (5*Z*,7*E*,9*E*,11*E*)-tetradeka-5,7,9,11-tetraen-1-ol, koji je korišćen bez dodatnog prečišćavanja u sledećem koraku. Jedinjenje **32** je sintetisano polazeći od (5*Z*,7*E*,9*E*,11*E*)-tetradeka-5,7,9,11-tetraen-1-ola (3 mg, 0,01 mmol), izovalerijanske kiseline (3 mg, 0,03 mmol), DMAP-a (1 mg, 0,01 mmol) i DCC-a (6,2 mg, 0,03 mmol). Dobijeni estar je prečišćen kolonskom hromatografijom na silika-gelu, čime je dobijeno 3 mg (prinos 71%) čistog jedinjenja **32**.

3.3.4.1.3. Hidrogenizacija jedinjenja **36**

Uzorak jedinjenja **36** (10 mg), rastvoren u EtOAc, pomešan je sa 5 mg 10% (w/w) Pd na aktivnom uglju. Najpre je kroz smešu, uz mešanje, dva puta propušten vodonik, nakon čega je smeša mešana pod atmosferom vodonika (1 atm) tokom 2 h na sobnoj temperaturi. Nakon toga, reakciona smeša je profiltrirana kroz *Pasteur*-ovu pipetu napunjenu *Celite*®-om. Etil-acetat iz filtrata je uklonjen pod sniženim pritiskom, a dobijeni ostatak analiziran je pomoću GC-MS-a. Na ovaj način dobijen je čist γ -tetradekalakton (10 mg, prinos 96%).

(*R*)- γ -Tetradekalakton: $[\alpha]^{20}_D +30,1$ (c 1, CHCl₃); literaturna vrednost $[\alpha]^{20}_D +32,0$ (c 1,1, CHCl₃, Thijs & Zwanenburg, 2004; Zhou et al., 2018)

3.3.4.1.4. Sinteza hlorida *Mosher*-ovih kiselina

Oksalil-hlorid (131 μ L, 1,5 mmol) dodat je u rastvor (*R*)-(+)- ili (*S*)-(-)- α -metoksi- α -trifluormetilfenilsirćetne kiseline (MTPA, 70 mg, 0,3 mmol) i DMF-a (25 μ L, 0,3 mmol) u heksanu (2 mL) na sobnoj temperaturi, pod argonom. Nakon jednog časa, smeša je ukoncentrovana pod sniženim pritiskom, a dobijeni ostatak je kao takav korišćen u sledećem koraku esterifikacije.

3.3.4.1.5. Sinteza jedinjenja (*R*)- i (*S*)-**31a**

Polazeći od 1,93 g DL-valina ili 1,00 g L-valina ((*S*)-valin), dobijene su, odvojeno, odgovarajuće (*R/S*)- i (*S*)-2-hidroksi-3-metilbutanske kiseline, prema ranije opisanom postupku (Deechongkit et al., 2004). Kiseline su zatim konvertovane u metil-estre reakcijom sa diazometanom i prečišćene kolonskom hromatografijom na silika-gelu pod gradijentnim uslovima (0–100% dietil-etar u heksanu, v/v). Na taj način je dobijen čisti metil-(*S*)-2-hidroksi-3-metilbutanoat, (*S*)-**31a**, u prinosu od 20% (216 mg), dok je racemska smeša metil-(*R/S*)-2-hidroksi-3-metilbutanoata, (*R*)- i (*S*)-**31a**, izolovana u prinosu od 16% (182 mg). Čistoća estra je proverena tankoslojnom hromatografijom i GC-MS analizom.

3.3.4.1.6. Sinteza (*R*)-MTPA estara jedinjenja (*R*)- i (*S*)-**31a**

(*R*)-MTPA i prethodno pripremljeni (*R*)- i (*S*)-**31a** podvrgnuti su *Steglich*-ovoj esterifikaciji, prema postupku opisanom za jedinjenje **34**. Esterifikacija (*S*)-**31a** sa (*R*)-MTPA pomoću DCC-a izvedena je u prinosu od 79% (28 mg). Nastala smeša estara, dobijena reakcijom (*R*)-MTPA sa racemskom smešom (*R*)- i (*S*)-**31a**, dalje je razdvojena hromatografijom na silika-gelu pod gradijentnim uslovima (0–40% dietil-etar u heksanu, v/v), čime je dobijen čist (*R*)-MTPA estar jedinjenja (*R*)-**31a** u prinosu od 85% (30 mg).

(*R*)-MTPA estar jedinjenja (*R*)-**31a**: žućkasta uljasta supstanca; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) i ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100,6 MHz) spektralni podaci su dati u tabeli 19; EIMS (70 eV) m/z (%): 348 $[\text{M}]^+$ (1), 190 (44), 189 (97), 170 (47), 126 (31), 119 (17), 105 (36), 83 (100), 77 (23), 55 (49), 41 (17); RI (DB-5MS) 1701.

(*R*)-MTPA estar jedinjenja (*S*)-**31a**: žućkasta uljasta supstanca; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) i ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100,6 MHz) spektralni podaci su dati u tabeli 19; EIMS (70 eV) m/z (%): 348 $[\text{M}]^+$ (1), 190 (42), 189 (96), 170 (30), 126 (28), 119 (15), 105 (25), 83 (100), 77 (27), 55 (60), 41 (10). RI (DB-5MS) 1718.

3.3.4.1.7. Sinteza (*R*)-MTPA estra jedinjenja **31**

U inertnoj atmosferi argona, rastvor jedinjenja **31** (23 mg, 0,07 mmol), Et_3N (28 μL , 0,35 mmol) i DMAP-a (mala količina, približno 1 mg) u hloroformu (2 mL) dodat je sirovom hloridu (*R*)-MTPA (35 mg, oko 0,15 mmol), pripremljenom neposredno pre toga. Nakon 72 h mešanja, dodato je još 10 mL hloroforma, a zatim je reakciona smeša tri puta isprana zasićenim rastvorom natrijum-hlorida (3 x 10 mL). Organska faza je osušena nad anhidrovanim MgSO_4 i ukoncentrovana pod sniženim pritiskom. Nakon prečišćavanja na koloni silika-gela (10% dietil-etra u heksanu, v/v), izolovan je čisti (*R*)-MTPA estar jedinjenja **31** u prinosu od 31% (12 mg).

(*R*)-MTPA estar jedinjenja **31**: žućkasta uljasta supstanca; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) i ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100,6 MHz) spektralni podaci su dati u tabeli 19; EIMS (70 eV) m/z (%): 522 $[\text{M}]^+$ (4), 189 (96), 186 (20), 159 (18), 145 (49), 133 (25), 131 (34), 119 (16), 117 (30), 105 (29), 91 (100); RI (DB-5MS) 2968.

3.3.4.1.8. Sinteza (*R*)- i (*S*)-MTPA estara jedinjenja **39**

Prethodno pripremljeni (*R*)- i (*S*)-MTPA hloridi (oko 15 mg, 0,06 mmol) reagovali su sa jedinjenjem **39** (7 mg, 0,03 mmol) na sličan način kao što je opisano za jedinjenje **31**. Čisti diastereomerni MTPA-estri su izolovani pomoću kolonske hromatografije na silika-gelu (25% dietil-etra u heksanu, v/v), pri čemu su dobijeni prinosi iznosili 14 mg (40%) za (*R*)-izomer i 12 mg (35%) za (*S*)-izomer.

(*R*)-MTPA estar jedinjenja **39**: ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5,93 (2H, s, H-3' i H-5'), 5,26 (1H, ddd, $J = 7,0, 6,3, 5,5$ Hz, H-3), 2,94 (1H, dd, $J = -18,6, 5,5$ Hz, H-2a), 2,74 (1H, dd, $J = -18,6, 7,0$ Hz, H-2b), 1,09 (3H, d, $J = 6,3$ Hz, H-4); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100,6 MHz) δ 195,5

(C, C-1), 164,3 (C, C-4'), 163,6 (C, C-2 i C-6'), 104,6 (C, C-1), 95,7 (CH, C-3' i C-5'), 67,0 (CH, C-3), 49,0 (CH₂, C-2), 16,9 (CH₃, C-4).

(S)-MTPA estar jedinjenja **39**: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 6,02 (2H, s, H-3' i H-5'), 4,79 (1H, td, J = 7,8, 6,3 Hz, H-3), 2,79 (2H, d, J = 7,8 Hz, H-2), 1,61 (3H, d, J = 6,3 Hz, H-4); ¹³C NMR (CDCl₃, 100,6 MHz) δ 195,9 (C, C-1), 163,5 (C, C-4), 163,4 (C, C-2' i C-6), 105,2 (C, C-1), 97,1 (CH, C-3 i C-5), 76,4 (CH, C-3), 42,6 (CH₂, C-2), 25,3 (CH₃, C-4),

3.3.4.1.9. Sililovanje jedinjenja **39**

Jedinjenje **39** (20 mg, 0,084 mmol) je rastvoreno u 10 mL suvog dietil-etra, nakon čega je dodat veliki višak hlortrimetilsilana (200 μ L, 1,6 mmol), zatim 120 μ L suvog trietilamina i jedna kap dimetil-sulfoksida. Reakciona smeša je mešana 2 h na sobnoj temperaturi pod inertnom atmosferom azota. Nakon toga je dodato 10 mL vode, a smeša je tri puta ekstrahovana dietil-etrom. Organske faze su spojene, osušene anhidrovanim MgSO₄, a rastvarač uklonjen pod sniženim pritiskom. Na taj način je dobijena sirova smeša koja sadrži tetrasililovani derivat jedinjenja **39** (prinos 84%), koja je direktno analizirana GC-MS-metodom.

Trimetilsilil-derivat jedinjenja **39**: EIMS (70 eV) m/z (%): 500 [C₂₂H₄₄O₅Si₄]⁺ (2), 485 [M – Me]⁺ (14), 395 (32), 370 (27), 369 [M – C₆H₁₅OSi]⁺ (59), 353 [M – 2Me₃Si – H]⁺ (17), 344 (20), 343 (48), 342 [M – C₇H₁₄O₂Si]⁺ (98), 117 [C₅H₁₃OSi]⁺ (42), 75 (25), 73 [Me₃Si]⁺ (100); RI (DB-5MS) 2111.

3.3.4.2. Identifikacija jedinjenja izolovanih iz ekstrakata vrste *B. falcatum*

3.3.4.2.1. Sinteza jedinjenja **45** i **52–55**

Sprovedene su dve odvojene reakcije acetilovanja – jedna sa frakcijom 19 (dobijene hromatografijom dietl-etarskog ekstrakta nadzemnih delova uzroka **BFS**), pri čemu su dobijena jedinjenja **52–55**, i druga sa frakcijom 23 iz iste hromatografije, kojom je dobijeno jedinjenje **45**. U oba slučaja, reakcione smeše su pripremljene rastvaranjem odgovarajuće frakcije (oko 10 mg), sirćetne kiseline (5 mg), DMAP-a (4 mg) i DCC-a (25 mg) u 1 mL suvog dihlormetana. Reakcije su vođene preko noći na sobnoj temperaturi, pod inertnom atmosferom argona. Nakon završetka reakcije, rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom, a ostatku je dodat hladan pentan (3 mL), čime je izazvano taloženje *N,N'*-dicikloheksiluree, koja je potom uklonjena filtracijom. Dobijeni filtrat je nakon uklanjanja rastvarača direktno analiziran GC-MS-metodom.

3.3.4.2.2. Redukcija tung ulja

Rastvor tung ulja (2 g) u suvom THF-u (20 mL) dodat je postepeno, u porcijama, u prethodno pripremljenu suspenziju litijum-aluminijumhidrida (0,03 mol, 1,15 g) u suvom THF-u (20 mL), tokom 30 min. Reakciona smeša je potom dodatno mešana 1 h. Nakon toga je dodato 100 mL vodenog rastvora natrijum-hidroksida (10%, w/w), a THF je uklonjen pod sniženim pritiskom. Ostatak nakon uparavanja je tri puta ekstrahovan dietil-etrom. Organske faze su spojene, osušene anhidrovanim MgSO_4 , a rastvarač uklonjen pod sniženim pritiskom. Dobijena smeša (1,55 g) analizirana je GC-MS-metodom i utvrđeno je da se u najvećoj meri sastoji od proizvoda redukcije, (9Z,11E,13E)-oktadeka-9,11,13-trien-1-ola (jedinjenje **43**).

(9Z,11E,13E)-Oktadeka-9,11,13-trien-1-ol (**43**): EIMS (70 eV) m/z (%): 264 (47), 105 (29), 93 (71), 91 (100), 80 (47), 79 (86), 77 (48), 67 (39), 55 (33), 41 (44); RI (DB-5MS) 2214; stereochemija je pretpostavljena na osnovu stereochemije početnog jedinjenja i proizvoda (**44**).

3.3.4.2.3. Sintaza jedinjenja **44**

Rastvor jedinjenja **43** (2 mmol, 530 mg), tiglinske kiseline ((*E*)-2-metilbut-2-enske kiseline, 200 mg, 2 mmol), DMAP-a (24 mg, 0,2 mmol) i DCC-a (512 mg, 2 mmol) u 20 mL suvog dihlormetana mešan je u balonu sa okruglim dnom preko noći, na sobnoj temperaturi, pod inertnom atmosferom argona. Nakon završetka reakcije, rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom, a ostatku je dodat hladan pentan (10 mL), da bi se ukloniola nastala urea. Filtrat je zatim ukoncentrovan pod vakuumom, a sirovi proizvod je dalje prečišćen kolonskom hromatografijom na silicijum-dioksidu, čime je dobijeno 484 mg (9Z,11E,13E)-oktadeka-9,11,13-trien-1-il-tiglata (**44**), u prinosu od 70%.

(9Z,11E,13E)-Oktadeka-9,11,13-trien-1-il-(*E*)-2-metilbut-2-enoat (**44**): ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) i ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100,6 MHz) spektralni podaci dati su u tabeli S4 (prilog); EIMS (70 eV) m/z (%): 346 (40), 105 (43), 101 (61), 93 (72), 91 (95), 83 (86), 80 (62), 79 (100), 67 (45), 55 (92); RI (DB-5MS) 2652.

3.3.4.3. Identifikacija jedinjenja detektovanih u etarskom ulju vrste *B. affine*

3.3.4.3.1. Sintaza perila-alkohola

Smeša perila-aldehida (450 mg, 3 mmol) i NaBH_4 (456 mg, 12 mmol) u anhidrovanom metanolu (25 mL) je mešana na 0 °C tokom 1 h, zatim je ledeno kupatilo uklonjeno, a mešanje je nastavljeno još 1 h na sobnoj temperaturi. Reakciona smeša je prekinuta sporim dodavanjem 1 M HCl dok nije uništen višak borhidrida. Smeša je, zatim, ekstrahovana dietil-etrom (3 × 50

mL). Organski slojevi su spojeni, isprani zasićenim rastvorom NaCl, osušeni anhidrovanim MgSO_4 , a rastvarač je uklonjen na rotacionom vakuum-uparivaču, dajući 387 mg perila-alkohola (prinos 85%). Maseni spektar i RI sintetisanog alkohola ((4-(prop-1-en-2-il)cikloheks-1-en-1-il)metanola) bili su u saglasnosti sa podacima dostupnim u literaturi (Adams, 2007).

3.3.4.3.2. Sinteza perilil-2-metilbutanoata i perilil-3-metilbutanoata

Rastvor perila-alkohola (152 mg, 1 mmol), 2-metilbutanske kiseline (102 mg, 1 mmol), DMAP-a (24 mg, 0,2 mmol) i DCC-a (206 mg, 1 mmol) u 10 mL suvog CH_2Cl_2 mešan je u balonu sa okruglim dnom preko noći na sobnoj temperaturi, pod argonom. Nakon toga, rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom; zatim je ostatku dodato 10 mL hladnog pentana, a istaložena urea je odfiltrirana. Filtrat je ukoncentrovan pod vakuumom, a ostatak je prečišćen hromatografijom na koloni silika-gela dajući 177 mg (75% prinos) perilil-2-metilbutanoata.

Perilil-2-metilbutanoat (4-(prop-1-en-2-il)cikloheks-1-en-1-il)metil-2-metilbutanoat): bezbojna tečnost; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) i ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100,6 MHz) spektralni podaci dati su u tabeli 26; EIMS (70 eV) m/z (%): 236 (2), 134 (62), 119 (100), 106 (50), 105 (42), 93 (56), 92 (66), 91 (85), 79 (40), 57 (92), 41 (36); elementna analiza: C 76,25; H 10,22; O 13,53; izračunato C 76,23; H 10,23; O 13,54; HREIMS m/z 236,1780 $[\text{M}]^+$ (izračunato za $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$, 236,1776); RI (DB-5MS) 1664.

Na analogan način sintetisan je perilil-3-metilbutanoata, pri čemu je izolovano 19,5 mg perilil-3-metilbutanoata u prinosu od 83%.

Perilil-3-metilbutanoat (4-(prop-1-en-2-il)cikloheks-1-en-1-il)metil-3-metilbutanoat): bezbojna tečnost; ^1H NMR (CDCl_3) δ 5,76 (1H, m, CH-3), 4,73 (1H, quint, $J = 1,5$ Hz, CH-9Z), 4,71 (1H, m, CH-9E), 4,43–4,50 (2H, m, CH_2 -1), 2,19–2,23 (2H, m, CH_2 -12), 2,05–2,20 (5H, preklopljeni multipleti, CH-5, CH-4a, CH_2 -7, CH-13), 1,91–2,03 (1H, m, CH-4b), 1,81–1,89 (1H, m, CH-6a), 1,74 (3H, m, CH_3 -10), 1,43–1,55 (1H, m, CH-6b), 0,96 (6H, d, $J = 6,6$ Hz, CH_3 -14 i CH_3 -15); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 173,2 (C-11), 149,8 (C-8), 132,9 (C-2), 125,9 (C-3), 108,9 (C-9), 68,3 (C-1), 43,6 (C-12), 41,00 (C-5), 30,6 (C-4), 27,5 (C-6), 26,6 (C-7), 25,9 (C-13), 22,6 (C-14 i C-15), 20,9 (C-10); EIMS (70 eV) m/z (%): 236 (2), 134 (64), 119 (100), 106 (49), 105 (43), 93 (55), 92 (66), 91 (86), 85 (56), 79 (38), 57 (60); HREIMS m/z 236,1781 $[\text{M}]^+$ (izračunato za $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$, 236,1776); RI (DB-5MS) 1672.

3.4. *In vitro* testovi na ćelijskim kulturama

3.4.1. Korišćeni lekovi i supstance

Rastvor antibiotika i antimikotika (korišćen u razblaženju 100 ×) nabavljen je od kompanije *Sigma-Aldrich* (St. Louis, Misuri, SAD), dok je standardni citotoksični lek, cisplatina, nabavljen od kompanije Teva (Beograd, Srbija). Reagensi 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromid (MTT) i tripan-plavo takođe su nabavljeni od firme *Sigma-Aldrich* (St. Louis, Misuri, SAD). Medijum za ćelijske kulture koji je korišćen u svim eksperimentima se sastojao od medijuma RPMI 1640 u koji je dodato 20 mmol L⁻¹ HEPES-a i L-glutamina (bez natrijum-hidrogenkarbonata), sa 10% (v/v) seruma fetusa govečeta i 1% (w/w) antibiotskog i antimikotskog rastvora.

3.4.2. Eksperimentalne životinje

U eksperimentima su korišćeni odrasli mužjaci pacova soja *Wistar*, telesne mase 250–300 g. Životinje su čuvane u standardnim laboratorijskim uslovima (temperatura 22 ± 2 °C, relativna vlažnost 60%), sa hranom i vodom dostupnim *ad libitum*, u Vivarijumu Instituta za biomedicinska istraživanja, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu. Svi eksperimenti sprovedeni su u skladu sa deklaracijom iz Helsinkija (2013.) i smernicama Evropske unije za etičko postupanje sa laboratorijskim životinjama (EU Direktiva 2010/63/EU), kao i u skladu sa propisima Republike Srbije (br. odobrenja Etičkog komiteta: 323-07-06862/2016-05/2).

3.4.3. Priprema i kultura makrofaga i splenocita pacova

Peritonealni makrofagi (Mφ) i splenociti (SPC) izolovani su prema standardnim, ranije opisanim protokolima (Radulović et al., 2016b). Nakon bojenja tripan-plavim, izvršeno je brojanje ćelija i priprema suspenzije sa gustom od $2,5 \times 10^6$ živih ćelija po mL. Više od 95% ćelija bilo je vitalno nakon bojenja.

3.4.4. Određivanje ćelijske vijabilnosti

Makrofagi su ostavljeni da se vežu za površinu ploče sa 96 bunarića tokom 1,5 h, dok su suspendovani SPC u RPMI medijumu direktno korišćeni (100 µL/bunarić). Medijum RPMI koji je sadržao cisplatinu (10^{-4} mol L⁻¹), ili različite koncentracije jedinjenja **31**, **34**, **35** i arcitina (10^{-8} – 10^{-4} mol L⁻¹), dodavan je u pripremljene bunariće, nakon čega su ploče inkubirane 24 h na 37 °C u atmosferi CO₂ (5%, v/v). Nakon inkubacije, ćelije su tretirane MTT-reagensom (5 mg mL⁻¹). Formirani formazanski kristali su, nakon 4 h, rastvoreni u zakišljenom izopropanolu, a apsorbancije svakog bunarića očitane su na 540 nm (Multiscan Ascent,

Labsystems, Finska). Rezultati su izraženi kao procenat citotoksičnosti u odnosu na kontrolu (ćelije tretirane samo medijumom RPMI), na osnovu količine formiranog formazana. Svi eksperimenti su izvedeni u tri ponavljanja.

3.4.5. Funkcija lizozoma u makrofagima

Test sa neutralnim crvenim (Neutral Red, NR) izveden je prema ranije opisanom protokolu (Radulović et al., 2016b). Nakon 24 h inkubacije sa uzorcima, medijum je uklonjen, ćelije isprane i inkubirane sa NR bojom. Dva sata kasnije, višak boje je uklonjen, a dodat je rastvor za obezbojavanje (etanol:voda:sirćetna kiselina = 5:5:1, v/v/v). Količina ekstrahovane boje merena je na 540 nm, a dobijeni rezultati izraženi su kao procenat aktivnosti u odnosu na ćelije gajene u čistom medijumu RPMI.

3.4.6. Određivanje aktivnosti mijeloperoksidaze (MPO)

Primarne kulture makrofaga tretirane su cisplatinom, kao i jedinjenjima **31**, **34**, **35** i arcitinom, u istim koncentracijama kao u prethodnim eksperimentima. MPO-aktivnost je procenjivana na osnovu oksidacije 1,2-diaminobenzena, koja je inicirana H_2O_2 (Radulović et al., 2014). Reakcija je zaustavljena dodavanjem H_2SO_4 (1 M), a apsorbancija formiranog obojenog produkta merena je na 540 nm. Rezultati su izraženi kao procenat aktivnosti u odnosu na netretiranu kontrolu (100% aktivnost). Svi eksperimenti su sprovedeni u pet replika i ponavljani dva puta.

3.4.7. Statistička analiza

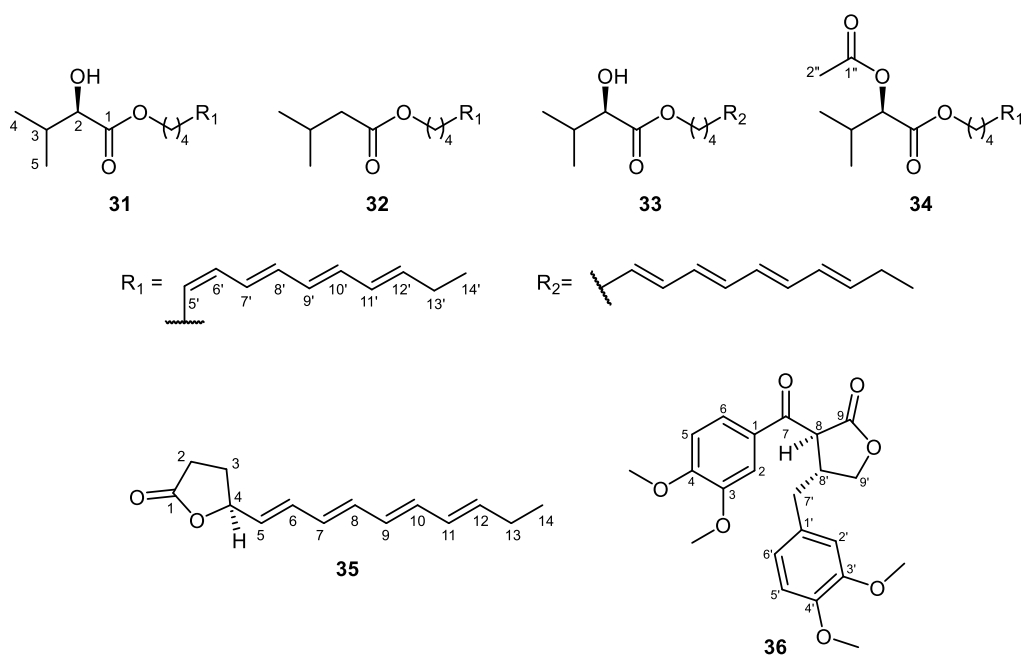
Rezultati testova na ćelijskim kulturama prikazani su kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija (SD). Statistički značajna razlika između grupa procenjena je metodom jednosmerne analize varijanse (One-Way ANOVA), uz *Tukey-ev post hoc* test za višestruka poređenja (GraphPad Prism, verzija 5.03, San Dijego, Kalifornija, SAD). Vrednosti $p < 0,05$ smatrane su statistički značajnim.

4. Rezultati i diskusija

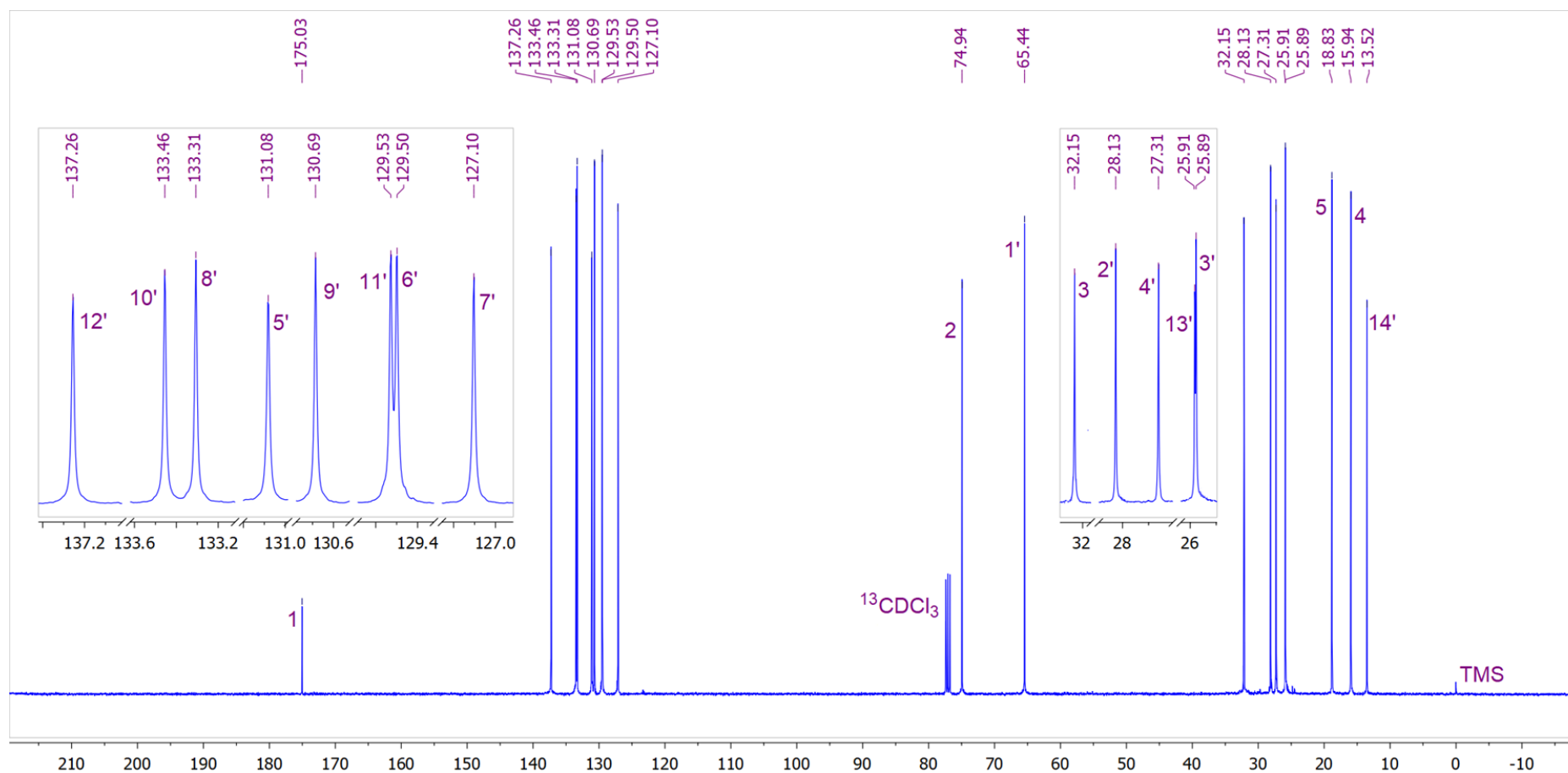
4.1. Analiza hemijskog sastava dietil-etarskog ekstrakta vrste *B. praealtum*

U ovom delu biće opisana analiza hemijskog sastava dietil-estarskog ekstrakta nadzemnih delova i šizokarpijuma vrste *B. praealtum*. Potpuna NMR-karakterizacija izolovanih jedinjenja izvršena je uz primenu manuelne iterativne simulacije ^1H NMR-spektra. Na taj način identifikovana su četiri nova polinezasićena estra (**31–34**), jedan polinezasićeni γ -butirolakton (**35**) i jedan lignan (**36**). Jedinjenja **31**, **34**, **35** i (+)-arcitin, izolovana u dovoljnoj količini, testirana su na imunomodulatornu aktivnost procenom efekata na izolovane splenocite i peritonealne makrofage pacova. Apsolutna konfiguracija estra **31** određena je sintezom odgovarajućih Mosher-ovih estara i poređenjem spektroskopskih karakteristika sa enantiočistim model-jedinjenjima.

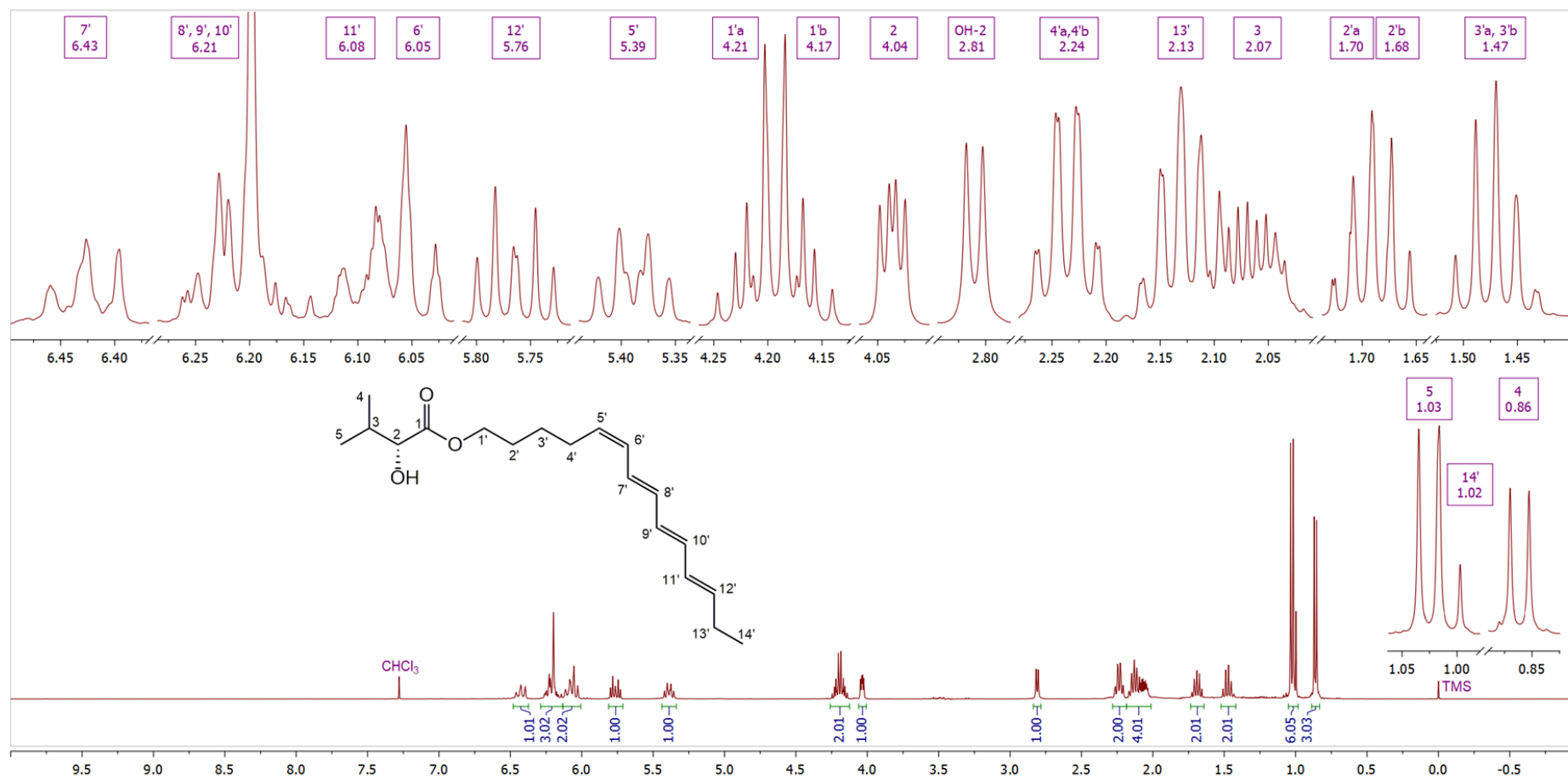
Inicijalnom GC-MS-analizom dietil-etarskog ekstrakta osušenih šizokarpijuma uzorka **BP-1** je uočeno prisustvo dominantnog ispraljivog jedinjenja (**31**, slika 27), sa molekulskim jonom na m/z 306 u masenom spektru (MS), a koje je izolovano u čistom stanju nakon *dry-flash* hromatografije. Masenom spektrometrijom visoke rezolucije (HREIMS) određena je molekulska formula jedinjenja **31** kao $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_3$. IR-spektar sa apsorpcionim maksimumima u opsegu $3100\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ (maksimum na 3334 cm^{-1}) i na 1727 cm^{-1} ukazivao je na prisustvo hidroksilne i estarske funkcionalne grupe. Od ukupno 19 signala u ^{13}C NMR-spektru jedinjenja **31** (tabela 17, slika 28), signal estarskog karbonilnog ugljenika na 175,0 ppm (C-1), kao i dva signala oksigenovanih sp^3 -hibridizovanih atoma ugljenika na 65,4 ppm (C-1') i 74,9 ppm (C-2), dodatno su potvrdili prisustvo pomenutih funkcionalnih grupa. Dijastereotopni protoni C-1' metilenske grupe javljaju se na δ_{H} 4,21 (H-1'a) i 4,17 (H-1'b) u ^1H NMR-spektru (tabela 18, slika 29), i kroz korelacije, uočene u HMBC-spektru, kroz tri veze sa C-1 (slika 30) potvrdile su postojanje susednog hiralnog centra u molekulu. Ova strukturna karakteristika je u skladu sa eksperimentalno određenom optičkom rotacijom (+64,3, c 1, MeOH).



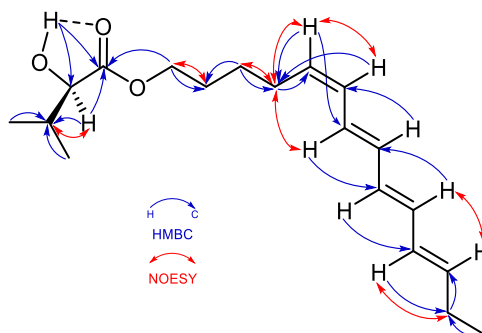
Slika 27. Strukture jedinjenja **31–36**, kao i odgovarajuća numeracija atoma ugljenika korišćena pri asignaciji NMR-spektara



Slika 28. ^{13}C NMR (100,6 MHz, CDCl_3) spektar jedinjenja **31** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala



Slika 29. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spektar jedinjenja **31** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala



Slika 30. Ključne HMBC- i NOESY-interakcije za određivanje strukture jedinjenja **31**

Na osnovu gHMBC-korelacija između C-1 i dubleta dubleta na δ_H 4,05 ($J = 6,0, 3,4$ Hz, H-2), koji se spreže sa metinskim protonom (δ_H 2,07) iz izopropil-grupe i sa protonom iz alkoholne grupe (δ_H 2,81, koji je izmenljiv sa D_2O), određeno je da se hiralni centar nalazi u α -položaju u odnosu na estarsku grupu. Sprezanje sa izmenljivim protonom i gHMBC-interakcija protona OH-grupe sa C-1 sugerišu postojanje intramolekulske vodonične veze (slika 30).

Na osnovu svih navedenih podataka, zaključeno je da jedinjenje **31** predstavlja ester 2-hidroksi-3-metilbutanske kiseline i primarnog alifatičnog C_{14} -alkohola sa četiri dvostruke veze. U 1H NMR-spektru (slika 29), pored signala dve diastereotopne metil-grupe (δ_H 0,86 i 1,03, tabela 18) iz kiselinskog dela molekula, uočen je i dodatni triplet koji potiče od metil-grupe na δ_H 1,02 ($J = 7,5$ Hz), što ukazuje da su nezasićenja u alkoholu pozicionirana blizu ω -kraja dela estera koji potiče od alkohola, te da ne postoji dodatno račvanje u tom delu molekula.

Sva četiri nezasićenja potiču od dvostrukih veza, što je potvrđeno prisustvom osam signala sp^2 -hibridizovanih ugljenika u ^{13}C NMR/DEPT-90-spektrima (tabela 17). Njihova međusobna konjugacija potvrđena je i postojanjem karakterističnih apsorpcionih maksimuma za konjugovane tetraenske sisteme u UV spektru jedinjenja **31** (Kuklev & Smith, 2004). Na osnovu gHMBC- i 1H - 1H COSY-spektara, određeno je da su dvostruke veze locirane između atoma C-5'/C-6', C-7'/C-8', C-9'/C-10' i C-11'/C-12', čime je potvrđeno da se četiri nezasićenja nalaze u konjugaciji, što je dodatno potvrdilo prisustvo terminalne etil-grupe na ω -kraju alkoholnog fragmenta.

Tabela 17. ^{13}C NMR-spektralni podaci (100,6 MHz, CDCl_3) za jedinjenja **31**, **33-35** i **38**

Pozicija	31	34	33	38	Pozicija	35
	δ_{C}					δ_{C}
1, C	175,0	170,0	175,1	177,3		
2, CH	74,9	77,0	75,0	34,2		
2-OH	/ ¹	/	/	/	/	/
3, CH	32,2	30,1	32,2	19,1		
4, CH ₃	15,9	17,4	16,0	19,1		
5, CH ₃	18,8	18,9	19,0	/		
1', CH ₂	65,4	65,1	65,5	64,2	1, CH	177,2
2', CH ₂	28,1	28,2	28,1	28,4	2, CH ₂	28,8
3', CH ₂	25,9	26,00 ³	25,6	26,1	3, CH ₂	29,0
4', CH ₂	27,3	27,5	32,3	27,6	4, CH	80,8
5', CH	131,1	131,5	133,8	134,8	5, CH	128,9
6', CH	129,50 ³	129,5	129,59 ³	129,4	6, CH	133,6
7', CH	127,1	127,3	132,1	128,4	7, CH	135,1
8', CH	133,3	133,3	131,36 ^{2,3}	133,3	8, CH	130,04 ³
9', CH	130,7	130,9	131,43 ^{2,3}	132,8	9, CH	129,98 ³
10', CH	133,5	133,5	132,9	128,0	10, CH	135,6
11', CH	129,53 ³	129,6	129,63 ³	128,2	11, CH	129,4
12', CH	137,3	137,4	136,9	132,0	12, CH	138,5
13', CH ₂	25,9	26,05 ³	26,0	21,4	13, CH ₂	26,1
14', CH ₃	13,5	13,7	13,6	14,4	14, CH ₃	13,6
1'', C	/	171,0	/	/		/
2'', CH ₃	/	20,8	/	/		/

¹ Nema ugljenika u ovoj poziciji. ² Moguće je da se asignacija ova dva signala međusobno zameni. ³ Vrednost pomeranja je data na dve decimale jer su u spektru bili vidljivi razdvojeni signali.

Tabela 18. ¹H NMR spektralni podaci (400 MHz, CDCl₃) za jedinjenja **31**, **33-35**, i **38**

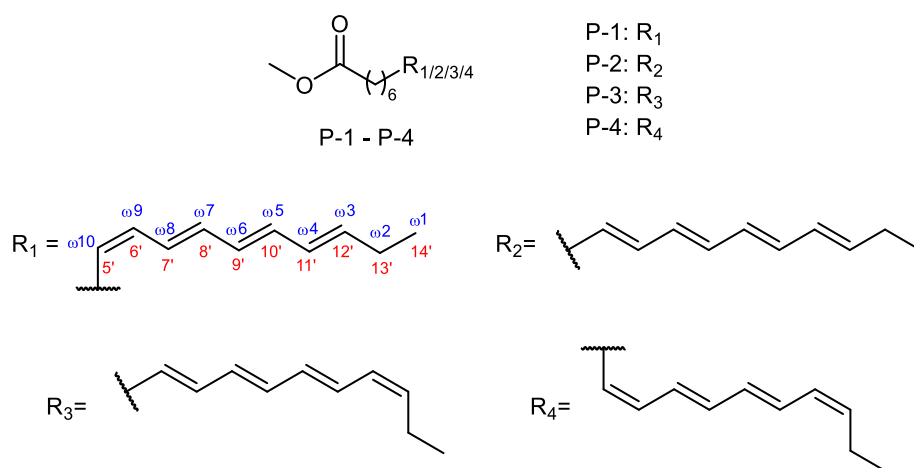
Pozicija	31	34	33	38	Pozicija	35
	δ_{H^1} , m (J u Hz, integral) ²					δ_{H^1} , m (J u Hz, integral) ²
1	³	/	/	/		/
2	4,04, dd (6,0, 3,4, 1 H)	4,82, d (4,7, 1 H)	4,03, dd (6,0, 3,6, 1 H)	2,54, sept (6,9, 1 H)		/
OH-2	2,81, d (6,0, 1 H)	/	2,81, d (6,0, 1 H)	/		/
3	2,07, qqd (7,0, 6,8, 3,4, 1 H)	2,22 qqd (7,0, 6,8, 4,7, 1 H)	2,07, qqd (7,0, 6,8, 3,4, 1 H)	1,16, d (6,9, 3 H)		/
4	0,86, d (7,0, 3 H)	0,98, d (7,0, 3H)	0,86, d (7,0, 3 H)	1,16, d (6,9, 3 H)		/
5	1,03, d (6,8, 3 H)	1,00, d (6,8, 3 H)	1,03, d (6,8, 3 H)	/		/
1'a	4,21, dt ⁴ (-10,8, 6,6, 1 H)	4,16, ddd (-10,6, 7,0, 6,5, 1 H)	4,20, dt ⁴ (-10,7, 6,6, 1 H)	4,07, t (6,6, 2 H)		/
1'b	4,17, dt ⁴ (-10,8, 6,6, 1 H)	4,14, ddd (-10,6, 7,0, 6,5, 1 H)	4,17, dt ⁴ (-10,7, 6,6, 1 H)			/
2'a	1,70, dddt ⁴ (-13,8, 8,0, 7,2, 6,6, 1 H)	1,68, dddddd (-13,8, 9,0, 7,0, 6,5, 6,0, 1 H)	1,70, dt ⁴ t ⁴ (-13,8, 7,2, 6,6, 1 H)	1,67, tt (7,6, 6,6, 2 H)	2a	2,57, ddd (-17,5, 9,5, 9,4, 1 H)
2'b	1,68, dddt ⁴ (-13,8, 8,0, 7,2, 6,6, 1 H)	1,67, dddddd (-13,8, 9,0, 7,0, 6,5, 6,0, 1 H)	1,68, dt ⁴ t ⁴ (-13,8, 7,2, 6,6, 1 H)		2b	2,54, ddd (-17,5, 9,2, 4,6, 1 H)
3'a	1,48, ddt ⁴ d (-13,3, 8,0, 7,6, 7,2, 1 H)	1,47, ddt ⁴ d (-13,3, 9,0, 7,6, 6,0, 1 H)	1,48, dt ⁴ t ⁴ (-13,3, 7,6, 7,2, 1 H)	1,47, quint ⁴ (7,6, 2 H)	3a	2,41, dddddd (-13,0, 9,5, 6,8, 4,6, 0,7, 1 H)
3'b	1,47, ddt ⁴ d (-13,3, 8,0, 7,6, 7,2, 1 H)	1,46, ddt ⁴ d (-13,3, 9,0, 7,6, 6,0, 1 H)	1,46, dt ⁴ t ⁴ (-13,3, 7,6, 7,2, 1 H)		3b	2,01, dddd (-13,0, 9,4, 9,2, 7,7, 1 H)
4'a	2,24, ddt ⁴ d (-17,2, 7,7, 7,6, -1,3, 1 H)	2,24, ddt ⁴ d (-17,2, 7,7, 7,6, -1,3, 1 H)	2,15, dt ⁴ dd (-17,2, 7,6, 6,9, -1,3, 1 H)	2,24, td (7,6, -1,4, 2 H)	4	5,00, dddddd (7,7, 7,0, 6,8, 0,7, -0,7, 1 H)
4'b	2,23, dt ⁴ dd (-17,2, 7,6, 7,1, -1,4, 1 H)	2,23, dt ⁴ dd (-17,2, 7,6, 7,1, -1,4, 1 H)	2,13, dt ⁴ dd (-17,2, 7,6, 6,9, -1,4, 1 H)			
5'	5,39, dddd (10,3, 7,7, 7,1, 1,1, 1 H)	5,40, dddd (10,3, 7,7, 7,1, 1,1, 1 H)	5,65, dt ⁴ d (14,6, 6,9, -0,7, 1 H)	5,46, dtd (11,2, 7,6, -1,1, 1 H)	5	5,65, dddd (15,4, 7,0, 0,7, -0,7, 1 H)
6'	6,05, dddd (11,3, 10,3, -1,4, -1,3, -0,7, 1 H)	6,05, dddddd (11,3, 10,3, -1,4, -1,3, -0,7, 1 H)	6,08, ddt ⁴ d (14,6, 11,3, -1,3, -0,7, 1 H)	6,06, dddd (11,2, 10,9, -1,4, -0,7, 1 H)	6	6,34, dddtd (15,4, 11,1, -0,9, 0,7, -0,7, 1 H)
7'	6,43, dddd (14,5, 11,3, 1,1, -0,7, 1 H)	6,44, dddd (14,5, 11,3, 1,1, -0,7, 1 H)	6,16, ddd (15,0, 11,3, -0,7, 1 H)	6,50, dddd (15,4, 10,9, -1,1, -0,7, 1 H)	7	6,18, ddt ⁴ t ⁴ (14,8, 11,1, 0,7, -0,7, 1 H)
8'	6,224, dddd (14,5, 11,2, -0,8, -0,7, 1 H)	6,224, dddd (14,5, 11,2, -0,8, -0,7, 1 H)	6,14, ddd (15,0, 11,0, -0,7, 1 H)	6,27, ddt ⁴ (15,4, 10,9, -0,7, 1 H)	8	6,30, dddddd (14,8, 10,7, -0,9, 0,7, -0,7, 1 H)

9'	6,19, ddt ⁴ (15,5, 11,2, -0,7, 1 H)	6,19, ddt ⁴ (15,5, 11,2, -0,7, 1 H)	6,14, ddd (15,0, 11,0, -0,7, 1 H)	6,26, ddt ⁴ (15,4, 10,9, -0,7, 1 H)	9	6,15, ddt ⁴ d (14,3, 10,7, 0,7, -0,7, 1 H)
10'	6,216, ddt ⁴ (15,5, 10,8, -0,8, 1 H)	6,221, ddt ⁴ (15,5, 10,8, -0,8, 1 H)	6,15, ddd (15,0, 11,0, -0,7, 1 H)	6,47, dddd (15,4, 10,9, -0,8, -0,7, 1 H)	10	6,26, dddt ⁴ (14,3, 10,4, 0,7, -0,7, 1 H)
11'	6,08, ddt ⁴ d (15,0, 10,0, -1,4, -0,7, 1 H)	6,09, ddt ⁴ d (15,0, 10,8, -1,4, -0,7, 1 H)	6,08, ddt ⁴ d (14,5, 11,0, -1,4, -0,7, 1 H)	6,01, ddt ⁴ d (11,3, 10,9, -1,4, -0,7, 1 H)	11	6,09, ddt (15,2, 10,4, -1,3, 1 H)
12'	5,76, dtd (15,0, 6,8, -0,8, 1 H)	5,77, dtd (15,0, 6,8, -0,8, 1 H)	5,75, dt (14,5, 7,1, 1 H)	5,43, dtd (11,3, 7,7, -0,8, 1 H)	12	5,82, dtdd (15,2, 6,7, 0,7, -0,7, 1 H)
13'	2,13, qdd (7,5, 6,8, -1,4, 2 H)	2,13, qdd (7,5, 6,8, -1,4, 2 H)	2,13, qd (7,5, 7,1, -1,4, 2 H)	2,22, dqd (7,7, 7,5, -1,4, 2 H)	13	2,14, qdd (7,4, 6,7, -1,3, 2 H)
14'	1,02, t (7,5, 3H)	1,02, t (7,5, 3 H)	1,01, t (7,5, 3 H)	1,01 t (7,5, 3 H)	14	1,02, t (7,4, 3 H)
2''	/	2,15, s (3 H)	/	/	/	/

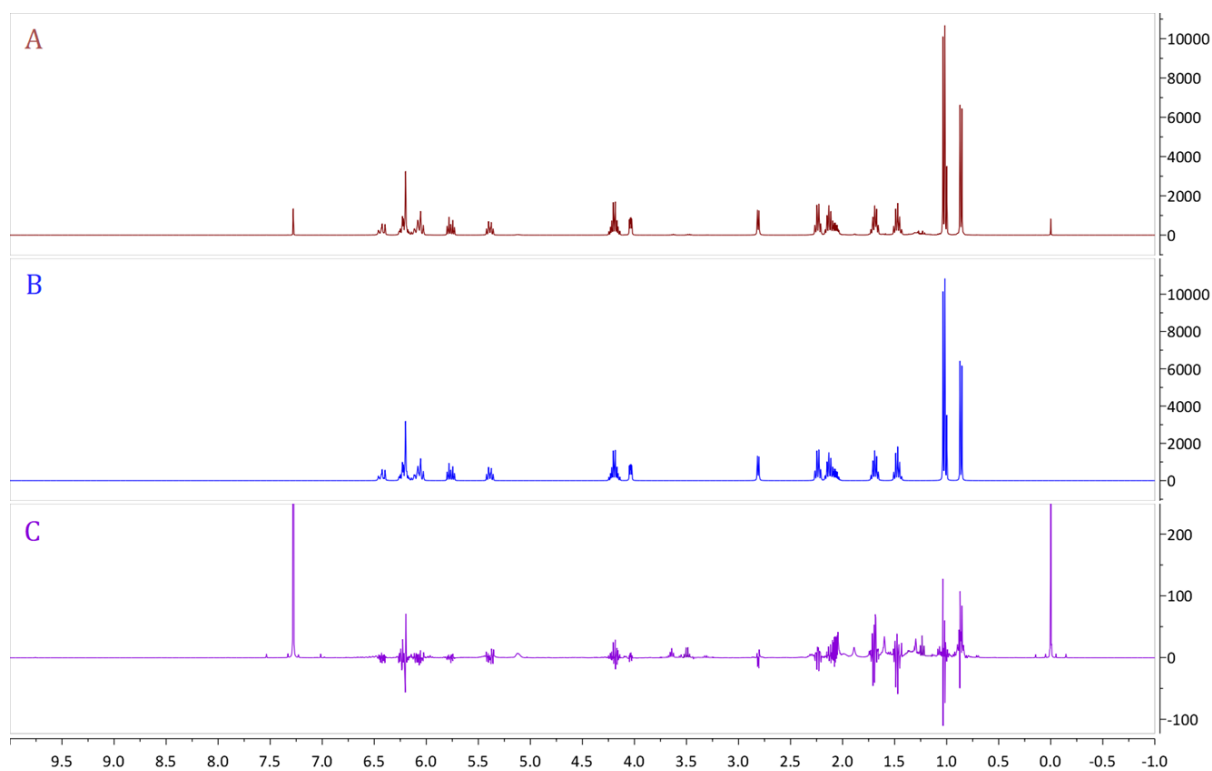
¹ Hemijska pomeranja i konstante sprežanja određene su na osnovu eksperimenata selektivnog homodekuplovanja i spinske simulacije. ² Vrednosti konstanti sprežanja $|J| < 0,7$ nisu navedene radi lakšeg poređenja. ³ /, Nema protona ili nema pozicije. ⁴ Pseudo, odnosno pseudo-multiplet. Na primer, dublet dubleta sa dve slične J -vrednosti mogao bi da na triplet, takav je ovde nazvan pseudotripletom.

Geometrija C-5'-C-6' i C-11'-C-12' dvostrukih veza određena je kao *Z*, odnosno *E*, na osnovu uočenih vrednosti konstanti sprežanja između odgovarajućih protona ($J_{\text{H-5'-H-6'}} = 10,3 \text{ Hz}$ i $J_{\text{H-11'-H-12'}} = 15,0 \text{ Hz}$), kao i vrednosti konstanti sprežanja odgovarajućih protona i ugljenika-13 (slika 31). Na osnovu kuplovanih ^1H - ^{13}C NMR-spektara, eksperimenata selektivnog homodekuplovanja i naknadne potpune spinske simulacije ^1H NMR-spektra (Radulović et al., 2019), omogućeno je određivanje geometrije unutrašnjih dvostrukih veza (*E,E*) i potpuna asignacija NMR-signalâ protona i ugljenika-13 (tabele 17 i 18). Poređenje sa NMR-podacima za izomere metil-parinarata (Kuklev & Smith, 2004; slika 32, tabele S1 i S2, prilog) dodatno je potvrdilo konfiguraciju 5*Z*,7*E*,11*E*,13*E* jedinjenja **31**. Treba naglasiti da potpuna spektralna, strukturna i stereohemijska karakterizacija nije mogla biti postignuta konvencionalnim pristupima (uključujući i 2D NMR), već isključivo putem potpune simulacije ^1H NMR-spektra (slika 33), što je ključno za dereplikaciju polinezasićenih alifatičnih lanaca (Pauli et al., 2014). NMR-parametri dobijeni simulacijom, kako u ovom, tako i u svim drugim slučajevima gde je pristup primenjen, navedeni su u prilogu sa odgovarajućim brojem decimala (tabele S1 i S2, prilog).

Slika 32. Odabrane a) ^1H - ^1H i b) ^1H - ^{13}C konstante sprežanja (Hz) jedinjenja **31**, **33**, i **38**

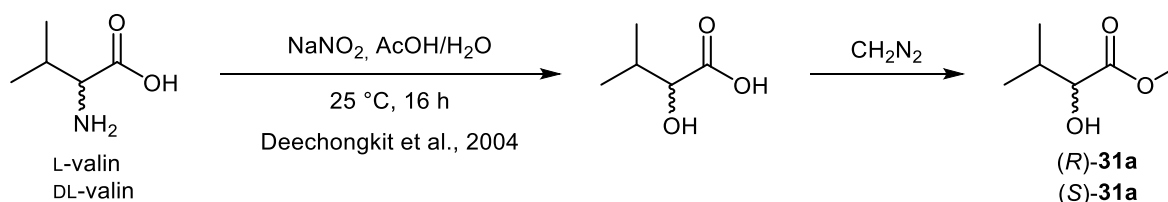


Slika 32. Strukture i numeracija atoma stereoizomernih metil-parinarata (P-1 – P-4)



Slika 33. A) Eksperimentalni ¹H NMR-spektar jedinjenja **31**; B) Simulirani ¹H NMR-spektar jedinjenja **31**; C) Razlika između eksperimentalnog i simuliranog spektra jedinjenja **31**

Apsolutna konfiguracija hiralnog centra na C-2 u jedinjenju **31** određena je upoređivanjem ^1H NMR-parametara Mosher-ovog estera (*R*)-MTPA i jedinjenja **31** sa odgovarajućim podacima za diastereomerno čiste (*R*)-MTPA estere dva model jedinjenja – metil-2-hidroksi-3-metilbutanoata, (*R*)-**31a** i (*S*)-**31a** (šema 4; tabela 19). Najznačajnije razlike između diastereomernih estara uočene su u hemijskim pomeranjima geminalnih metil-grupa (C-4 i C-5), *orto*-protona na benzenovom prstenu i metoksi-grupe (slika 34). Odlično poklapanje podataka za (*R*)-MTPA-**31** i (*R*)-MTPA-(*R*)-**31a** (tabela 19, slika 34), kao i izražene razlike u odnosu na (*R*)-MTPA-(*S*)-**31a**, omogućili su nedvosmisleno određivanje strukture jedinjenja **31** kao (5*Z*,7*E*,9*E*,11*E*)-tetradeka-5,7,9,11-tetraen-1-il-(*R*)-2-hidroksi-3-metilbutanoata, a ono predstavlja novi prirodni proizvod, za koji se predlaže naziv prealtaestar A.

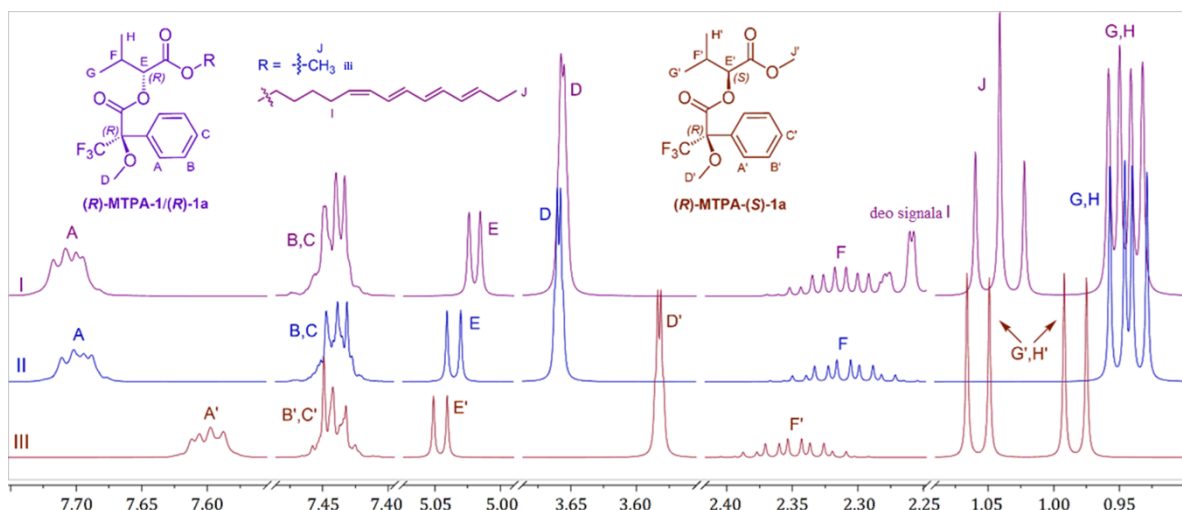


Šema 4. Sinteza model jedinjenja (*R*)-**31a** i (*S*)-**31a**

Tabela 19. ^1H NMR-parametri (CDCl_3) (*R*)-MTPA estara jedinjenja **31**, (*R*)- i (*S*)-**31a**.

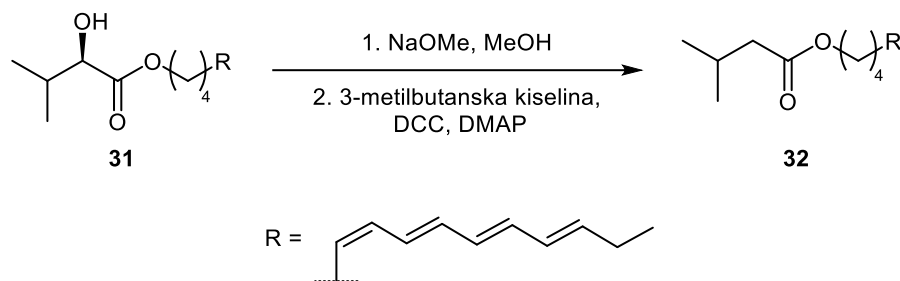
Pozicija	δ_{H} , m (<i>J</i> in Hz, integral)		
	(<i>R</i>)-MTPA-(<i>R</i>)- 31a	(<i>R</i>)-MTPA- 31	(<i>R</i>)-MTPA-(<i>S</i>)- 31a
E ¹	5,0351, d (4,2, 1 H)	5,0186, d (4,21 H)	5,0457, d (4,2, 1 H)
F	2,3100, sept ² d (6,8, 4,2, 1 H)	2,3130, qqd (7,0, 6,8, 4,2, 1 H)	2,3479, sept ² d (6,8, 4,2, 1 H)
H	0,9369, d (6,8, 3 H)	0,9410, d (7,0, 3 H)	1,0577, d (6,8, 3 H)
G	0,9483, d (6,8, 3 H)	0,9498, d (6,8, 3 H)	0,9836, d (6,8, 3 H)
A/A'	7,6988, ABB'MM'	7,7058, ABB'MM'	7,5990, ABB'MM'
B/B'	7,4400, ABB'MM'	7,4430, ABB'MM'	7,4400, ABB'MM'
C/C'	7,4370, ABB'MM'	7,4380, ABB'MM'	7,4450, ABB'MM'
D/D'	3,6587, q (0,9, 3 H)	3,6564, q (1,0, 3 H)	3,5825, q (0,9, 3 H)
OMe	3,8146, s (3 H)	–	3,7769, s (3 H)

¹ Korišćeno obeležavanje vodonika prikazano je na slici 32. ² Pseudo, odnosno pseudo-multiplet; vidi objašnjenje fusnote 4, tabela 18.



Slika 34. Odabrana uvećanja ^1H NMR-spektara (*R*)-MTPA estara jedinjenja: I) **31**, II) (*R*)-**31a**, i III) (*S*)-**32a**

Alkoholni deo prealtaestra A (**31**), ali sa različitom konfiguracijom dvostrukih veza (5*E*,7*E*,9*Z*,11*E*), do sada je objavljen za nepotpuno okarakterisani estar izolovan iz vrste *Centaurea ruthenica* Lam. (Asteraceae, Bohlmann & Jastrow, 1962; Bohlmann et al., 1961), a kasnije i iz vrste *C. scabiosa* L. kao odgovarajući izovalerat (Christensen et al., 1991), ali geometrija dvostrukih veza nije bila određena za ovaj izovalerat. U ekstraktu nadzemnih delova uzorka **BP-1** detektovano je i jedinjenje **32**, koje predstavlja izovalerat tetradeka-5,7,9,11-tetraen-1-ola. U cilju potvrđivanja strukture ovog jedinjenja, pripremljen je uzorak estra izovalerijanske kiseline i (5*Z*,7*E*,9*E*,11*E*)-tetradeka-5,7,9,11-tetraen-1-ola, prethodno dobijenog pažljivom metanolizom jedinjenja **31** (šema 5). Eksperiment ko-injekcije sintetisanog jedinjenja potvrdio je prisustvo jedinjenja **32**, tj. (5*Z*,7*E*,9*E*,11*E*)-tetradeka-5,7,9,11-tetraen-1-il-3-metilbutanoata (prealtaestar B), u nadzemnim delovima vrste *B. praealtum*, dok se čini da je bio odsutan u zrelih šizokarpijumima.



Šema 5. Sinteza jedinjenja **32**

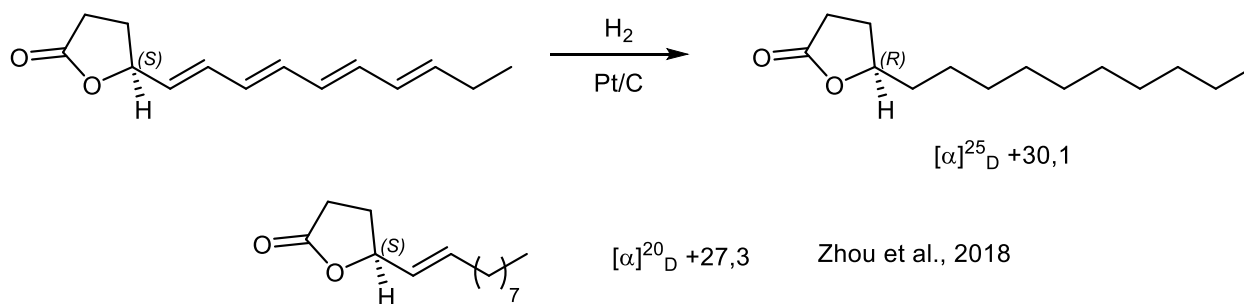
Takođe, u ekstraktu uzorka šizokarpijuma ovog taksona, GC-MS-analizom detektovan je i izomer jedinjenja **31** (jedinjenje **33**), kao i njegov odgovarajući acetilovani derivat (jedinjenje **34**, slika 27). Retencioni indeks jedinjenja **33** (RI(**33**)=2403) bio je za 38 jedinica viši u odnosu na indeks jedinjenja **31** (RI(**31**)=2365), pri čemu su njihovi maseni spektri bili gotovo identični. Ove sličnosti ukazivale su na odnos *cis*- i *trans*-geometrijskih izomera, u ovom slučaju između **31** i **33**, što je potvrđeno i upoređivanjem vrednosti retencionih indeksa jedinjenja sa sličnim trienskim sistemima (npr. RI(*trans,cis,trans*)=1598, RI(*trans,trans,trans*)=1648 (Binder & French, 1994)). Stoga se moglo pretpostaviti da jedinjenje **33** razlikuje od jedinjenja **31** isključivo po geometriji (C-5'-C-6') dvostruke veze. 1D i 2D NMR-spektri frakcije obogaćene jedinjenjem **33** (76%, slike S8-S10, prilog), zajedno sa prethodno simuliranim spektrom jedinjenja **31**, omogućili su potpunu spektralnu asignaciju (tabele 17 i 18) i nedvosmisleno potvrdili da je jedinjenje **33** „sve-*trans*“ izomer, tj. (5*E*,7*E*,9*E*,11*E*)-tetradeka-5,7,9,11-tetraen-1-il-2-hidroksi-3-metilbutanoat (prealtaestar C, slika 27). Moguće je da jedinjenje **33** predstavlja artefakt nastao iz jedinjenja **31**, termodinamički stabilniji izomer koji nastaje kao posledica izlaganja UV-zračenju (Bohlmann & Jastrow, 1962). Ovo bi moglo ukazivati na potencijalnu zaštitnu funkciju jedinjenja **31** i srodnih molekula u biljci protiv štetnog UV-zračenja. Ovakva postepena konverzija u „sve-*trans*“ izomer uočena je i kod jedinjenja **32**, pri čemu je transformacija najverovatnije bila uzrokovana sunčevim zračenjem. Sveže sintetisano jedinjenje **32** sadržavalo je manje od 2% „sve-*trans*“ izomera (na osnovu ¹H NMR-spektra), dok je posle nedelju dana (slika S5, prilog), molarni udeo porastao na 22%, iako je uzorak čuvan na 4 °C u zatvorenoj bočici u mraku.

Poređenje masenih spektara jedinjenja **31** i **34**, uključujući prisustvo dominantnog fragmenta na *m/z* 43 i porast molekulske mase za 42 jedinice, odnosno retencionog indeksa, ukazivalo je na to da je jedinjenje **34** (slika 26) acetilovani derivat jedinjenja **31**. Ova hipoteza je potvrđena sintezom acetata jedinjenja **31** i eksperimentom ko-injekcije sa ekstraktom **BP-1**. Pripremljeni uzorak korišćen je za prikupljanje svih relevantnih analitičkih podataka za novo jedinjenje (prealtaestar D, **34**), koji su dati u tabelama 17 i 18.

Još jedno polinezasićeno, poliensko jedinjenje, označeno kao **35** (slika 27), izolovano je iz ekstrakta nadzemnih delova uzorka **BP-1**, a na osnovu HREIMS-analize utvrđena je njegova molekulska formula – C₁₄H₁₈O₂. Oštra i intenzivna traka u IR-spektru na 1771 cm⁻¹ jasno je ukazivala na prisustvo γ-laktonskog prstena, koja objašnjava dva od ukupno šest nezasićenja prisutnih u molekulu (Pretsche et al., 2009). Preostala četiri nezasićenja pripisana su konjugovanim dvostrukim vezama, što je prvobitno zaključeno na osnovu apsorpcionih

maksimuma u UV-spektru jedinjenja **35**, a zatim potvrđeno prisustvom osam signala metinskih sp^2 -hibridizovanih ugljenikovih atoma u ^{13}C NMR/DEPT-90-spektrima. Podaci iz ^{13}C i ^1H NMR-spektara (tabele 17 i 18) dodatno su ukazivali na prisustvo metil-grupe (triplet na 1,02 ppm), tri metilenske grupe, još jedne metinske grupe vezane za atom kiseonika, kao i laktonskog ugljenika (177,2 ppm). Signal na δ_{H} 5,00, koji odgovara protonu H-4, pružio je uvid u povezanost laktonskog fragmenta sa ostatkom molekula i to na osnovu vrednosti konstanti sprežanja od 7,7, 7,0 i 6,8 Hz, kao i odgovarajućih daljinskih C-H sprežanja. Time je pokazano da je laktonski fragment smešten s jedne strane tetraenskog sistema, dok se s druge strane nalazi etil-grupa, slično kao kod jedinjenja **31–34**. Odgovarajuća ^1H NMR-potpuna spinska simulacija, kao i poređenje hemijskih pomeranja i konstanti sprežanja sa jedinjenjima **31–34**, omogućila je određivanje (*E,E,E,E*)-konfiguracije četiri dvostruke veze.

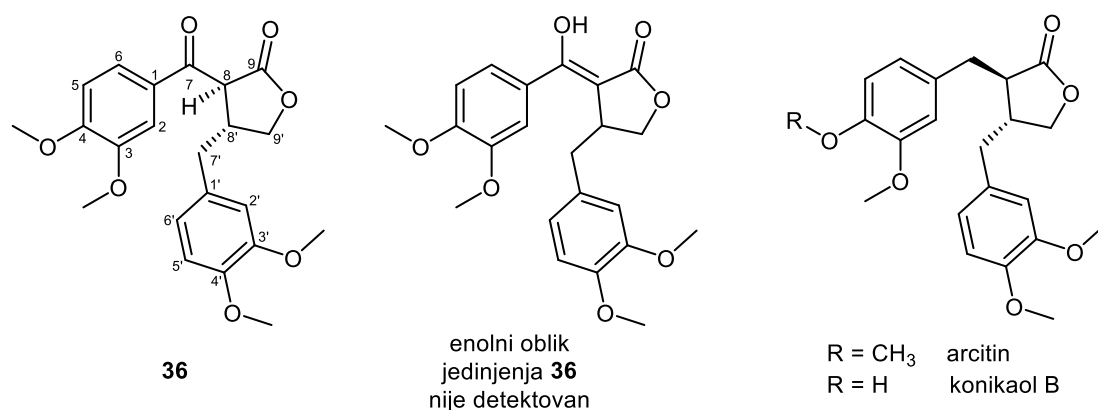
Apsolutna konfiguracija hiralnog centra na C-4 u jedinjenju **35** određena je nakon potpune hidrogenizacije (šema 6). Specifična optička rotacija dobijenog γ -tetradekalaktona bila je istog znaka i približno iste vrednosti kao kod (*R*)-enantiomera (Thijs & Zwanenburg, 2004; Zhou et al., 2018). Ovo ukazuje na to da jedinjenje **35** poseduje (*S*)-konfiguraciju na C-4, usled formalne promene oznake konfiguracije zbog promene prioriteta supstituenata po *Cahn-Ingold-Prelog*-ovim pravilima nakon hidrogenizacije. Prethodno je sintetisano i strukturno slično dvostruko nezasićeno laktonsko jedinjenje sa (*S*)-konfiguracijom na C-4 (Naruse et al., 1996) i ono je takođe pokazalo pozitivan znak optičke rotacije, kao i jedinjenje **35**. Na osnovu navedenog, jedinjenje **35** predstavlja novi prirodni lakton, identifikovan kao (*S*)-5-((1*E*,3*E*,5*E*,7*E*)-deka-1,3,5,7-tetraen-1-il)dihidrofuran-2(3*H*)-on, za koji je predložen naziv prealtalakton.



Šema 6. Hidrogenizacija jedinjenja **35** sa navedenim vrednostima specifičnih optičkih rotacija

Iz ekstrakata uzorka **BP-1** izolovana su još dva srodna dibenzilbutirolaktona. Jedan od njih, nađen u nadzemnim delovima, bio je (+)-arcitin (sinonim: *O,O*-dimetilmatairesinol; slika

35), čija je identifikacija potvrđena poređenjem NMR-podataka sa ranije objavljenim vrednostima (Davidson et al., 2018). NMR-, IR- i MS-spektri drugog lignana (**36**, slika 35), izolovanog iz ekstrakta šizokarpijuma, ukazivali su na to da on predstavlja oksigenovani derivat arcitina sa ketonskom funkcijom u položaju 7.



Slika 35. Strukture jedinjenja i numeracija atoma jedinjenja **36** (7-oksoarcitin, tj. *O*-metilkonikaol B) i (+)-arcitina, izolovanih iz uzorka **BP-1**, i struktura konikaola B

Zaključeno je da lignan **36** u CDCl₃ postoji isključivo u ketonskom tautomernom obliku, s obzirom da u NMR-spektrima nisu uočeni ni tragovi enolnog oblika (slika 35), koji se inače mogu očekivati kod β -ketolaktone. Enolni tautomeri takođe nisu pomenuti ni u radovima koji su se bavili sintezom srodnih ketolignana, niti za prirodni konikaol B (slika 33, Fan et al., 2006; He et al., 2010). Podaci iz pomenutih radova bili su korisni i pri određivanju relativne konfiguracije hirlnih centara u položajima 8 i 8', budući da NOESY-interakcije za protone u jedinjenju **36** nisu bile jednoznačne – uočeni su korelacioni signali kako između H-8 i H-8', tako i između H-8 i H-7'a/b. Kao i kod strukture arcitina, na osnovu poređenja relevantnih spektralnih podataka utvrđeno je da su dve supstituisane benzilne grupe na γ -butirolaktonskom prstenu jedinjenja **36** u međusobnom *trans* odnosu.

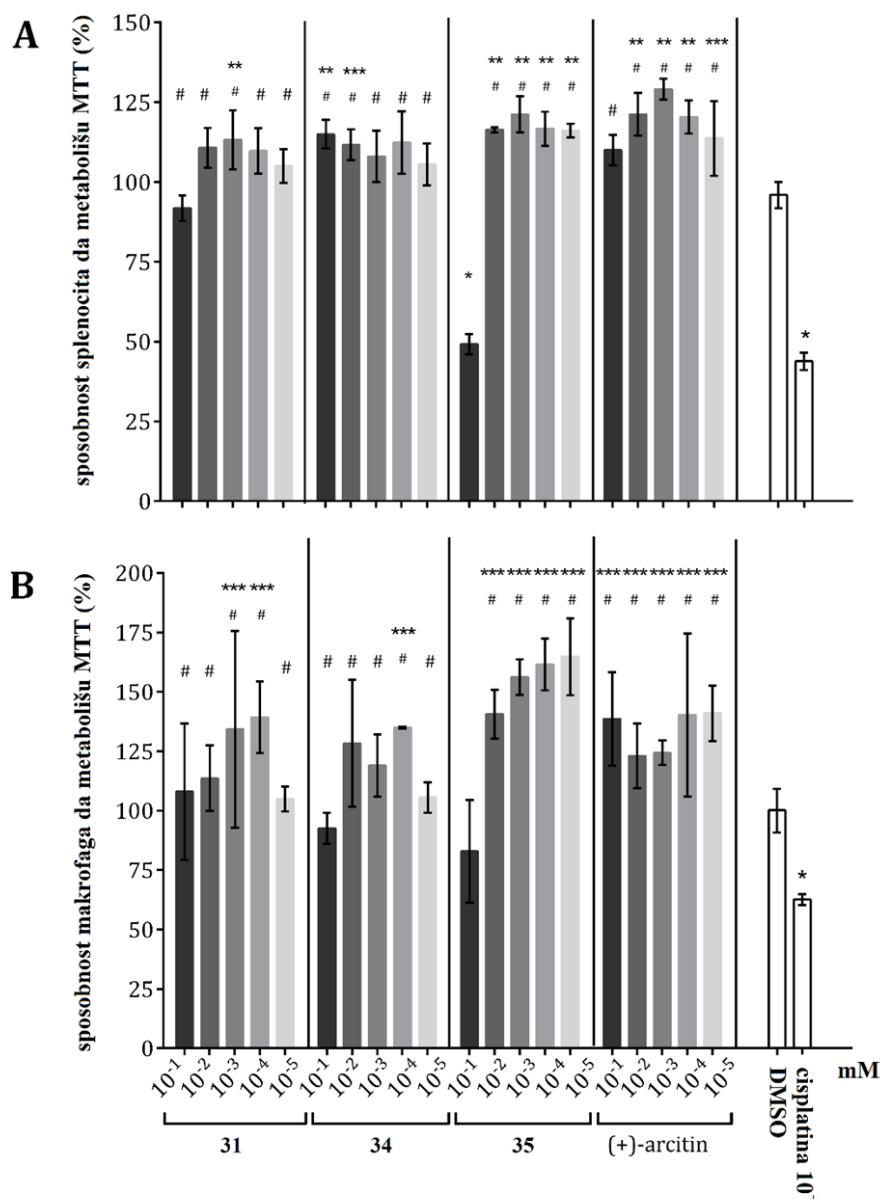
Na taj način, jedinjenje **36** je identifikovano kao 7-oksoarcitin, ili *O*-metilkonikaol B – novi prirodni proizvod; pre skoro 60 godina ovo jedinjenje zabeleženo je kao nedovoljno okarakterisan sintetski intermedijer (Adjangba, 1963; Adjangba, 1965) uz navedene samo UV- i IR-spektralne podatke. Stoga je u ovom radu prvi put izvršena potpuna NMR-karakterizacija ovog jedinjenja (slike S21 i S22, prilog).

4.2. Ispitivanje imunomodulatorne aktivnosti odabranih metabolita izolovanih iz vrste *B. praealtum*

Jedinjenja **31**, **34**, **35** i (+)-arcitin, koja su izolovana u dovoljnim količinama, zajedno sa cisplatinom (0,1 mM), ispitivana su u koncentracionom opsegu od 10^{-5} do 10^{-1} mM kako bi se procenio njihov uticaj na vijabilnost i funkcionalne karakteristike splenocita (SPC) i makrofaga ($M\phi$). Sva testirana jedinjenja su statistički značajno menjala (povećavala i/ili smanjivala) mitohondrijalnu i lizozomalnu funkciju SPC i $M\phi$, što je potvrđeno njihovom sposobnošću da redukuju MTT* (slika 36) i akumuliraju bojeni marker neutralno crveno (NR) (slika 37).

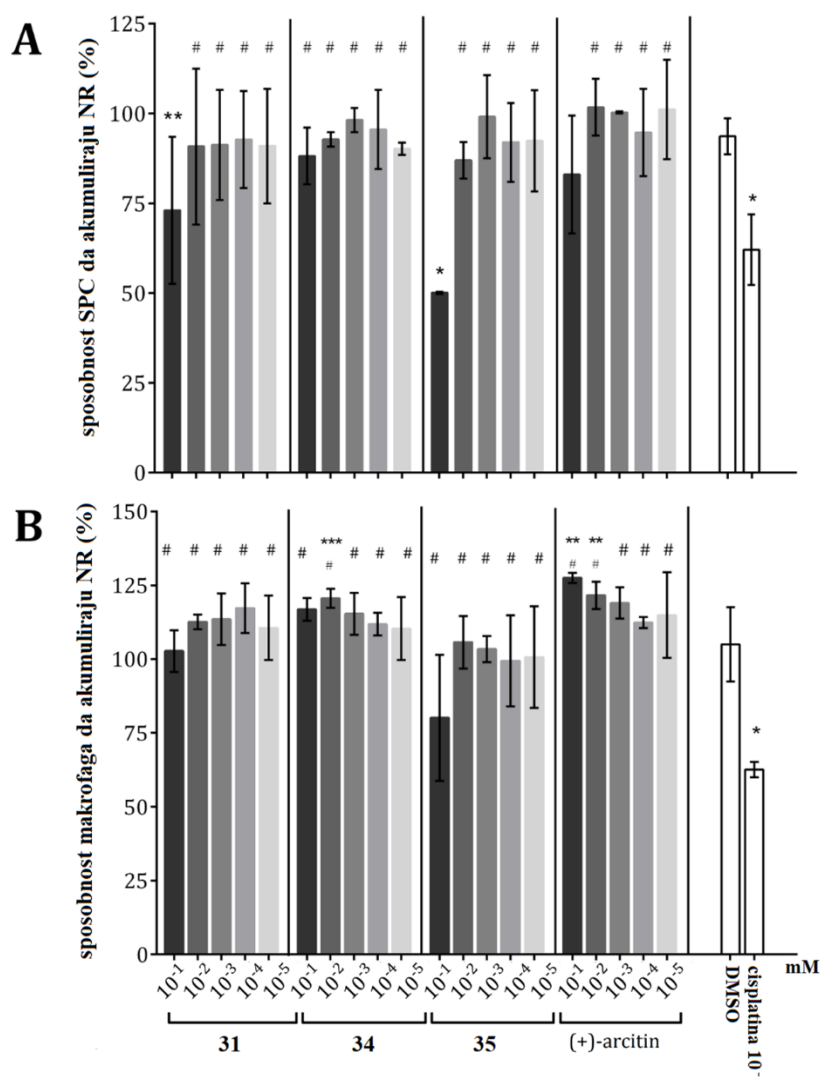
Jedinjenja **31**, **34** i **35** poseduju isti strukturni motiv – deka-1,3,5,7-tetraen-1-ilnu grupu – koji je takođe karakterističan za parinarne kiseline. Poznato je da pomenute parinarne kiseline utiču na vijabilnost ćelija humane leukemije (THP-1 monocitna leukemija i HL-60 humani promijelocitni oblik) već pri koncentracijama od 5 μ M ili nižim (Cornelius et al., 1991). U poređenju sa citotoksičnim efektima parinarnih kiselina, prealtakton (**35**) je značajno smanjivao vijabilnost SPC i $M\phi$ *in vitro* tek pri koncentraciji od 100 μ M. S druge strane, jedinjenja **31** i **34** u svim testiranim koncentracijama, kao i jedinjenje **35** pri koncentracijama ispod 10 μ M, pokazala su suprotan efekat – povećavala su mitohondrijalnu redukcionu aktivnost i funkciju lizozoma. Ovakva selektivna citotoksičnost usmerena na transformisane (tumorske), a ne na normalne ćelije, ranije je primećena i za α -parinarnu kiselinu u slučaju netumorskih astrocita. Veruje se da parinarne kiseline povećavaju proizvodnju slobodnih radikala i tako senzitiviziraju transformisane ćelije na lipidnu peroksidaciju, pre svega zbog pojačanog unosa ovih kiselina u tumorske ćelije koje brzo rastu.

* U proceni citotoksičnosti najčešće se kombinuju MTT i *Neutral Red* testovi: prvi se oslanja na sposobnost mitohondrijalnih NAD(P)H-zavisnih oksidoreduktaza da žutu tetrazolijum-so MTT redukuju u nerastvorni ljubičasti formazan, čija je količina, izmerena spektrofotometrijski nakon rastvaranja, srazmerna broju metabolički aktivnih ćelija; dok drugi koristi katjonsku boju Neutral Red koja se, zahvaljujući protonskim-pumpama, selektivno akumulira u kiselim lizozomima; količina boje (takođe određena apsorbancijom) odražava integritet lizozomalne membrane, pa je zajednička interpretacija rezultata oba testa pouzdan pokazatelj ćelijske vijabilnosti i subćelijskog oštećenja.



Slika 36. Uticaj jedinjenja **31**, **34**, **35** i (+)-arcitina na sposobnost splenocita (A) i makrofaga (B) da metabolišu MTT. Prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti (%) sa standardnom devijacijom (SD), izračunate na osnovu vrednosti dobijenih za ćelije tretirane samo medijumom RPMI. Za međusobno upoređivanje rezultata korišćena je jednofaktorska-ANOVA analiza, nakon čega je primenjen *Tukey-jev post-hoc* test: * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,05$ u poređenju sa ćelijama tretiranim medijumom RPMI; # $p < 0,001$ u poređenju sa tretmanom cisplatinom.

Tretman splenocita (+)-arcitinom u koncentraciji od 100 μ M doveo je do smanjenja njihove sposobnosti akumulacije neutralnog crvenog (slika 37); međutim, ovaj efekat nije bio statistički značajan. Zanimljivo je da je kod makrofaga, pri izlaganju najvišim koncentracijama arcitina (100 i 10 μ M), zabeležen suprotan efekat – statistički značajno povećanje sposobnosti za akumulaciju neutralnog crvenog.

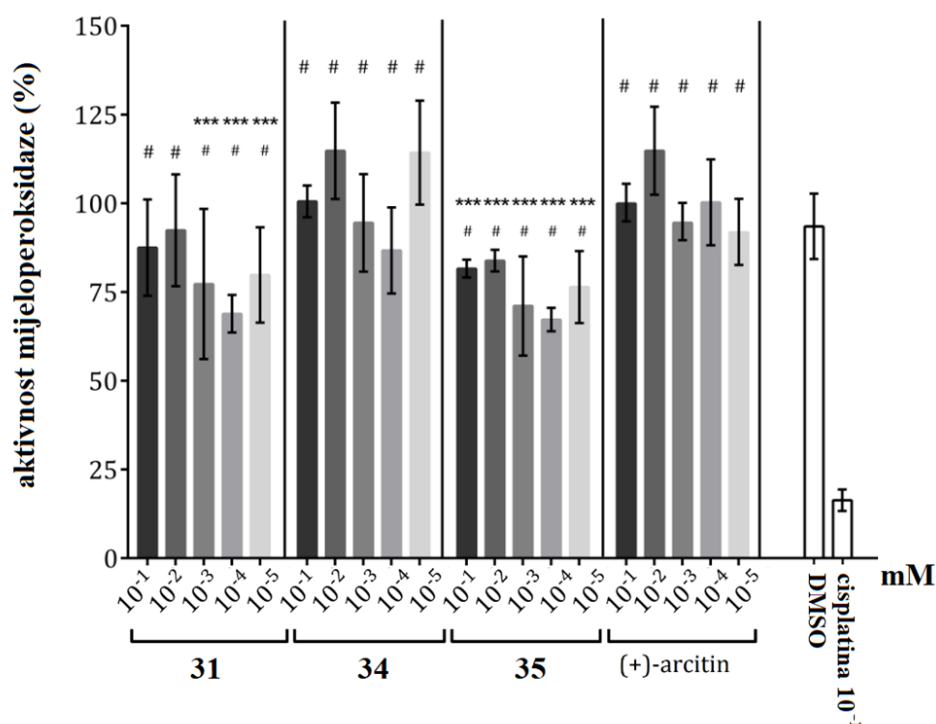


Slika 37. Uticaj jedinjenja **31**, **34**, **35** i (+)-arcitina na sposobnost splenocita (A) i makrofaga (B) da akumuliraju NR. Prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti (%) sa standardnom devijacijom (SD), izračunate na osnovu vrednosti dobijenih za ćelije tretirane samo medijumom RPMI. Za međusobno upoređivanje rezultata korišćena je jednofaktorska-ANOVA analiza, nakon čega je primenjen *Tukey-jev post-hoc* test: * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,05$ u poređenju sa ćelijama tretiranim medijumom RPMI; # $p < 0,001$ u poređenju sa tretmanom cisplatinom.

Ranije je utvrđeno da arcitin pokazuje izraženu citotoksičnost prema *Jurkat T* ćelijama (besmrtni humani T-limfociti, Davidson et al., 2018) i da na koncentraciono zavisani način smanjuje nivo IgE u kulturama U266 ćelija (besmrtni humani B limfociti, Tanabe et al., 2011). Međutim, rezultati dobijeni na primarnim kulturama limfocita i makrofaga slezine pacova pokazuju da (+)-arcitin ne smanjuje njihovu vijabilnost, već čak podstiče njihovu sposobnost da metabolišu MTT i akumuliraju neutralno crveno, što ukazuje na funkcionalnu aktivaciju ovih imunih ćelija. Na osnovu toga se može zaključiti da ovaj lignan deluje selektivno citotoksično na transformisane limfocite, dok ne utiče negativno na vijabilnost i/ili funkciju normalnih ćelija.

Prealalakton (**35**), pretežno, i prealtaestar A (**31**), u manjoj meri, pokazali su potencijal za modulaciju aktivnosti mijeloperoksidaze makrofaga (slika 38). Ova aktivnost može biti rezultat njihove sposobnosti da inhibiraju enzim MPO (mijeloperoksidaza) ili da reaguju sa slobodnim radikalima (van den Berg, 1994) koje MPO generiše, što ukazuje na njihovo moguće direktno učešće u oksidativnim ćelijskim procesima izazvanim reaktivnim kiseoničnim vrstama, slično kao α -parinarna kiselina. Antioksidativna svojstva jedinjenja **31**, **34** i **35** u ćelijskim kulturama sugerišu i njihovu potencijalnu zaštitnu ulogu u biljnim tkivima.

Izraženija citotoksičnost jedinjenja **35** mogla bi se objasniti njegovim specifičnim metabolizmom u ćelijama, koji može dovesti do stvaranja citotoksičnih agenasa tipa Majklovih akceptora. Poznato je da alifatični γ -laktoni podležu hidrolizi uz posredstvo paraoksonidaza, nakon čega sledi α - ili β -oksidacija masnih kiselina. U slučaju jedinjenja **35**, nakon hidrolize i početne oksidacije novonastale hidroksilne grupe, verovatno dolazi do formiranja α,β -nezasićenog konjugovanog ketona, koji se ponaša kao Majklov akceptor, tj. potencijalni alkilujući agens.



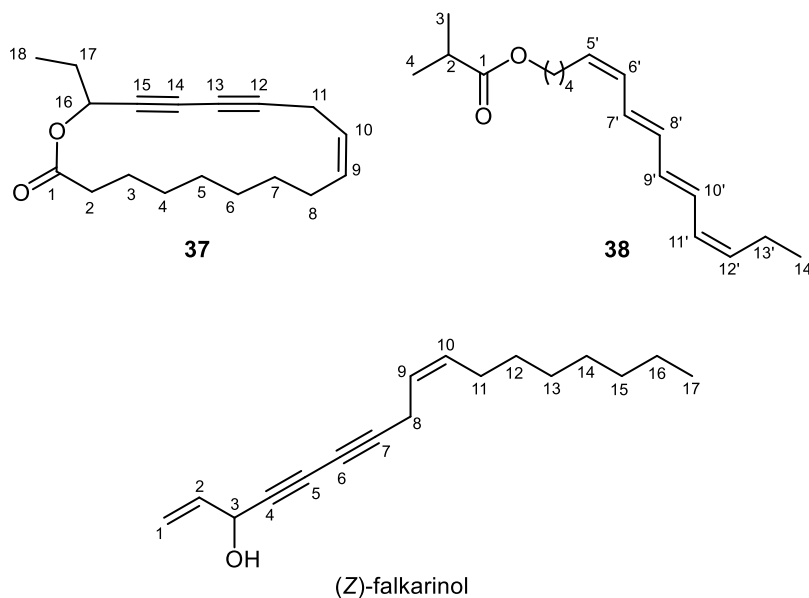
Slika 38. Aktivnost MPO u makrofagima tretiranim jedinjenjima **31**, **34**, **35** i (+)-arctinom. Prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti (%) sa standardnom devijacijom (SD), izračunate na osnovu vrednosti dobijenih za ćelije tretirane medijumom RPMI. Za međusobno upoređivanje rezultata korišćena je jednofaktorska-ANOVA analiza, nakon čega je primenjen *Tukey-jev post-hoc* test: * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,05$ u poređenju sa ćelijama tretiranim RPMI; # $p < 0,001$ u poređenju sa tretmanom cisplatinom.

U zaključku, može se reći da vrste roda *Bupleurum* koje su etnofarmakološki cenjene zaista opravdavaju svoj status biljaka sa imunomodulatornim dejstvom – posebno u smislu biljnih lekova koji jačaju funkcionalne karakteristike normalnih splenocita i makrofaga, iako pojedinačni metaboliti mogu ispoljiti specifične, različite efekte.

4.3. Analiza hemijskog sastava ekstrakta vrste *B. veronense*

U ovom delu biće opisana analiza hemijskog sastava dietil-etarskog ekstrakta vrste *B. veronense*. Hromatografija ekstrakta rezultirala je izolovanjem tri nova jedinjenja: sedamnaestočlanog makrolida (**37**), jednog polinezasićenog estera (**38**) i derivata floroglucinola (**39**). Strukturna identifikacija izvršena je kombinacijom spektroskopskih metoda, uključujući masenu spektrometriju, infracrvenu spektroskopiju, detaljnu analizu NMR-spektara, kao i hemijske transformacije. Potpuna NMR-karakterizacija postignuta je primenom iterativne spinske simulacije. Apsolutna konfiguracija jedinjenja **39** određena je sintezom odgovarajućih diastereomernih Mosher-ovih estara.

Hromatografskim razdvajanjem dietil-etarskog ekstrakta vrste *B. veronense* (**BV**) izolovano je jedinjenje **37** (slika 39), čiji je maseni spektar bio sličan masenom spektru falkarinola (Radulović et al., 2016a), diendiinskom sekundarnom alkoholu. Molekulski jon jedinjenja **37**, određen HREIMS-analizom, odgovarao je formuli $C_{18}H_{24}O_2$, što ukazuje na sedam nezasićenja u ovom molekulu – odnosno da on poseduje jedan atom ugljenika, jedan atom kiseonika i jedno nezasićenje više u poređenju sa falkarinolom. U IR-spektru uočena je traka koja potvrđuje prisustvo i estarske karbonilne grupe ($1727,5\text{ cm}^{-1}$) u ovom molekulu.



Slika 39. Strukture i numeracija atoma jedinjenja **37–39** i falkarinola

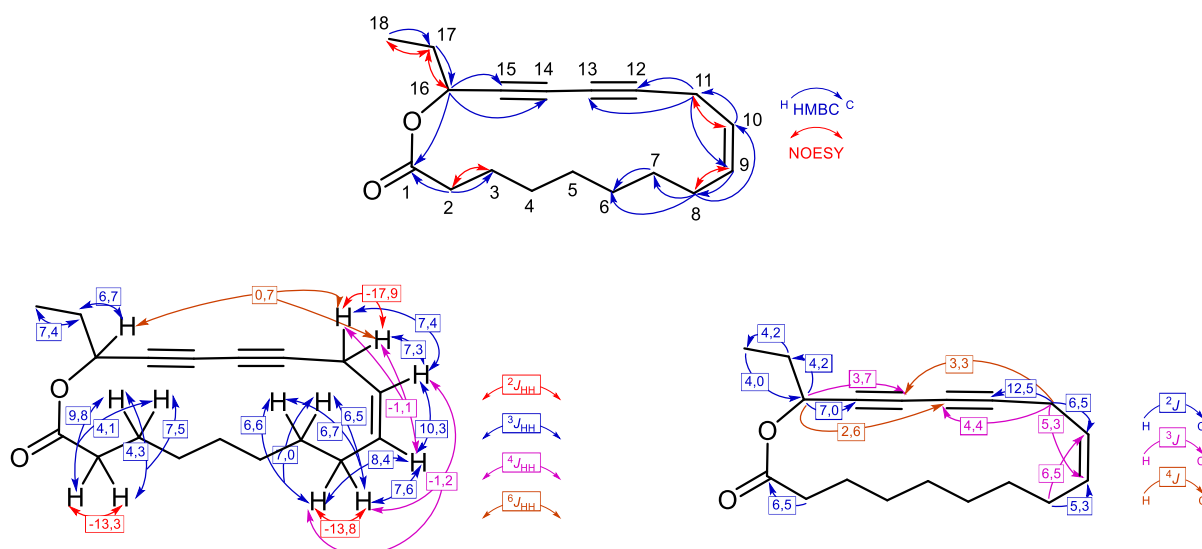
U ^{13}C NMR-spektru jedinjenja **37** (tabela 20; slika S27, prilog) uočeno je osamnaest signala, što je u skladu s molekulskom formulom, uključujući jedan karbonilni ugljenik (δ_{C} 173,5), jednu metil-grupu (δ_{C} 9,6), devet sp^3 -metilenskih ugljenika, jedan oksigenovani sp^3 -ugljenik (δ_{C} 65,3), dva sp^2 -metinska, kao i četiri neprotonovana sp -hibridizovana ugljenika (δ_{C} 64,7, 70,4, 74,5 i 80,5). Pomenute funkcionalne grupe objašnjavaju šest od ukupno sedam nezasićenja, što ukazuje na to da jedinjenje **37** poseduje i jedan prsten.

Tabela 20. ^1H (400 MHz) i ^{13}C (100,6 MHz) NMR (CDCl_3) spektralni podaci jedinjenja **37** i (Z)-falkarinola

homodihidrofalkarinolid (37)			(Z)-falkarinol (Radulović et al., 2016a)		
Pozicija	δ_{C} , tip	δ_{H}^1 , (J u Hz, integral) ²	Pozicija	δ_{C} , tip	δ_{H} , (J u Hz, integral)
1	173,5, C	/ ³	17		- ⁴
2a	34,7, CH_2	2,35, ddd (-13,3, 9,8, 4,1, 1 H)	16	22,6, CH_2	
2b		2,31, ddd (-13,3, 4,3, 7,5, 1 H)			
3a	26,6, CH_2	1,70, m (1 H)	15	31,9, CH_2	1,22-1,31 preklopljeni signali (8 H)
3b		1,64, m (1 H)			
4	28,80, CH_2	1,35 ¹ , m (2 H)	14	29,2, CH_2	
5	29,8, CH_2	1,30 ¹ , m (2 H)			
6	30,3, CH_2	1,34 ¹ , m (2 H)	13		
7	28,77, CH_2	1,43, m (2 H)	12		1,37, m (2 H)
8a	28,4, CH_2	2,11, dddddd (-13,8, 8,4, 7,0, 6,6,	11	27,2, CH_2	2,02, q ^e (7,1, 2 H)
8b		2,06, dddddd (-13,8, 7,6, 6,7, 6,5,			
9	135,2, CH	5,58, dddt ⁵ (10,3, 8,4, 7,6, -1,1,	10	133,1, CH	5,52, dtt (10,5, 7,1, 1,5, 1 H)
10	121,4, CH	5,45, dt ⁵ t ⁵ (10,3, -1,2, -1,1, 1 H)	9	121,9, CH	5,37, dtt (10,5, 6,9, 1,5, 1 H)
11a	17,0, CH_2	2,95, ddd (-17,9, 7,4, -1,1, 1 H)	8	17,7, CH_2	3,03, d (6,9, 2 H)
11b		2,89, ddd (-17,9, 7,3, -1,1, 1 H)			
12	80,5, C	/	7	80,2, C	/
13	64,7, C	/	6	64,0, C	/
14	70,4, C	/	5	71,2, C	/
15	74,5, C	/	4	74,3, C	/
16	65,3, CH	5,28, t (6,7, 1 H)	3	63,5, CH	4,92, d ⁵ quint (5,3, 1,1, 1 H)
17	27,3, CH_2	1,79, dq (7,4, 6,7, 2 H)	2	136,2, CH	5,94 ddd (17,0, 10,1, 5,3, 1 H)
18	9,6, CH_3	1,00, t (7,4, 3 H)	1	-	-

¹ Hemijska pomeranja i konstante sprežanja određene su na osnovu eksperimenata selektivnog homodekuplovanja i spinske simulacije. ² $|J| < 0,7$ nije navedeno radi lakšeg poređenja. ³ /, Nema protona ili nema pozicije. ⁴ Pomeranja nisu relevantna za poređenje. ⁵ Pseudo, odnosno pseudo-multiplet. Na primer, dublet dubleta sa dve slične J vrednosti verovatno bi se ispoljio kao pseudotriplet.

Položaj estarske karbonilne grupe C-1 (δ_C 173,5) određen je na osnovu gHMBC-interakcija protona H-2a i H-2b sa C-1 (slika 40). Gradijentni ^1H - ^1H COSY-eksperiment ukazao je na prisustvo dugog niza međusobno spregnutih protona na ugljenicima od C-2 do C-11 i od C-16 do C-18. Ova dva fragmenta međusobno su povezana na osnovu slabe daljinske J -konstante od 0,7 Hz, najverovatnije preko dve konjugovane trostruke veze. Analiza gHMBC-spektra jedinjenja **37** potvrdila je ovakvu povezanost, dok je položaj estarske/laktonske grupe utvrđen na osnovu korelacije H-16–C-1 kroz tri veze, što ukazuje na formiranje vrlo retkog sedamnaestočlanog makrolida.



Slika 40. HMBC- i NOESY- interakcije ključne za određivanje strukture jedinjenja **37**; i vrednosti odabranih ^1H - ^1H (dole levo) i ^{13}C - ^1H (dole desno) konstanti sprežavanja (Hz)

Prisustvo dvostruke veze u jedinjenju **37** u istom položaju kao kod falkarinola potvrđeno je poređenjem hemijskih pomeranja njihovih protona i ugljenika-13 u položajima 9 (δ_H 5,58; δ_C 135,2, odnosno δ_H 5,52; δ_C 133,1) i 10 (δ_H 5,49; δ_C 121,4, odnosno δ_H 5,37; δ_C 121,9), a na osnovu vrednosti konstante kuplovanja ovih protona ($J = 10,3$ Hz) ustanovljena je (Z)-konfiguracija ove dvogube veze. To je dodatno potvrđeno uočenim višestrukim gHMBC-korelacijama: H-8–C-9 i C-10, H-10–C-9 i C-11, kao i H-11–C-10 (slika 40). Korelacije preko više veza u gHMBC-spektru, H-11 sa C-12 (δ_C 80,5) i C-13 (δ_C 64,7), kao i H-16 sa C-14 (δ_C 70,4) i C-15 (δ_C 74,5), ukazuju na prisustvo konjugovanog diinskog fragmenta (od C-12 do C-15, četiri sp -hibridizovana ugljenika) koji povezuje C-11 i C-16. Na osnovu svega navedenog, zaključeno je da jedinjenje **37** predstavlja (Z)-17-etiloksacikloheptadeka-10-en-13,15-diin-2-on – novo prirodno jedinjenje, verovatno biosintetski povezano sa (Z)-falkarinolom, pa je za njega predloženo ime homodihidrofalkarinolid.

Strukturno najbližnja jedinjenja jedinjenju **37** su imunosupresivni makrolid ivorenolid B, izolovan iz afričkog mahagonija *Khaya ivorensis* A.Chev. (Meliaceae, Wang et al., 2014; Zhang et al., 2012) i kampestrolid izolovan iz *Eryngium campestre* L. (Apiaceae, Medbouhi et al., 2018). Ivorenolid B sadrži dva dodatna atoma kiseonika: umesto dvostruke veze između C-9 i C-10 nalazi se epoksidni prsten, dok je u alilno-propargilnom položaju C-11 prisutna hidroksilna grupa. Kampestrolid se razlikuje od homodihidrofalkarinolida samo u postojanju dodatne C-17–C-18 dvostruke veze. U skladu sa predloženim imenom jedinjenja **37**, kampestrolid je homofalkarinolid. Smatra se da (Z)-falkarinol i homodihidrofalkarinolid (**37**) dele zajednički biosintetski put (o čemu će biti reči kasnije); pretpostavlja se da je 17,18-didehidro-kiselina, koja odgovara nelaktonizovanom obliku jedinjenja **37**, prekursor koji dekarboksilacijom daje falkarinol (Minto & Blacklock, 2008). Jedinjenje **37** može predstavljati kariku koja nedostaje u biosintetskom putu od krepeninske kiseline ka derivatima falkarinola, ili pak polaznu tačku divergentnog biosintetskog ogranka. Nije moguće zaključiti da li kampestrolid je biosintetski prekursor ili metabolit koji nastaje iz homodihidrofalkarinolida.

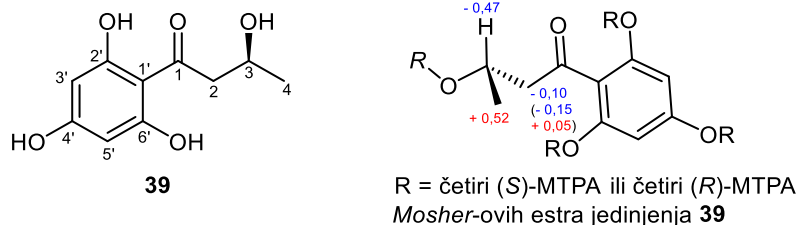
Maseni spektar jedinjenja **38**, izolovanog iz ekstrakta **BV**, slično kao i prealtaestar A (**31**), sadržao je dominantne fragmentne jone na m/z 91, 105, 117 itd., što ukazuje na visok stepen nezasićenja. Molekulski jon (m/z 276) sugerisao je da se radi o jedinjenju srodnom jedinjenju **31**, odnosno estru tetradekatetraenola i zasićene karboksilne kiseline sa četiri atoma ugljenika. Kao što je prethodno opisano za jedinjenja **31–34**, analizom ^1H i ^{13}C NMR-spektara, zaključeno je da je jedinjenje **38** zapravo tetradeka-5,7,9,11-tetraen-1-il-2-metilpropanoat (slika 39).

Na osnovu oblika signala olefinskih protona u ^1H NMR-spektru jedinjenja **38** odmah je uočeno da se konfiguracija dvostrukih veza razlikuje od one u jedinjenjima **31**, **32** i **34** (5Z,7E,9E,11E), kao i od one u jedinjenju **33** (5E,7E,9E,11E). Geometrija dvostrukih veza C-5'–C-6' i C-11'–C-12' u jedinjenju **38** određena je kao Z, na osnovu vrednosti konstanti sprežanja *cis*-protona ($J_{\text{H-5'-H-6'}} = 11,2$ Hz i $J_{\text{H-11'-H-12'}} = 11,3$ Hz), kao i *trans*-proton–ugljenik-13 sprežanja ($J_{\text{H-6'-C-4'}} = 12,0$ Hz, $J_{\text{H-5'-C-7'}} = 11,3$ Hz i $J_{\text{H-12'-C-10'}} = 11,0$ Hz). Ove vrednosti su dobijene direktnim očitavanjem iz spektra ili simulacijom; poslednji pristup omogućio je određivanje svih preostalih konstanti. Na sličan način, konfiguracije unutrašnjih dvostrukih veza određene su kao E, što je u skladu sa konfiguracijom u jedinjenjima **31–34**.

Uporedna analiza ^{13}C i ^1H NMR-spektara jedinjenja **38** sa odgovarajućim izomerom metil-parinarata (tabele S1 i S2, prilog) potvrdila je (5Z,7E,11E,13Z)-konfiguraciju. Dakle,

(5*Z*,7*E*,11*E*,13*Z*)-tetradeka-5,7,9,11-tetraen-1-il-2-metilpropanoat (**38**), za koji je po analogiji sa jedinjenjima **31–34**, predloženo ime veronaestar, predstavlja novo prirodno jedinjenje izolovano iz vrste *B. veronense*, srodno jedinjenjima iz vrste *B. praealtum*, pri čemu se razlike ogledaju u vrsti esterifikujuće kiseline i konfiguraciji regiohemijski istog tetraenskog alkohola. Hemotaksonomski gledano, prisustvo ovih jedinjenja u oba taksona predstavlja snažan argument za njihovo svrstavanje u istu sekciju unutar roda *Bupleurum* (sekcija *Aristata*).

Jedinjenje **39** (slika 41), izolovano iz jedne od najpolarnih hromatografskih frakcija ekstrakta **BV**, bilo je podvrgnuto reakciji sililovanja. Dobijen je višestruko trimetilsililovani derivat, čiji je maseni spektar, nakon gubitka fragmenta C₇H₁₄O₂Si, pokazao veliku sličnost sa spektrom trimetilsilil-derivata floroglucinola (Zenkevich et al., 2007), što ukazuje na prisustvo tri fenolne i jedne alkoholne hidroksilne grupe. U IR-spektru uočena je apsorpciona traka na 1630 cm⁻¹, što sugerise na prisustvo karbonilne funkcionalne grupe koja je intramolekulski vodonično vezana i konjugovano stabilizovana sa elektron-donorskom grupom. Takođe, uočena je i široka traka na oko 3241 cm⁻¹, koja odgovara većem broju hidroksilnih grupa. Prisustvo konjugovanog ketona dodatno je potvrđeno signalom u ¹³C NMR-spektru ((CD₃)₂SO) na 203,6 ppm (tabela 21).



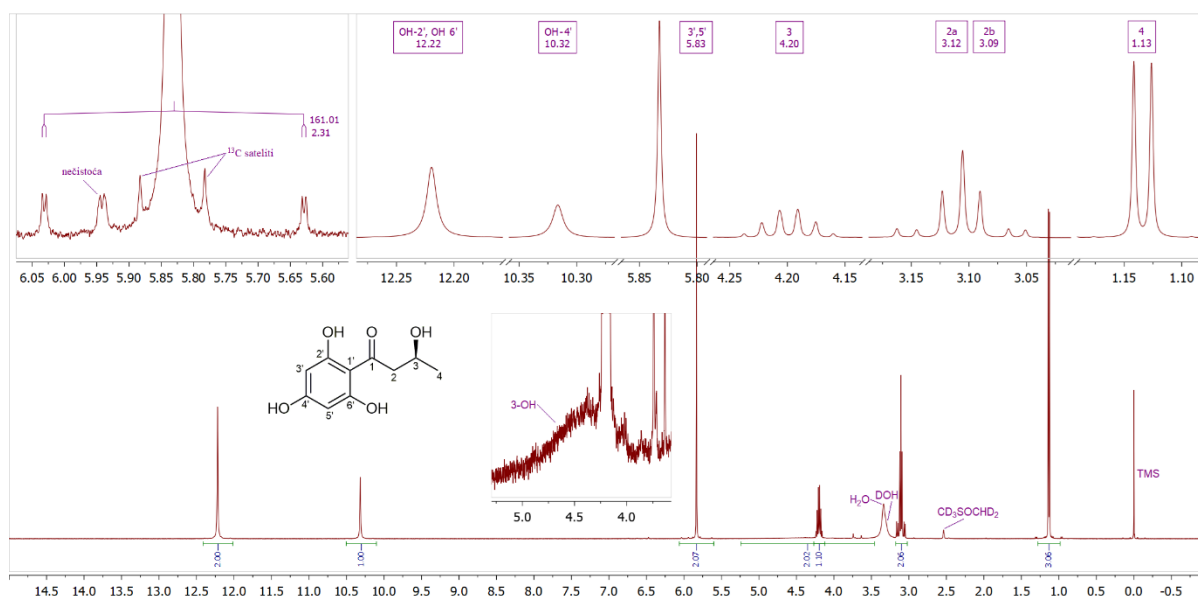
Slika 41. Struktura i numeracija atoma jedinjenja **39** i njegovih *Mosher*-ovih estara sa relevantnim ¹H NMR-podacima

Tabela 21. ^1H (400 MHz) i ^{13}C (100,6 MHz) NMR-podaci veroglucinola (**39**) u $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ i CD_3OD

Pozicija	$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$		CD_3OD		HMBC ¹	NOESY ²
	δ_{C} , tip	δ_{H} , (J u Hz, integral)	δ_{C} , tip	δ_{H} , (J u Hz, integral)		
1	203,6, C	/ ³	205,2, C	/	/	/
2a	52,9, CH_2	3,13, dd (-15,8, 7,1, 1 H)	53,9, CH_2	3,22, dd (-16,0, 5,3, 1 H)	1, 3	4
2b		3,09, dd (-15,8, 5,6, 1 H)		3,18, dd (-16,0, 7,5, 1 H)		
3	63,4, CH	4,20, dqd (7,1, 6,1, 5,6, 1 H)	65,7, CH	4,35, dqd (7,5, 6,1, 5,3, 1 H)	2, 4	2, 4
4	23,8, CH_3	1,13, d (6,1, 3 H)	23,7, CH_3	1,23, d (6,1, 3 H)	2, 3	3
1'	104,3, C	/	104,3, C	/	/	/
2', 6'	164,3, C	/	166,0, C	/	/	/
3', 5'	94,8, CH	5,83, s (2 H)	95,9, CH	5,81, s (2 H)	1', (5', 3')	/
4'	164,7, C	/	166,4, C	/	/	/
OH-2', 6'	/	12,22, s (1 H)	/	/	2', 6'	/
OH-4'	/	10,32, s (1 H)	/	/	4'	/

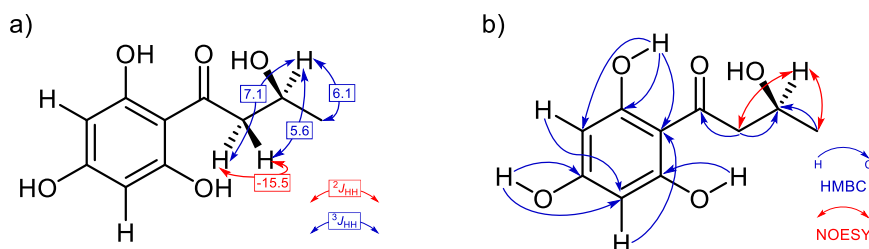
¹ Kuplovanje kroz veći broj veza između protona u koloni pozicija i ugljenika u koloni HMBC. ² Uočene nOe interakcije između protona u koloni pozicija i protona u koloni NOESY. ³ /, nema protona ili nema pozicije.

Odnos integrala signala ^1H NMR-spektaru na 12,22 ppm (OH-2' i 6') i 10,32 ppm (OH-4'), koji odgovaraju izmenljivim protonima fenolnih grupa, kao i signala na 5,83 ppm (H-3' i H-5'), koji potiče od protona na elektron-bogatom aromatičnom prstenu, ukazuju na simetričnu supstituciju jezgra jedinjenja **39** (slika 42). Simetrija aromatičnog prstena potvrđena je i prisustvom *meta*-konstante kuplovanja (2,3 Hz) za hemijski ekvivalentne protone H-3' i H-5', koja je vidljiva kroz cepanje ^{13}C satelita u ^1H NMR-spektaru (slika 39).



Slika 42. ^1H NMR (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) spektar jedinjenja **39** i odgovarajuća uvećanja

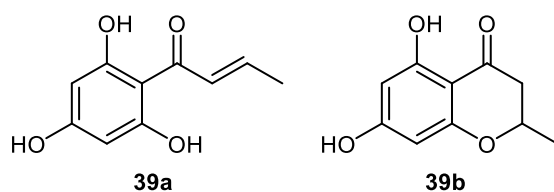
Hemijska pomeranja dijastereotopnih protona H-2a (3,13 ppm) i H-2b (3,09 ppm), kao i njihove gHMBC-korelacije sa ugljenicima C-1 i C-3 (slika 43), pozicioniraju ih α u odnosu na karbonilnu grupu i ukazuju na prisustvo sekundarnog alkoholnog centra unutar aldolnog fragmenta (C-3, 63,4 ppm). Na osnovu svega navedenog, zaključeno je da jedinjenje **39** predstavlja 3-hidroksi-1-(2,4,6-trihidoksifenil)butan-1-on, relativno strukturno jednostavan derivat acilfloroglucinola, ali i novi prirodni proizvod.



Slika 43. a) Konstante sprezanja protona i b) odabrane HMBC- i NOESY-interakcije u jedinjenju **39** ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$)

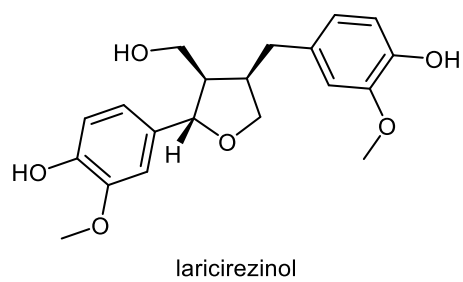
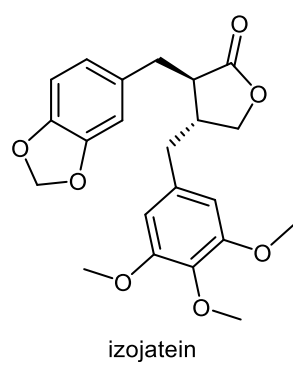
Određivanje konfiguracije hiralnog centra na C-3 zahtevalo je pripremu diastereoizomernih *Mosher*-ovih estara korišćenjem komercijalno dostupnih enantiomerno čistih *Mosher*-ovih kiselina. ^1H NMR-podaci dobijenih estara omogućili su nam da dodelimo konfiguraciju *S* tom centru (slika 41), što je dodatno potvrđeno poređenjem relevantnih hemijskih pomeranja u ^1H NMR-spektrima sa literaturnim podacima za srodna jedinjenja dobijena u enantiospecifičnom koraku redukcije pomoću pekarskog kvasca (Berti et al., 2011). Za jedinjenje **39**, (*S*)-3-hidroksi-1-(2,4,6-trihidroksifenil)butan-1-on, predloženo je ime veroglucinol, zbog njegove veoma ograničene rasprostranjenosti u prirodi.

Rehromatografijom frakcije koja prethodi onoj koja sadrži jedinjenje **39** izolovana su još dva jedinjenja – proizvod njegove dehidratacije **39a**, kao i proizvod dalje ciklizacije ovog konjugovanog enona, odnosno **39b** (slika 44). Jedinjenje **39a** se u literaturi pominje isključivo kao sintetski intermedijer (Tanabe et al., 2017) i do sada nikada nije izolovano iz prirodnih izvora, dok je ciklizovani derivat **39b** ranije izolovan iz biljne vrste *Aphanamixis grandifolia* Blume, Meliaceae (Zeng et al., 2013) i gljive *Xylaria nigripes* (Gong et al., 2008). Čini se da su ova tri jedinjenja – **39**, **39a** i **39b** – međusobno povezana ili biosintetski ili kao artefakti procesa izolovanja. S obzirom na to da **39** postoji kao jedan enantiomer, najverovatniji sled transformacija podrazumeva (laku) dehidrataciju β -hidroksiketona (krotonsku kondenzaciju), pri čemu nastaje konjugovani enon (**39a**), a zatim i intramolekulsku Majklovu adiciju kojom nastaje hromanonski derivat (**39b**). Imajući u vidu da su **39a** i **39b** izolovani u tragovima i da praktično koeluiraju sa jedinjenjem **39**, više argumenata ide u prilog artefaktnoj prirodi ova dva dodatna derivata floroglucinola.



Slika 44. Strukture jedinjenja **39a** i **39b** izolovanih iz uzorka **BV**

Iz ekstrakta vrste *B. veronense* izolovana su još dva lignana – izojatein i laricirezinol (slika 45). Izojatein predstavlja redak derivat dibenzilbutirolaktona, koji je ranije izolovan iz vrste *Piper cubeba* L.f., Piperaceae (Badheka et al., 1986), a detektovan je i u vrsti *Callitris preissii* Miq., Cupressaceae (Xie et al., 2003). S druge strane, laricirezinol je široko rasprostranjen u biljnom svetu (Hanthanong et al., 2019), ali do sada nije identifikovan kao sekundarni metabolit vrsta roda *Bupleurum*.

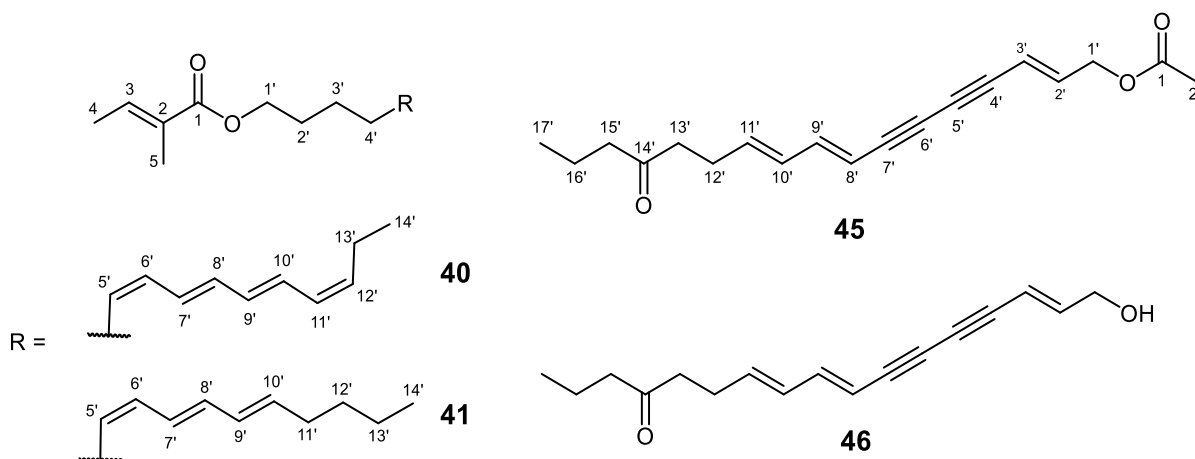


Slika 45. Strukture izojateina i laricirezinola detektovanih u ekstraktu uzorka **BV**

4.4. Analiza hemijskog sastava dietil-etarskog ekstrakta taksona *B. falcatum sensu lato*

Polazeći od činjenice da manje polarni sastojci taksona *B. falcatum* nisu dovoljno istraženi, za razliku od polarnih metabolita, konkretno saikosaponina, u ovom delu biće opisan hemijski sastav dietil-etarskih ekstrakata više populacija taksona *B. falcatum sensu lato*, s ciljem identifikacije potencijalno novih prirodnih jedinjenja. Hromatografskim razdvajanjem na silika-gelu izolovana su tri do sada nepoznata jedinjenja, kao i još jedan metabolit koji ranije nije bio detektovan u biljkama.

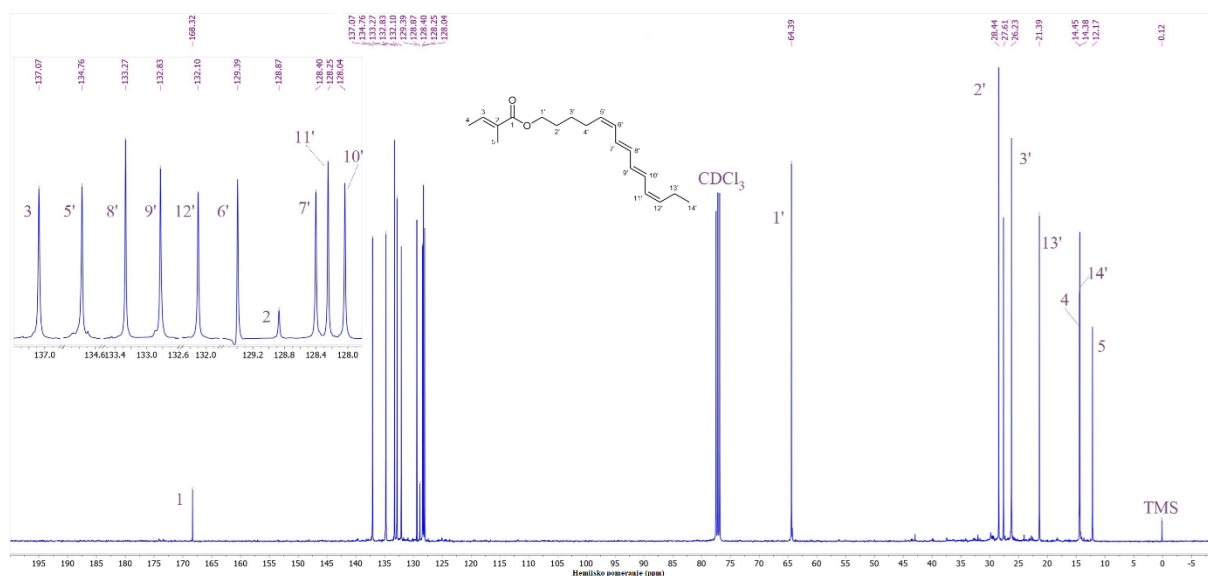
Frakcija dobijena *dry-flash* hromatografijom ekstrakta uzorka *B. falcatum* prikupljenog na Suvoj planini (**BFS**), eluirana smešom heksana i dietil-etra (6:1, v/v), koja je sadržavala jedinjenje **40** (slika 46), 10-nonakozanon i još neke manje zastupljene sastojke, ponovo je hromatografisana na koloni silika-gela, čime je dobijeno 30 mg čistog jedinjenja **40**. Masenom spektrometrijom visoke rezolucije (HREIMS) određena je njegova molekulska formula: $C_{19}H_{28}O_2$ ($\Delta = +0,5$ mmu, slika S41). Karakteristični fragmentni joni (na m/z 91, 105, 117 i 131), uočeni u masenom spektru jedinjenja **40**, ukazuju na visok stepen sličnosti sa prealtaestrima izolovanim iz vrste *B. praealtum*. Na osnovu ove sličnosti pretpostavljeno je da je jedinjenje **40** estar već pomenutog polinezasićenog alkohola – 5,7,9,11-tetradekatetraenola. Razlika između molekulskog jona jedinjenja **40** (m/z 288) i molekulske mase ovog alkohola, u kombinaciji sa uočenim fragmentom na m/z 83, ukazuje na to da je u pitanju estar 5,7,9,11-tetradekatetraenola i neke nezasićene karboksilne kiseline sa pet ugljenikovih atoma.



Slika 46. Strukture i numeracija atoma jedinjenja **40**, **41** i **45**, izolovanih iz ekstrakta taksona *B. falcatum*, kao i jedinjenja **46**

U ^{13}C NMR-spektru jedinjenja **40** uočeno je 19 signala (slika 47), uključujući po jedan signal karbonilnog ugljenika na δ_C 168,3 (C-1) i signal oksigenovanog, sp^3 -hibridizovanog

ugljenika na δ_C 64,4 (C-1'). Signali vodonika metilenske grupe u položaju 1' u 1H NMR-spektru uočeni su na δ_H 4,13 (tabela 22) i pokazali su korelaciju sa signalom C-1 u gHMBC-spektru (slika S39, prilog). Pored signala dveju metil-grupa (δ_H 1,78 i 1,83; tabela 22) u 1H NMR-spektru (slika S38, prilog) koji potiču iz kiselinskog dela molekula, primećen je i dodatni signal metil-grupe, tripleta, bez virtuelne konstante sprezanja, na δ_H 1,01 ($J = 7,5$ Hz), što ukazuje na to da se nezasićenja nalaze blizu ω -kraja alkoholnog lanca, kao i da jedinjenje **40** ne sadrži dodatna račvanja ugljovodoničnog niza. Na osnovu osam sp^2 -CH signala u ^{13}C NMR/DEPT-90-spektrima (tabela 22), zaključeno je da su sva četiri nezasićenja locirana u četiri dvostruke veze, a na osnovu izgleda UV-spektra ovog jedinjenja zaključeno je da su one međusobno konjugovane.



Slika 47. ^{13}C NMR-spektar (100,6 MHz, $CDCl_3$) jedinjenja **40** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala

Njihove pozicije u lancu određene su na osnovu analize gHMBC-spektra (slika S39, prilog) i gradijentnog 1H - 1H COSY-spektra, i nalaze se između C-5' i C-6', C-7' i C-8', C-9' i C-10', kao i C-11' i C-12', pri čemu je na ω -kraju alkoholne grupe prisutna etil-grupa. Geometrija dvostrukih veza C-5'-C-6' i C-11'-C-12' određena je kao Z, na osnovu uočenih konstanti sprezanja između olefinskih protona ($J_{H-5'-H-6'} = J_{H-11'-H-12'} = 11,0$ Hz). Poređenje sa NMR-podacima srodnih prealtaestara dodatno je potvrdilo (5Z,7E,9E,11Z) konfiguraciju jedinjenja **40**. NOESY- i ROESY-korelacije uočene za jedinjenje **40** podržavaju ove konfiguracije dvostrukih veza. Ipak, zbog vrlo sličnih hemijskih pomeranja vodonika unutrašnjih dvostrukih veza, nisu sve uzajamne korelacije protona bile jasno uočljive. Za ove

protone, spinska simulacija je bila od ključnog značaja za potvrdu konfiguracije, preciznim reprodukovanjem oblika uočenih signala. Svi dobijeni podaci su u skladu sa predloženim konfiguracijama i slažu se sa podacima datim za jedinjenja izolovana iz **BP-1** uzorka opisanih u delu 4.1 i 4.2. Pored toga, ^{13}C NMR-pomeranja C-4' i C-13' alilnih metilenskih grupa bila su u saglasnosti sa vrednostima zabeleženim za veronaestar, koji takođe poseduje (5Z,7E,9E,11Z)-konfiguraciju. Kao što je i očekivano, odgovarajuća pomeranja za prealtaestar A, koji sadrži (5Z,7E,9E,11E)-5,7,9,11-tetradekatetraenil-grupu, razlikovala su se značajno jedino za C-13', za približno 4 ppm.

Tabela 22. ^1H (400 MHz) i ^{13}C (100,6 MHz) NMR-podaci (CDCl_3) jedinjenja **40** i **41** (NMR-spektralni podaci su dobijeni spinskom simulacijom)

Jedinjenje 40			Jedinjenje 41		
Pozicija	δ_{H} m, (J u Hz, integral) ¹	δ_{C} , tip	Pozicija	δ_{H} m, (J u Hz, integral)	δ_{C} , tip
1	/	168,3, C	1	/	168,3, C
2	/	128,9, C	2	/	128,8, C
3	6,85 qq (7,1, 1,4, 1 H)	137,1, CH	3	6,85 qq (7,0, 1,5, 1 H)	137,3, CH
4	1,78 d (7,1, 3 H)	14,4, CH_3	4	1,79 dq (7,0, 1,2, 3 H)	14,4, CH_3
5	1,83 d (1,4, 3 H)	12,2, CH_3	5	1,83 dq (1,5, 1,2, 3 H)	11,8, CH_3
1'a	4,13 dd (7,7, 5,5, 1 H)	64,4, CH_2	1'a	4,13 dd (7,0, 1 H)	64,2, CH_2
1'b	4,13 dd (7,7, 5,5, 1 H)		1'b	4,13 dd (7,0, 1 H)	
2'a	1,69 dddd (9,8, 7,7, 5,6, 5,5, 1 H)	28,4, CH_2	2'a	1,69 dddd (9,0, 7,0, 5,0, 1 H)	26,1, CH_2
2'b	1,69 dddd (9,8, 7,7, 5,6, 5,5, 1 H)		2'b	1,69 dddd (9,0, 7,0, 5,0, 1 H)	
3'a	1,49 dddd (9,8, 5,6, 1 H)	26,2, CH_2	3'a	1,48 dddd (9,0, 5,0, 1 H)	26,9, CH_2
3'b	1,49 dddd (9,8, 5,6, 1 H)		3'b	1,48 dddd (9,0, 5,0, 1 H)	
4'a	2,23 dddd (9,8, 7,8, 5,6, 1,7, 1 H)	27,6, CH_2	4'a	2,12 dddd (9,0, 7,3, 5,0, 1,3, 1 H)	27,6, CH_2
4'b	2,23 dddd (9,8, 7,8, 5,6, 1,7, 1 H)		4'b	2,12 dddd (9,0, 7,3, 5,0, 1,3, 1 H)	
5'	5,46 dddd (11,0, 7,8, -1,7, 1 H)	134,8, CH	5'	5,38 dddd (10,8, 7,3, -0,8, 1 H)	132,0, CH
6'	6,06 ddddd (11,0, 1,7, -0,7, 1 H)	129,4, CH	6'	6,02 ddddd (11,4, 10,8, 1,3, -0,7, 1 H)	129,3, CH
7'	6,50 ddddd (15,2, 11,0, -1,7, -0,8, -0,6, 1 H)	128,4, CH	7'	6,36 dddd (14,8, 11,4, -0,8, -0,7, 1 H)	125,9, CH
8'	6,27 dddd (15,2, 12,0, -0,8, -0,7, 1 H)	133,3, CH	8'	6,17 dddd (14,8, 10,8, -0,7, -0,7, 1 H)	132,0, CH
9'	6,26 dddd (15,2, 12,0, -0,8, -0,7, 1 H)	132,8, CH	9'	6,0980 ddddd (15,0, 10,8, -0,7, 1,3, 1 H)	130,6, CH
10'	6,48 ddddd (15,2, 11,0, 1,0, -0,8, -0,6, 1 H)	128,0, CH	10'	5,71 dddd (15,0, 6,9, -0,7, 1 H)	135,6, CH
11'	6,01 ddddd (11,0, 1,6, -0,7, 1 H)	128,2, CH	11'a	2,10 dddd (6,9, 7,2, 1,3, 1 H)	32,6, CH_2
			11'b	2,10 dddd (6,9, 7,2, 1,3, 1 H)	
12'	5,43 dddd (11,0, 7,8, 1,0, 1 H)	132,1, CH	12'a	1,29 dddd (9,0, 7,2, 5,0, 1 H)	31,6, CH_2
			12'b	1,29 dddd (9,0, 7,2, 5,0, 1 H)	

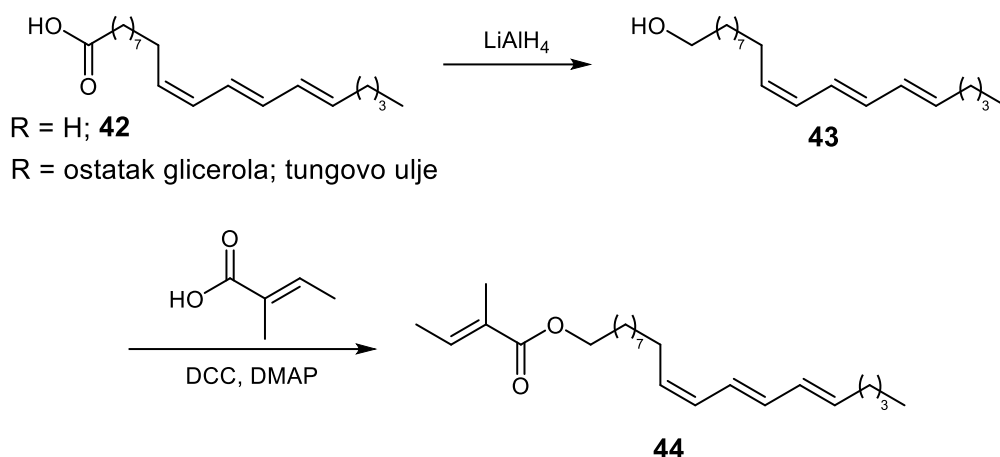
13'a	2,24 ddd (7,8, 7,5, 1,6, 1 H)	21,4, CH ₂	13'a	1,37 ddd (9,0, 7,0, 5,0, 1 H)	22,5, CH ₂
13'b	2,24 ddd (7,8, 7,5, 1,6, 1 H)		13'b	1,37 ddd (9,0, 7,0, 5,0, 1 H)	
14'	1,01 t (7,5, 3 H)	14,4, CH ₃	14'	0,90 t (7,0, 3 H)	14,1, CH ₃

¹ Vrednosti konstanti sprežanja su inicijalno određene iz eksperimenata selektivnog homodekuplovanja, a zatim su utačnjavane koristeći spinsku simulaciju.

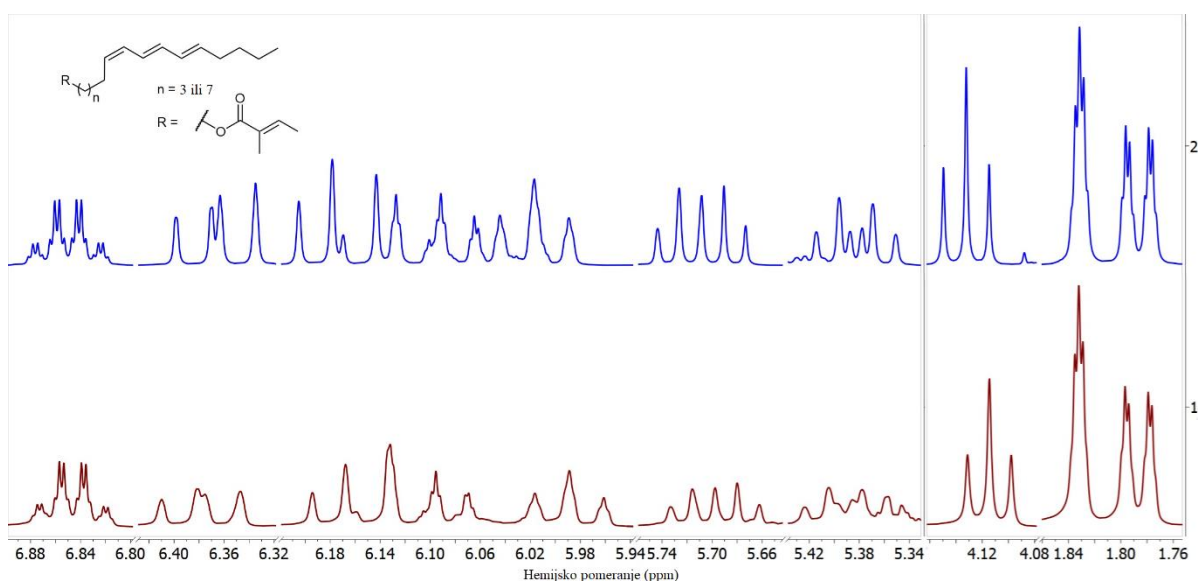
U TIC-hromatogramu iste frakcije **BFS** ekstrakta koja je sadržavala jedinjenje **40**, uočen je dodatni pik sa sličnom fragmentacijom u masenom spektru. Molekulski jon je detektovan na m/z 290, za koji je na osnovu HREIMS-analize zaključeno da odgovara molekulskoj formuli $C_{19}H_{30}O_2$, što ukazuje na to da jedinjenje ima jednu dvostruku vezu manje u odnosu na jedinjenje **40**. Fragmentni jon na m/z 83 upućuje na to da se radi o estru tiglinske kiseline (kao i u slučaju jedinjenja **40**), pri čemu alkoholni deo molekula sadrži jedno nezasićenje manje. Naknadnim postupcima prečišćavanja dobijena je frakcija obogaćena jedinjenjem **41** (slika 46).

Analiza NMR-spektra ove frakcije nije bila jednostavna, budući da je došlo do preklapanja signala u delu u kome se javljaju protoni dvostrukih veza, što je onemogućilo donošenje jasnih zaključaka. Na osnovu gHMBC-interakcija, pretpostavljeno je da su dvostruke veze u jedinjenju **41** smeštene u položajima C-5', C-7' i C-9', ali je ovu pretpostavku bilo potrebno potvrditi, a i odrediti konfiguraciju dvostrukih veza. Zato je sintetisano model jedinjenje sa pretpostavljenom regiohemijom tri dvostruke veze, koje je poslužilo za određivanje konfiguracije.

α -Eleostearinska kiselina (**42**), odnosno (9Z,11E,13E)-9,11,13-oktadekatrienska kiselina, koja sadrži tri konjugovane dvostruke veze i koja ima (ω -5)-regiohemiju, kao i jedinjenje **41**, može se lako dobiti iz komercijalnog tungovog ulja (*Vernicia fordii* (Hemsl.) Airy Shaw, Euphorbiaceae, Madbouly et al., 2016). Direktnom redukcijom tungovog ulja sa $LiAlH_4$ dobija se tetrahomo-alkohol u odnosu na onaj koji se nalazi u jedinjenju **41** (**43**, šema 7). Ovaj alkohol (**43**) je dalje esterifikovan tiglinskom kiselinom, čime je dobijen odgovarajući homologi estar ((9Z,11E,13E)-oktadeka-9,11,13-trien-1-il-tiglat, **44**). 1H NMR-spektri sintetisanog model-jedinjenja **44** i frakcije obogaćene jedinjenjem **41** su međusobno upoređeni (slika 48), čime je sa sigurnošću potvrđeno prisustvo i položaj tri konjugovane dvostruke veze u alkoholnom delu estra, kao i njihova (5Z,7E,9E)-konfiguracija. Takođe, očekivana razlika u retencionim indeksima za ova dva jedinjenja od približno 400 jedinica (RI 2652 za jedinjenje **44** i 2253 za jedinjenje **41**) dodatno je potvrdila identifikaciju jedinjenja **41** kao (5Z,7E,9E)-tetradeka-5,7,9-trien-1-il-(E)-2-metilbut-2-enoata u ekstraktu uzorka **BFS**.



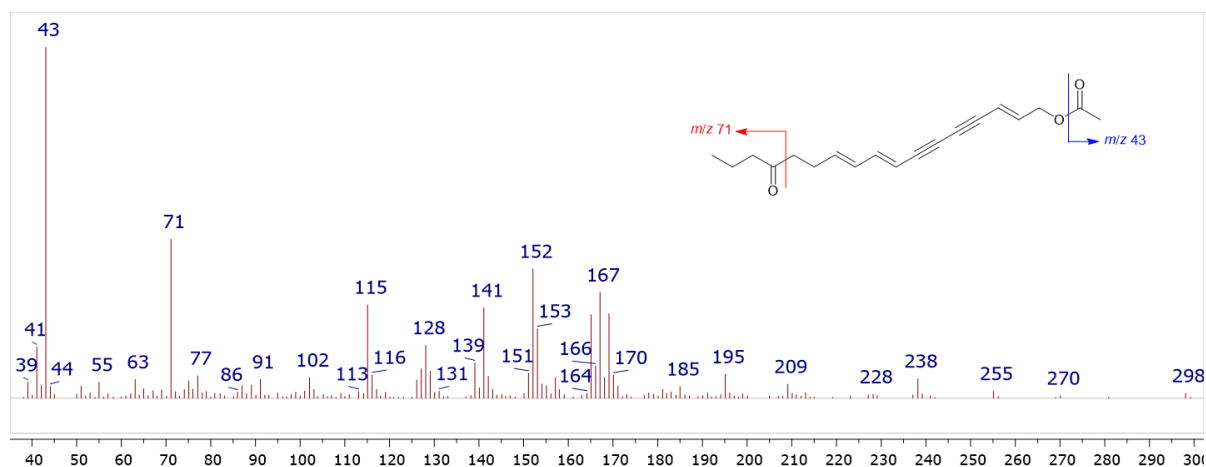
Šema 7. Sinteza (9Z,11E,13E)-oktadeka-9,11,13-trien-1-il-tiglata (**44**)



Slika 48. Odabrana uvećanja ^1H NMR-spektra jedinjenja **41** (gore) i jedinjenja **44** (dole)

Jedna od polarnijih frakcija dobijena *dry-flash* hromatografijom ekstrakta **BFS** (heksan : Et₂O = 3:2, v/v) predstavljala je smešu koja je sadržavala jedinjenje **45** (slika 46). Na osnovu karakteristične fragmentacije (dominantni joni na m/z 43, 71, 115 i molekulski jon na m/z 298), pretpostavljeno je da se radi o acetatu jedinjenja **46** ((7E,9E,15E)-17-hidroksiheptadeka-7,9,15-trien-11,13-diin-4-on). Na osnovu HREIMS spektra, molekulaska formula jedinjenja **45** određena je kao C₁₉H₂₂O₃. Kao i za jedinjenje **46** (Bohlmann & Viehe, 1955; Bohlmann & Rode, 1968b; videti ispod), karbonilna grupa uočena je na δ_C 209,8 u ^{13}C NMR-spektru, a njena pozicija na C-14' potvrđena je prisustvom fragmenta m/z 71 (acilijum jon) u masenom spektru (slika 49). Konstanta sprežanja protona H-2' i H-3' (15,8 Hz) potvrdila je *E*-konfiguraciju dvostruke veze. gHMBC-interakcija protona u položaju 1, sa estarskim ugljenikom C-1 na δ_C 170,4 dodatno je potvrdila identitet jedinjenja kao acetata. Spektralni podaci za jedinjenje **45**

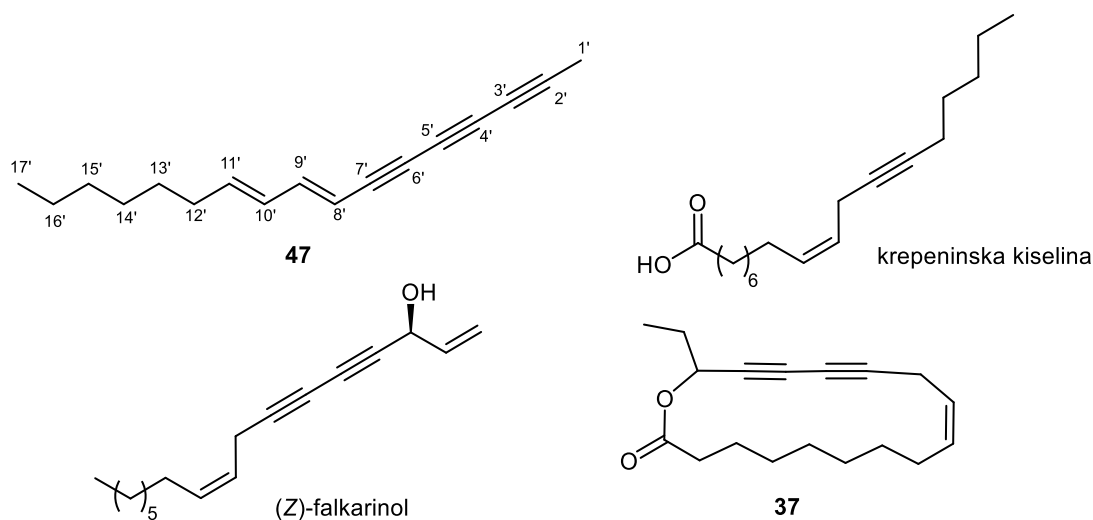
navedeni su u radu *Sommerwerk*-a i saradnika (sintetski derivat, *Sommewerk et al.*, 2015), a ovde se po prvi put pominje kao novo prirodno jedinjenje.



Slika 49. EIMS (70 eV) spektar jedinjenja **45**

Dry-flash hromatografijom ekstrakta taksona *B. falcatum* sakupljenog na planini Galičica (**BFG**) dobijeno je 25 frakcija. Frakcija 9 (heksan : dietil-etar = 13:1, v/v), sadržavala je jedinjenje **47** (slika 50), sa molekulskim jonom na m/z 224 i fragmentnim jonima na m/z 139, 152 i 165, što ukazuje na visok stepen nezasićenja (ekvivalentan propenilnaftalenu ili tetrainu). Na osnovu HREIMS-analize ($\Delta = +0,5$ mmu), molekulska formula jedinjenja **47** određena je kao $C_{17}H_{20}$, što je u skladu sa predloženim brojem nezasićenja.

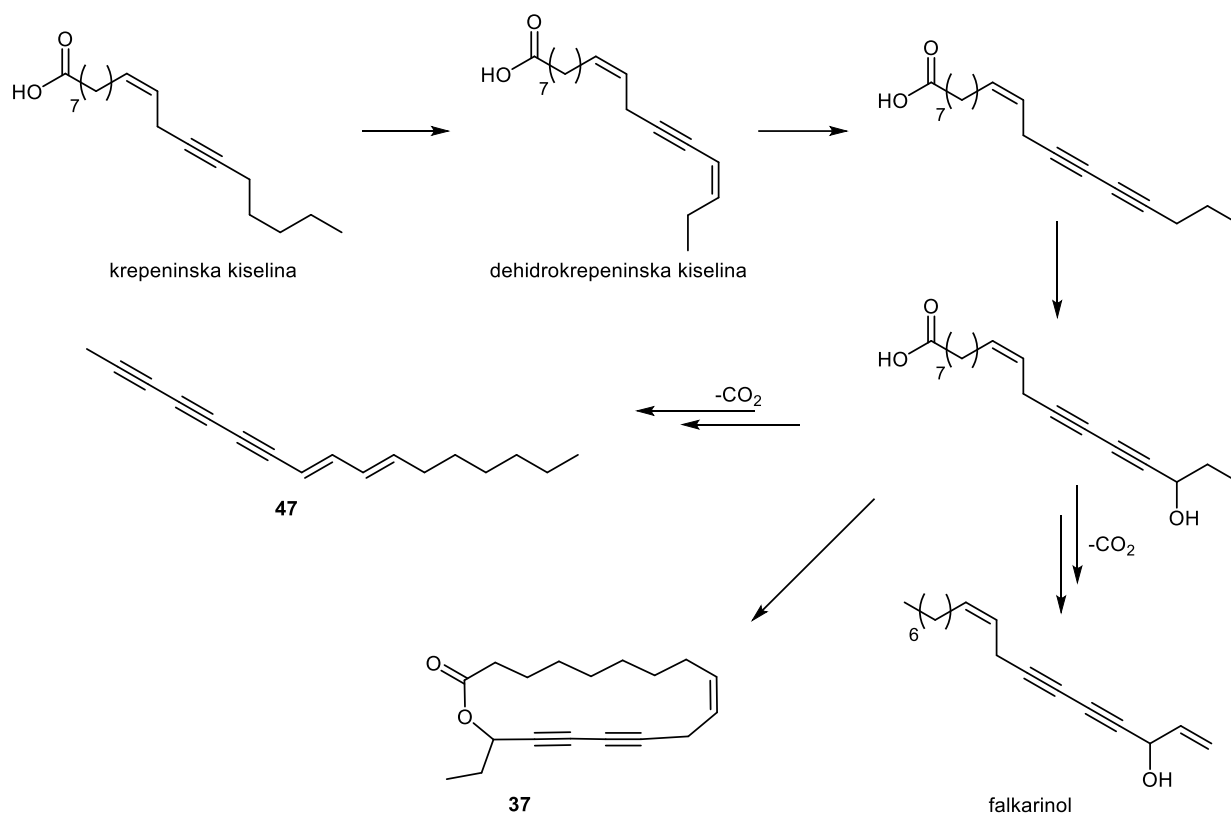
U ^{13}C NMR-spektru uočeno je 17 signala, a analiza DEPT-spektara ukazala je na prisustvo četiri sp^2 -C-H signala (tabela 23). Konstante sprezanja protona vezanih za ove ugljenike, H-8 i H-9, kao i H-10 i H-11, iznosile su približno 15,6 i 15,1 Hz, što ukazuje na *trans*-konfiguraciju dvostrukih veza. Pored toga, konstanta sprezanja protona H-9 i H-10 sugerise da dve dvostruke veze zauzimaju *s-trans* konformaciju. U DEPT-spektrima uočeno je prisustvo sedam sp^3 -hibridizovanih ugljenikovih atoma: pet metilenskih i dve metil-grupe, pri čemu se jedna metil-grupa javljala na niskom hemijskom pomeranju δ_C 4,9. Uočeno je i postojanje šest neprotonovanih ugljenika u rasponu hemijskih pomeranja δ_C 59,5–78,6, koji su prepoznati kao sp -hibridizovani ugljenici u okviru tri trostruke veze.



Slika 50. Strukture jedinjenja **47**, krepeninske kiseline, (Z)-falkarinola i homodihidrofalkarinolida (**37**)

Signal ugljenika na δ_C 4,86, sa karakterističnim hemijskim pomeranjem propargil-metil-grupe, vezan je za protone na hemijskom pomeranju δ_H 1,99 (tabela 23), a njihove gHMBC-interakcije sa signalima na δ_C 78,6 i 65,2 (koji odgovaraju ugljenicima C-2 i C-3) nedvosmisleno potvrđuju da je ova metil-grupa direktno vezana za *sp*-hibridizovani ugljenik. Dodatne, iako slabije, gHMBC-korelacije ovih protona sa ugljenicima na δ_C 68,0 i 59,5 sugerišu da se radi o ugljenicima trostruke veze C-4 i C-5. Takođe, interakcije protona H-9 i H-8 sa ugljenicima C-7 i C-6, kao i „slabije“ interakcije sa C-5 i C-4 u gHMBC-spektrom, zajedno sa poređenjem sa dostupnim podacima iz literature (Bohlmann & Brehm, 1979; Hearn & Turner, 1976; Zeisberg & Bohlmann, 1974), omogućile su asignaciju signala ovih šest *sp*-hibridizovanih ugljenika. Na taj način, jedinjenje je identifikovano kao (8*E*,10*E*)-heptadeka-8,10-dien-2,4,6-triin, novo jedinjenje izolovano iz uzorka **BFG**.

Može se pretpostaviti da biosinteza jedinjenja **47** i homodihidrofalkarinolida (**37**, slika 4), identifikovanog u vrsti *B. veronense*, prati tzv. krepeninski biosintetski put, kao što je diskutovano u slučaju poliacetilena falkarinolskog tipa (Dawid et al., 2015; Hansen & Boll, 1986). Ukratko, oleinska kiselina podleže nizu desaturacija i acetilenizacija kako bi se formirale linolna kiselina, krepeninska kiselina i dehidrokrepeninska kiselina, ključni intermedijeri na putu ka poliacetilenskim skeletima (Ahmad et al., 2019; Hansen & Boll, 1986). Kod falkarinola i homodihidrofalkarinolida, intermedijerna 17,18-didehidro kiselina se oksiduje, hidroksiluje i na kraju dekarboksiluje kako bi se dobio konačni skelet falkarinola (slika 51).



Slika 51. Biosintetski put sinteze falkarinola i jedinjenja **37** (BV) i **47** (BFG)

Na osnovu predstavljene strukturne analize može se predložiti biosintetski put koji vodi do jedinjenja **47**, a koji se odvaja od standardnog biosintetskog puta falkarinola nakon hidroksilacije – koraka ključnog za nastanak karakteristične 3-hidroksi-grupe kod falkarinola (slika 51). Ova razlika u toku biosinteze dovodi do jedinstvene strukture jedinjenja **47** i otvara mogućnost da ono predstavlja ili do sada neprepoznat međuprodukt u okviru falkarinol-serije, ili granu iz koje nastaju strukturno srodni derivati.

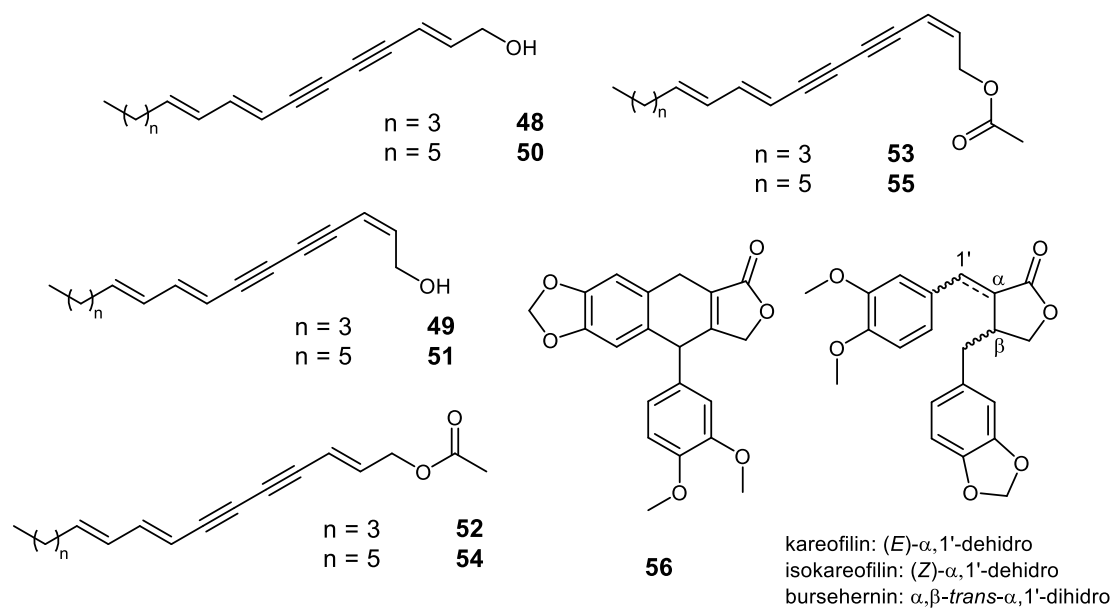
Zanimljiva paralela ovim pretpostavkama jeste i prisustvo strukturno srodnog jedinjenja, pentadeka-8,10-dien-2,6,4-triina, u vrsti *Jungia spectabilis* D.Don (Asteraceae, Bohlmann & Zdero, 1977). Budući da vrste roda *Jungia* L.f. obično imaju drugačije terminalne supstituente u svojim poliacetilenima u poređenju sa falkarinol-tipom, pretpostavlja se da njihova biosinteza sledi drugačiji, „ne-falkarinolski“ put (Bohlmann & Zdero, 1977). Kada uzmemo u obzir sve navedene činjenice možemo zaključiti da prisustvo homologih C_{15} i C_{17} poliacetilenima u porodicama Apiaceae i Asteraceae ukazuje na postojanje konvergentnih, ali ipak različitih biosintetskih puteva u različitim biljnim porodicama, što dodatno potvrđuje biohemijsku prilagodljivost metabolizma acetilenskih lipida.

Tabela 23. ¹H (400 MHz) i ¹³C (100,6 MHz) NMR-podaci (CDCl₃) jedinjenja **47**

Pozicija	δ_H m (J u Hz, integral) ¹	δ_C , tip
1	1,99 s (3 H)	4,9, CH ₃
2	/ ²	78,5, C
3	/	65,2, C
4	/	68,0, C
5	/	59,5, C
6	/	76,5, C
7	/	75,6, C
8	5,48 ddd (15,6, 0,7, 0,6, 1 H)	106,7, CH
9	6,74 ddd (15,6, 10,9, 0,6, 1 H)	147,0, CH
10	6,10 ddtd (15,1, 10,9, 1,3, 0,7, 1 H)	129,5, CH
11	5,89 dtdd (15,1, 7,2, 0,6, 1 H)	141,1, CH
12	2,12 m (7,2, 1,3, 2 H)	33,06, CH ₂
13 ³	1,37 preklopljeni multipleti (2 H)	28,98, CH ₂
14 ³	1,31 preklopljeni multipleti (2 H)	29,85, CH ₂
15 ³	1,25 preklopljeni multipleti (2 H)	31,79, CH ₂
16 ³	1,29 m (7,2, 2 H)	22,71, CH ₂
17	0,88 t (7,2, 3 H)	14,21, CH ₃

¹ Vrednosti konstanti sprežanja su inicijalno određene iz eksperimenata selektivnog homodekuplovanja, a zatim su utačnjavane koristeći spinsku simulaciju. ² Nema protona. ³ Preklopljeni multipleti; signali nisu simulirani.

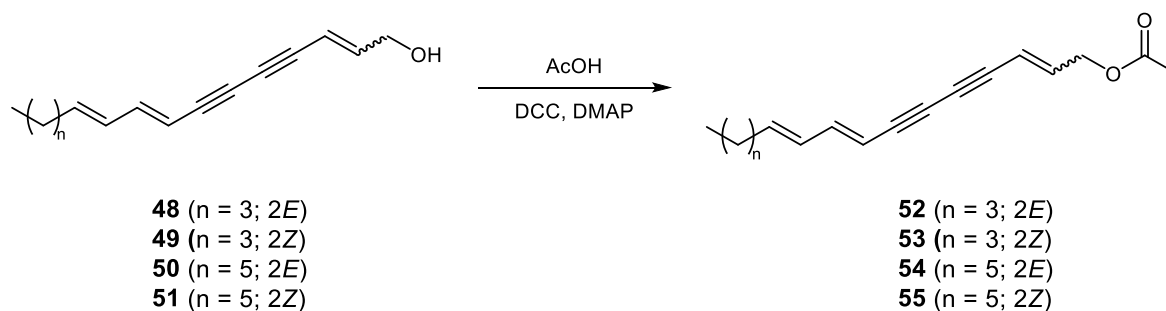
Inicijalna GC-MS-analiza dietil-etarskog ekstrakta uzorka **BFS** omogućila je dodatnu identifikaciju 10-nonakozanona (15,3%) kao dominantnog isparljivog sastojka (pod uslovima GC-analize), zajedno sa germakrenom D (4,1%), dugolančanim aldehydima (heksakozanal 6,0%, oktakozanal 4,1%), alkoholima (1-heksakozanol 9,8%) i *n*-alkanima (tabela 24). *Dry-flash* hromatografija ekstrakta rezultovala je u dobijanju 30 frakcija, pri čemu je identifikacija jedinjenja **40**, **41** i **45** iz frakcija 11 i 18 već opisana. Frakcija 10 (heksan : Et₂O = 12:1, v/v) sadržavala je pretežno dugolančane aldehide i metil-estre masnih kiselina. U frakciji 20, koja je eluirana smešom heksan-Et₂O (1:4, v/v), identifikovano je čisto jedinjenje **48** – (2*E*,8*E*,10*E*)-pentadekatrien-4,6-diin-1-ol (slika 52), što je potvrđeno NMR-analizom, a spektroskopski podaci su bili u skladu sa onim dostupnim u literaturi (Bohlmann & Zdero, 1971; Huang et al., 2009).



Slika 52. Strukture jedinjenja **48–56** identifikovanih u ekstraktu uzorka **BFS**, kao i lignana detektovanih u ekstraktu uzorka **BFG**

Prethodna frakcija (19, heksan : Et₂O = 3:2, v/v) sadržavala je smešu (*2E,8E,10E*)- i (*2Z,8E,10E*)-pentadekatrien-4,6-diin-1-ola (**48** i **49**, slika 52), bupleurinola i njegovog stereoizomera (**51** i **50**, slika 52; Ma et al., 2017), što je određeno na osnovu poređenja masenih spektara i vrednosti retencionih indeksa (videti eksperimentalni deo).

U manje polarnoj frakciji (13, heksan : Et₂O = 4:1, v/v) detektovana su četiri jedinjenja (**52–55**), koja su, u svojim masenim spektrima, imala osnovni jon na *m/z* 43 i sličan način fragmentacije kao i jedinjenja **48–51**. Na osnovu ovoga i molekulskih jona, preliminarno su identifikovana kao acetati pomenutih alkohola. Radi potvrde, frakcija 19 je podvrgnuta *Steglich*-ovoj esterifikaciji sirćetnom kiselinom, a retencioni indeksi i maseni spektri dobijenih estara upoređeni su sa podacima za jedinjenja detektovana u frakciji 13 (šema 8). Ova analiza je potvrdila da su jedinjenja **52–55** zaista acetati alkohola **48–51** (slika 52).



Šema 8. Sintaza jedinjenja **52–55**

Frakcija 26 (EtOAc, 20 mg) predstavljala je kao čisti lignan (**56**, slika 52) prethodno detektovan u vrsti *B. handiense* (Lopez et al., 1996). Hidroksilovani polinezasićeni keton **46** (slika 46) detektovan je u frakciji 23 (Et₂O, v/v, 170 mg) kao deo kompleksne smeše. Njegov identitet je najpre pretpostavljen na osnovu analize njegovog masenog spektra, a zatim potvrđen i NMR-analizom. U ¹³C NMR-spektru frakcije 23 uočen je signal na δ_C 203,5, što ukazuje na prisustvo ketona, dok su u ¹H NMR-spektru uočeni signali na δ_H 5,5 i 5,7 sa konstantom sprežanja od 15 Hz, što potvrđuje *E*-konfiguraciju dvostruke veze na poziciji 2.

Uparedna analiza dietil-etarskih ekstrakata četiri taksona roda *Bupleurum* (**BFS**, **BFK**, **BFG** i **BS**, tabela 24) ukazuje na izraženu fitohemijsku raznolikost, što je u skladu sa ranijim zapažanjima o morfološkoj i taksonomskoj složenosti ove grupe (Micevski, 2005; Nikolić, 1973). Dobijeni rezultati dodatno potvrđuju da varijacije u metaboličkom profilu mogu odražavati genetske i ekološke faktore koji oblikuju različite hemotipove.

Tabela 24: Hemijski sastav dietil-etarskih ekstrakata uzoraka **BFS**, **BFK**, **BFG** i **BS**

RI ¹	RI ²	Jedinjenje ³	Relativna zastupljenost, % ⁴			
			BFS	BFK	BFG	BS
1100	1100	Undekan ⁵	0,2	- ⁶	0,3	-
1424	1419	β -Ilangen	-	-	0,1	-
1420	1417	(<i>E</i>)-Kariofilen ⁵	0,2	-	-	-
1489	1484	Germakren D ⁵	4,1	-	tr ⁷	tr
1504	1500	Biciklogermakren	0,2	-	-	-
1512	1505	β -Bisabolen	-	-	0,1	-
1550	1542	(<i>E</i>)- α -Bisabolen	-	-	0,1	-
1844	1841	Neofitadien (Izomer 1)	-	-	0,2	-
2116	/	Jedinjenje 49	2,2	4,5	-	-
2110	2104	(<i>E</i>)-Fitol ⁵	-	-	0,8	-
2196	/	Jedinjenje 48	10,1	17,6	-	-
2210	/	Jedinjenje 47	-	-	5,1	-
2219	/	Stereoizomer jedinjenja 52 ⁹	-	0,3	-	-
2229	/	Prealtaestar B	0,6	-	-	-
2232	/	Stereoizomer 1 prealtaestara B	1,5	0,1	-	0,7
2236	/	Stereoizomer 2 prealtaestara B	-	0,3	-	0,7
2240	/	Stereoizomer 3 prealtaestara B	-	1,0	-	4,5
2245	/	Jedinjenje 53	0,3	-	-	-
2253	/	Jedinjenje 41	0,6	0,6	-	1,4
2270	/	Stereoizomer 4 prealtaestara B	-	0,6	-	1,6

2274	/	Stereoizomer 5 prealtaestara B	-	0,5	-	2,6
2300	2300	Trikozan ⁵	-	0,1	0,1	0,4
2310	/	Jedinjenje 52	2,2	10,5	-	-
2331	/	Jedinjenje 40	10,3	1,0	-	1,4
2338	/	Jedinjenje 51	tr	0,7	1,8	-
2341	/	Stereoizomer 1 jedinjenja 40	3,4	4,7	-	6,1
2358	/	Stereoizomer 1 jedinjenja 50	-	-	-	4,9
2371	/	Stereoizomer 2 jedinjenja 40	0,3	1,2	-	1,3
2378	/	Stereoizomer 3 jedinjenja 40	tr	1,9	-	2,8
2416	/	Jedinjenje 50	4,6	6,3	0,8	-
2432	2432	Dokozanal ⁵	-	-	0,1	-
2434	/	Stereoizomer 2 jedinjenja 50	-	-	-	5,2
2500	2500	Pentakozan ⁵	0,4	0,1	0,5	0,8
2532	/	Jedinjenje 54	0,5	4,8	0,1	-
2595	2595	1-Heksakozen	-	-	0,1	-
2600	2600	Heksakozan ⁵	-	-	0,1	-
2639	2632	Tetrakozanal ⁵	0,2	0,4	0,2	0,4
2700	2700	Heptakozan ⁵	0,9	0,2	1,5	1,1
2742	2738	Pentakozanal	tr	0,1	-	tr
2800	2800	Oktakozan ⁵	tr	-	-	-
2831	2835	(<i>E,E,E,E</i>)-Skvalen ⁵	-	-	0,2	-
2845	2833	Heksakozanal ⁵	6,0	9,6	6,0	7,1
2900	2900	Nonakozan ⁵	-	0,3	1,1	1,0
2908	2906	1-Heksakozanol ⁵	9,8	-	3,0	0,9
2946	2944	Heptakozanal	0,3	0,1	0,3	-
3049	3040	Oktakozanal ⁵	4,1	3,9	3,3	4,0
3097	3090	10-Nonakozanon	15,3	8,8	0,6	40,1
3100	3100	Hentriakontan ⁵	-	0,1	0,4	-
3111	3111	1-Oktakozanol ⁵	6,7	4,8	-	-
3112	3111	10-Nonakozanol	-	-	9,5	-
3120	/	Bursehernin ¹⁰	-	-	21,3	-
3148	3149	α -Tokoferol ⁵	1,6	-	3,6	2,8
3175	/	Kareofilin ¹¹	-	-	12,6	-
3186	/	Izokareofilin ¹²	-	-	2,7	-
3251	3250	Triakontan	-	-	0,4	0,8
Ukupno identifikovano (%):			86,6	85,1	77,0	92,6

¹ Eksperimentalno određeni retencioni indeksi na koloni DB-5MS, u odnosu na seriju *n*-alkana (C₁₀-C₃₃). ² Literaturne vrednosti retencionih indeksa preuzetih iz odgovarajućih baza (Adams, 2007; NIST, 2017); osim ukoliko nije naglašeno drugačije. ³ Jedinjenje je identifikovano na osnovu poređenja masenih spektara i retencionih indeksa sa onim dostupnim u literaturi. ⁴ Date vrednosti su rezultat tri individualne analize; Relativna zastupljenost (%) je određena integraljenjem TIC-hromatograma, bez primene korekcionih faktora. ⁵ Identitet jedinjenja potvrđen je ko-injekcijom sa standardom. ⁶ -, Nije detektovano analizom sirovih ekstrakata. ⁷ tr, tragovi (<0,05%). ⁸ Nema dostupnih podataka; verovatno

novo ili prvi put identifikovano jedinjenje.⁹ Ovde se stereoizomer odnosi na diastereoizomer koji se razlikuje isključivo u konfiguraciji dvostrukih veza.¹⁰ EIMS (70 eV) *m/z* (%): 371 (11), 370 (48), 177 (14), 152 (24), 151 (74), 136 (13), 135 (100), 107 (14), 105 (11), 77 (25) (McDoniel & Cole, 1972).¹¹ EIMS (70 eV) *m/z* (%): 368 (14), 234 (13), 233 (96), 177 (36), 146 (13), 135 (100), 131 (11), 115 (9), 77 (31), 51 (11) (González et al., 1990; Mikaya et al., 1981).¹² EIMS (70 eV) *m/z* (%): 368 (13), 234 (14), 233 (100), 177 (42), 146 (15), 135 (86), 131 (12), 115 (10), 77 (30), 51 (12) (González et al., 1990; Mikaya et al., 1981).

Hemotaksonomski profil, koji karakteriše relativno visok sadržaj 10-nonakozanona, 1-heksakozanola, heksakozanala i jedinjenja **40**, jasno izdvaja uzorak sa Suve planine (**BFS**) u odnosu na ostale ispitivane taksone. Ovaj hemotip se stoga najverovatnije može dovesti u vezu sa taksonom *B. falcatum* f. *latifolium*, za koji je Nikolić (1973) naveo da je rasprostranjen isključivo na Suvoj planini.

Dalje, iako je Micevski (2005) pretpostavio da je na Šar-planini dominantna podvrsta *B. falcatum* subsp. *cernuum*, hemijski profil uzorka **BFK** sa te lokacije ukazuje na verovatno prisustvo mešovitenih morfotipova. Većina analiziranih jedinki pokazuje morfološke karakteristike tipične za *B. falcatum* subsp. *falcatum*, dok su u okviru iste populacije zabeležene i jedinke čije su osobine u skladu sa opsiom podvrste *B. falcatum* subsp. *cernuum*. Ova pojava može ukazivati na postojanje zone potencijalne simpatrije između navedenih taksona, što implicira potrebu za dodatnim ispitivanjem prisustva hibridnih ili intermedijernih populacija. Morfološka varijabilnost se dalje odražava i na hemijski sastav, pri čemu su u **BFK** ekstraktu najzastupljenija isparljiva jedinjenja **48** i **52**, uz manju zastupljenost dugolančanih alkana i alkohola u poređenju sa ekstraktom **BFS**.

Uzorak sa Olimpa (**BS**) imao je najviši sadržaj 10-nonakozanona među svim analiziranim uzorcima, čime se može potvrditi njegov izdvojeni status. Naime, ovaj uzorak se može opavdano pripisati taksonu *B. falcatum* subsp. *cernuum* (syn. *B. sibthorpiatum*), što je u skladu sa distribucijom ovog taksona zabeleženom od strane Nikolića (1973). Izrazito visoka koncentracija 10-nonakozanona u ekstraktu **BS**, kao i prisustvo stereoizomernih jedinjenja (stereoizomer jedinjenja **40** – 6,1% i dva stereoizomera jedinjenja **50** – 4,9% i 5,2%), dodatno potvrđuju njegovu hemijsku izdvojenost. Ova metabolička raznolikost dosledna je jasno morfološki definisanom taksonu *B. sibthorpiatum*, sa linearnim i sedećim bazalnim listovima. Visok sadržaj 10-nonakozanona, prisustvo *n*-alkana i novootkrivenih polinezasićenih estara ukazuju na značajnu metaboličku divergenciju unutar populacija *B. falcatum sensu lato*.

Sa druge strane, ekstrakt **BFG** sa planine Galičice pokazuje hemijski sastav koji ukazuje na specifičnu biosintezu, koja se pre svega ogleda u prisustvu bursehernina i većih količina α -

tokoferola. Ovakvi rezultati mogu podržavati pretpostavku Micevskog, da se na Galičici mogu javiti varijeteti *B. falcatum* var. *orbelicum* ili *B. falcatum* var. *montenegrinum*, iako morfološki karakteri za razlikovanje ovih varijeteta još uvek nisu dovoljno jasno definisani. Ipak, prisustvo znatno užih, bazalnih listova sa diferenciranim lisnim drškama u uzorku sa Galičice u odnosu na druge taksone, ukazuje na potrebu za ciljanom morfološkom kao i molekularnom analizom.

Ovi rezultati dodatno potvrđuju hipotezu da su morfološke razlike – posebno one koje se odnose na izgled bazalnih listova (oblik, diferenciranost i dužina lisne drške) – u korelaciji sa specifičnim profilima sekundarnih metabolita, koji mogu poslužiti kao taksonomski markeri. Na primer, zastupljenost 10-nonakozanona u uzorcima sa Suve planine i Galičice u kontrastu je sa raznovrsnijim spektrom polinezasićenih metabolita u populaciji sa Šar-planine, što sugeriše divergentne evolutivne puteve. Naravno, pomenute razlike mogu predstavljati i rezultat adaptacije na različite mikroklimatske uslove, što ukazuje na potrebu za obuhvatanjem i ovog aspekta istraživanja. Zajedno posmatrano, rezultati ističu neophodnost integracije morfoloških, fitohemijskih, citoloških i molekularnih ekoloških pristupa za konačno rasvetljavanje kompleksnih odnosa u okviru taksona *B. falcatum*.

Iako su biološke aktivnosti saikosaponina roda *Bupleurum* detaljno ispitivane, mnogo manje je poznato o farmakološkoj aktivnosti polinezasićenih derivata. Prethodna istraživanja strukturno srodnih poliena u drugim vrstama familije Apiaceae ukazuju na moguću antiinflamatornu i antiproliferativnu aktivnost (Teng et al., 2023). Dalja istraživanja ovih novih jedinjenja izolovanih iz vrsta roda *Bupleurum*, uključujući testove na ćelijskim linijama i *in vivo* modelima, mogla bi doprineti boljem razumevanju njihove moguće uloge u ispoljavanju lekovitih svojstava koja se tradicionalno povezuju sa taksonom *B. falcatum*.

4.5. Analiza hemijskog sastava etarskih ulja vrsta *B. praealtum* i *B. affine*

U ovom delu biće opisana analiza hemijskog sastava etarskih ulja dveju vrsta roda *Bupleurum*. Korišćenjem GC-MS-analize ispitan je hemijski sastav etarskih ulja izolovanih iz šizokarpijuma vrste *B. praealtum* (**BP-2**), kao i, po prvi put, iz nadzemnih delova vrste *B. affine* (**BA**). Poseban fokus biće stavljen na identifikaciju i karakterizaciju novootkrivenih jedinjenja, uz kompletnu NMR-asignaciju. Radi potvrde identiteta odabranih sastojaka, sprovedena je odgovarajuća sinteza, čime su dobijeni standardi, koji su zatim korišćeni za validaciju preliminarnih identifikacija putem ko-injekcionih eksperimenata.

GC-MS-analiza etarskih ulja vrsta *B. affine* i *B. praealtum* rezultirala je identifikacijom ukupno 230 sastojaka (tabela 25), koji čine 97,1%, odnosno 91,1% ukupnih površina detektovanih ispod GC-pikova. Ulje izolovano iz nadzemnih delova uzorka **BA** pokazuje nešto niži udeo seskviterpenskih ugljovodonika (41,2%) u poređenju sa uljem šizokarpijuma uzorka **BP-2** (45,3%). Sa druge strane, ulje **BP-2** sadrži znatno veći udeo strukturno i biohemijski različitih sastojaka, klasifikovanih kao „ostalo“ (30,0%) u odnosu na ulje **BA** (12,7%), što odražava veću raznovrsnost manje zastupljenih sastojaka. Ipak, ulje **BP-2** karakteriše znatno manji sadržaj alkana (5,0%) u poređenju sa uljem **BA** (23,4%), što može ukazivati na razlike u isparljivim sekundarnim metabolitima, odnosno aromatičnim osobinama biljaka. Dominantni sastojci ulja šizokarpijuma **BP-2** bili su germakren D (24,0%), (*E*)-fitol (14,2%) i biciklogermakren (11,4%). Nasuprot tome, glavni sastojci ulja **BA** bili su undekan (21,0%), koji nije prisutan u ulju **BP-2**, zatim germakren D (18,6%) i (*E*)-fitol (5,0%).

Tabela 25. Hemijski sastav etarskih ulja vrsta *B. affine* i *B. praealtum*

RI ¹	RI ²	Jedinjenje ³	Sadržaj ⁴		Klasa ⁵
			BA	BP	
770	768	(<i>Z</i>)-2-Penten-1-ol	tr ⁶	- ⁷	GL
802	801	Heksanal ⁸	tr	-	GL
830	828	Furfural ⁸	tr	-	O
845	844	(<i>E</i>)-3-Heksen-1-ol ⁸	tr	-	GL
853	850	(<i>Z</i>)-3-Heksen-1-ol ⁸	2,3	-	GL
862	859	(<i>Z</i>)-2-Heksenal ⁸	tr	-	GL
868	863	1-Heksanol ⁸	0,7	-	GL
900	900	Nonan ⁸	0,1	-	A
904	901	Heptanal ⁸	0,1	-	GL
927	924	α -Tujen	tr	-	MH
936	932	α -Pinen ⁸	0,2	-	MH
953	946	Kamfen ⁸	tr	-	MH

959	947	(<i>E</i>)-2-Heptenal ⁸	tr	-	GL
968	959	1-Heptanol ⁸	tr	-	GL
972	952	Benzaldehid ⁸	tr	tr	O
975	969	Sabinen	0,4	-	MH
978	974	1-Okten-3-ol ⁸	tr	-	GL
983	974	β -Pinen ⁸	0,1	-	MH
985	981	6-Metil-5-hepten-2-on ⁸	tr	-	O
989	984	2-Pentilfuran	tr	-	GL
989	988	Mircen ⁸	0,7	-	MH
1000	1000	Dekan ⁸	tr	-	A
1004	1004	(<i>Z</i>)-3-Heksenil-acetat	0,6	-	GL
1005	998	Oktanal ⁸	tr	-	GL
1010	1007	Heksil-acetat ⁸	0,1	-	GL
1020	1005	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-2,4-Heptadienal	tr	-	GL
1020	1014	α -Terpinen ⁸	tr	-	MH
1024	/	6,6-Dimetil-2-cikloheksanon ⁹	tr	-	O
1027	1020	<i>p</i> -Cimen ⁸	0,1	-	MH
1032	1024	Limonen ⁸	1,0	-	MH
1034	1025	β -Felandren ⁸	tr	-	MH
1038	1033	2,2,6-Trimetilcikloheksanon	tr	-	O
1044	1044	β -Izoforon (syn. 3,5,5-trimetil-3-cikloheksen-1-on)	tr	-	O
1045	1044	(<i>E</i>)- β -Ocimen	tr	-	MH
1049	1036	Fenilacetaldehid ⁸	0,1	0,2	O
1060	1054	γ -Terpinen ⁸	tr	-	MH
1061	1049	(<i>E</i>)-2-Oktenal	tr	-	GL
1063	1057	2,6,6-Trimetil-2-cikloheksanon ⁸	tr	-	O
1070	1060	(<i>E</i>)-2-Okten-1-ol	tr	-	GL
1070	1063	1-Oktanol ⁸	0,1	tr	GL
1074	1065	<i>cis</i> -Sabinen-hidrat	tr	-	MO
1090	1086	Terpinolen ⁸	tr	-	MH
1092	1098	1-Undecen	0,2	-	O
1100	1100	Undekan ⁸	21,0	-	A
1101	1100	Nonanal ⁸	-	tr	GL
1125	1108	1,3,8- <i>p</i> -Mentatrien	tr	-	MH
1125	1127	2,6,6-Trimetil-2-cikloheksen-1-karboksaldehid (syn. α -Ciklocitral) ⁸	tr	-	O
1163	1157	(<i>E</i>)-2-Nonenal	0,1	tr	GL
1173	1165	1-Nonanol ⁸	tr	-	GL
1185	1174	Terpinen-4-ol ⁸	0,1	tr	MO
1200	1186	α -Terpineol ⁸	tr	-	MO
1200	1200	Dodekan ⁸	tr	tr	A
1205	1196	Safranal ⁸	tr	-	O
1208	1201	Dekanal ⁸	0,1	tr	GL
1224	1217	β -Ciklocitral	0,1	-	O
1232	1232	<i>O</i> -Metiltimol ⁸	0,1	-	MO
1235	1232	(<i>Z</i>)-3-Heksenil-3-metilbutanoat ⁸	tr	-	GL
1241	1241	Heksil-izovalerat ⁸	tr	-	MO

1259	1261	(2,6,6-Trimetil-1-cikloheksen-1-il)acetaldehid	tr	tr	O
1260	1262	(<i>E</i>)-2-Decenal	0,1	0,2	GL
1274	1266	1-Dekanol ⁸	tr	-	GL
1289	1288	3-Undekanon ⁸	tr	-	O
1292	1293	Dihidroedulan I	0,1	tr	O
1292	1286	4-Undekanol	tr	-	O
1294	1294	2-Undekanon ⁸	tr	-	O
1297	1298	1-Tridecen	tr	-	O
1297	1289	Timol ⁸	tr	-	MO
1300	1300	Tridekan ⁸	0,4	-	A
1300	1293	3-Undekanol	tr	-	O
1302	1299	Teaspiran (izomer 1)	tr	tr	O
1304	1301	2-Undekanol	0,1	-	O
1304	/	4-Decil-acetat ¹⁰	tr	-	
1309	1305	Undekanal ⁸	tr	0,1	GL
1318	1313	Teaspiran (izomer 2)	tr	tr	O
1320	1309	<i>p</i> -Vinilgvajakol ⁸	tr	-	O
1324	1315	(<i>E,E</i>)-2,4-Dekadienal	0,1	0,1	GL
1336	1335	δ -Elemen	tr	2,0	SH
1347	1345	7- <i>epi</i> -Silfiperfol-5-en	tr	-	SH
1349	1345	α -Kubeben	tr	tr	SH
1358	1355	Dehidro- <i>ar</i> -jonon	tr	tr	O
1361	1361	(<i>Z</i>)- β -Damascenon	tr	-	O
1368	1365	(<i>Z</i>)-2-Undecenal	0,1	0,1	GL
1372	1374	Cikloizosativen	0,1	-	SH
1373	1373	α -Ilangen	tr	-	SH
1379	1374	α -Kopaen	0,2	0,2	SH
1382	1383	(<i>E</i>)- β -Damascenon	0,2	tr	O
1387	1387	β -Burbonen	0,3	2,2	SH
1390	1387	β -Kubeben	tr	-	SH
1392	1389	β -Elemen	0,9	0,7	SH
1394	/	4-Undecil-acetat ¹⁰	tr	-	O
1400	1400	Tetradekan ⁸	tr	tr	A
1404	1405	Seskvitujen	0,3	-	SH
1407	1412	6,10-Dimetil-2-undekanon	-	tr	O
1411	1407	1-Decil-acetat ⁸	1,4	-	GL
1417	1412	Dodekanal ⁸	-	0,4	GL
1424	1417	(<i>E</i>)-Kariofilen ⁸	4	-	SH
1424	1419	β -Ilangen	-	2,2	SH
1430	1437	α -Gvajen	0,2	-	SH
1436	1431	β -Gurjunen	2,5	-	SH
1437	1430	β -Kopaen	-	1,0	SH
1442	1446	Seskvisabinen	0,2	-	SH
1446	1439	Izogermakren D	-	0,5	SH
1453	1458	<i>allo</i> -Aromadendren	tr	-	SH
1455	1453	Geranil-aceton	-	1,6	O
1456	1454	(<i>E</i>)- β -Farnezen ⁸	4,7		SH
1460	1452	α -Humulen ⁸	1,7	tr	SH

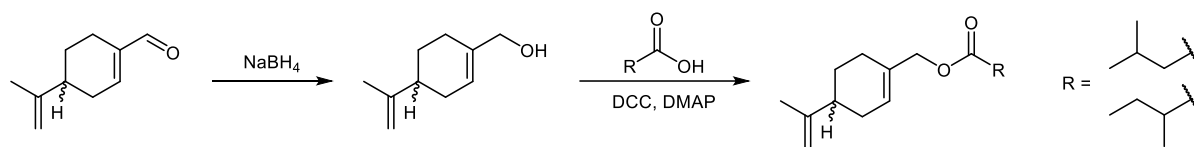
1477	1469	1-Dodekanol ⁸	-	0,3	GL
1493	1484	Germakren D ⁸	18,6	24,0	SH
1496	1489	β -Selinen	0,2	-	SH
1498	1493	α -Zingiberen	0,3	-	SH
1498	1500	α -Murolen	tr	-	SH
1501	1500	Biciklogermakren	2,8	11,4	SH
1500	1500	Pentadekan ⁸	tr	-	A
1506	1505	(<i>E,E</i>)- α -Farnezen ⁸	tr	-	SH
1510	1503	β -Dihidroagarofuran	tr	-	SO
1513	1508	Germakren A	1,3	-	SH
1513	1514	β -Kurkumen	tr	-	SH
1514	1504	Kuparen	tr	-	SH
1518	1513	γ -Kadinen	0,4	-	SH
1520	1514	Kubebol	tr	-	SO
1524	1522	δ -Kadinen	2,1	1,1	SH
1525	1521	β -Seskvifelandren	tr	-	SH
1526	1528	Zonaren	0,2	-	SH
1529	1529	(<i>E</i>)- γ -Bisabolen	tr	-	SH
1535	1529	Kesan	0,5	-	SO
1535	1528	<i>cis</i> -Kalamenen	tr	-	SH
1535	1533	10- <i>epi</i> -Kubebol	tr	-	SO
1536	1533	<i>trans</i> -Kadina-1,4-dien	tr	-	SH
1541	1537	α -Kadinen	0,2	tr	SH
1541	1534	Liguloksid	tr	-	SO
1545	1544	α -Kalakoren	tr	tr	SH
1552	1548	α -Agarofuran	0,1	-	SO
1552	1550	<i>cis</i> -Murol-5-en-4 β -ol	tr	-	SO
1562	1561	(<i>E</i>)-Nerolidol	0,1	0,1	SO
1572	1565	Dodekanska kiselina ⁸	0,1	-	O
1575	1577	(<i>E</i>)-Dendrolazin	-	tr	SO
1576	1565	(<i>Z</i>)-3-Heksenil-benzoat ⁸	tr	-	GL
1577	1567	(<i>E</i>)-2-Tridecenal	-	0,2	GL
1579	1574	Germakren D-4-ol	tr	-	SO
1582	1577	Spatulenol ⁸	1,3	5,0	SO
1587	1581	10- <i>epi</i> -Junenol	0,6	-	SO
1595	1589	<i>allo</i> -Hedikariol	1,9	-	SO
1598	1594	Salvial-4(14)-en-1-on	0,4	0,6	SO
1600	1600	Heksadekan ⁸	tr	tr	A
1609	1607	β -Oplopenon	0,5	-	SO
1610	1600	Rozifoliol	-	tr	SO
1607	1611	1-Dodecil-acetat ⁸	tr	0,5	GL
1615	1608	Humulen-epoksid II	0,1	-	SO
1619	1618	1,10-di- <i>epi</i> -Kubenol	tr	-	SO
1626	1618	Junenol	-	tr	SO
1633	1627	1- <i>epi</i> -Kubenol	1,5	-	SO
1635	1631	(<i>E</i>)-Seskvilavandulol	-	0,5	SO
1639	1625	Izospatulenol	-	1,2	SO
1640	1641	β -Eudezmol	0,2	-	SO

1646	1640	<i>epi</i> - α -Murolol (<i>syn.</i> τ -murolol)	0,5	-	SO
1652	1645	α -Murolol (<i>syn.</i> torejol)	1,1	-	SO
1661	1652	α -Kadinol	1,9	0,1	SO
1664	1664	Perilil-2-metilbutanoat ^{8,11}	0,3	-	MO
1671	1666	Bulnezol	tr	-	SO
1671	1671	1-Tetradekanol ⁸	-	0,5	O
1677	1673	3-Metilheksadekan	0,6		A
1690	1685	Germakra-4(15),5,10(14)-trien-1 α -ol	0,2	0,6	SO
1700	1698	2-Pentadekanon	0,2	-	O
1700	1700	Heptadekan ⁸	tr	-	A
1716	1715	Pentadekanal ⁸	0,1	0,1	O
1734	1739	(<i>E</i>)-Seskvilavandulil-acetat	-	0,3	SO
1745	1740	Mint-sulfid	0,1	0,5	SO
1775	1759	Benzil-benzoat ⁸	-	0,3	O
1769	1765	Tetradekanska kiselina ⁸	tr	0,5	O
1793	1789	1-Oktadecen	tr	-	O
1800	1800	Oktadekan ⁸	tr	tr	A
1804	1803	14-Hidroksi- δ -kadinen	tr	-	SO
1819	1818	Heksadekanal ⁸	0,1	0,2	O
1837	1830	Neofitadien (izomer 1)	1,3	0,5	O
1843	1843	Heksahidrofarnesil-aceton	0,4	3,7	O
1851	1843	6,10,14-Trimetilpentadeka-2-ol ¹¹	tr	-	O
1861	1849	Neofitadien (izomer 3)	0,1	0,1	O
1883	/	Neofitadien (izomer 2) ⁹	-	0,2	O
1884	1880	1-Heksadekanol ⁸	tr	-	O
1900	1900	Nonadekan ⁸	0,2	0,3	A
1911	1913	(<i>E,E</i>)-5,9-Farnesil-aceton	tr	-	O
1920	1920	Heptadekanal ⁸	0,1	0,6	O
1926	1921	Metil-heksadekanoat ⁸	tr	0,1	O
1947	1942	Izofitol	tr	0,1	O
1977	1959	Heksadekanska kiselina ⁸	0,3	6,0	O
1994	1990	Etil-heksadekanoat ⁸	tr	-	O
2000	2000	Eikozan ⁸	tr	-	A
2024	2026	(<i>E,E</i>)-Geranillinalol	tr	0,2	O
2043	2035	(<i>Z</i>)-Falkarinol	0,4	-	O
2088	2083	1-Oktadekanol ⁸	0,1	-	O
2097	2092	Metil-(6 <i>Z</i> ,9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i>)-6,9,12-oktadekatrienoat	tr	0,2	O
2100	2100	Heneikozan ⁸	0,4	0,4	A
2117	2114	(<i>E</i>)-Fitol ⁸	5,0	14,2	O
2192	2172	1-Nonadekanol ⁸	0,1	-	O
2195	2196	1-Dokozen	tr	-	O
2200	2200	Dokozen ⁸	tr	0,1	A
2203	2213 ¹⁰	Dodecil-benzoat ⁸	0,1	-	O
2227	2225	Eikozanal	-	0,1	O
2230	2227	(5 <i>Z</i> ,7 <i>E</i> ,9 <i>E</i> ,11 <i>E</i>)-Tetradeka-5,7,9,11-tetraen-1-il-3-metilbutanoat (prealtaestar B)	0,1	-	O
2238	/	(5,7,9,11)-Tetradeka-5,7,9,11-tetraen-1-il-3-metilbutanoat (izomer I) ⁹	0,1	-	O

2273	/	5,7,9,11)-Tetradeka-5,7,9,11-tetraen-1-il-3-metilbutanoat (izomer II) ⁹	0,1	-	O
2297	/	(5,7,9,11)-Tetradeka-5,7,9,11-tetraen-1-il-2-hidroksi-3-metilbutanoat (izomer) ⁹	tr	-	O
2300	2300	Trikozan ⁸	0,1	-	A
2323	2329	Heneikozanal	-	tr	O
2346	2342	δ -Heksadekalakton	tr	-	O
2364	2352	4,8,12,16-Tetrametilheptadekan-4-olid ¹¹	-	0,1	O
2370	2365	(5Z,7E,9E,11E)-Tetradeka-5,7,9,11-tetraen-1-il-(R)-2-hidroksi-3-metilbutanoat (prealtaestar A)	1,5	-	O
2395	2395	1-Tetrakozen	0,1	tr	O
2400	2400	Tetrakozan ⁸	0,3	0,2	A
2414	/	(5,7,9,11)-Tetradeka-5,7,9,11-tetraen-1-il-2-hidroksi-3-metilbutanoat (izomer) ⁹	1,5	-	O
2430	2430	Dokozanal	tr	-	O
2500	2500	Pentakozan ⁸	0,1	1,2	A
2514	/	(5,7,9,11)-Tetradeka-5,7,9,11-tetraen-1-il-2-acetoksi-3-metilbutanoat (izomer) ⁹	tr	-	O
2594	2595	1-Heksakozen	tr	tr	O
2600	2600	Heksakozan ⁸	tr	0,5	A
2635	2630	Tetrakozanal	tr	-	O
2700	2700	Heptakozan ⁸	0,1	1,7	A
2740	2735	Pentakozanal	tr	-	O
2794	2795	1-Oktakozen	tr	-	O
2800	2800	Oktakozan ⁸	tr	0,2	A
2811	2814	(E,E,E,E)-Skvalen	tr	0,1	O
2841	2840	Heksakozanal	0,1	0,1	O
2900	2900	Nonakozan ⁸	0,1	0,4	A
2940	2944	Heptakozanal	-	tr	O
3040	3042	Oktakozanal	tr	0,5	O
3082	3090	10-Nonakozanon	tr	-	O
3100	3100	Hentriakontan ⁸	-	tr	A
3213	3235	Triakontan	tr	-	O
Ukupno identifikovano (%)			97,1	91,1	
Alkani			23,4	5,0	
Oksilipinski metaboliti (<i>green leaf volatiles</i> , GL)			5,8	1,9	
Monoterpeni ugljovodonici (MH)			2,5	tr	
Oksigenovani monoterpeni (MO)			0,5	tr	
Seskviterpeni ugljovodonici (SH)			41,2	45,3	
Oksigenovani seskviterpeni (SO)			11,0	8,9	
Ostalo (O)			12,7	30,0	

¹ Retencioni indeksi određeni eksperimentalno na DB-5MS koloni u odnosu na niz *n*-alkana C₇–C₄₀. ² Retencioni indeksi preuzeti iz literature (Adams, 2007; NIST, 2017) osim ako nije drugačije navedeno. ³ Jedinjenje je identifikovano na osnovu poređenja masenog spektra i retencionog indeksa sa literaturnim podacima, osim ako nije drugačije navedeno. ⁴ Vrednosti predstavljaju srednje vrednosti tri pojedinačne analize. ⁵ A, alkani; GL, oksilipinski metaboliti; MH, monoterpeni ugljovodonici; MO, oksigenovani monoterpeni; SH, seskviterpeni ugljovodonici; SO, oksigenovani seskviterpeni; O, ostalo. ⁶ tr, tragovi (< 0,05%). ⁷ -, nije detektovano. ⁸ Identitet sastojka potvrđen ko-injekcijom sa standardom. ⁹ Preliminarna identifikacija zasnovana isključivo na poređenju masenih spektara. ¹⁰ Videti eksperimentalni deo ¹¹ Tačna stereochemija nije poznata.

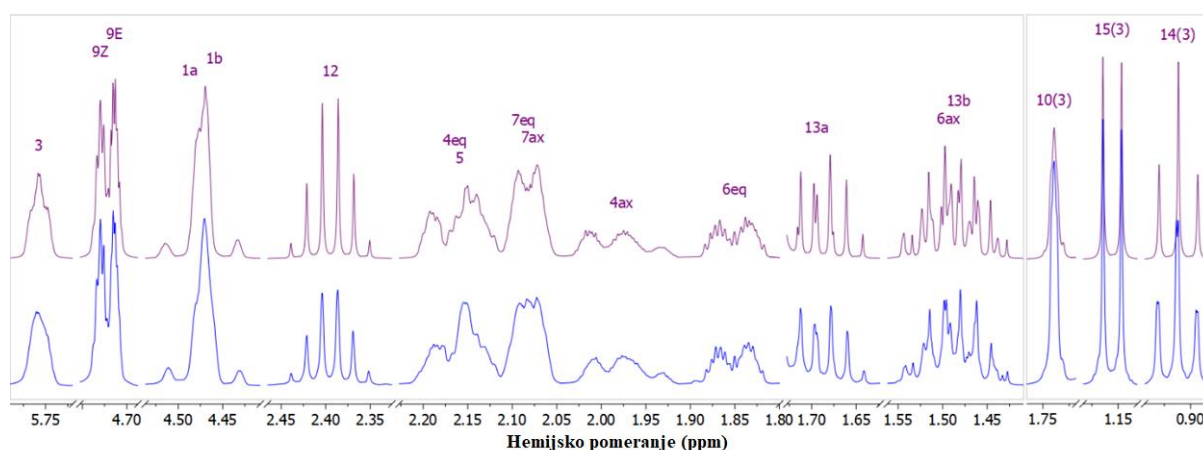
GC-MS-analiza etarskog ulja vrste **BA** ukazala je na prisustvo jednog manje zastupljenog sastojka na RI 1664, čiji maseni spektar, odnosno fragmentacija, na osnovu poređenja sa masenim spektrima iz baza podataka, sugerise da se radi o nekom perilil-estru. Na osnovu molekulskog jona na m/z 236 (slika S63, prilog) pretpostavljeno je da je reč o estru perila-alkohola i kiseline sa pet ugljenikovih atoma. Ova grupa estara je do sada zabeležena samo jednom, i to u etarskom ulju druge vrste iz porodice Apiaceae – *Kitagawia baicalensis* (Redow. ex Willd) Pimenov, bajkalska kitagavija (Letchamo et al., 2005). Međutim, u pomenutom radu nije precizirano na koji način su identifikovani estri perila-alkohola sa 2-metilbutanskom i 3-metilbutanskom kiselinom. Zbog male razlike u njihovim retencionim indeksima, samo njihovo poređenje (RI 1658 za perilil-2-metilbutanoat i RI 1665 za perilil-3-metilbutanoat) sa indeksom pomenutog sastojka iz ulja **BA** (RI 1664) nije dovoljno za pouzdanu identifikaciju prisutnog estra. Radi razjašnjenja ove nedoumice pristupljeno je njihovoj sintezi – redukcijom komercijalno dostupnog perila-aldehida, a zatim esterifikacijom odgovarajućim kiselinama, dobijeni su željeni estri (šema 9). Eksperimentima ko-injekcije potvrđeno je prisustvo perilil-2-metilbutanoata u ulju **BA**. Vrednosti retencionih indeksa naših, sintetisanih standarda ne poklapaju se sa onima iz literature (Letchamo et al., 2005), što upućuje na moguću pogrešnu identifikaciju ovih estara kod autora *Letchamo* i saradnika. Reticioni indeks perilil-3-metilbutanoata koji je naveden u radu *Letchamo* i saradnika odgovara indeksu našeg sintetisanog 2-metilbutanoata, te predlažemo ispravku identiteta ovih jedinjenja. Stoga je ovde prvi put pouzdanu potvrđeno prisustvo perilil-2-metilbutanoata u prirodi. Zanimljivo je da u etarskom ulju nisu detektovani ni slobodan perila-alkohol, kao ni perila-aldehid, iako su biosintetski blisko povezani sa prisutnim perila-estrom. Pretpostavljamo da detektovan perila-estar potiče od enzimatske alilne oksidacije limonena, koji je prisutan u ulju **BA** (1,0%).



Šema 9. Sinteza perilil-2-metilbutanoata i perilil-3-metilbutanoata

S obzirom na to da u perilil-2-metilbutanoatu postoje dva hiralna centra, postoje dva dijastereoizomera. Sintetisani uzorak bio je sačinjen od smeše ovih dijastereoizomera, koji se nisu mogli razdvojiti ni preparativno na koloni SiO_2 , ni na koloni gasnog-hromatografa, a njihovi NMR-signali bili su preklopljeni. Spektri smeše sintetisanih estara interpretirani su uz pomoć manuelne potpune spinske simulacije ^1H NMR-spektra (slika 53; tabela 26). Simulacija

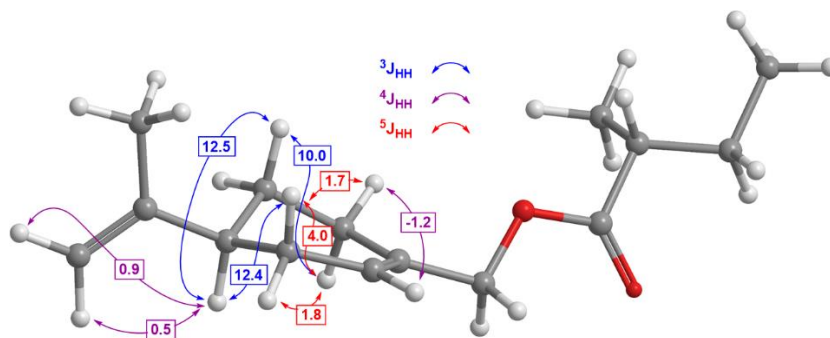
spektra je izvršena podešavanjem δ_H i J vrednosti, korišćenjem softvera MestReNova 11.0.3 (tools/spin simulation), kako bi izgled signala bio u skladu sa eksperimentalno dobijenim spektrom. Iako eksperimentalni spektar predstavlja sumu signala oba diastereoizomera (slike S65 i S66, prilog), dok je simulacija izvršena samo za jedan diastereoizomer, postignuto slaganje između simuliranih i eksperimentalnih podataka bilo je odlično. Ovakav rezultat može se objasniti time što su hiralni centri međusobno udaljeni unutar molekula, te se ne uočavaju značajne razlike u položaju i obliku signala udaljenih protona iz različitih diastereomera. Takve razlike (najčešće blago širenje signala) mogu se primetiti samo kod pojedinih protona, naročito onih u neposrednoj blizini hiralnih centara – na primer, kod metil-grupe u okviru kiselinskog dela estra.



Slika 53. Simulirani ^1H NMR (400 MHz) spektar perilil-2-metilbutanoata (gore); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spektar perillyl-2-metilbutanoata (dole, smeša dva diastereoizomera)

Simulacija spektra (slika 53) omogućila je prepoznavanje glavnih konstanti sprežanja među protonima koji su obično u spektrima preklapljeni, a neki od njih su i signali višeg reda. Najznačajnije konstante sprežanja prikazane su na strukturi na slici 54. Tri konstante sa vrednostima većim od 10 Hz, ukazuju na približno antiperiplanarnu orijentaciju protona u okviru $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$ spinskog sistema na šestočlanom prstenu, čime se izopropilenska grupa pozicionira u pseudoekvatorijalni položaj – što je i očekivano. Takođe je uočen i izraženo homoalilno sprežanje između aksijalnih protona u pozicijama 4 i 7, sa konstantom od 4 Hz, uz još dva homoalilna sprežanja od oko 2 Hz. Razlog za tako snažnu interakciju između relativno udaljenih protona može se naći u njihovom prostornom položaju u odnosu na dvostruku vezu, pri čemu paralelna orijentacija $\sigma\text{C-H}$ i $\pi\text{C=C}$ orbitala dodatno potvrđuje prikazanu trodimenzionalnu strukturu (slika 54). Visoka vrednost još jedne daljinske konstante (tzv.

W-sprezanje), od oko 2 Hz, između ekvatorijalnih protona u pozicijama 4 i 6, dodatno potvrđuje pouzdanost prikazane 3D strukture ovog perila-estra.



Slika 54. 3D struktura perilil-2-metilbutanoata i analiza konstanti sprezanja dobijena spinskom simulacijom.

Četiri moguća stereoizomera perilil-2-metilbutanoata mogu se razlikovati ne samo po mirisu, već i po potencijalnim biološkim aktivnostima. Sintetisana smeša ovih izomera (sva četiri) imala je cvetno-mentolast miris. Sintezom ovih estara uz upotrebu hiralno čistih alkohola i kiselina bilo bi moguće utvrditi miris svakog pojedinačnog stereoizomera.

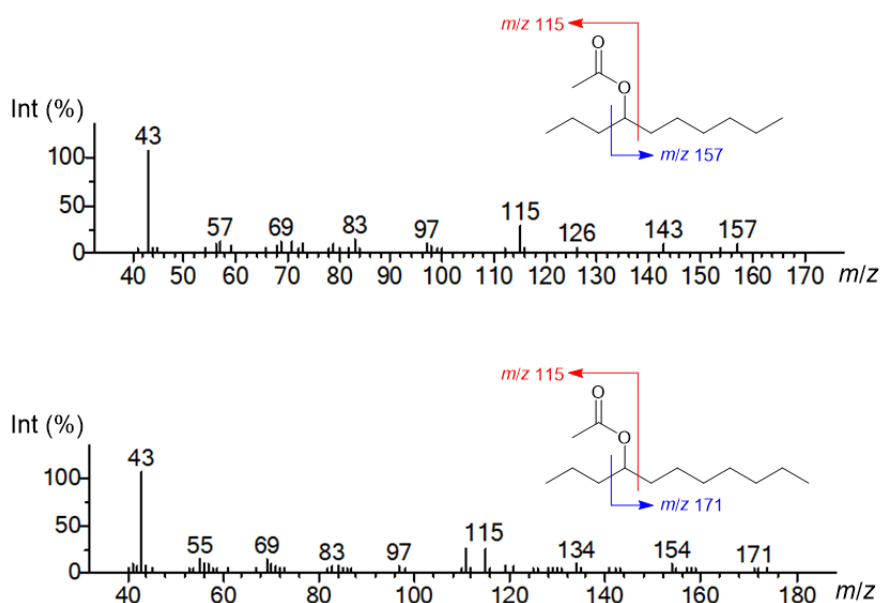
Tabela 26. ^1H (400 MHz) i ^{13}C (100,6 MHz) NMR-parametri perilil-2-metilbutanoata (CDCl_3 , NMR-parametri određeni su potpunom spinskom simulacijom), kao i uočene gHMBC- i NOESY-interakcije

Pozicija	δ_{H} m (J u Hz, integral) ¹	δ_{C} , tip	gHMBC ²	NOESY ³
1a	4,49 ddtdd (-14,1, 2,0, 1,8, 1,4, 1,25, 1 H)	68,2, CH_2	2, 3, 7, 11	3, 7ax, 7eq
1b	4,46 ddt (-14,1, -1,35, 1,3, 0,7, 1 H)			
2	/	132,9, C	/	/
3	5,76 dddddd (4,4, 3,45, -1,6, 1,4, -1,35, -1,2, 1 H)	125,6, CH	2, 7, 4	4ax, 4eq, 1a, 1b
4ax	1,98 dddddd (-18,7, 12,4, 4,4, 4,0, 2,0, 1,7, 1,3, 1 H)	30,6, CH_2	2, 3, 5	3
4eq	2,164 ddddtdd (-18,7, 3,45, 2,8, 2,0, 1,8, 1,3, 1,25, 1 H)			
5	2,158 dddddd (12,5, 12,4, 4,8, 2,8, 0,85, 0,55, 0,5, 1 H)	50,0, CH	8, 9, 6	6a, 6b
6ax	1,49 dddd (-13,3, 12,5, 10,0, 7,0, 1 H)	27,4, CH_2	5, 7	5, 7a, 7b
6eq	1,85 dddd (-13,3, 6,0, 4,8, 2,0, 0,6, 1 H)			
7ax	2,08 ddddtdd (-17,5, 10,0, 6,0, 4,0, 1,8, -1,6, 0,7, 1 H)	26,9, CH_2	2, 3, 6	6aq, 6eq, 1a, 1b
7eq	2,09 ddtddd (-17,5, 7,0, 1,8, 1,7, -1,2, 0,7, 0,6, 1 H)			
8	/	149,7, CH	/	/
9E	4,71 dqd (1,85, 1,1, 0,85, 1 H)	108,9, CH_2	8, 10, 5	5
9Z	4,73 dqd (1,85, 1,5, 0,5, 1 H)			
10	1,74 ddd (1,5, 1,1, 0,55, 3 H)	20,9, CH_3	5, 8, 9	5
11	/	176,8, C	/	/
12	2,39 tq (7,1, 7,05, 1 H)	41,3, CH	11, 13, 15	13, 15
13a	1,69 dqd (-17,2, 7,4, 7,1, 1 H)	26,5, CH_2	12, 14	12, 14
13b	1,48 dqd (-17,2, 7,4, 7,1, 1 H)			
14	0,91 q (7,4, 3 H)	11,8, CH_3	12, 13	13a, 13b
15	1,16 d (7,5, 3 H)	16,8, CH_3	11, 12	12

¹ Vrednosti spin-spin sprežanja prvobitno su određene pomoću eksperimenata selektivnog homodekuplovanja, a zatim utačnjavane spinskom simulacijom. ² gHMBC-korelacije uočene između protona u ovom redu i ugljenika-13 na navedenoj poziciji. ³ nOe korelacije uočene između protona u ovom redu i protona na navedenoj poziciji.

U etarskom ulju vrste **BA** zabeleženo je prisustvo brojnih sastojaka čiji su maseni spektri identični ili slični spektrima estara tetradeka-4,6,8,10-tetraen-1-ola i kiselina sa pet atoma ugljenika, identifikovanih u dietil-etarskom ekstraktu vrste *B. praealtum* (prealtaestri A, B, C i D). Može se pretpostaviti da, pored već poznatih estara, preostali detektovani estri predstavljaju sastojke koji se razlikuju u konfiguraciji dvostrukih veza u alkoholnom delu molekula. Zanimljivo je da ovakva jedinjenja nisu detektovana u etarskom ulju vrste *B. praealtum*. Ova razlika mogla bi se pripisati uticaju ekoloških faktora ili činjenici da je etarsko ulje dobijeno iz plodova te biljne vrste, dok su pomenuti polinezasićeni estri izolovani uglavnom iz dietil-etarskog ekstrakta celih nadzemnih delova biljke. Svi detektovani izomeri predstavljali bi nove prirodne proizvode.

Pored toga, međusobno slična fragmentacija u masenom spektru kod dva minorna sastojka ulja **BA** (RI 1304 i 1394), sa osnovnim jonom na m/z 43, karakterističnim za acetate, i manje intenzivnim jonom na m/z 115, ukazuje na to da se radi o homologima acetata dugolančanih zasićenih 4-alkanola (slika 55). Alternativna α -fragmentacija 4-alkil-acetata, uočena na m/z 157, odnosno m/z 171, u ova dva spektra, navela je na zaključak da broj atoma ugljenika u alkoholnom delu iznosi 10, odnosno 11. Prisustvo 4-decil-acetata i 4-undecil-acetata, novih prirodnih jedinjenja, potvrđena je korelacijom eksperimentalnih vrednosti RI sa dostupnim literaturnim podacima za 4-nonil-acetat (RI 1206; Andriamaharavo, 2014). Takođe, u etarskom ulju **BA** identifikovani su izomerni undekanoli (razlikuju se po položaju hidroksilne grupe), koji su verovatno nastali hidroksilacijom undekana prisutnog u ulju.



Slika 55. Maseni spektri 4-decil-acetata i 4-undecil-acetata

Zanimljivo je da i etarska ulja vrsta roda *Hypericum* (Hypericaceae) i vrste *Scandix pecten-veneris* L. (Apiaceae) sadrže značajnu količinu alkana sa 9 do 15 atoma ugljenika, što je u skladu sa sastavom ulja **BA**. Na primer, etarska ulja izolovana iz vrsta *Hypericum* iz Bugarske okarakterisana su prisustvom 2-metiloktana (9,13–40,9%), kao i nonana i undekana (Semerdjieva et al., 2023). Slično tome, etarska ulja različitih vrsta roda *Hypericum* Tourn. ex L. iz Srbije imaju visok sadržaj alkana, pri čemu je ulje vrste *H. hirsutum* L. sadržavalo veće količine nonana i undekana (Saroglou, 2007). Frakcija alkana u etarskom ulju *S. pecten-veneris* bila je naročito zastupljena u uzorcima dobijenim iz nadzemnih delova i korena, čineći 47,8% do 78,1% ukupnog sastava ulja (Radulović et al., 2014b). Iako su isti alkani detektovani i u plodovima, njihov relativni udeo bio je znatno niži (11,1%). U etarskim uljima ove biljne vrste uočene su izuzetno visoke koncentracije tridekana i pentadekana. Takav sastav je u skladu sa rezultatima analize ulja **BA**, u kojem je undekan identifikovan kao jedan od glavnih sastojaka (21%), dok je u ulju **BP** undekan, kao i ostali alkani slične dužine lanca, potpuno izostao. Vredno je istaći da je prethodno analizirano etarsko ulje nadzemnih delova vrste *B. praealtum* sadržavalo značajne količine (+)-spatulenola, (–)-(E)-kariofilen-oksida i oktil-2-metilbutanoata, koji su u ovde analiziranom ulja šizokarpijuma bile prisutne u znatno manjim količinama ili potpuno odsutni. U radu Kapetanosa i saradnika (Kapetanos et al., 2008) nije precizirano na koje delove biljke se odnosi termin „nadzemni delovi“, ali se na osnovu datuma sakupljanja (jun 2003) može pretpostaviti da biljke tada nisu bile u fazi formiranja plodova, te da nisu sadržavale šizokarpijume. Ova razlika u fenofazi biljke mogla bi objasniti i uočene razlike u hemijskom sastavu između ulja dobijenog iz plodova analiziranog u ovom radu i ranije analiziranog ulja nadzemnih delova.

Do sada ispitivana etarska ulja vrsta roda *Bupleurum* koje pripadaju podsekciji *Juncea*, uključujući *B. cappadocicum*, *B. gerardii* i *B. pauciradiatum*, okarakterisana su visokim sadržajem undekana. Međutim, među njima su uočene značajne razlike u hemijskom sastavu u zavisnosti od analiziranog biljnog organa. Tako je, na primer, u ulju cvetova vrste *B. cappadocicum* detektovan visok sadržaj heptanala, dok je ulje plodova bilo bogato spatulenolom, a ulje korena heksadekanskom kiselinom (Saraçoğlu et al., 2012). Nasuprot tome, u etarskim uljima vrste *B. gerardii* varirao je sadržaj heksanala u zavisnosti od organa, dok je undekan u svim uzorcima bio prisutan u visokom procentu (Rustaiyan et al., 2010; Saraçoğlu et al., 2011). Slično tome, kod vrste *B. pauciradiatum*, germakren D je bio dominantan sastojak iz ulja cvetova, β -pinen iz ulja plodova, a spatulenol iz ulja korena, što ukazuje na izraženu specifičnost hemijskog profila unutar iste podsekcije.

Ovi rezultati ukazuju na značajnu varijabilnost hemijskog sastava među vrstama roda *Bupleurum* unutar podsekcije *Juncea*, pri čemu na ove razlike utiču kako genetski faktori, tako i uslovi životne sredine. Dve vrste analizirane u okviru ove doktorske disertacije pokazuju hemijske karakteristike slične onima ranije proučavanih taksona iz ove podsekcije. Moguće je da kod ovih vrsta postoji mehanizam specijacije u pogledu akumulacije ili biosinteze isparljivih alkana i seskviterpena, koji čine glavne sastojke etarskih ulja. Ova pretpostavka zahteva dodatna istraživanja i mogla bi imati potencijal za prepoznavanje hemotaksonomski značajnih osobina.

5. Zaključak

U okviru doktorske disertacije pod nazivom „Sekundarni metaboliti odabranih vrsta roda *Bupleurum* L. (Apiaceae): izolovanje, identifikacija i biološka aktivnost“ predstavljeni su rezultati hemijske analize dietil-etarskih ekstrakata četiri taksona ovog roda: *B. praealtum*, *B. veronense*, *B. sibthorpiatum* i *B. falcatum*. Pored toga, sprovedena je komparativna analiza hemijskog sastava etarskih ulja biljnih vrsta *B. praealtum* i *B. affine*. Dietil-etarski ekstrakti vrsta *B. praealtum*, *B. veronense* i *B. falcatum* bili su podvrgnuti *dry-flash* hromatografiji na silika-gelu, nakon čega su odabrane frakcije dodatno prečišćavane kolonskom hromatografijom, pa detaljno analizirane primenom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS) i NMR-spektroskopijom.

Hemijskom analizom dietil-etarskog ekstrakta nadzemnih delova i šizokarpijuma vrste *B. praealtum* izolovano je ukupno šest jedinjenja, među kojima četiri nova polinezasićena estra (**31–34**, prealtaestri A–D), jedno novo polinezasićeno γ -butirolaktonsko jedinjenje (**35**) i jedan lignan (**36**), novo prirodno jedinjenje. Novi estri predstavljaju derivate C₁₄ tetraenskog alkohola, esterifikovanog različitim (hidroksi)kiselinama. Konfiguracija dvostrukih veza u polienskom lancu svih novih jedinjenja određena je kombinacijom 1D- i 2D-NMR spektroskopije i potpune spinske simulacije, koja je bila od ključnog značaja za utvrđivanje geometrije konjugovanih sistema i potvrdu stereostrukture. Apsolutna konfiguracija jedinjenja **31** utvrđena je poređenjem NMR-parametara njegovog Mosher-ovog estra sa odgovarajućim parametrima diastereomernih Mosher-ovih estara model jedinjenja poznate konfiguracije (dobijenih iz enantiomerno čistog i racemskog valina). Kod jedinjenja **35**, apsolutna konfiguracija hiralnog centra određena je na osnovu uporedne analize vrednosti optičke rotacije potpuno hidrogenizovanog derivata i literaturnih podataka za strukturno slična jedinjenja poznate konfiguracije. Lignan **36** predstavlja derivat arcitina – 7-oksoarcitin, novo prirodno jedinjenje.

Jedinjenja **31**, **34**, **35** i (+)-arcitin testirana su na primarnim kulturama splenocita i makrofaga pacova radi procene njihove imunomodulatorne aktivnosti, a kroz ispitivanje njihovog uticaja na vijabilnost i funkcionalne karakteristike ovih ćelija. Sva jedinjenja su značajno uticala na mitohondrijalnu i lizozomalnu aktivnost ovih ćelija, pri čemu su jedinjenja **31**, **34** i **35**, koja poseduju deka-1,3,5,7-tetraen-1-ilnu grupu, pokazala dvojako svojstvo – u nižim koncentracijama stimulatивно, a u višim potencijalno citotoksično dejstvo. (+)-Arcitin nije ispoljio citotoksičnost prema primarnim imunim ćelijama, već je čak stimulisao njihovu funkcionalnu aktivaciju, što ukazuje na njegovu selektivnu aktivnost prema transformisanim, a ne zdravim ćelijama. Prealtalakton (**35**) je pokazao izraženiju citotoksičnost, moguće usled

stvaranja reaktivnih metabolita tipa Majklovih akceptora. Pored toga, jedinjenja **31** i **35** su delimično inhibirala aktivnost mijeloperoksidaze, ukazujući na njihovu potencijalnu ulogu u modulaciji oksidativnog stresa.

Hemijskom analizom dietil-etarskog ekstrakta nadzemnih delova vrste *B. veronense* izolovana su tri nova jedinjenja, među kojima jedan makrolidni derivat (homodihidrofalkarinolid), jedan polinezasićeni estar srodan estrima detektovanim u vrsti *B. praealtum* (veronaestar) i jedno fenolno jedinjenje iz klase derivata floroglucinola (**39**). Homodihidrofalkarinolid verovatno predstavlja biosintetski prekursor falkarinola ili neku bočnu granu tog biosintetskog puta. Apsolutna konfiguracija jedinjenja **39** određena je Mosher-ovom metodom, sintezom diastereomernih estara jedinjenja **39** i (*R*)-MTPA, odnosno (*S*)-MTPA. Takođe, izolovana su još dva derivata nastala dehidratacijom i ciklizacijom jedinjenja **39**. S obzirom na prisustvo veoma male količine ovih jedinjenja i činjenicu da koeluiraju sa jedinjenjem **39**, pretpostavlja se da su ova dva derivata nastala kao artefakti tokom procesa izolovanja. Iz ekstrakta vrste *B. veronense* izolovana su i dva poznata lignana – izojatein i laricirezinol. Laricirezinol do sada nije identifikovan kao sekundarni metabolit vrsta roda *Bupleurum*.

U ovoj doktorskoj disertaciji izvršena je analiza dietil-etarskih ekstrakata četiri balkanske populacije koje su preliminarno identifikovane kao *B. falcatum* subsp. *falcatum* (syn. *B. falcatum*) ili *B. falcatum* subsp. *cernuum* (syn. *B. sibthorpiatum*). Primenom hromatografskih i spektroskopskih metoda (GC-MS i 1D/2D-NMR) izolovana su i identifikovana tri nova alifatična polinezasićena estra (**40**, **41** i **45**). Takođe izolovan je novi polinezasićeni ugljovodonik (**47**) strukturno srodan homodihidrofalkarinolidu detektovanom u vrsti *B. veronense*, odnosno falkarinolu. Hemijski profili svake uzorkovane populacije pokazali su varijaciju koja odgovara varijaciji morfologije bazalnih listova i u skladu je sa literaturnim navodima o distribuciji pojedinih infraspecifičnih taksona. Na primer, populacija sa planine Galičice (*B. falcatum*) sadržala je jedinstveno, do sada nepoznato, jedinjenje heptadekadietriin (**47**), dok su populacije sa Šar-planine i Suve planine sadržavale različite koncentracije drugih polinezasićenih jedinjenja. U uzorku *B. falcatum* sa Suve planine detektovani su i prethodno poznati homologe stereoizomerni polinezasićeni alkoholi sa 15, odnosno 17 ugljenikovih atoma, koji su se razlikovali u konfiguraciji dvostruke veze u položaju 2, kao i njihovi odgovarajući acetati. Radi potvrde struktura acetata, izvršena je njihova sinteza Steglich-ovom esterifikacijom frakcije koja je sadržavala pomenute alkohole. Uzorak sa Olimpa okarakterisan je visokim sadržajem 10-nonakozanona i različitih stereoizomernih estara.

Dobijeni rezultati ukazuju na značajnu hemotipsku varijabilnost unutar taksona *B. falcatum* i predstavljaju prvi sistematski opis manje polarnih sekundarnih metabolita, uključujući novootkrivene polinezasićene derivate. Buduća istraživanja koja budu obuhvatila molekularne markere i testove biološke aktivnosti mogla bi razjasniti ulogu ovih specijalizovanih metabolita u taksonomiji i farmakološkom potencijalu ovih nedovoljno proučenih taksona. Iako taksoni *B. falcatum* i *B. sibthorpiatum* pokazuju visok stepen hemijske sličnosti u pogledu prisustva alifatičnih estara i ostalih isparljivih i delimično isparljivih sekundarnih metabolita, pažljivom analizom utvrđene su kvantitativne i kvalitativne razlike koje ukazuju na mogućnost njihovog potencijalnog hemotaksonomskog razgraničenja.

Na kraju je izvršena i detaljna hemijska analiza etarskih ulja dve vrste roda *Bupleurum* sa prostora Srbije – *B. praealtum* i *B. affine*. Primenom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom identifikovano je ukupno 230 jedinjenja, pri čemu su zabeležene jasne razlike u kvalitativnom i kvantitativnom profilu između analiziranih vrsta. Etarsko ulje *B. affine* karakteriše visoka koncentracija alkana (23,4%) i seskviterpenskih ugljovodonika (41,2%), dok u ulju vrste *B. praealtum* dominiraju seskviterpenski ugljovodonici (45,3%) i „ostala” jedinjenja (30,0%). Oba ulja sadrže relativno nizak udeo monoterpenskih i oksilipinskih metabolita, uz primetne kvantitativne razlike koje ukazuju na specifične isparljive profile ovih vrsta. U ulju *B. affine* po prvi put je identifikovan perilil-2-metilbutanoat, čiji je hemijski identitet potvrđen njegovom sintezom, i sintezom njegovog regioizomera (perilil-3-metilbutanoat). Pored toga, u ulju su detektovana dva nova prirodna proizvoda, koja su preliminarno identifikovana kao 4-decil-acetat i 4-undecil-acetat.

U zaključku, dobijeni rezultati ne samo da proširuju fitohemijska znanja o rodu *Bupleurum*, već i otvaraju mogućnosti za primenu izolovanih jedinjenja u imunofarmakologiji, posebno kao potencijalni modulatori funkcije imunih ćelija. Dalja istraživanja ovih jedinjenja, uključujući testiranje na različitim modelima i ciljnim putevima, mogla bi doprineti razvoju novih fitofarmaceutika baziranih na hemijskom potencijalu biljaka iz roda *Bupleurum*.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji su objavljeni u jednom radu kategorije M21a i dva rada kategorije M21.

6. Summary

Within the doctoral dissertation entitled “Secondary metabolites of selected taxa of the genus *Bupleurum* L. (Apiaceae): isolation, identification and biological activity” we report the chemical analysis of diethyl-ether extracts from four *Bupleurum* taxa: *B. praealtum*, *B. veronense*, *B. sibthorpiatum*, and *B. falcatum*. In addition, we performed a comparative study of the essential-oil composition of *B. praealtum* and *B. affine*. The diethyl-ether extracts of *B. praealtum*, *B. veronense*, and *B. falcatum* were fractionated on silica gel. Selected fractions were then characterized by GC-MS and 1D/2D NMR spectroscopy.

From the aerial parts and schizocarps of *B. praealtum*, six compounds were isolated: four new polyunsaturated esters (**31–34**, praealtaesters A–D), one new polyunsaturated γ -butyrolactone (**35**), and one lignan (**36**), a new natural compound. These C₁₄ tetraene esters bear diverse (hydroxy)acid moieties. The geometry of all conjugated double bonds was unambiguously established by combining 1D/2D NMR experiments with full spin-system simulation – an approach that proved essential for resolving stereochemical details. Absolute configuration of compound **31** was determined by comparison of its Mosher ester NMR data with those of diastereomeric standards (synthesized from enantiomerically pure and racemic valine); for compound **35**, complete hydrogenation followed by optical-rotation measurement against literature values confirmed its chiral center. Lignan **36** was identified as 7-oxoarcitin, a previously undescribed natural product.

Compounds **31**, **34**, **35** and (+)-arcitin were evaluated on primary rat splenocyte and macrophage cultures for immunomodulatory effects via the assessment of cell viability and function. All four significantly modulated mitochondrial and lysosomal activity: esters **31**, **34** and **35** – each bearing a deca-1,3,5,7-tetraen-1-yl motif – exhibited dual behavior, stimulating at low doses and exerting cytotoxicity at higher concentrations. In contrast, (+)-arcitin showed no toxicity toward normal immune cells but actually enhanced their metabolic activity, indicating selective action against transformed cells. Praealtalactone (**35**) proved most cytotoxic, likely through formation of Michael-type electrophilic metabolites. Moreover, compounds **31** and **35** partially inhibited myeloperoxidase activity, suggesting a role in oxidative-stress modulation.

From *B. veronense* extract, three new metabolites were isolated: a macrolide derivative (homodihydrofalcarinolide), a polyene ester structurally related to those from *B. praealtum* (veronaester), and a phloroglucinol derivative (**39**). Homodihydrofalcarinolide represents a biochemical precursor of falcarinol or a side branch of the later. Absolute configuration of compound **39** was elucidated via Mosher-ester synthesis with (*R*)- and (*S*)-MTPA. Two additional dehydration/cyclization artifacts co-eluting with **39** are presumed to have formed during isolation. Two known lignans – isoyatein and lariciresinol – were also obtained; lariciresinol represents the first report of this diol in the genus *Bupleurum*.

We further analyzed diethyl-ether extracts of four Balkan populations preliminarily identified as *B. falcatum* subsp. *falcatum* (syn. *B. falcatum*) and *B. falcatum* subsp. *cernuum* (syn. *B. sibthorpiatum*). GC-MS and NMR studies led to the discovery of three new aliphatic polyunsaturated esters and a new polyunsaturated hydrocarbon (**47**) closely related to homodihydrofalcarinolide. Chemical profiles correlated strongly with basal leaf morphology and is in accordance with published data on the distribution of certain intraspecific taxa. The Galičica population uniquely produced a heptadecadienetriyne (**47**), while populations from Mt. Šar planina and Mt. Suva Planina differed in their polyene contents. In the *B. falcatum* sample from Mt. Suva Planina, we also detected homologous polyunsaturated stereoisomeric C₁₅ and C₁₇ alcohols differing in double-bond geometry at C-2 and their corresponding acetates. To confirm acetate structures, we performed Steglich esterification of the fraction containing these alcohols, thereby synthesizing and validating the natural acetates. The sample from Olymp Mt. was characterized by a high content of 10-nonacosanone and various stereoisomeric esters.

These findings reveal significant chemotypic diversity within the *B. falcatum* complex and constitute the first systematic description of its less-polar secondary metabolites, including newly discovered polyenes. Future work combining molecular markers and bioactivity assays will clarify the taxonomic and pharmacological significance of these specialized metabolites. Although *B. falcatum* and *B. sibthorpiatum* taxa share many aliphatic esters and other volatiles, quantitative and qualitative differences support their potential chemotaxonomic discrimination.

Finally, GC-MS analysis of the essential oils of Serbian *B. praealtum* and *B. affine* allowed the identification of 230 constituents with distinct quantitative profiles: *B. affine* oil is rich in alkanes (23.4%) and sesquiterpene hydrocarbons (41.2%), while *B. praealtum* oil is dominated by sesquiterpene hydrocarbons (45.3%) and other unclassified components

(30.0%). Monoterpenes and oxylipins remain minor fractions. Perillyl 2-methylbutanoate was observed in *B. affine* oil for the first time and confirmed by its synthesis, and of the isomeric valerate, alongside two new natural products – 4-decyl acetate and 4-undecyl acetate, tentatively identified.

Collectively, these studies expand our phytochemical knowledge of the genus *Bupleurum* and point toward promising immunopharmacological applications of its metabolites. Continued evaluation across diverse biological models and pathways may pave the way for novel plant-derived therapeutics.

The work presented here has been published in one M21a-category paper and two M21-category papers.

7. Literatura

- Abe, H., Orita, M., Konishi, H., Arichi, S., Odashima, S., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1985, 37, 555–559.
- Abe, H., Sakaguchi, M., Odashima, S., Arich, S., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1982, 320, 266–271.
- Abe, H., Sakaguchi, M., Yamada, M., Arich, S., Odashima, S., *Planta Med.*, 1980, 40, 366–372.
- Abolfazl, M., Frhad, M., Ahmadsreza, D., Hossein, N., *Afr. J. Agric. Res.*, 2013, 8, 3151–3158.
- Abolfazl, M., Hossein, N., Sohrab, I., Hadi, A., *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 2014, 5, 1000–1006.
- Adams, R.P., *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th ed., Allured Publishing, Carol Stream, IL, USA, 2007.
- Adjangba, S., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1963, 8, 1942–1950.
- Adjangba, S., *Mem. Mus. Natl. Hist. Nat. (Paris), Ser. D*, 1965, 1, 107–205.
- Ahmad, T., Cawood, M., Iqbal, Q., Ariño, A., Batool, A., Tariq, R.M.S., Azam, M., Akhtar, S., *Foods*, 2019, 8, 424.
- Ahmad, M., Maqbool, J.R., Sabir, A.W., Bhatti, M.K., *Pak. J. Sci. Ind. Res.*, 1987, 30, 603–604.
- Ahn, B.Z., Kim, S.I., *Arch. Pharm.*, 1988, 321, 61–63.
- Ahn, S.S., Lee, Y.H., Yeo, H.J., Jung, E., Lim, Y., Shin, S.Y., *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, 23, 4857.
- Aimi, N., Shibata, S., *Tetrahedron Lett.*, 1966, 39, 4721–4724.
- Akai, E., Takeda, T., Kobayashi, Y., Ogihara, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, 1985, 33, 4685–4690.
- Akin, M., Saraçoğlu, H.T., Demirci, B., Baser, K.H.C., Kucukoduk, M., *Rec. Nat. Prod.*, 2012, 6, 316–320.
- Alanko, J., Kurahashi, Y., Yoshimoto, T., Yamamoto, S., Baba, K., *Biochem. Pharmacol.*, 1994, 48, 1979–1981.
- Altantsetseg, S., Shatar, S., Javzmaa, N., *Mong. J. Chem.*, 2012, 13, 28–30.
- Andriamaharavo, N.R. Retention Data; NIST Mass Spectrometry Data Center: Gaithersburg, MD, USA, 2014.
- Anet, E.F.L.J., Lythgoe, B., Silk, M.H., Trippett, S., *J. Chem. Soc.*, 1953, 309–322.
- Ashour, M.L., El-Readi, M.Z., Hamoud, R., Eid, S.Y., El Ahmady, S.H., Nibret, E., Herrmann, F., Youns, M., Tahrani, A., Kaufmann, D., Wink, M., *Chin. Med.*, 2014, 9, 4.
- Ashour, M.L., El-Readi, M., Youns, M., Mulyaningsih, S., Sporer, F., Efferth, T., Wink, M., *J. Pharm. Pharmacol.*, 2009, 61, 1079–1087.
- Ashour, M.L., Wink, M., *J. Pharm. Pharmacol.*, 2011, 63, 305–321.

- Assenov, I. 1982. *Bupleurum* L. – In: Velchev, V. (ed.), Fl. Reipubl. Popularis Bulgaricae. Vol. 8, pp. 109-125. In Aedibus Acad. Sci. Bulgaricae, Serdicae (in Bulgarian).
- Badheka, L., Prabhu, B., Mulchandani, N., *Phytochemistry*, 1986, 25, 487–489.
- Banerji, M.J., Rej, R.N., Handa, K.L., *Indian J. Chem. B*, 1977, 15B, 293–294.
- Barrero, A.F., Haídour, A., Muñoz-Dorado, M., Akssira, M., Sedqui, A., Mansour, I., *Phytochemistry*, 1998, 48, 1237–1240.
- Barrero, A.F., Haídour, A., Sedqui, A., Mansour, A.I., Rodríguez-García, I., López, A., Muñoz-Dorado, M., *Phytochemistry*, 2000, 54, 741–745.
- Barrero, A.F., Herrador, M.M., Akssira, M., Arteaga, P., Romera, J.L., *J. Nat. Prod.*, 1999, 62, 946–948.
- Benito, P.B., Abad-Marinez, M.J., Silvan-Sen, A.M., Sanz-Gomez, A., Fernandez-Matellano, L., Sanchez-Contreras, S., Diaz-Lanza, A.M., *Life Sci.*, 1998, 63, 1147–1156.
- Bermejo, P., Abad, M.J., Diaz, A.M., Fernandez, L., Santos, J.D., Sanchez, S., Villaescusa, L., Carrasco, L., Irurzun, A., *Planta Med.*, 2002, 68, 106–110.
- Berti, F., Bincoletto, S., Donati, I., Fontanive, G., Fregonese, M., Benedetti, F., *Org. Biomol. Chem.*, 2011, 9, 1987–1999.
- Bertoli, A., Pistelli, L., Morelli, I., Fraternali, D., Giamperi, L., Ricci, D., *Plant Sci.*, 2004, 167, 807–810.
- Binder, R.G., French, R.C., *J. Agric. Food Chem.*, 1994, 42, 2942–2945.
- Bohlmann, F., Brehm, M., *Org. Magn. Reson.*, 1979, 12, 535–536.
- Bohlmann, F., Jastrow, H., *Chem. Ber.*, 1962, 95, 2939–2944.
- Bohlmann, F., Rode, K.-M., *Chem. Ber.*, 1968a, 101, 525–531.
- Bohlmann, F., Rode, K.M., *Chem. Ber.*, 1968b, 101, 1163–1175.
- Bohlmann, F., Sucrow, W., Jastrow, H., Koch, H., *Chem. Ber.*, 1961, 94, 3179–3188.
- Bohlmann, F., Viehe, H.G., *Chem. Ber.*, 1955, 88, 1245–1251.
- Bohlmann, F., Zdero, C., *Phytochemistry*, 1977, 16, 239–242.
- Bohlmann, F., Zdero, C., Grenz, M., *Chem. Ber.*, 1975, 108, 2822–2823.
- Bohlmann, F., Zdero, C., Thefeld, W., *Chem. Ber.*, 1971a, 104, 2030–2032.
- Bohlmann, F., Zdero, C., Trénel, J., Hänel, P., Grenzal, M., *Chem. Ber.*, 1971b, 104, 1322–1328.
- Boissier, E., *Flora Orientalis*, Vol. 2, Geneva and Basel, 1872.
- Bremner, P., Tang, S., Birkmayer, H., Fiebich, B.L., Munoz, E., Marquez, N., Rivera, D., Heinrich, M., *Planta Med.*, 2004, 70, 914–918.

- Briquet, J., in: Burnat, E. (Ed.), *Matériaux pour servir à l'histoire de la flore des Alpes Maritimes*, Georg & Co., Bale et Genève, 1897.
- Bui, T.T., Piao, C.H., Hyeon, E., Fan, Y., Choi, D.W., Jung, S.Y., Jang, B.H., Shin, H.S., Song, C.H., Chai, O.H., *Am. J. Chinese Med.*, 2019, 47, 405–421.
- Calestani, V., *Webbia*, 1905, 1, 89–170.
- Casiglia, S., Bruno, M., Senatore, F., Senatore, F., *Nat. Prod. Commun.*, 2016, 11, 105–108.
- Cauwet-Marc, A.-M., PhD Thesis, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Perpignan, 1976.
- Cerceau-Larrival, M.T., Roland-Heydacker, F., 1978, Apport de la palynologie à la connaissance des Ombellifères actuelles et fossiles. In: Cauwet-Marc AM, Carbonnier J, eds. 1982. *Les Ombellifères: contributions pluridisciplinaires à la systématique: actes du 2e Symposium International sur les Ombellifères*, Centre Universitaire de Perpignan, 18–21 Mai 1977, St Louis, MO: Missouri Botanical Garden, 213–229.
- Chang, W.L., Chiu, L.W., Lai, J.H., Linet H.C., *Phytochemistry*, 2003, 64, 1375–1379.
- Chen, C.H., Chen, M.F., Huang, S.J., Huang, C.Y., Wang, H.K., Hsieh, W.C., Huang, C.H., Liu, L.F., Shiu, L.Y., *Am. J. Chin. Med.*, 2017, 2, 1-18.
- Chen, M.F., Huang, C.C., Liu, P.S., Chen, C.H., Shiu, L.Y., *J. Med. Food*, 2013, 16, 793–800.
- Chizzola, R., *Chem. Nat. Compd.*, 2008, 44, 792–793.
- Christensen, L.P., Brandt, K., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006, 41, 683–693.
- Christensen, L.P., Lam, J., Thomasen, T., *Phytochemistry*, 1991, 30, 3457–3458.
- Contreras S.S., Lanza, A.M.D., Pajares, M.B., Esteban, C.B., Castillo, L.V., Martínez, M.J.A., Benito, P.B., Matellano, L.F., *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 2002, 27, 659–696.
- Cornelius, A., Yerram, N., Kratz, D., Spector, A., *Cancer Res.*, 1991, 51, 6025–6030.
- Dale, J.A., Mosher, H.S., *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, 95, 512–519.
- Davidson, S., Pilkington, L., Dempsey-Hibbert, N., El-Mohtadi, M., Tang, S., Wainwright, T., Whitehead, K., Barker, D., *Molecules*, 2018, 23, 3057–3083.
- Dawid, C., Dunemann, F., Schwab, W., Nothnagel, T., Hofmann, T., *J. Agric. Food Chem.*, 2015, 63, 9211–9222.
- Deechongkit, S., You, S.L., Kelly, J., *Org. Lett.*, 2004, 6, 497–500.
- Ding, J.K., Fujino, H., Kasai, R., Fujimoto, N., Tanaka, O., Zhou, J., Matsuura, H., Fuwa, T., *Chem. Pharm. Bull.*, 1986, 34, 1158–1167.
- Drude, O., Umbelliferae. In: Engler A, Prantl K, eds. *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*, Vol. 3, Part 8, Leipzig: Wilhelm Engelman, 1898.
- Du, J.K., Song, D.B., Cao, T.S., Li, Y.H., Liu, J.R., Li, B.H., Li, L., *Cell Cycle*, 2021, 20, 2221–2232.

- Ebata, N., Nakajima, K., Hayashi, K., Okada, M., Maruno, M., *Phytochemistry*, 1996, 41, 895–901.
- Estévez-Braun, A., González, A.G., *Nat. Prod. Rep.*, 1997, 14, 465–475.
- Estévez-Braun, A., Estévez-Reyes, R., González, A.G., *Phytochemistry*, 1992, 31, 2841–2845.
- Estévez-Braun, A., Estévez-Reyes, R., González, A.G., *Tetrahedron*, 1994, 50, 5203–5210.
- Estévez-Braun, A., Estévez-Reyes, R., González, A.G., *J. Nat. Prod.*, 1993, 56, 1177–1181.
- Estévez-Braun, A., Estévez-Reyes, R., González, A.G., *Phytochemistry*, 1996, 43, 885–886.
- Estévez-Braun, A., Estévez-Reyes, R., González-Pérez, J.A., González, A.G., *J. Nat. Prod.*, 1995, 58, 887–892.
- Evergetis, E., Haroutounian, S.A., *Ind. Crops Prod.*, 2014, 54, 70–77.
- Ezawa, T., *Rep. Taiwan Cent. Res. Lab.*, 1916, 5, 179.
- Fan, C.Q., Zhu, X.Z., Zhan, Z.J., Ji, X.Q., Li, H., Yue, J.M., *Planta Med.*, 2006, 72, 590–595.
- Fang, W., Yang, Y. J., Guo, B. L., Cen, S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2017, 27, 1654–1659.
- Feng, Y.C., Weng, H.B., Ling, L.J., Zeng, T., Zhang, Y.Y., Chen, D.F., Li, H., *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, 132, 1001–1011.
- Fernández-Ocaña, A.M., Fernández-López, C., Camacho-Simarro, A.M., Velasco-Negueruela, A., Perez-Alonso, M.J., Pala-Paul, J., Garcia-Vallejo, M.C., Altarejos, J., *J. Essent. Oil Res.*, 2006, 18, 396–401.
- Fernández-Ocaña, A.M., Gómez-Rodríguez, M.V., Velasco-Negueruela, A., Camacho-Simarro, A.M., Fernández-López, C., Altarejos, J., *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 6414–6417.
- Fois, B., Bianco, G., Sonar, V., Distinto, S., Maccioni, E., Meleddu, R., Melis, C., Marras, L., Pompei, R., Floris, C., Caboni, P., Cottiglia, F., *J. Nat. Prod.*, 2017, 80, 2799–2806.
- Fu, Y.H., Hu, X.Y., Cao, Y.G., Zhang, Z.C., Zhang, N.S., *Free Radic. Biol. Med.*, 2015, 89, 777–785.
- Fujimoto, Y., Sakuma, S., Komatsu, S., Sato, D., Nishida, H., Xiao, Y.Q., Baba, K., Fujita, T., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1998, 50, 1075–1078.
- Gevrenova, R., Kondeva-Burdina, M., Denkov, N., Zheleva-Dimitrova, D., *Pharmacogn. Mag.*, 2015, 11, 14–23.
- Giamperi, L., Ricci, D., Fraternali, D., Manunta, A., Tabacchi, R., *J. Essent. Oil Res.*, 1998, 10, 369–374.
- Gong, Q., Zhang, Y., Tan, N., Chen, Z., *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, 2008, 33, 1269–1272.
- González, A.G., Estévez-Reyes, R., Mato, C., *J. Nat. Prod.*, 1989, 52, 1139–1142.

- González, A.G., Estévez-Reyes, R., Mato, C., Estévez-Braun, A.M., *Phytochemistry*, 1990, 29, 675–678.
- Gonzalez, A.G., Trujillo, J.M., Estevez, R., Perez, J.P., *An. Quim.*, 1975, 71, 109–110.
- Grenier, M., Godron, M., Flore de France, Vol. 1, Paris, 1848.
- Han, N.R., Kim, H.M., Jeong, H.J., *Biol. Pharm. Bull.*, 2011, 34, 817–823.
- Han, W.J., Xu, J., Wan, H.F., Zhou, L., Wu, B., Gao, J.P., Guo, X.W., Sui, C., Wei, J.H., *FEBS Open Bio*, 2022, 12, 1344–1352.
- Hanthanong, S., Choodej, S., Teerawatananond, T., Pudhom, K., *J. Nat. Prod.*, 2019, 82, 1405–1411.
- Hansen, L., Boll, P.M., *Phytochemistry*, 1986, 25, 285–293.
- He, H., Dai, L.X., You, S.L., *Org. Biomol. Chem.*, 2010, 8, 3207–3210.
- Hearn, M.T.W., Turner, J.L., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1976, 9, 1027–1029.
- Ho, T.-T., Murthy, H.N., Park, S.-Y., *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, 21, 716.
- Hoye, T.R., Jeffrey, C.S., Shao, F., *Nat. Protoc.*, 2007, 2, 2451–2458.
- Hsu, M.J., Cheng, J.S., Huang, H.C., *Br. J. Pharmacol.*, 2000, 131, 1285–1293.
- Hu, W., Ge, Y., Ojcius, D.M., Sun, D., Dong, H., Yang, F.X., Yan, J., *Cell Microbiol.*, 2013, 15, 1642–1659.
- Hu, S.C.S., Lee, T.I., Yen, M.H., Lin, C.C., Lee, C.W., Yen, F.L., *J. Ethnopharmacol.*, 2016, 179, 432–442.
- Huang, H.Q., Zhang, X., Lin, M., Shen, Y.H., Yan, S.K., Zhang, W.D., *J. Sep. Sci.*, 2008, 31, 3190–3201.
- Huang, H.Q., Zhang, X., Shen, Y.H., Su, J., Liu, X.H., Tian, J.M., Lin, S., Shan, L., Zhang, W.D., *J. Nat. Prod.*, 2009, 72, 2153–2157.
- Ishii, H., Nakamura, M., Seo, S., Tori, K., Tozyo, T., Yoshimura, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, 1980, 28, 2367–2373.
- Joshi, R.K., Pande, C., *Nat. Prod. Commun.*, 2008, 3, 1919–1920.
- Kapetanios, C., Karioti, A., Bojović, S., Marin, P., Veljić, M., Skaltsa, H., *Chem. Biodivers.*, 2008, 5, 101–119.
- Kato, M., Pu, M., Isobe, K.L., Hattori, T., Yamagita, N., Nakashima, I., *Immunopharmacology*, 1995, 29, 207–213.
- Kiliç, Ö., *Turk. J. Agric. Nat. Sci.*, 2014, 1, 445–449.
- Kim, S.O., Park, J.Y., Jeon, S.Y., Yang, C.H., Kim, M.R., *Int. J. Mol. Med.*, 2015, 35, 1126–1132.

- Kobaisy, M., Abramowski, Z., Lermer, L., Saxena, G., Hancock, R.E., Towers, G.H., Doxsee, D., Stokes, R.W., *J. Nat. Prod.*, 1997, 60, 1210–1213.
- Kobayashi, M., Tawara, T., Tsuchida, T., Mitsuhashi H., *Chem. Pharm. Bull.*, 1990, 38, 3169–3171.
- Koso-Poljansky, B.M., *Acta Horti Petropolitani*, 1913, 30, 135–333.
- Kubota, T., Hinoh, H., *Tetrahedron Lett.*, 1966, 39, 4725–4728.
- Kubota, T., Hinoh, H., *Tetrahedron Lett.*, 1968a, 3, 303–306.
- Kubota, T., Hinoh, H., *Tetrahedron*, 1968b, 24, 675–686.
- Kubota, T., Tonami, F., Hinoh, H., *Tetrahedron*, 1967, 23, 3333–3351.
- Kuklev, D. V., Smith, W.L., *Chem. Phys. Lipids*, 2004, 131, 215–222.
- Kumazawa, Y., Kawakita, T., Takimoto, H., Nomoto, K., *Int. J. Immunopharmacol.*, 1990, 12, 531–537.
- Kumazawa, Y., Takimoto, H., Nishimura, C., Kawakita, T., Nomoto, K., *Int. J. Immunopharmacol.*, 1989, 11, 21–28.
- Laouer, H., Hireche-Adjal, Y., Prado, S., Boulaacheb, N., Akkal, S., Singh, G., Singh, P., Isidorov, V. A., Szczepaniak, L., *Nat. Prod. Commun.*, 2009, 4, 1605–1610.
- Lee, T.F., Lin, Y.L., Huang, Y.T., *Liver Int.*, 2011a, 31, 618–629.
- Lee, T.F., Lin, Y.L., Huang, Y.T., *Eur. J. Clin. Invest.*, 2012, 42, 607–616.
- Lee, J., Yang, D.H., Suh, J.H., Kim, U., Eom, H.Y., Kim, J., Lee, M.Y., Kim, J., Hna, S.B., *J. Chromatogr. B*, 2011b, 879, 3887–3895.
- Letchamo, W., Korolyuk, E.A., Tkachev, A.V., *J. Essent. Oil Res.*, 2005, 17, 577–578.
- Li, D.Q., Wu, J., Liu, L.Y., et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2015, 25, 3887–3892.
- Li, T., Zhang, Y., Tang, G., Wang, B., Chen, S., Zhang, R., *Phytochemistry*, 1999, 50, 139–142.
- Li, X., Jia, Y., Song, A., Chen, X., Bi, K., *Yakugaku Zasshi*, 2005, 125, 815–819.
- Li, X.Q., He, Z.G., Bi, K.S., Song, Z.H., Xu, L., *J. Essent. Oil Res.*, 2007, 19, 234–238.
- Li, Z.Y., Guo, Y., Liu, Y.M., Liu, X.M., Chang, Q., Liao, Y.H., Pan, R.L., *J. Ethnopharmacol.*, 2013, 148, 794–803.
- Liang, H., Cui, Y.-J., Zhao, Y.-Y., Wang, B., Yang, W.-X., Yu, Y., *Chin. Chem. Lett.*, 2001a, 12, 331–332.
- Liang, H., Han, Z.-Y., Zhao, Y.-Y., Wang, B., Cui, Y.-X., Yang, W.-X., Yu, Y., *Acta Bot. Sin.*, 2001b, 43, 198–200.
- Liang, Z., Qin, M., Tang, L., Wang, Z.-T., *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao*, 2003, 34, 305–308.

- Liang, H., Zhao, Y.-Y., Cui, Y.-X., *Chin. Chem. Lett.*, 1998a, 9, 69–70.
- Liang, H., Zhao, Y., Qiu, H., Huang, J., Zhang, R., *Yao Xue Xue Bao*, 1998b, 33, 37–41.
- Lim, S.H., Lee, H.S., Han, H.K., Choi, C.I., *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22, 11409.
- Lin, X.M., Wu, S.D., Wang, Q., Shi, Y.L., Liu, G.Z., Zhi, J., Wang, F., *Cell. Mol. Neurobiol.*, 2016b, 36, 1365–1375.
- Lin, M., Zhang, W., Su, J., *J. Ethnopharmacol.*, 2016a, 4, 566–573.
- Liu, K., Lota M.L, Casanova J., Tomi F., *Chem. Biodiversity*, 2009, 6, 2244–2254.
- Liu, Q.-X., Liang, H., Zhao, Y.-Y., Wang, B., Yang, W.-X., Yu, Y., *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 2001, 3, 139–144.
- Liu, Y., Zhang, T.-T., Zhou, J.-S., Wang, Q., *Helv. Chim. Acta*, 2008, 91, 2316–2320.
- Lopez, H., Valera, A., Trujillo, J., *J. Nat. Prod.*, 1996, 59, 493–494.
- Lorente, I., Ocete, M.A., Zarzuelo, A., Cabo, M.M., Jimenez, J., *J. Nat. Prod.*, 1989, 52, 267–272.
- Lu, C.N., Yuan, Z.G., Zhang, X.L., Yan, R., Zhao, Y.Q., Liao, M., Chen, J.X., *Int. Immunopharm.*, 2012, 14, 121–126.
- Luo, H.-S., Zhao, Y.-Y., Ma, L.-B., Jin, Y.-Z., Peng, J.-R., Zhang, R.-Y., *Acta Pharm. Sin.*, 1995, 30, 435–439.
- Luo, H.-S., Zhao, Y.-Y., Qiao, L., Ma, L.-B., Zhang, R.-Y., *Acta Bot. Sin.*, 1996, 38, 910–913.
- Luo, S.-Q., Lin, L.-Z., Cordell, G.A., *Phytochemistry*, 1993, 33, 193–196.
- Ma, K.-Q., Miao, Y.-H., Gao, X.-X., Chao, J.-B., Zhang, X., Qin, X.-M., *Chin. Chem. Lett.*, 2017, 28, 1035–1038.
- Ma, L.-B., Jin, Y.-Z., Tu, G.-Z., Luo, H.-S., Zhao, Y.-Y., Hu, C.-F., Zhang, R.-Y., Lai, L.-H., Xu, X.-jie, Tang Y.-qi, *Acta Chim. Sin.*, 1996, 12, 1207–1208.
- Mabberley, D.J., *Mabberley's Plant-Book*, Cambridge Univ. Press, 2008.
- Machado, S., Silva, E., Massa, A., *Contact Dermatitis*, 2002, 47, 113–114.
- Madbouly, S.A., Liu, K., Xia, Y., Kessler, M.R., *RSC Adv.*, 2014, 4, 6710–6718.
- Manunta, A., Tirillini, B., Fraternali, D., *J. Essent. Oil Res.*, 1992, 4, 461–466.
- Martin, S., Padilla, E., Ocete, M.A., Galvez, J., Jimenez, J., Zarzuelo, A., *Planta Med.*, 1993, 59, 533–536.
- Massanet, G.M., Guerra, F.M., Jorge, Z.D., Casalsvázquez, L.G., *Phytochemistry*, 1997, 44, 173–177.
- Matsuda, H., Murakami, T., Ninomiya, K., Inadzuki, M., Yoshikawa, M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1997, 7, 2193–2198.
- Matsumoto, T., Hosono-Nishiyama, K., Yamada, H., *Biol. Pharm. Bull.*, 2008, 31, 931–934.

- Matsunaga, H., Katano, M., Yamamoto, H., Fujito, H., Mori, M., Takata, K., *Chem. Pharm. Bull.*, 1990, 38, 3480–3482.
- Matsunaga, H., Katano, M., Yamamoto, H., Mori, M., Takata, K., *Chem. Pharm. Bull.*, 1989, 37, 1279–1281.
- Maxia, A., Frau, M. A., Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Goncalves, M. J., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., *Rec. Nat. Prod.*, 2011, 5, 92–99.
- Medbouhi, A., Tintaru, A., Beaufay, C., Naubron, J.-V., Djabou, N., Costa, J., Quetin-Leclercq, J., Muselli, A., *Molecules*, 2018, 23, 3250.
- Mékaoui, R., Benkaci-Ali, F., Alsafr, Z., Eppe, G., *Nat. Prod. Res.*, 2020, 34, 3134–3138.
- Meng, J., Chen, X., Yang, W., Song, J., Zhang, Y., Li, Z., Yang, X., Yang, Z., *J. Tradit. Chin. Med.*, 2014, 34, 741–748.
- Metcalf, C.R., Chalk, L., *Anatomy of the Dicotyledons*, Vol. 2, Clarendon Press, Oxford, UK, 1950.
- Micevski, K., *The Flora of the Republic of Macedonia*, Vol. 1(6), Macedonian Academy of Sciences and Arts, Skopje, 2005, pp. 1433–1715.
- Mikaya, G.A., Turabelidze, D.G., Kemertelidze, E.P., Wulfson, N.S., *Planta Med.*, 1981, 43, 378–380.
- Minto, R., Blacklock, B., *Prog. Lipid Res.*, 2008, 47, 233–306.
- Mohammadi, A., Nazari, H., Imani, S., Amrollahi, H., *J. Mycol. Med.*, 2014, 24, 1–8.
- Morita, M., Nakajima, K., Ikeya, Y., Mitsuhashi, H., *Phytochemistry*, 1991, 30, 1543–1545.
- Murdoch, S.R., Dempster, J., *Contact Dermatitis*, 2000, 42, 236.
- Nageswara, R.G., Ravi, G., Sharath K.G.S., *J. Pharm. Sci. Res.*, 2012, 4, 1807–1809.
- Naruse, M., Aoyagi, S., Kibayashi, C., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1996, 1153–1124.
- Navarro, P., Giner, R.M., Recio, M.C., Manes, S., Cer-Nicolas, M., Rios, J.L., *Life Sci.*, 2001, 68, 1199–1206.
- Neves, S.S., Watson, M.F., *Ann. Bot.*, 2004, 93, 379–398.
- Nikolić, V., in: Josifović, M. (Ed.), *Flora SR Srbije*, Vol. V, Serbian Academy of Sciences and Arts, Belgrade, 1973, pp. 199–214.
- NIST 17, *Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH)*, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA, 2017.
- Nose, M., Amagaya, S., Ogihara, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, 1989, 37, 2736–2740.
- Ocete, M.A., Risco, S., Zarzuelo, A., Jimenez, J., *J. Ethnopharmacol.*, 1989, 25, 305–313.
- Ohtani, I., Kusumi, T., Ishitsuka, M.O., Kakisawa, H., *Tetrahedron Lett.*, 1989, 30, 3147–3150.
- Ohtani, I., Kusumi, T., Kashman, Y., Kakisawa, H., *J. Org. Chem.*, 1991a, 56, 1296–1298.

- Ohtani, I., Kusumi, T., Kashman, Y., Kakisawa, H., *J. Am. Chem. Soc.*, 1991b, 113, 4092–4096.
- Otsuka, H., Kobayashi, S., Shibata, S., *Planta Med.*, 1978, 33, 152–159.
- Pala-Paul, J., Perez-Alonso, M.J., Velasco-Negueruela, A., *J. Essent. Oil Res.*, 1999, 11, 456–458.
- Pan, S.-L. (Ed.), *Bupleurum Species: Scientific Evaluation and Clinical Applications*, 1st ed., CRC Press, 2006.
- Pande, C., Tewari, G., Singh, C., Singh, S., *Nat. Prod. Res.*, 2012, 26, 1442–1445.
- Park, K.H., Park, J., Koh, D., Lim, Y., *Phytother. Res.*, 2002, 16, 359–363.
- Park, W.H., Kang, S., Piao, Y., Pak, C.J., Oh, M.S., Kim, J., Kang, M.S., Pak, Y.K., *J. Ethnopharmacol.*, 2015, 174, 37–44.
- Pauli, G.F., Chen, S.N., Lankin, D.C., Bisson, J., Case, R.J., Chadwick, L.R., Gödecke, T., Inui, T., Krunić, A., Jaki, B.U., McAlpine, J.B., Mo, S., Napolitano, J.G., Orjala, J., Lehtivarjo, J., Korhonen, S.P., Niemitz, M., *J. Nat. Prod.*, 2014, 77, 1473–1487.
- Pauli, G., Ray, G.J., Bzhelyansky, A., Jaki, B., Corbett, C., Szabo, C., Setinbeck, C., Sørensen, D., Jeannerat, D., Ferreira, D., Lankin, D., McAlpine, J., Dumez, J.-N., Bisson, J., Krishnamurty, K., Niemitz, M., Nelson, M., Giraudeau, P., Korhonen, S.-P., Kuhn, S., Miura, T., Botros, L., ChemRxiv, 2021. Doi: [10.33774/chemrxiv-2021-l3dhr](https://doi.org/10.33774/chemrxiv-2021-l3dhr)
- Pistelli, L., Bertoli, A., Bilia, A.R., Morelli, I., *Phytochemistry*, 1996, 41, 1579–1582.
- Pistelli, L., Bilia, A.R., Bertoli, A., Morelli, I., Marsili, A., *J. Nat. Prod.*, 1995, 58, 112–116.
- Pistelli, L., Bilia, A.R., Marsili, A., De Tommasi, N., Manunta, A., *J. Nat. Prod.*, 1993, 56, 240–244.
- Pistelli, L., Cammilli, A., Manunta, A., Marsili, A., Morelli, I., *Phytochemistry*, 1993, 33, 1537–1539.
- Pistelli, L., Noccioli, C., Giachi, I., Dimitrova, B., Gevrenova, R., Morelli, I., Donatella Potenza, D., *Nat. Prod. Res.*, 2005, 19, 783–788.
- Pretsch, E., Bühlmann, P., Badertscher, M., *Structure Determination of Organic Compounds. Tables of Spectral Data*, 4th ed., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2009, p. 317.
- Radulović, N., Đorđević, M., Dekić, M., Blagojević, P., *Chem. Biodivers.*, 2016a, 13, 403–415.
- Radulović, N., Filipović, S., Zlatković, D., Đorđević, M., Stojanović, N., Randjelović, P., Mitić, K., Jevtović Stoimenov, T., Randelović, V., *RSC Adv.*, 2016, 6, 41847–41860.
- Radulović, N., Mladenović, M., Stojanović, N., Randjelović, P., Blagojević, P., *J. Nat. Prod.*, 2019, 82, 1874–1885.
- Radulović, N.S., Mladenović, M.Z., Stojanović-Radić, Z.Z., *Flavour Fragrance J.*, 2014, 29, 255–266.

- Radulović, N.S., Zlatković, D.B., Mitić, K.V., Randjelović, P.J., Stojanović, N.M., *Polyhedron*, 2014, 80, 134–141.
- Raveau, R., Fontaine, J., Sahraoui, A.L.-H., *Foods*, 2020, 9, 1–31.
- Ren, M.D., McGowan, E., Li, Y., Zhu, X.F., Lu, X.L., Zhu, Z.F., Lin, Y.G., He, S.X., *Front. Pharmacol.*, 2019, 10, 623.
- Robate, J., *Chem. Zentralbl.*, 1931, 102, 1772.
- Roma-Marzio, F., Najar, B., Nardi, V., Pistelli, L., Peruzzi, L., *Biochem. Syst. Ecol.*, 2020, 80, 103966.
- Rustaiyan, A., Masnabadi, N., Masoudi, S., Samadizadeh, M., Firouznia, A., Larijani, K., *J. Essent. Oil Bear. Plants*, 2010, 6, 727–731.
- Sajjadi, S.E., *J. Essent. Oil Bear. Plants*, 2008, 11, 638–642.
- Sánchez-Contreras, S., Díaz-Lanza, A.M., Bernabé, M., *J. Nat. Prod.*, 2000, 63, 1479–1482.
- Saraçoğlu, H.T., Ph.D. Thesis, 2011, The Determination of Essential Oil Compositions and Antibacterial Activities of Some *Bupleurum* L. (Apiaceae) Taxa Growing in Central Anatolia Region.
- Saraçoğlu, H.T., Akin, M., Demirci, B., Baser, K.H.C., *Afr. J. Microbiol. Res.*, 2012, 6, 2899–2906.
- Saroglou, V., Marin, P.D., Rancić, A., Veljić, M., Skaltsa, H., *Biochem. Syst. Ecol.*, 2007, 35, 146–152.
- Schulte, K.E., Petter, B., *Arch. Pharm.*, 1977, 310, 945–946.
- Schulte, K.E., Wulfhorst, G., *Arch. Pharm.*, 1977, 310, 285–286.
- Semerdjieva, I., Zheljazkov, V.D., Dincheva, I., Piperkova, N., Maneva, V., Cantrell, C.L., Astatkie, T., Stoyanova, A., Ivanova, T., *Plants*, 2023, 12, 923.
- Seto, H., Kawai, H., Ōtake, N., Luo, S.-Q., Qian, F.-G., Pan, S.-L., *Agric. Biol. Chem.*, 1986, 50, 1613–1620.
- Seto, H., Ōtake, N., Kawai, H., Luo, S.-Q., Qian, F.-G., Pan, S.-L., *Agric. Biol. Chem.*, 1986, 50, 1607–1611.
- Shi, S.Y., Chang, M.L., Liu, H.P., Ding, S.Y., Yan, Z.Q., Si, K., Gong, T.T., *Polymers*, 2022, 14, 1119.
- Shi, B., Liu, W., Wei, S., Wu, W., *Nat. Prod. Commun.*, 2010, 5, 1139–1142.
- Shibata, S., Kitagawa, I., Fujimoto, H., *Tetrahedron Lett.*, 1965, 42, 3783–3788.
- Shin, J.S., Im, H.T., Lee, K.T., *Inflammation*, 2019, 42, 342–353.
- Shimaoka, A., Seo, S., Minato, H., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1975, 20, 2043–2048.
- Snogerup, S., In: Davis, P.H. (Ed.) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, 1972, Vol. 4, Edinburgh University Press, pp. 393–418.

- Snogerup, S., Snogerup, B., *Willdenowia*, 2001, 31, 205–308.
- Snogerup, S., Snogerup, B., *Bocconeia*, 2003, 16, 751–755.
- Sommerwerk, S., Heller, L., Siewert, B., Csuk, R., *Bioorg. Med. Chem.*, 2015, 23, 5595–5602.
- Starreveld, E., Hope, E., *Neurology*, 1975, 25, 730–734.
- Sui, C., Chen, M., Xu, J.S., Wei, J.H., Jin, Y., Xu, Y.H., Sun, J., Gao, K., Yang, C.M., Zhang, Z., Chen, S.L., Luo, H.M., *Physiol. Plantarum*, 2015, 153, 230–242.
- Sui, C., Han, W.-J., Zhu, C.-R., Wei, J.-H., *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2021, 22, 329–340.
- Takagi, K., Shibata, M., *Yakugaku Zasshi*, 1969a, 89, 712–720.
- Takagi, K., Shibata, M., *Yakugaku Zasshi*, 1969b, 89, 1367–1378.
- Takeda, K., Kubota, T., *Chem. Pharm. Bull.*, 1958, 6, 6536–6539.
- Tan, L., Zhao, Y.-Y., Wang, B., Zhang, R.-Y., *J. Integr. Plant Biol.*, 1998, 40, 176–179.
- Tan, L., Zhao, Y.-Y., Zhang, R.-Y., Hong, S., *J. Chin. Pharm. Sci.*, 1996, 5, 128–131.
- Tanabe, G., Tsutsui, N., Shibatani, K., Marumoto, S., Ishikawa, F., Ninomiya, K., Muraoka, O., Morikawa, T., *Tetrahedron*, 2017, 73, 4481–4486.
- Tanabe, H., Fukutomi, R., Yasui, K., Kaneko, A., Imai, S., Nakayama, T., Isemura, M., *J. Health Sci.*, 2011, 57, 184–187.
- Teng, L., Guo, X., Ma, Y., Xu, L., Wei, J., Xiao, P., *J. Ethnopharmacol.*, 2023, 306, 116129.
- Teo, D.C.H., Ng, P.S.L., Tan, S.H., Lim, A.T., Toh, D.S.L., Chan, S.Y., Cheong, H.H., *BMC Compl. Alternative Med.*, 2016, 16, 1–11.
- Thijs, L., Zwanenburg, B., *Tetrahedron*, 2004, 60, 5237–5252.
- Tong, H.B., Jiang, G.Q., Qi, D., Bi, J.F., Tian, D., Guan, X.G., Zheng, S., Sun, X., *Carbohydr. Polym.*, 2017, 20, 244–252.
- Tutin, T.G., in: Davis, P.H. (Ed.), *Flora Europaea*, Vol. 2, Cambridge University Press, London, Great Britain, 1968, pp. 345–350.
- Tykheev, Z.A., Anenkhonov, O.A., Zhigzhitzhapova, S.V., Taraskin, V.V., Radnaeva, L.D., Zhang, F., *Plants*, 2020, 9, 1407.
- Tykheev, Z.A., Zhigzhitzhapova, S.V., Taraskin, V.V., Radnaeva, L.D., Zhang, F., Chen, S., Zhang, F., Anenkhonov, O.A., *Molecules*, 2018, 23, 1496–1512.
- Ushio, Y., Abe, H., *Planta Med.*, 1992, 58, 171–173.
- Uwai, K., Ohashi, K., Takaya, Y., Ohta, T., Tadano, T., Kisara, K., Shibusawa, K., Sakakibara, R., Oshima, Y., *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 4508–4515.
- van den Berg, J., *J. Redox Rep.*, 1994, 1, 11–21.
- Velasco-Negueruela, A., Pérez-Alonso, M.J., Palá-Paúl, J., Camacho, A., Ocaña, A.M.F., López, C.F., Vallejo, M.C.G., *J. Essent. Oil Res.*, 1998, 10, 9–19.

- Vetter, J., *Food Chem. Toxicol.*, 2004, 42, 1373–1382.
- Wang, H., Feng, M.L., Zhang, Y., Xi, X.H., Zhang, X.H., Song, M.Q., Liu, X., *World Science and Technology - Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Materia*, 2020, 22, 1517–1523.
- Wang, Y., Guo, Q., Cheng, Z., Zeng, K., Liang, H., Tu, P., Chen, S., Zhang, Q., *Phytochem. Lett.*, 2017, 21, 183–189.
- Wang, A.-R., Mi, L.-F., Zhang, Z.-L., Hu, M.-Z., Zhao, Z.-Y., Liu, B., Li, Y.-B., Zheng, S., *Behav. Brain Res.*, 2021a, 403, 113138.
- Wang, C.-B., Ma, X.-G., He, X.-J., *J. Syst. Evol.*, 2011, 49, 558–589.
- Wang, H., Feng, M.L., Zhang, Y., Xi, X.H., Zhang, X.H., Song, M.Q., Liu, X., *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Materia-World Science and Technology*, 2020, 22, 1517–1523.
- Wang, H., Zhang, G., Gao, Z., Sui, C., Ji, H., Jiang, J., Guo, X., Wei, J., *Ind. Crop. Prod.*, 2021b, 160, 113085.
- Wang, H.W., Liu, M., Zhong, T.D., Fang, X.M., *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2015, 8, 15137–15145.
- Wang, Y., Liu, Q.F., Xue, J.J., Zhou, Y., Yu, H.C., Yang, S.P., Zhang, B., Zuo, J.P., Li, Y., Yue, J.M., *Org. Lett.*, 2014, 16, 2062–2065.
- Wei, X.-M., Guo, S.-S., Yan, H., Cheng, X.-L., Wei, F., Du, S.-S., *Molecules*, 2018, 2018, 1–8.
- Wei, J.-H., Li, K.-T., Cheng, H.-Z., Xu, Z.-X., Ding, W.-L., Chu, Q.-L., *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2003, 28, 617–619.
- Wink, M., Van Wyk, B.-E., *Mind-Altering and Poisonous Plants of the World*, Timber Press, Portland, OR, 2008.
- Wittstock, U., Hadacek, F., Wurz, G., Teuscher, E., Greger, H., *Planta Med.*, 1995, 61, 439–445.
- Wittstock, U., Lichtnow, K.H., Teuscher, E., *Planta Med.*, 1997, 63, 120–124.
- Wolff, H., in: Engler, A. (Ed.), *Die Pflanzenreich* 43 (IV, 228), Wilhelm Engelmann, Leipzig, 1910.
- World Flora Online; <https://wfplantlist.org/>, pristupljeno 10.07.2025. godine.
- Wu, S.J., Lin, Y.H., Chu, C.C., Tsai, Y.H., Chao, J.C., *J. Med. Food*, 2008, 11, 224–229.
- Wu, S.J., Tam, K.W., Tsai, Y.H., Chang, C.C., Chao, J.C., *Am. J. Chinese Med.*, 2010, 38, 99–111.
- Wu, Z., Raven, P.H. (Eds.), *Flora of China*, Vol. 14, Science Press & Missouri Botanical Garden Press, Beijing & St. Louis, 2005.
- Xie, H., Huo, K., Chao, Z., Pan, S., *Planta. Med.*, 2009, 75, 89–93.

- Xie, L.H., Akao, T., Hamasaki, K., Deyama, T., Hattori, M., *Chem. Pharm. Bull.*, 2003, 51, 508–515.
- Xie, W., Bao, Y., Yu, L.J., Hou, G.N., Tan, H.X., *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2006, 26, 177–180.
- Xie, W., Meng, C.X., Shi, G.J., Fan, S.Q., Hong, Y., *J. Trop. Med.*, 2012, 4, 382–385.
- Yamada, H., Hirano, M., Kiyohara, H., *Carbohydr. Res.*, 1991, 219, 173–192.
- Yamada, H., Ra, K.-S., Kiyohara, H., Cyong, J.-C., Yang, H.C., Otsuka, Y., *Phytochemistry*, 1988, 27, 3163–3168.
- Yamamoto, M., Kumagai, A., Yamamura, Y., *Arzneimittelforschung*, 1975, 25, 1021–1023.
- Yan, H., Min, H., *Chinese J. Exp. Trad. Med. Formulae*, 2010, 17, 247–249.
- Yang, L.L., Li, Y., Yang, X., Zhang, T., Lan, Y.M., Yu, Z., Han, M., Yang, L.M., *Phytochemistry*, 2020, 177, 112434.
- Yao, R.Y., Chen, X.F., Zhang, B.L., Li, Z.F., Yang, X.W., *Zhongcaoyao*, 2013, 44, 1349–1353.
- Ying, Z.L., Li, X.J., Dang, H., Wang, F., Xu, X.Y., *Exp. Ther. Med.*, 2014, 7, 1354–1358.
- Yu, J.-Q., Deng, A.-J., Wu, L.-Q., Zhang, Z.-H., Liu, Y., Wang, W.-J., Qin, H.-L., *Fitoterapia*, 2013, 85, 101–108.
- Yu, Y.H., Xie, W., Bao, Y., Li, H.M., Hu, S.J., Xing, J.L., *PLOS One*, 2012, 7, e50694.
- Yuan, B., Yang, R., Ma, Y., Zhou, S., Zhang, X., Liu, Y., *Pharm. Biol.*, 2017, 55, 620–635.
- Yuan, B.C., Yang, R., Ma, Y.S., Zhou, S., Zhang, X.D., Liu, Y., *Pharm. Biol.*, 2016, 55, 620–635.
- Ze-Kun, L., Haixia, C., *J. Med. Plants Res.*, 2012, 6, 926–928.
- Zeisberg, R., Bohlmann, F., *Chem. Ber.*, 1974, 107, 3800–3805.
- Zeng, Q., Ye, J., Ren, J., Cheng, X.R., Qin, J.J., Jin, H.Z., Zhang, W.D., *Chem. Nat. Compd.*, 2013, 49, 486–492.
- Zenkevich, I.G., Eshchenko, A.Y., Makarova, S.V., Vitenberg, A.G., Dobryakov, Y.G., Utsal, V.A., *Molecules*, 2007, 12, 654–672.
- Zhang, B., Wang, Y., Yang, S.-P., Zhou, Y., Wu, W.-B., Tang, W., Zuo, J.P., Li, Y., Yue, J.-M., *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134, 20605–20608.
- Zhang, B.Z., Guo, X.T., Chen, J.W., Zhao, Y., Cong, X., Jiang, Z.L., Cao, R.F., Cui, K., Gao, S.S., Tian, W.R., *Am. J. Chin. Med.*, 2014, 42, 1261–1277.
- Zhang, Q., Li, M., Chen, X., Liu, G., Zhang, Z., Tan, Q., Hu, Y., Fan, Y., Liu, Y., Zhu, T., Yang, X., Yue, M., Bu, X., Zhang, Y., *Front. Genet.*, 2022a, 31, 878431.
- Zhang, R.-Y., Chen, X.-K., Yang, X.-B., He, W.-Y., Tan, L., *Acta Pharm. Sin.*, 1994, 29, 684–688.
- Zhang, T., Zhou, J., Liu, Y., Wang, Q., *Zhongguo Tianran Yaowu*, 2008, 6, 430–434.

- Zhang, T., Zhou, J., Wang, Q., *Biochem. Syst. Ecol.*, 2007, 35, 801–804.
- Zhang, X.J., Liu, Z.Z., Chen, S.P., Li, H., Dong, L., Fu, X.Y., *J. Ethnopharmacol.*, 2022b, 283, 114742.
- Zhao, H.Y., Li, S.P., Zhang, H.S., Wang, G., Xu, G.L., Zhang, H.B., *Exp. Ther. Med.*, 2015, 10, 823–827.
- Zhao, J.F., Guo, Y.Z., Meng, X.S., *Acta Pharm. Sin.*, 1987, 22, 507–511.
- Zhao, W., Li, J.J., Yue, S.Q., Zhang, L.Y., Dou, K.F., *Carbohydr. Polym.*, 2012, 89, 448–452.
- Zhou, J., Fu, C., Ma, S., *Nat. Commun.*, 2018, 9, 1–10.
- Zhu, J., Luo, C.Q., Wang, P., He, Q.Y., Zhou, J.D., Peng, H., *Exp. Ther. Med.*, 2013, 5, 1345–1350.
- Zuzarte, M., Correia, P.M.P., Alves-Silva, J.M., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C., Cruz, T., Salgueiro, L., *Antibiotics (Basel)*, 2021, 10, 592.
- Zykova, I.D., Naimushina, L.V., *Вестник КрасГАУ*, 2016, 9, 95–100.

Spisak priloga:

- Slika S1. ^1H - ^{13}C kuplovani NMR-spektar (100,6 MHz, CDCl_3) jedinjenja of **31** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala
- Slika S2. MS (EI, 70 eV) jedinjenja **31**
- Tabela S1. ^{13}C NMR-parametri (100,6 MHz, CDCl_3) jedinjenja **31**, **33-35**, **38** i P-1–P-4 (Kuklev & Smith, 2004)
- Tabela S2. ^1H NMR-parametri (400 MHz, CDCl_3) jedinjenja **31**, **33-35**, **38** i P-1–P-4 (Kuklev & Smith, 2004)
- Slika S3. ^1H NMR-spektar (400 MHz, CDCl_3) jedinjenja **32** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala
- Slika S4. ^{13}C NMR-spektar (100,6 MHz, CDCl_3) jedinjenja **32** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala
- Slika S5. ^1H NMR-spektar (400 MHz, CDCl_3) uzorka čuvanog u frižideru u zatvorenoj vijali koji sadrži 22% (*E,E,E,E*)-**32** (gore); ^1H NMR-spektar (400 MHz, CDCl_3) frakcije obogaćene jedinjenjem (*E,E,E,E*)-**32** (gore) (72%, dole)
- Slika S6. MS (EI, 70 eV) jedinjenja **32**
- Slika S7. Ključne HMBC- i NOESY-interakcije za određivanje strukture jedinjenja **32**
- Slika S8. ^1H NMR-spektar (400 MHz, CDCl_3) jedinjenja **33** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala (signali obeleženi sa Z potiču od jedinjenju **31**)
- Slika S9. ^{13}C NMR-spektar (100,6 MHz, CDCl_3) jedinjenja **33** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala (signali obeleženi sa Z potiču od jedinjenju **31**)
- Slika S10. Simulirani ^1H NMR-spektar jedinjenja **33** (gore); Simulirani ^1H NMR-spektar jedinjenja **31** (sredina); Eksperimentalni ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spektar smeše jedinjenja **31** i **33** (dole)
- Slika S11. MS (EI, 70 eV) jedinjenja **33**
- Slika S12. Ključne HMBC- i NOESY-interakcije za određivanje strukture jedinjenja **33**
- Slika S13. ^1H NMR-spektar (400 MHz, CDCl_3) jedinjenja **34** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala
- Slika S14. ^{13}C NMR-spektar (100,6 MHz, CDCl_3) jedinjenja **34** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala
- Slika S15. MS (EI, 70 eV) jedinjenja **34**
- Slika S16. Ključne HMBC- i NOESY-interakcije za određivanje strukture jedinjenja **34**
- Slika S17. ^1H NMR-spektar (400 MHz, CDCl_3) jedinjenja **35** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala
- Slika S18. ^{13}C NMR-spektar (100,6 MHz, CDCl_3) jedinjenja **35** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala
- Slika S19. MS (EI, 70 eV) jedinjenja **35**
- Slika S20. Ključne HMBC- i NOESY-interakcije za određivanje strukture jedinjenja **35**
- Slika S21. ^1H NMR-spektar (400 MHz, CDCl_3) jedinjenja **36** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala
- Slika S22. ^{13}C NMR-spektar (100,6 MHz, CDCl_3) jedinjenja **36** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala
- Slika S23. MS (EI, 70 eV) jedinjenja **36**
- Slika S24. Ključne HMBC- i NOESY-interakcije za određivanje strukture jedinjenja **36**
- Slika S25. ^1H NMR-spektar (400 MHz, CDCl_3) jedinjenja **37** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala
- Slika S26. A) Eksperimentalni ^1H NMR-spektar jedinjenja **37**; B) Simulirani ^1H NMR-spektar jedinjenja **37**; C) Razlika između eksperimentalnog i simuliranog spektra jedinjenja **37**

Slika S27. ^{13}C NMR-spektar (100,6 MHz, CDCl_3) jedinjenja **37** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala

Slika S28. MS (EI, 70 eV) jedinjenja **37**

Slika S29. ^1H NMR-spektar (400 MHz, CDCl_3) jedinjenja **38** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala

Slika S30. A) Eksperimentalni ^1H NMR-spektar jedinjenja **38**; B) Simulirani ^1H NMR-spektar jedinjenja **38**; C) Razlika između eksperimentalnog i simuliranog spektra jedinjenja **38**

Slika S31. ^{13}C NMR-spektar (100,6 MHz, CDCl_3) jedinjenja **38** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala

Slika S32. MS (EI, 70 eV) jedinjenja **38**

Slika S33. Ključne HMBC- i NOESY-interakcije za određivanje strukture jedinjenja **38**

Slika S34. ^{13}C NMR-spektar (100,6 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) jedinjenja **39** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala

Slika S35. ^1H NMR-spektar (400 MHz, CD_3OD) jedinjenja **39** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala

Slika S36. ^{13}C NMR-spektar (100,6 MHz, CD_3OD) jedinjenja **39** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala

Slika S37. MS (EI, 70 eV) sililovanog derivata jedinjenja **39**

Slika S38. ^1H NMR-spektar (400 MHz, CDCl_3) jedinjenja **40** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala

Slika S39. Ključne HMBC- i NOESY-interakcije za određivanje strukture jedinjenja **40**

Slika S40. MS (EI, 70 eV) jedinjenja **40**

Slika S41. HRMS spektar jedinjenja **40**

Tabela S3. ^1H (400 MHz) i ^{13}C (100,6 MHz) NMR-spektralni podaci (CDCl_3) jedinjenja **40** i **41** (NMR-parametri su određeni spinskom simulacijom)

Slika S42. ^1H NMR-spektar (400 MHz, CDCl_3) jedinjenja **41** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala

Slika S43. ^{13}C NMR-spektar (100,6 MHz, CDCl_3) jedinjenja **41** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala

Slika S44. Ključne HMBC- i NOESY-interakcije za određivanje strukture jedinjenja **41**

Slika S45. MS (EI, 70 eV) jedinjenja **41**

Slika S46. HRMS spektar jedinjenja **41**

Slika S47. HRMS spektar jedinjenja **45**

Slika S48. ^1H NMR-spektar (400 MHz, CDCl_3) jedinjenja **47** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala

Slika S49. ^{13}C NMR-spektar (100,6 MHz, CDCl_3) jedinjenja **47** sa asignacijom signala

Slika S50. Ključne HMBC- i NOESY-interakcije za određivanje strukture jedinjenja **47**

Slika S51. MS (EI, 70 eV) jedinjenja **47**

Slika S52. HRMS spektar jedinjenja **47**

Slika S53. MS (EI, 70 eV) stereoizomera 1 prealtaestra B

Slika S54. MS (EI, 70 eV) stereoizomera 2 prealtaestra B

Slika S55. MS (EI, 70 eV) stereoizomera 3 prealtaestra B

Slika S56. MS (EI, 70 eV) stereoizomera 4 prealtaestra B

Slika S57. MS (EI, 70 eV) stereoizomera 5 prealtaestra B

Slika S58. MS (EI, 70 eV) stereoizomera 1 jedinjenja **40**

Slika S59. EI (70 eV) MS (EI, 70 eV) stereoizomera 1 jedinjenja **50**

Slika S60. MS (EI, 70 eV) stereoizomera 2 jedinjenja **40**

Slika S61. MS (EI, 70 eV) stereoizomera 3 jedinjenja **40**

Slika S62. MS (EI, 70 eV) stereoizomera 2 jedinjenja **50**

Tabela S4. ^1H (400 MHz) i ^{13}C (100,6 MHz) NMR-spektralni podaci (CDCl_3) jedinjenja **44** (NMR-podaci su određeni spinskom simulacijom)

Slika S63. MS (EI, 70 eV) perilil-2-metilbutanoata

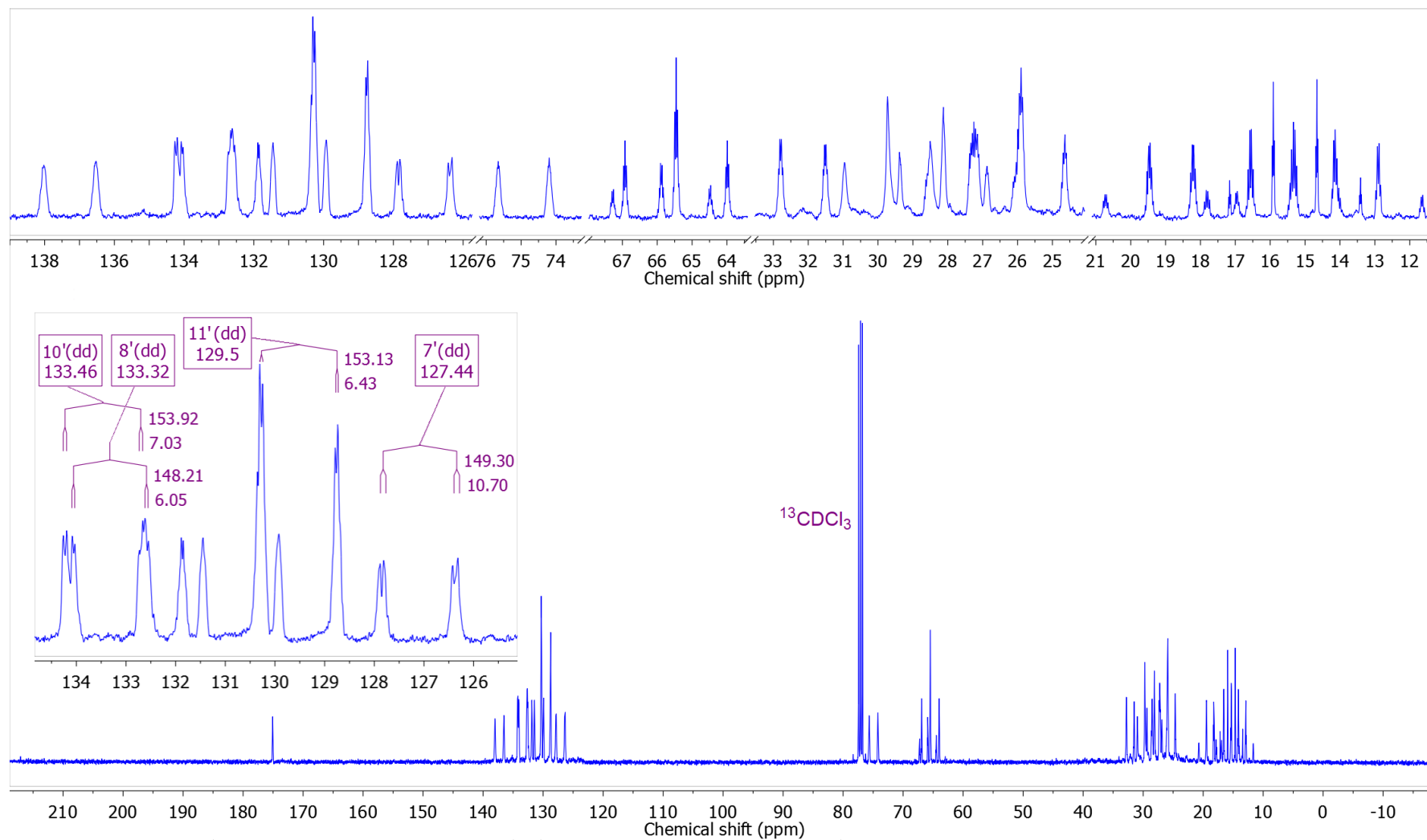
Slika S64. MS (EI, 70 eV) perilil-3-metilbutanoata

Slika S65. ^1H NMR-spektar (400 MHz, CDCl_3) perilil-2-metilbutanoata (smeša dijastereomera) i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala

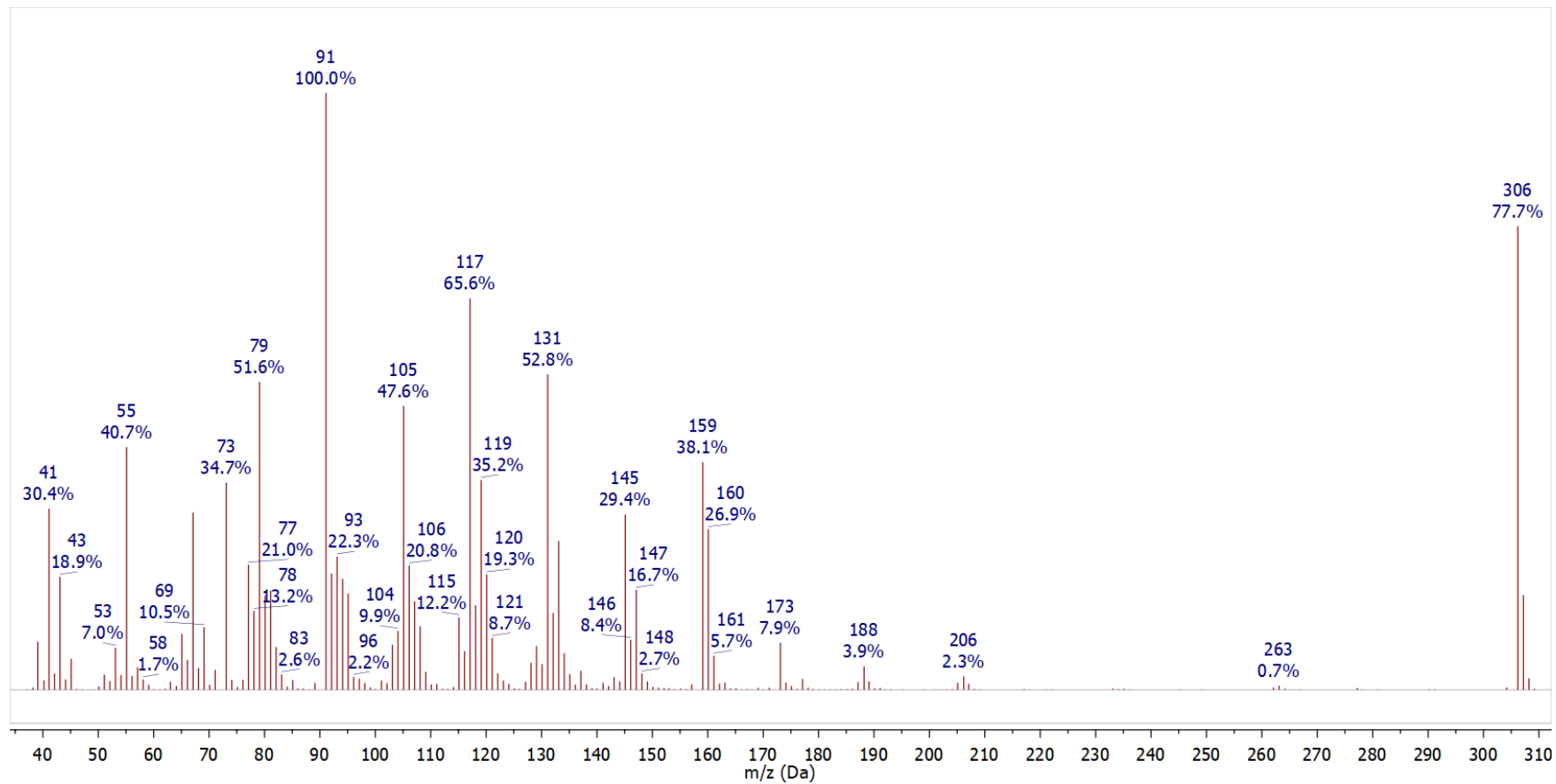
Slika S66. ^{13}C NMR-spektar (100,6 MHz, CDCl_3) perilil-2-metilbutanoata (smeša dijastereomera) i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala

Slika S67. ^1H NMR-spektar (400 MHz, CDCl_3) perilil-3-metilbutanoata

Slika S68. ^{13}C NMR-spektar (100,6 MHz, CDCl_3) perilil-3-metilbutanoata



Slika S1. ^1H - ^{13}C kuplovani NMR-spektar (100,6 MHz, CDCl_3) jedinjenja of **31** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala



Slika S2. MS (EI, 70 eV) jedinjenja **31**

Tabela S1. ¹³C NMR-parametri (100,6 MHz, CDCl₃) jedinjenja **31**, **33-35**, **38** i P-1–P-4 (Kuklev & Smith, 2004)

Pozicija	δ_C								Pozicija	
	31	34	P-1 ^{1,2}	33	P-2 ^{1,2}	38	P-3 ^{1,2}	P-4 ^{1,2}		35
1, C	175,03	170,01		175,12		177,34				
2, CH	74,94	76,99		75,01		34,15				
2-OH	/ ³	/		/		/			/	/
3, CH	32,15	30,13		32,23		19,14				
4, CH ₃	15,94	17,39	neuporedivo ⁴	16,00	neuporedivo ⁴	19,14	neuporedivo ⁴	neuporedivo ⁴		
5, CH ₃	18,83	18,87		18,97		/				
1', CH ₂	65,44	65,13		65,51		64,22			1, CH	177,16
2', CH ₂	28,13	28,20		28,11		28,36			2, CH ₂	28,77
3', CH ₂	25,89	26,00		25,63		26,09			3, CH ₂	29,02
4', (ω11), CH ₂	27,31	27,46	28,26	32,33	33,21	27,57	28,03	33,51	4, CH	80,85
5' (ω10), CH	131,08	131,47	133,20	133,75	135,39	134,76	134,66	134,88	5, CH	128,90
6' (ω9), CH	129,50	129,50	130,00	129,59	130,04	129,39	128,99	128,55	6, CH	133,63
7' (ω8), CH	127,10	127,35	129,21	132,10	132,81	128,40	128,34	129,22	7, CH	135,08
8' (ω7), CH	133,31	133,33	133,24	131,36 ₅	131,26	133,26	133,99	132,38	8, CH	130,04
9' (ω6), CH	130,69	130,88	132,82	131,43 ₅	131,29	132,78	133,04	130,67	9, CH	129,98
10' (ω5), CH	133,46	133,49	133,48	132,92	132,90	127,98	128,23	127,94	10, CH	135,55
11' (ω4), CH	129,53	129,64	131,29	129,63	131,05	128,22	128,29	129,18	11, CH	129,43
12' (ω3), CH	137,26	137,38	137,38	136,93	136,98	132,01	132,94	133,24	12, CH	138,50
13' (ω2), CH ₂	25,91	26,05	26,28	25,96	26,27	21,38	21,42	21,64	13, CH ₂	26,06
14' (ω1), CH ₃	13,52	13,66	13,92	13,60	13,94	14,37	14,45	14,65	14, CH ₃	13,56
1'', C	/	170,99	/	/	/	/	/	/	/	/
2'', CH ₃	/	20,79	/	/	/	/	/	/	/	/

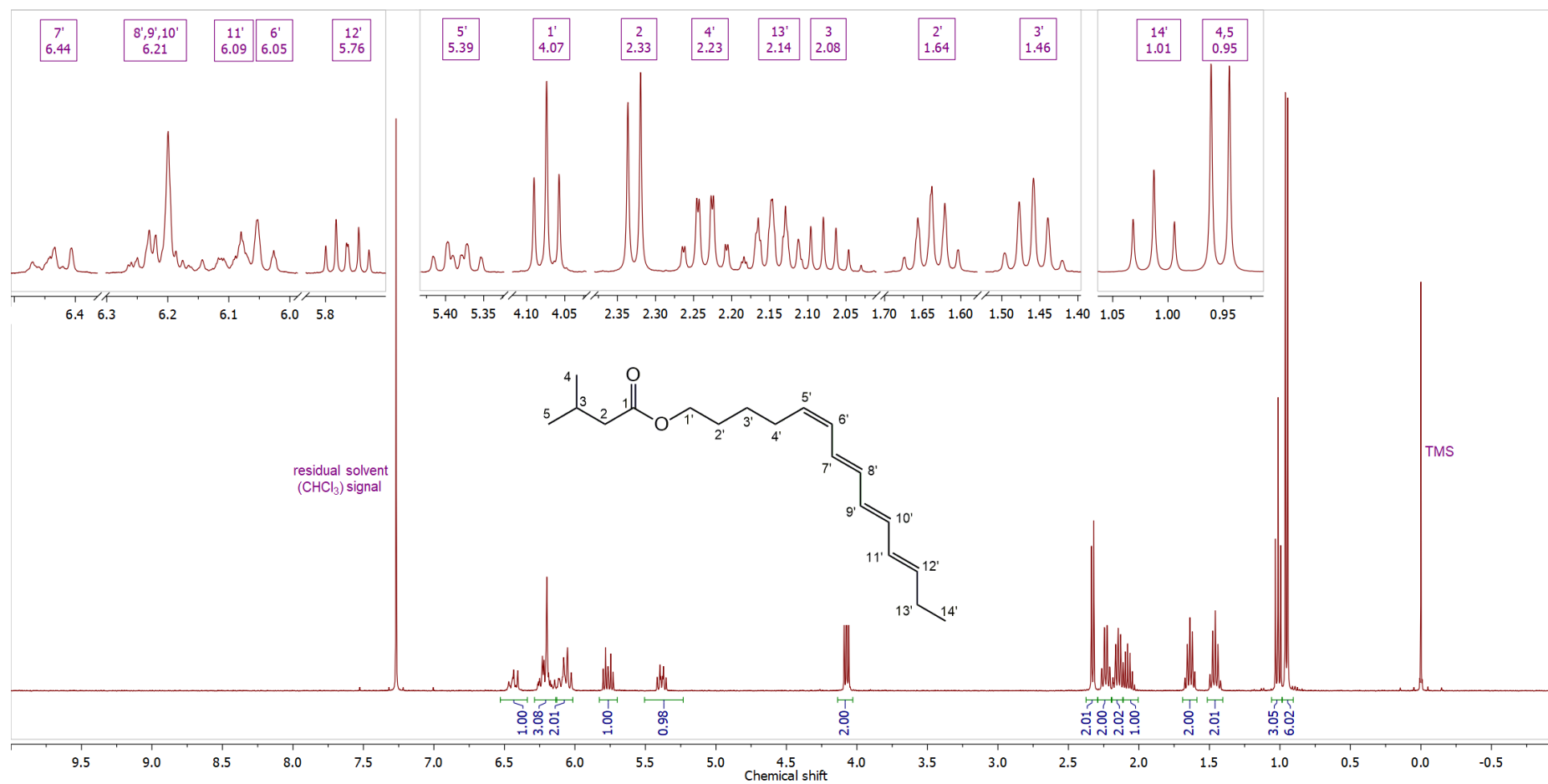
¹ Strukture jedinjenja P-1–P-4 su date na slici 32. ² Asignacija signala ugljenika-13 nije izvršena u citiranom radu (ona koja je ovde data zasniva se na najboljem slaganju vrednosti). ³ /, nema ugljenika ili nema pozicije. ⁴ Signali nisu od značaja za poređenje. ⁵ Moguće je da se asignacija ova dva signala međusobno zameni.

Tabela S2. ¹H NMR-parametri (400 MHz, CDCl₃) jedinjenja **31**, **33-35**, **38** i P-1–P-4 (Kuklev & Smith, 2004)

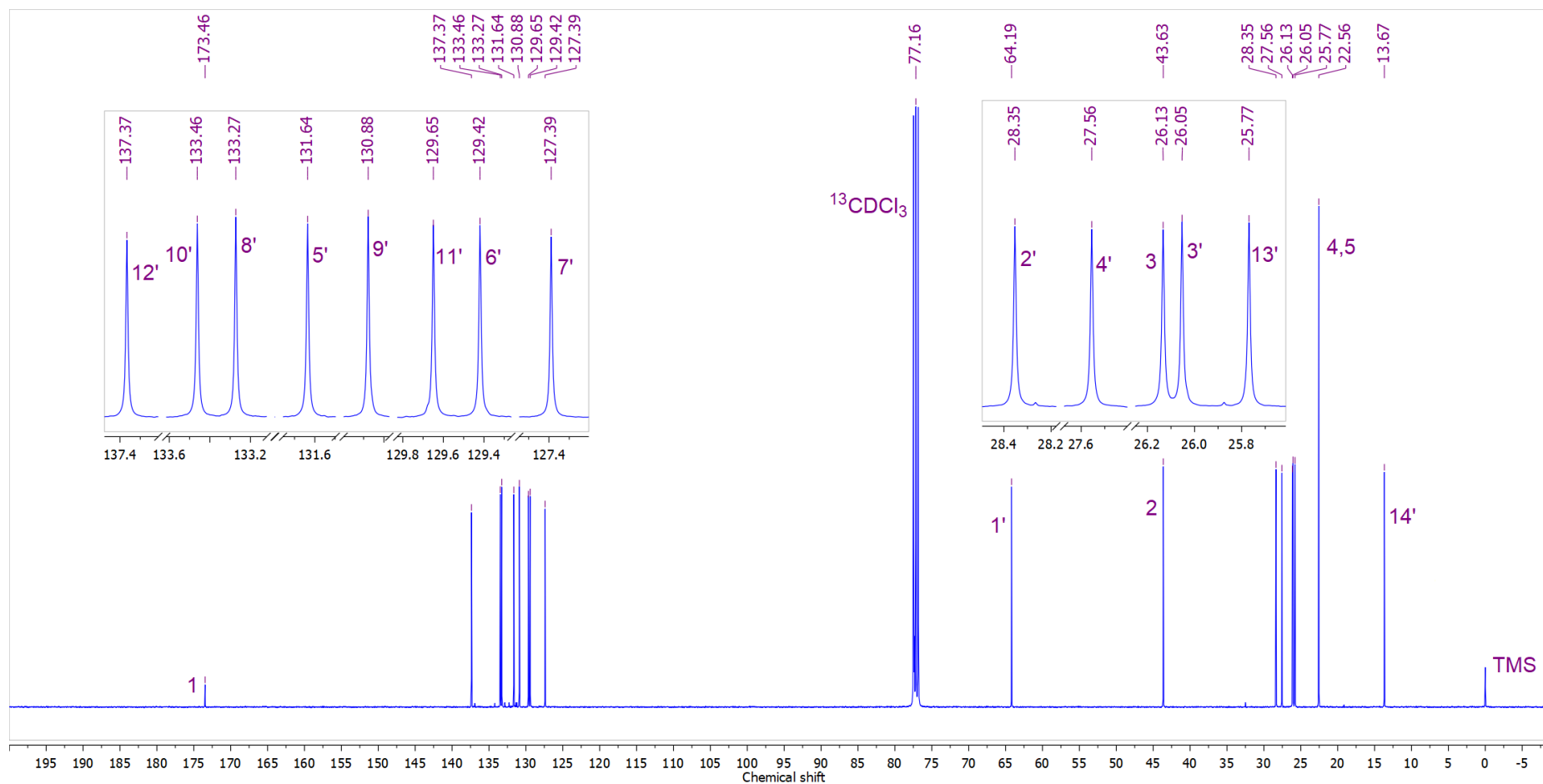
Pozicija	31	34	P-1 ¹	33	P-2 ¹	38	P-3 ¹	P-4 ¹	Pozicija	35
δ_{H}^2 , (J^3 in Hz)										
1	/ ⁴	/		/		/				/
2	4,0366, dd (6,0, 3,4)	4,8175, d (4,7)		4,0341, dd (6,0, 3,6)		2,5358, t (6,9)				/
2-OH	2,8102, d (6,0)	/		2,8077, d (6,0)		/				/
3	2,0730, qqd (7,0, 6,8, 3,4)	2,2222 qqd (7,0, 6,8, 4,7)		2,0730, qqd (7,0, 6,8, 3,4)		1,1628, d (6,9)				/
4	0,8615, d (7,0)	0,9760, d (7,0)		0,8615, d (7,0)		1,1628, d (6,9)				/
5	1,0262, d (6,8)	1,0013, d (6,8)		1,0262, d (6,8)		/				/
1'a	4,2122, dt ⁶ (-10,8, 6,6)	4,1643, ddd (-10,6, 7,0, 6,5)		4,2030, dt ⁶ (-10,7, 6,6)		4,0701, t (6,6)				/
1'b	4,1746, dt ⁶ (-10,8, 6,6)	4,1419, ddd (-10,6, 7,0, 6,5)		4,1679, dt ⁶ (-10,7, 6,6)						/
2'a	1,6970, dddd ⁶ (-13,8, 8,0, 7,2, 6,6)	1,6820, ddddd (-13,8, 9,0, 7,0, 6,5, 6,0)	neuporedivo ⁵	1,6990, dt ⁶ t ⁶ (-13,8, 7,2, 6,6)	neuporedivo	1,6750, tt (7,6, 6,6)	neuporedivo	neuporedivo	2a	2,5665, ddd (-17,5, 9,5, 9,4)
2'b	1,6850, dddd ⁶ (-13,8, 8,0, 7,2, 6,6)	1,6690, ddddd (-13,8, 9,0, 7,0, 6,5, 6,0)		1,6840, dt ⁶ t ⁶ (-13,8, 7,2, 6,6)					2b	2,5435, ddd (-17,5, 9,2, 4,6)
3'a	1,4765, ddt ⁶ d (-13,3, 8,0, 7,6, 7,2)	1,4657, ddt ⁶ d (-13,3, 9,0, 7,6, 6,0)		1,4808, dt ⁶ t ⁶ (-13,3, 7,6, 7,2)		1,4669, quint ⁶ (7,6)			3a	2,4118, ddddd (-13,0, 9,5, 6,8, 4,6, 0,7)
3'b	1,4663, ddt ⁶ d (-13,3, 8,0, 7,6, 7,2)	1,4560, ddt ⁶ d (-13,3, 9,0, 7,6, 6,0)		1,4645, dt ⁶ t ⁶ (-13,3, 7,6, 7,2)					3b	2,0128, dddd (-13,0, 9,4, 9,2, 7,7)
4'a	2,2405, ddt ⁶ d (-17,2, 7,7, 7,6, -1,3)	2,2360, ddt ⁶ d (-17,2, 7,7, 7,6, -1,3)		2,1494, dt ⁶ dd (-17,2, 7,6, 6,9, -1,3)		2,2375, td (7,6, -1,4)			4	4,9973, ddddd (7,7, 7,0, 6,8, 0,7, -0,7)
4'b	2,2307, dt ⁶ dd (-17,2, 7,6, 7,1, -1,4)	2,2262, dt ⁶ dd (-17,2, 7,6, 7,1, -1,4)		2,1294, dt ⁶ dd (-17,2, 7,6, 6,9, -1,4)						
5' (ω10)	5,3890, dddd (10,3, 7,7, 7,1, 1,1)	5,3991, dddd (10,3, 7,7, 7,1, 1,1)	5,36, dt (10,0, 7,2)	5,6513, dt ⁶ d (14,6, 6,9, -0,7)	5,75, m	5,4560, dtd (11,2, 7,6, -1,1)	5,41, m (10,0, 7,2)	5,73, dt (10,0, 7,0)	5	5,6550, dddd (15,4, 7,0, 0,7, -0,7)
6' (ω9)	6,0548, dddd (11,3, 10,3, -1,4, -1,3, -0,7)	6,0548, ddddd (11,3, 10,3, -1,4, -1,3, -0,7)	6,04, dd (11,0, 10,0)	6,0850, ddt ⁶ d (14,6, 11,3, -1,3, -0,7)	6,08 preklopljeni signali	6,0616, ddt ⁶ d (11,2, 10,9, -1,4, -0,7)	6,01, dd (11,0, 10,0)	6,2 preklopljeni signali	6	6,3437, dddtd (15,4, 11,1, -0,9, 0,7, -0,7)
7' (ω8)	6,4257, dddd (14,5, 11,3, 1,1, -0,7)	6,4380, dddd (14,5, 11,3, 1,1, -0,7)	6,43, m (14,4, 11,0)	6,1570, ddd (15,0, 11,3, -0,7)		6,5040, dddd (15,4, 10,9, -1,1, -0,7)	6,48, m (14,5, 11,0)		7	6,1810, ddt ⁶ t ⁶ (14,8, 11,1, 0,7, -0,7)

8' ($\omega 7$)	6,2235, dddd (14,5, 11,2, -0,8, -0,7)	6,2245, dddd (14,5, 11,2, -0,8, -0,7)	6,2 preklopljeni signali	6,1400, ddd (15,0, 11,0, -0,7)	5,75, m	6,2715, ddt ⁶ (15,4, 10,9, -0,7)	6,17 preklopljeni signali	8	6,2962, ddddd (14,8, 10,7, -0,9, 0,7, -0,7)
9' ($\omega 6$)	6,1855, ddt ⁶ (15,5, 11,2, -0,7)	6,1945, ddt ⁶ (15,5, 11,2, -0,7)		6,1400, ddd (15,0, 11,0, -0,7)		6,2611, ddt ⁶ (15,4, 10,9, -0,7)			6,1545, ddt ⁶ d (14,3, 10,7, 0,7, -0,7)
10' ($\omega 5$)	6,2163, ddt ⁶ (15,5, 10,8, -0,8)	6,2213, ddt ⁶ (15,5, 10,8, -0,8)		6,1520, ddd (15,0, 11,0, -0,7)		6,4750, dddd (15,4, 10,9, -0,8, -0,7)			6,2630, dddt ⁶ (14,3, 10,4, 0,7, -0,7)
11' ($\omega 4$)	6,0845, ddt ⁶ d (15,0, 10,0, -1,4, -0,7)	6,0925, ddt ⁶ d (15,0, 10,8, -1,4, -0,7)		6,0800, ddt ⁶ d (14,5, 11,0, -1,4, -0,7)		6,0099, ddt ⁶ d (11,3, 10,9, -1,4, -0,7)			6,0930, ddt (15,2, 10,4, -1,3)
12' ($\omega 3$)	5,7650, dtd (15,0, 6,8, -0,8)	5,7705, dtd (15,0, 6,8, -0,8)	5,78, dt (10,0, 7,0)	5,7480, dt (14,5, 7,1)	2,11, dq (7,5, 7,2)	5,4290, dtd (11,3, 7,7, -0,8)	5,41, m (10,0, 7,0)	5,44, dt (10,0, 7,2)	5,8200, dtdd (15,2, 6,7, 0,7, -0,7)
13' ($\omega 2$)	2,1304, qdd (7,5, 6,8, -1,4)	2,1347, qdd (7,5, 6,8, -1,4)	2,11, dq (7,5, 7,2)	2,1294, qd (7,5, 7,1, -1,4)		2,2176, dqd (7,7, 7,5, -1,4)	2,23, dq (7,5, 7,2)	2,22, dq (7,5, 7,2)	2,1425, qdd (7,4, 6,7, -1,3)
14' ($\omega 1$)	1,0162, t (7,5)	1,0185, t (7,5)	1,07, t (7,5)	1,0100, t (7,5)		1,0094 t (7,5)	1,03, t (7,5)	1,04, t (7,5)	1,0200, t (7,4)
2''	/	2,1511, s	/	/		/	/	/	/

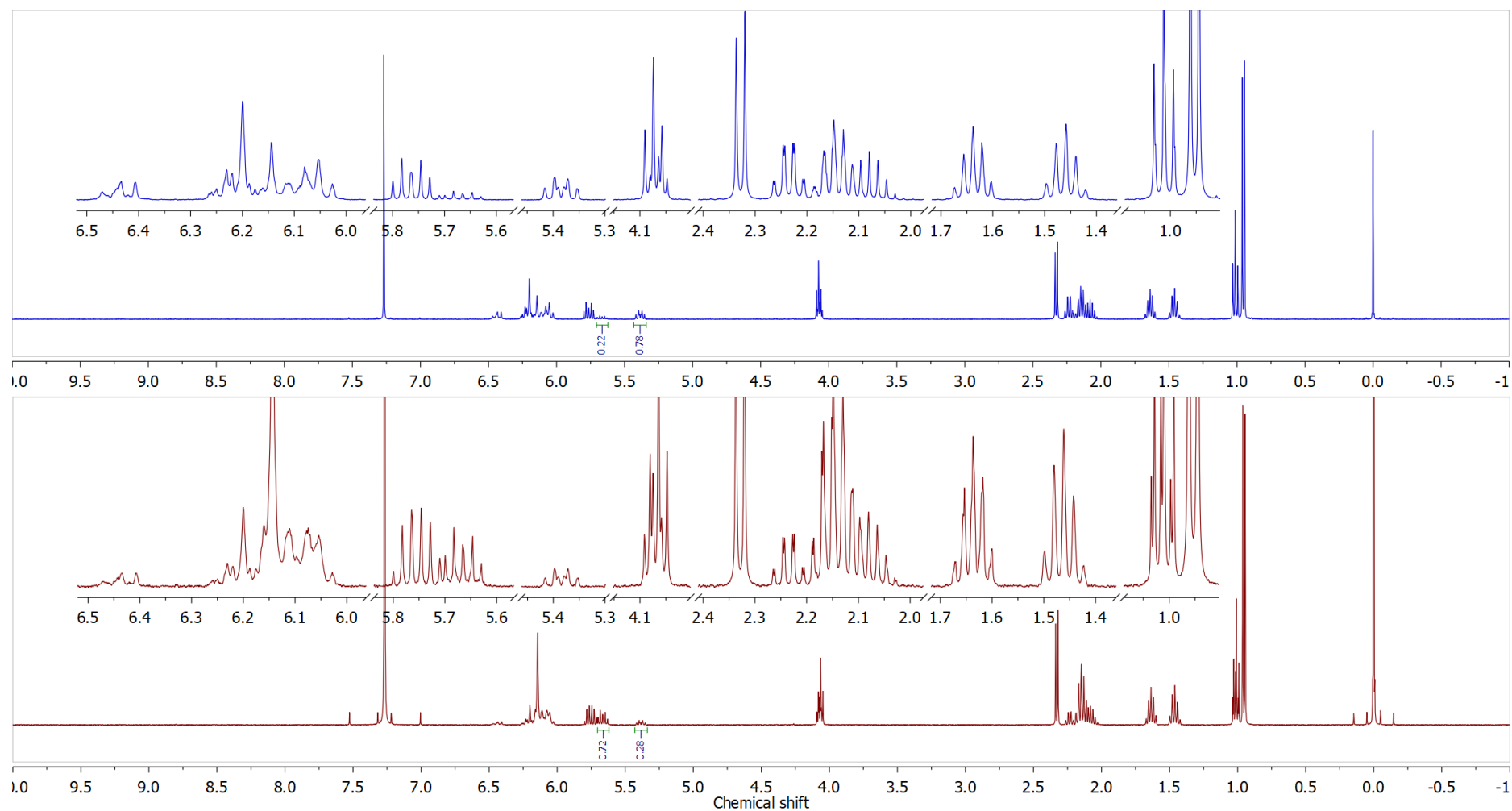
¹ Strukture jedinjenja P-1–P-4 su date na slici 32. ² Vrednosti hemijskih pomeranja i konstanti sprezanja određene su na osnovu eksperimenata selektivnog homodekuplovanja i spinskom simulacijom. ³ Vrednosti konstanti sprezanja $|J| < 0,7$ nisu navedene radi lakšeg poređenja. ⁴ /, Nema protona ili nema pozicije. ⁵ Signali nisu od značaja za poređenje. ⁶ Pseudo, odnosno pseudo-multiplet. Na primer, dublet dubleta sa dve slične J -vrednosti mogao bi da na triplet, takav je ovde nazvan pseudotripletom.



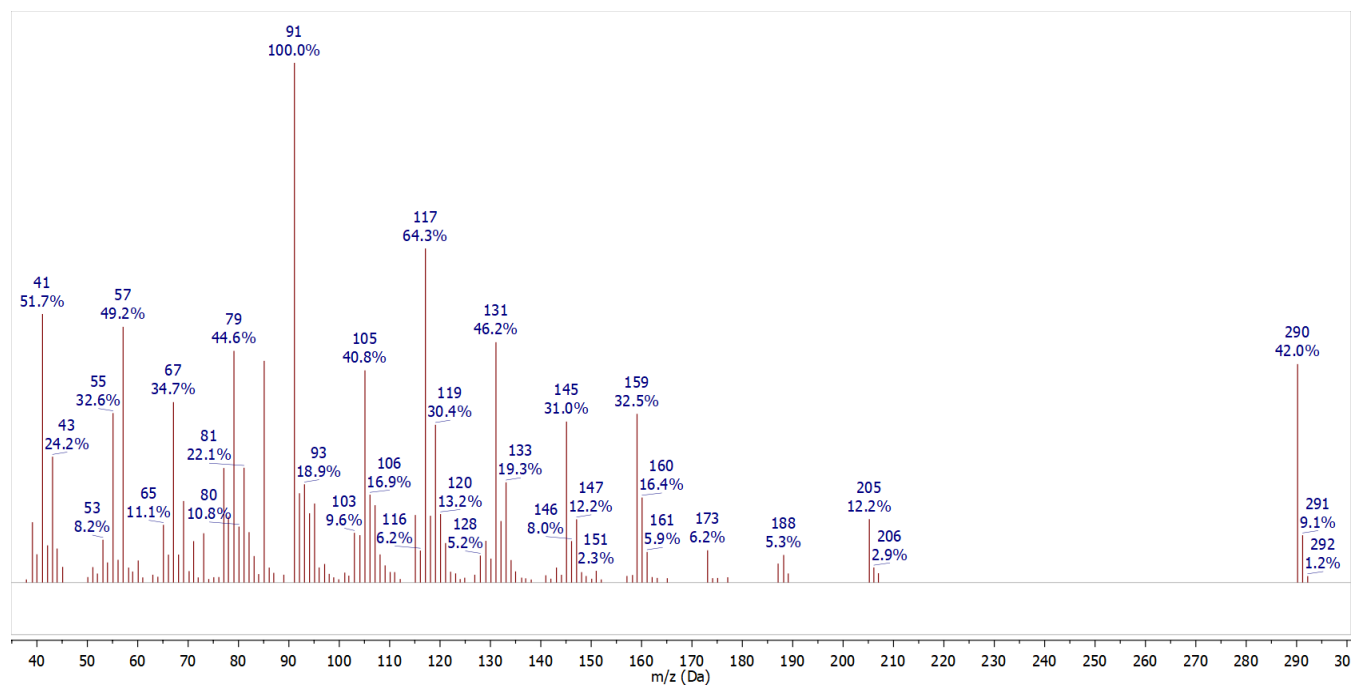
Slika S3. ^1H NMR-spektar (400 MHz, CDCl_3) jedinjenja **32** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala



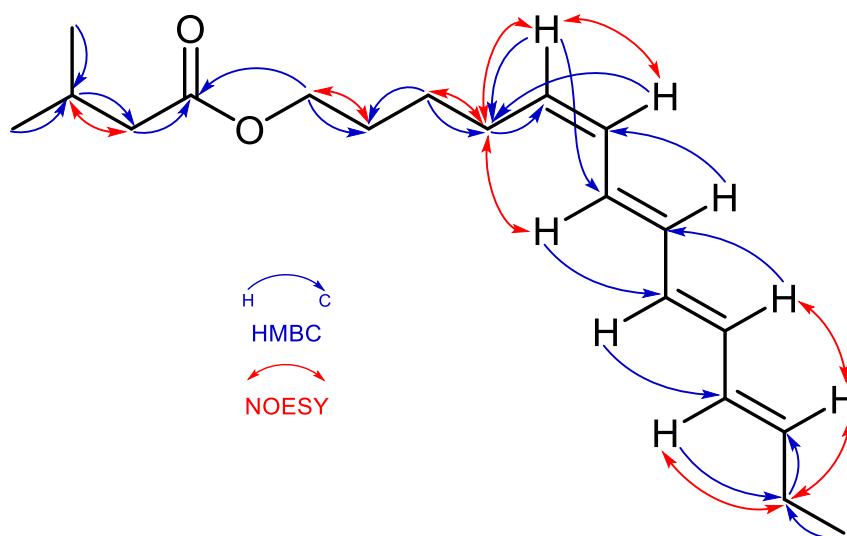
Slika S4. ¹³C NMR-spektar (100,6 MHz, CDCl₃) jedinjenja **32** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala



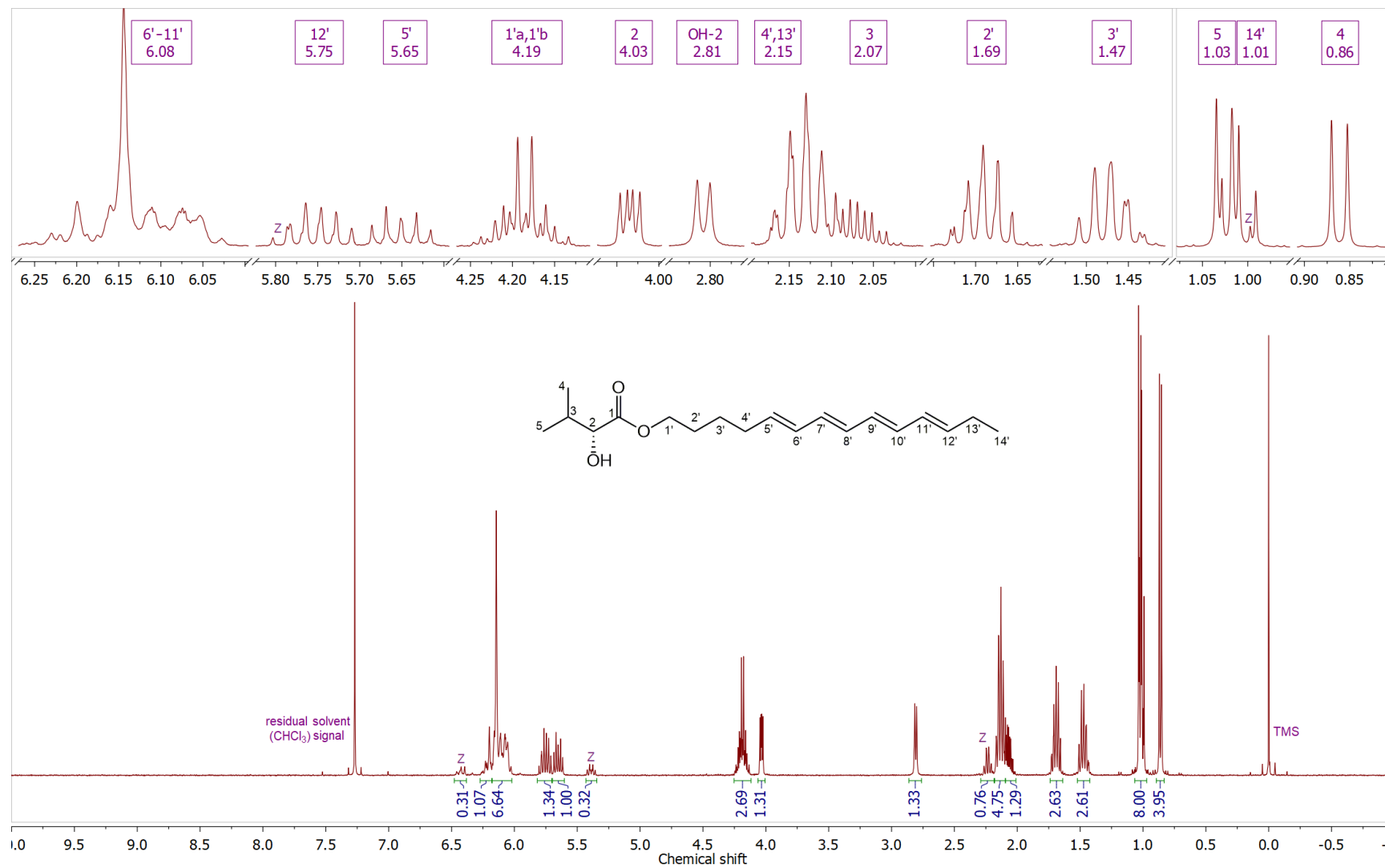
Slika S5. ^1H NMR-spektar (400 MHz, CDCl_3) uzorka čuvanog u frižideru u zatvorenoj vijali koji sadrži 22% (E,E,E,E) -32 (gore); ^1H NMR-spektar (400 MHz, CDCl_3) frakcije obogaćene jedinjenjem (E,E,E,E) -32 (gore) (72%, dole)



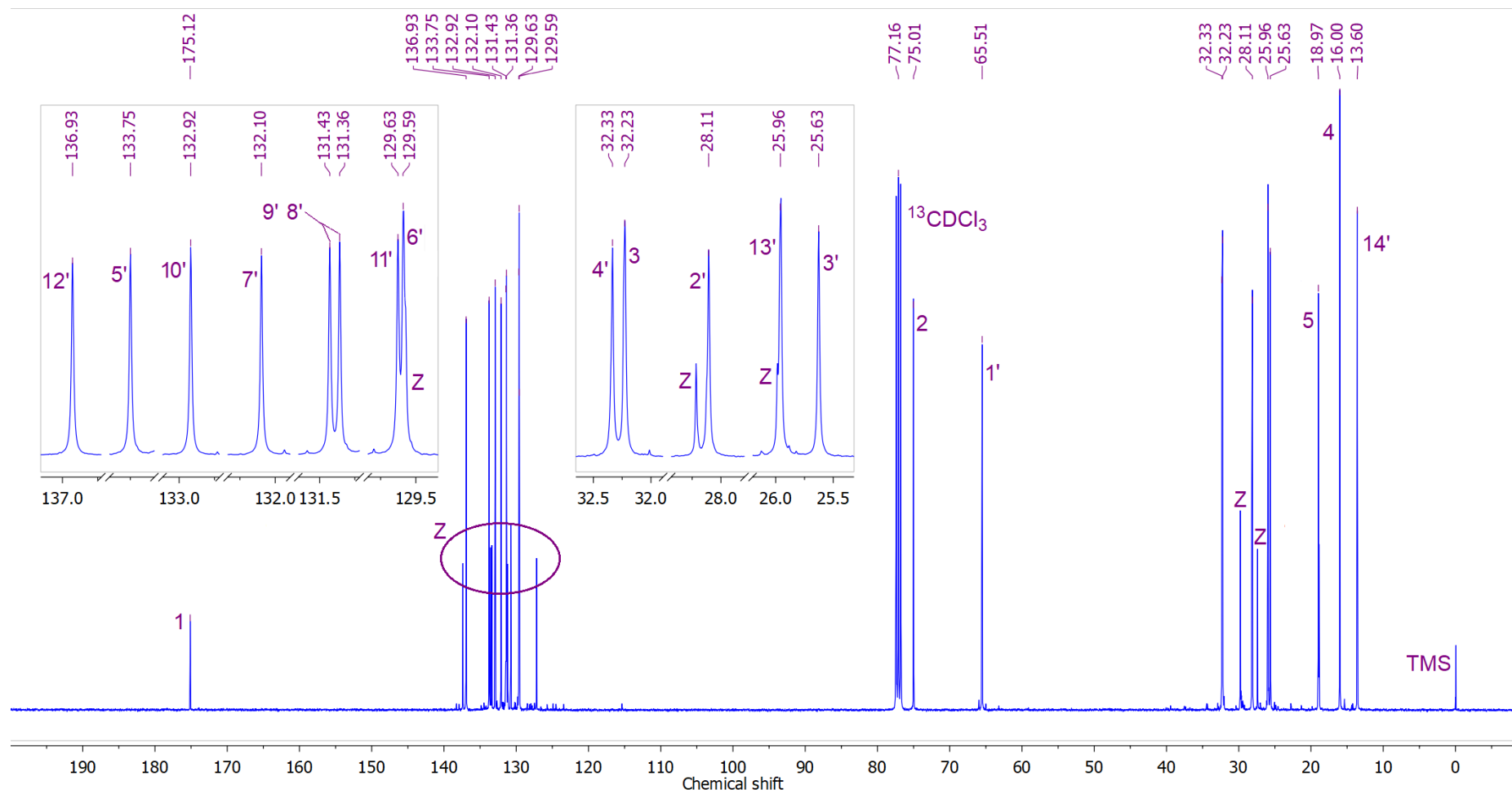
Slika S6. MS (EI, 70 eV) jedinjenja 32



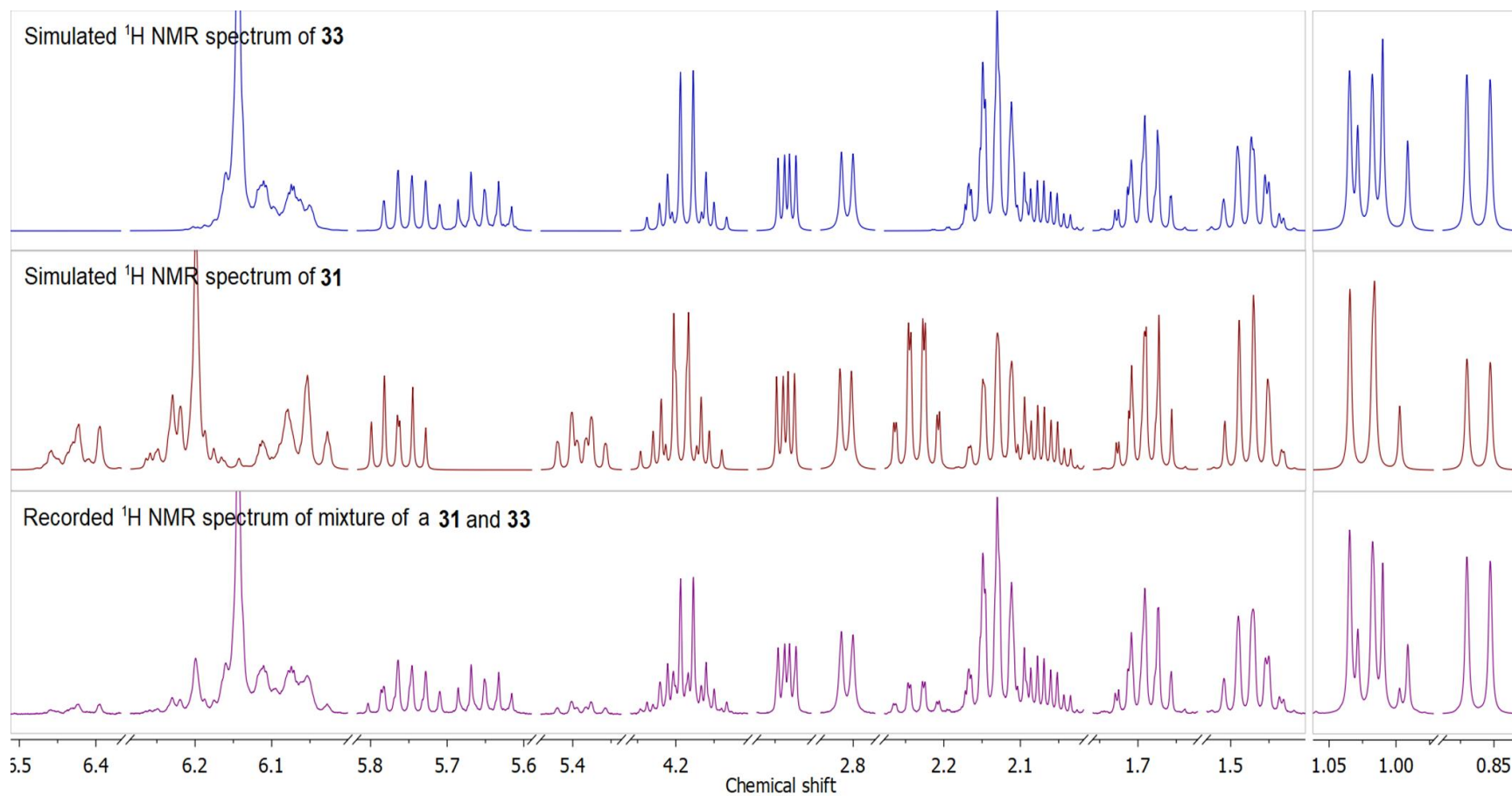
Slika S7. Ključne HMBC- i NOESY-interakcije za određivanje strukture jedinjenja 32



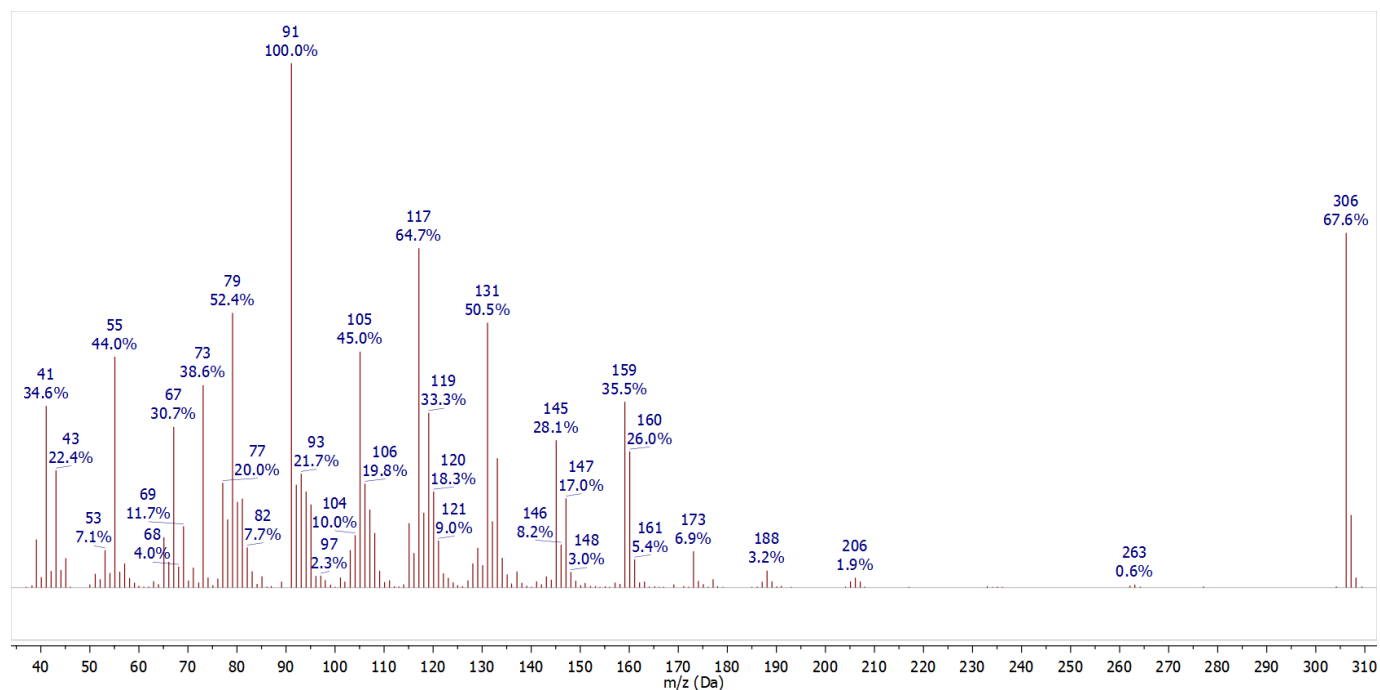
Slika S8. ¹H NMR-spektar (400 MHz, CDCl₃) jedinjenja **33** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala (signali obeleženi sa Z potiču od jedinjenju **31**)



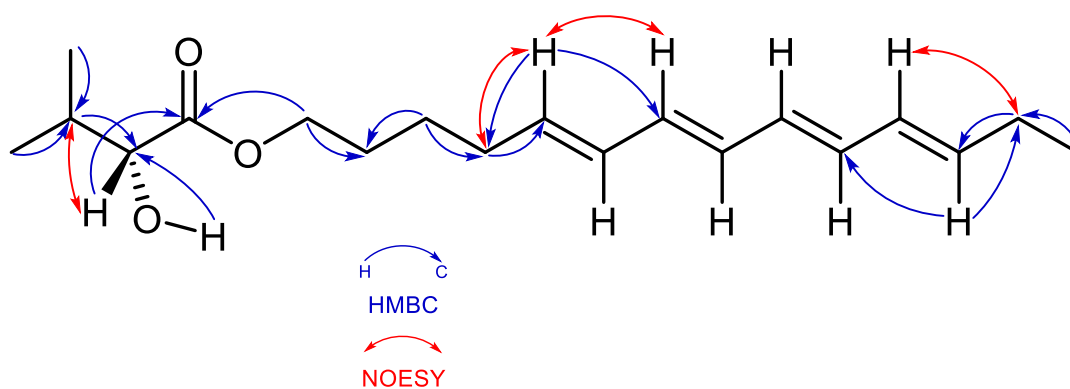
Slika S9. ^{13}C NMR-spektar (100,6 MHz, CDCl_3) jedinjenja **33** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala (signali obeleženi sa Z potiču od jedinjenju **31**)



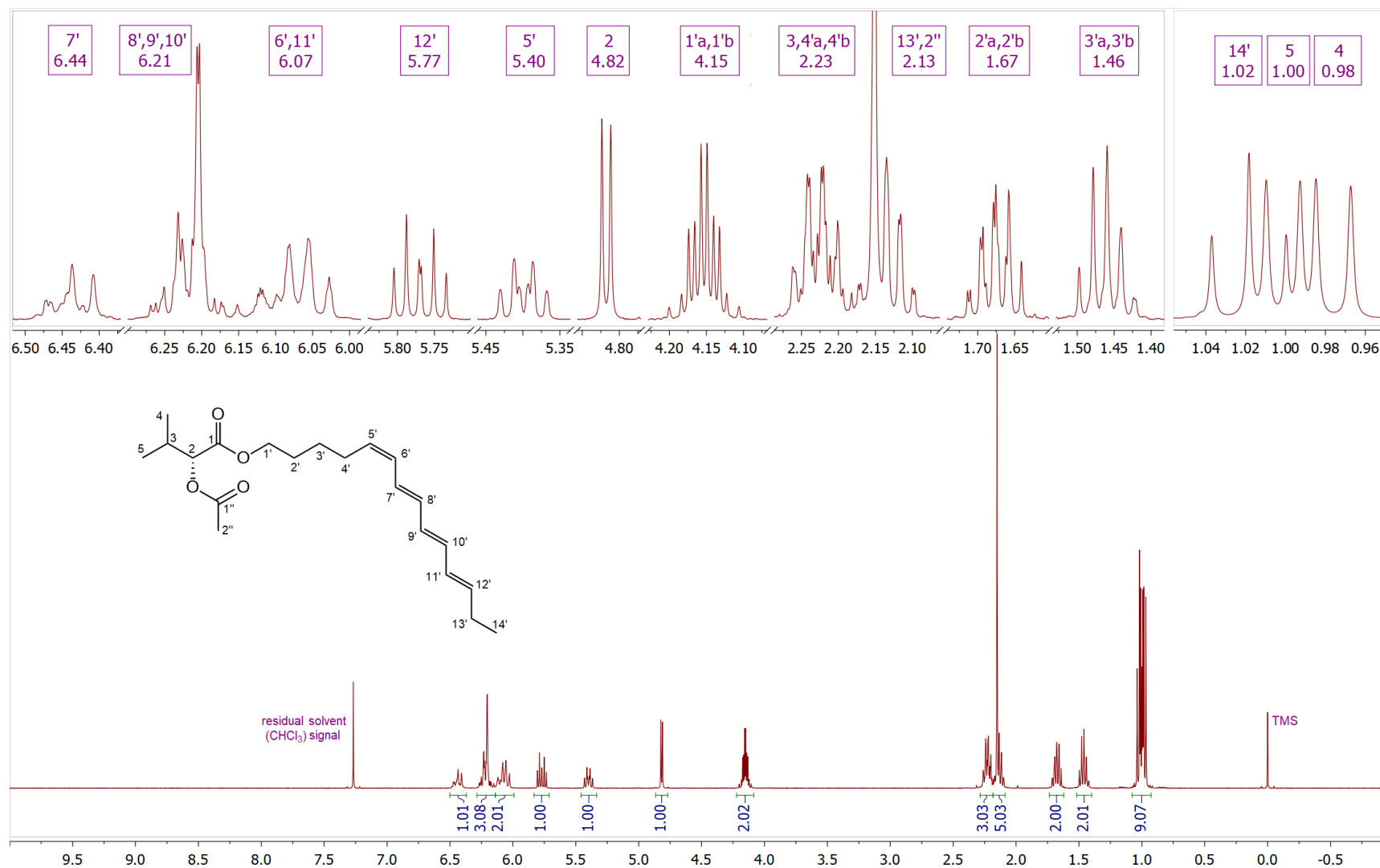
Slika S10. Simulirani ^1H NMR-spektar jedinjenja **33** (gore); Simulirani ^1H NMR-spektar jedinjenja **31** (sredina); Eksperimentalni ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spektar smeše jedinjenja **31** i **33** (dole)



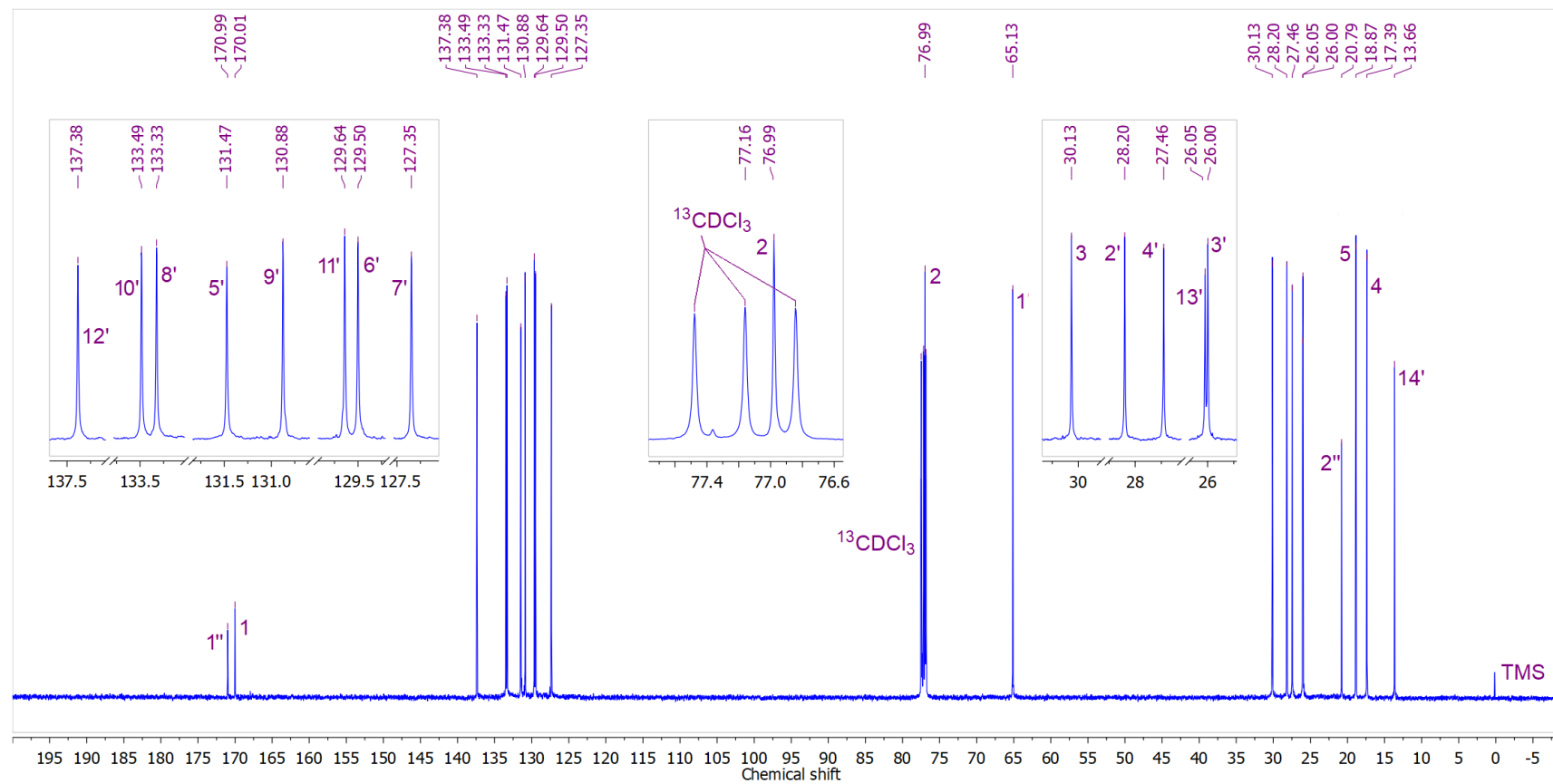
Slika S11. MS (EI, 70 eV) jedinjenja **33**



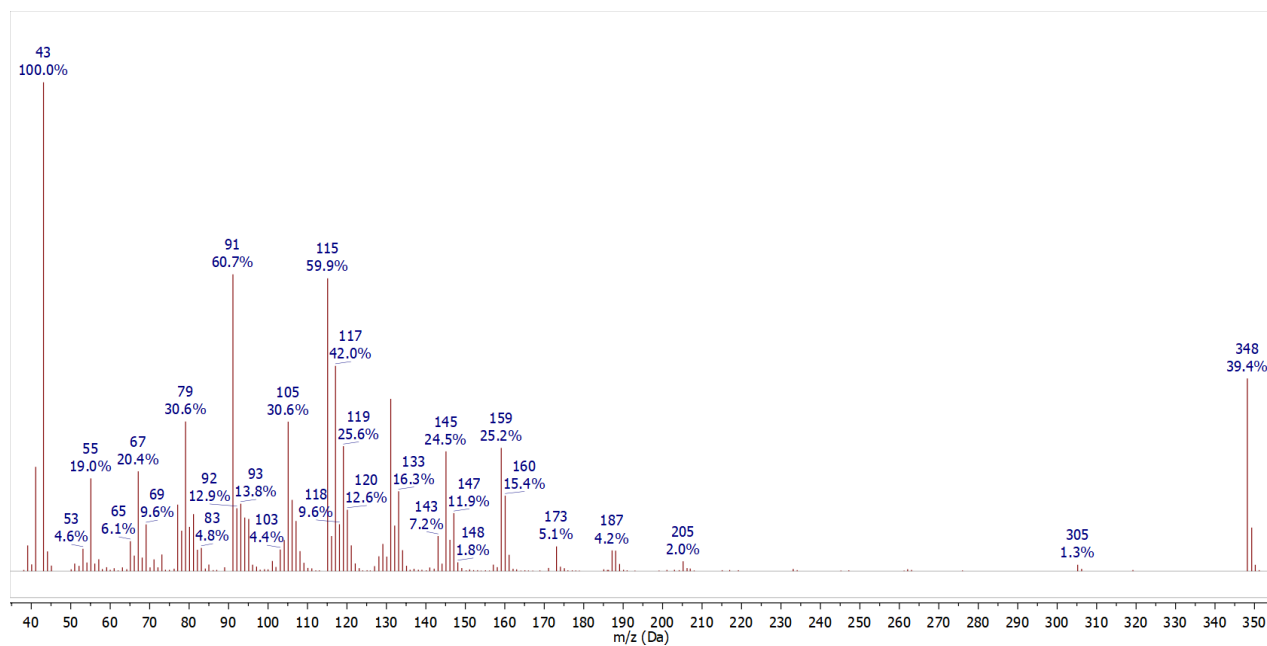
Slika S12. Ključne HMBC- i NOESY-interakcije za određivanje strukture jedinjenja **33**



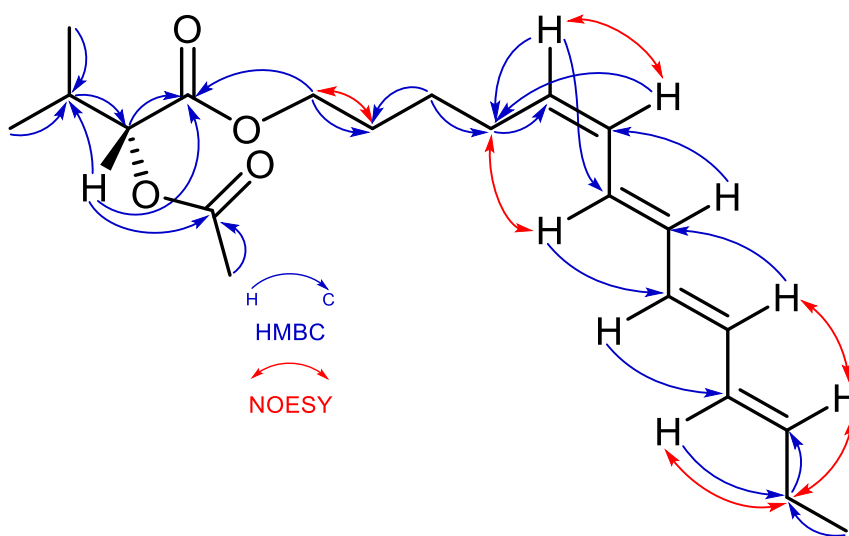
Slika S13. ¹H NMR-spektar (400 MHz, CDCl₃) jedinjenja **34** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala



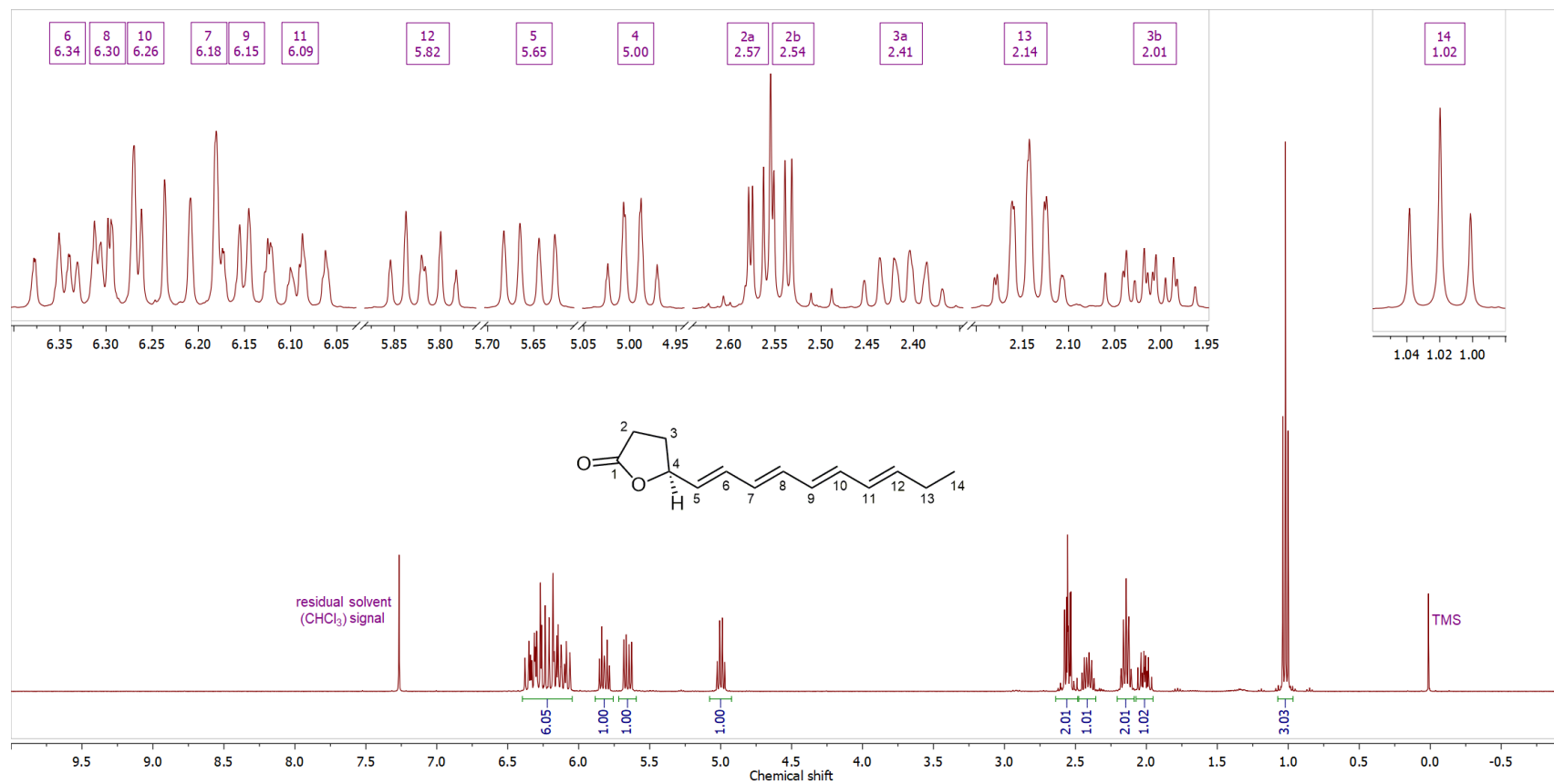
Slika S14. ^{13}C NMR-spektar (100,6 MHz, CDCl_3) jedinjenja **34** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala



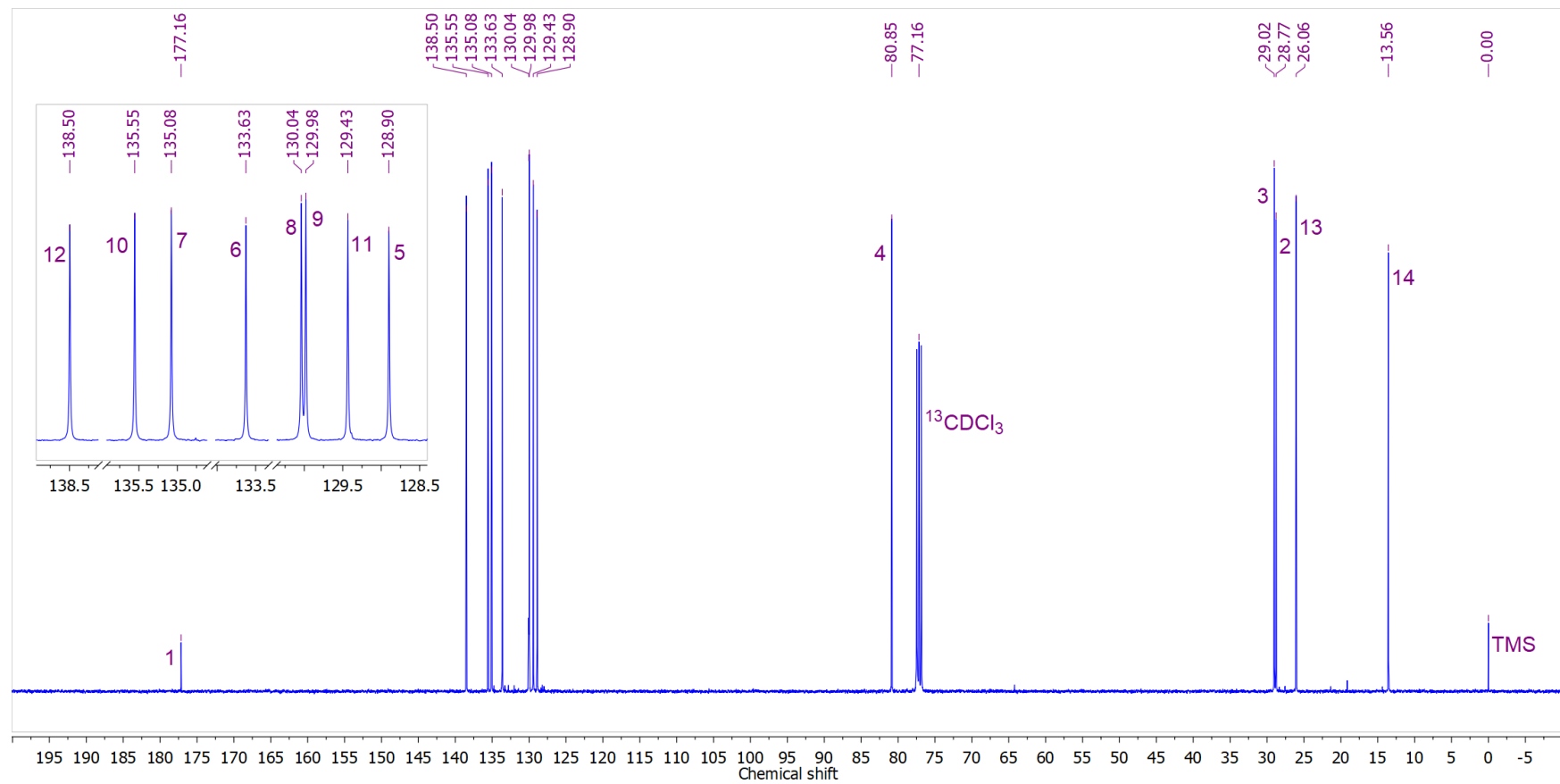
Slika S15. MS (EI, 70 eV) jedinjenja **34**



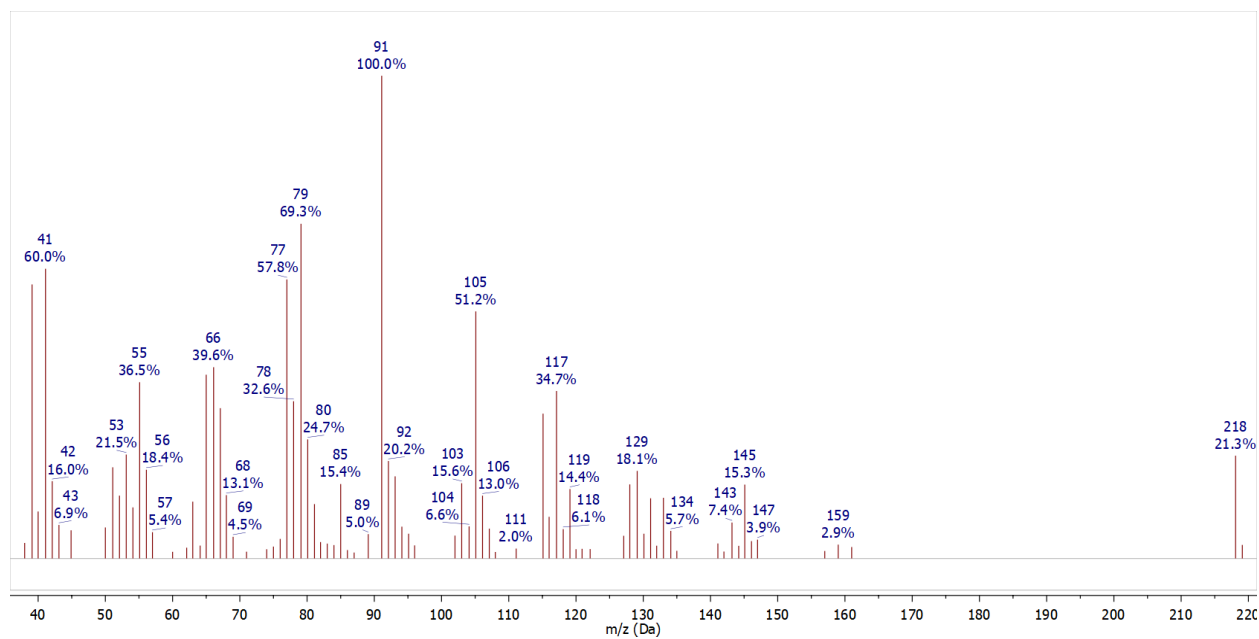
Slika S16. Ključne HMBC- i NOESY-interakcije za određivanje strukture jedinjenja **34**



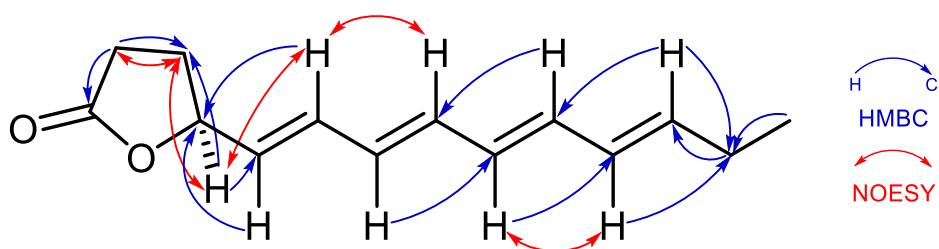
Slika S17. ¹H NMR-spektar (400 MHz, CDCl₃) jedinjenja 35 i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala



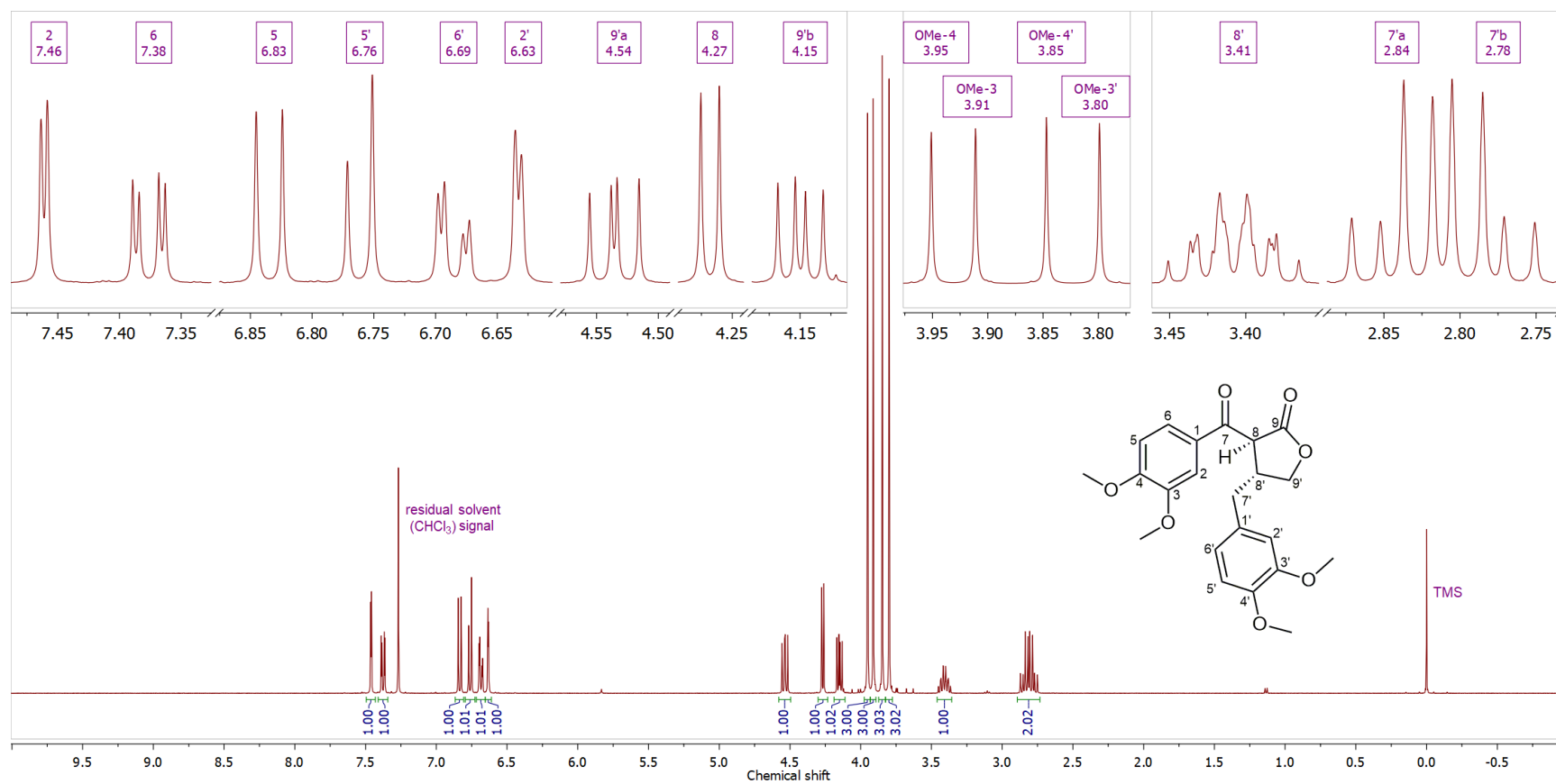
Slika S18. ^{13}C NMR-spektar (100,6 MHz, CDCl_3) jedinjenja 35 i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala



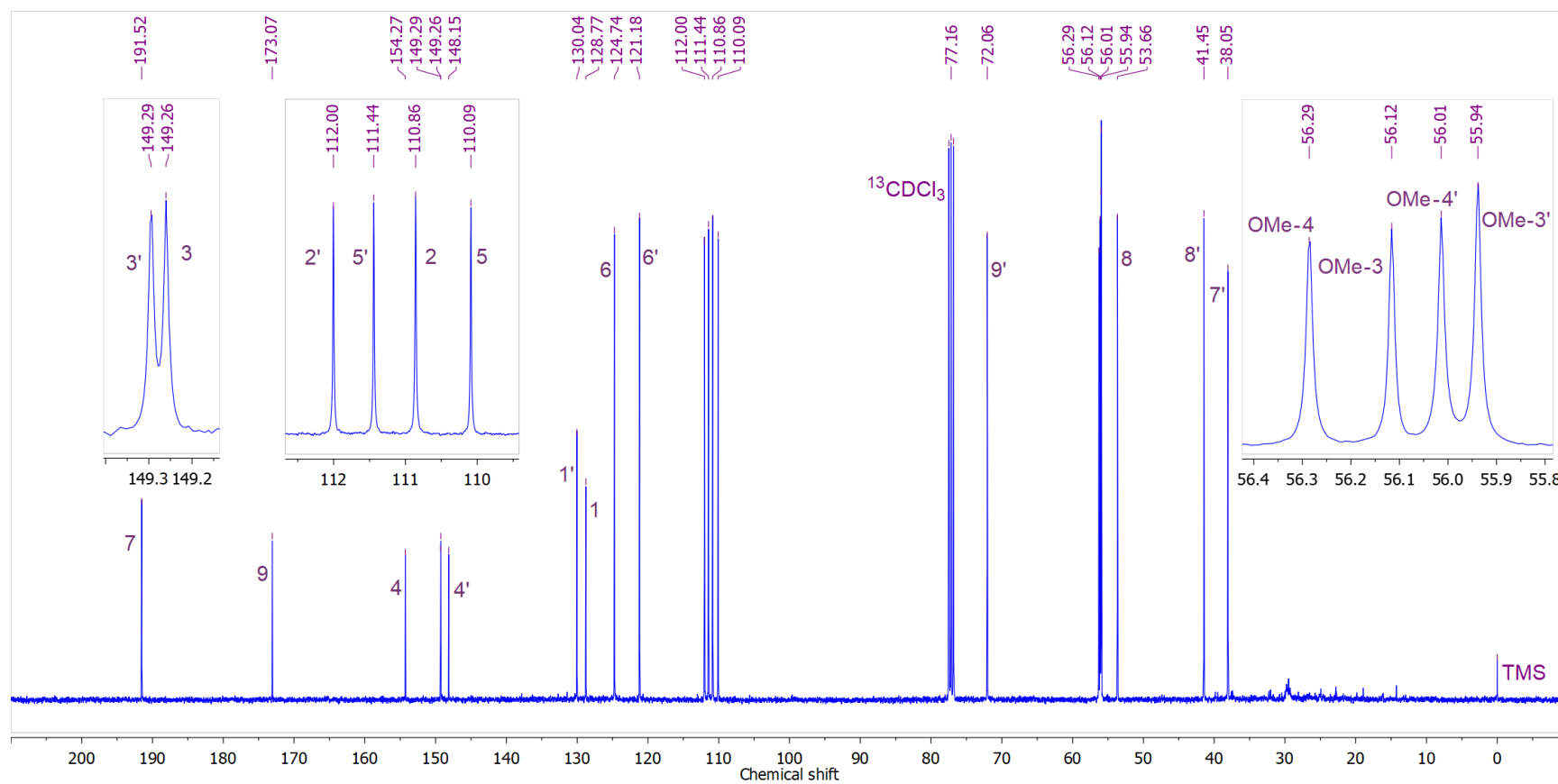
Slika S19. MS (EI, 70 eV) jedinjenja 35



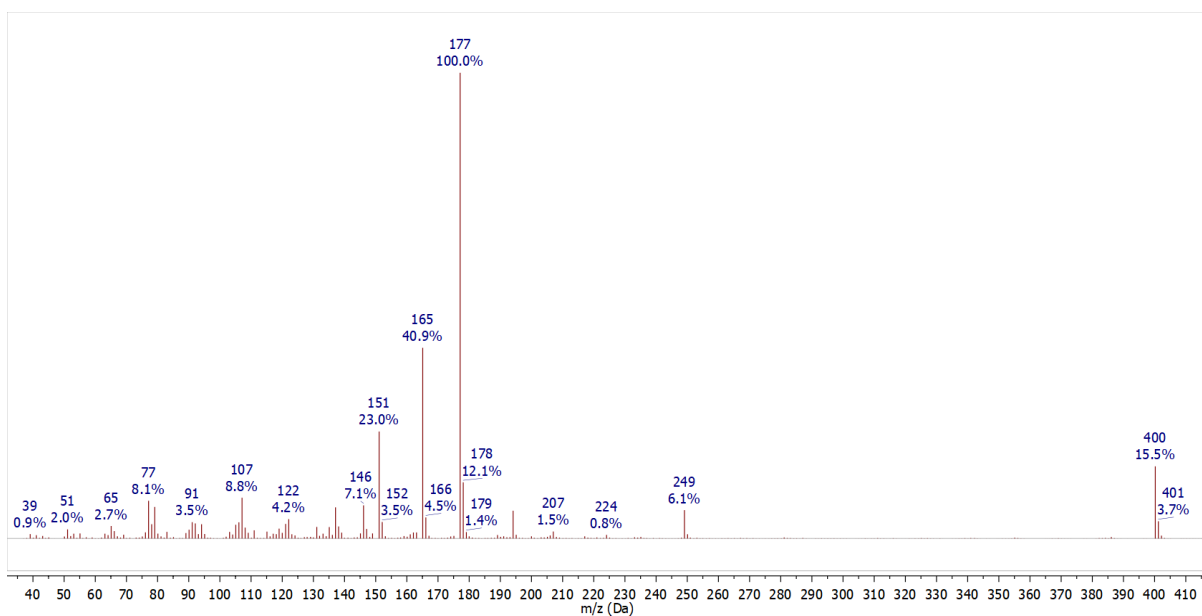
Slika S20. Ključne HMBC- i NOESY-interakcije za određivanje strukture jedinjenja 35



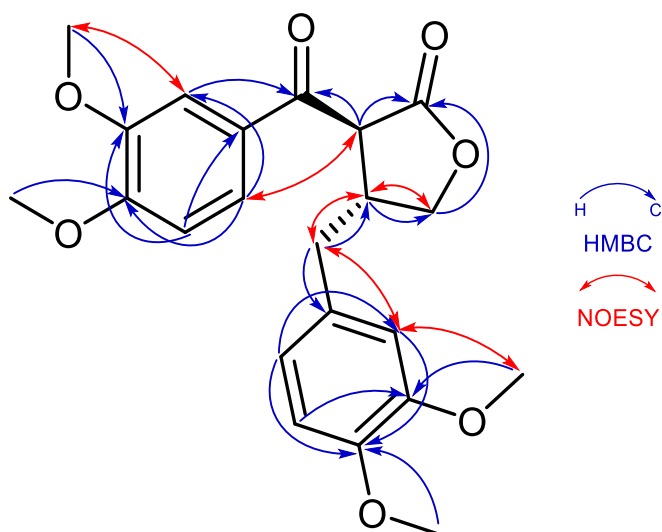
Slika S21. ^1H NMR-spektar (400 MHz, CDCl_3) jedinjenja **36** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala



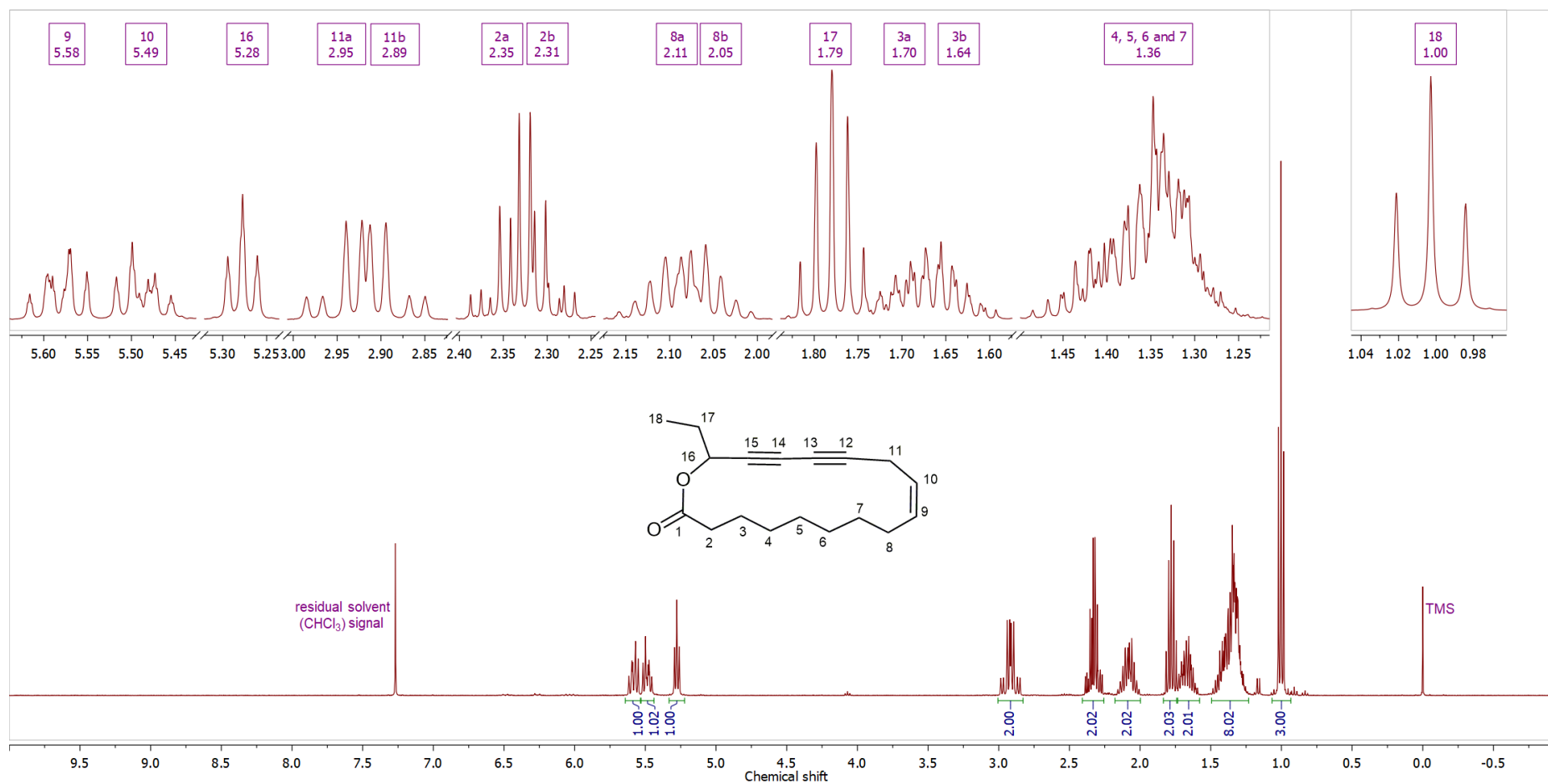
Slika S22. ^{13}C NMR-spektar (100,6 MHz, CDCl_3) jedinjenja **36** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala



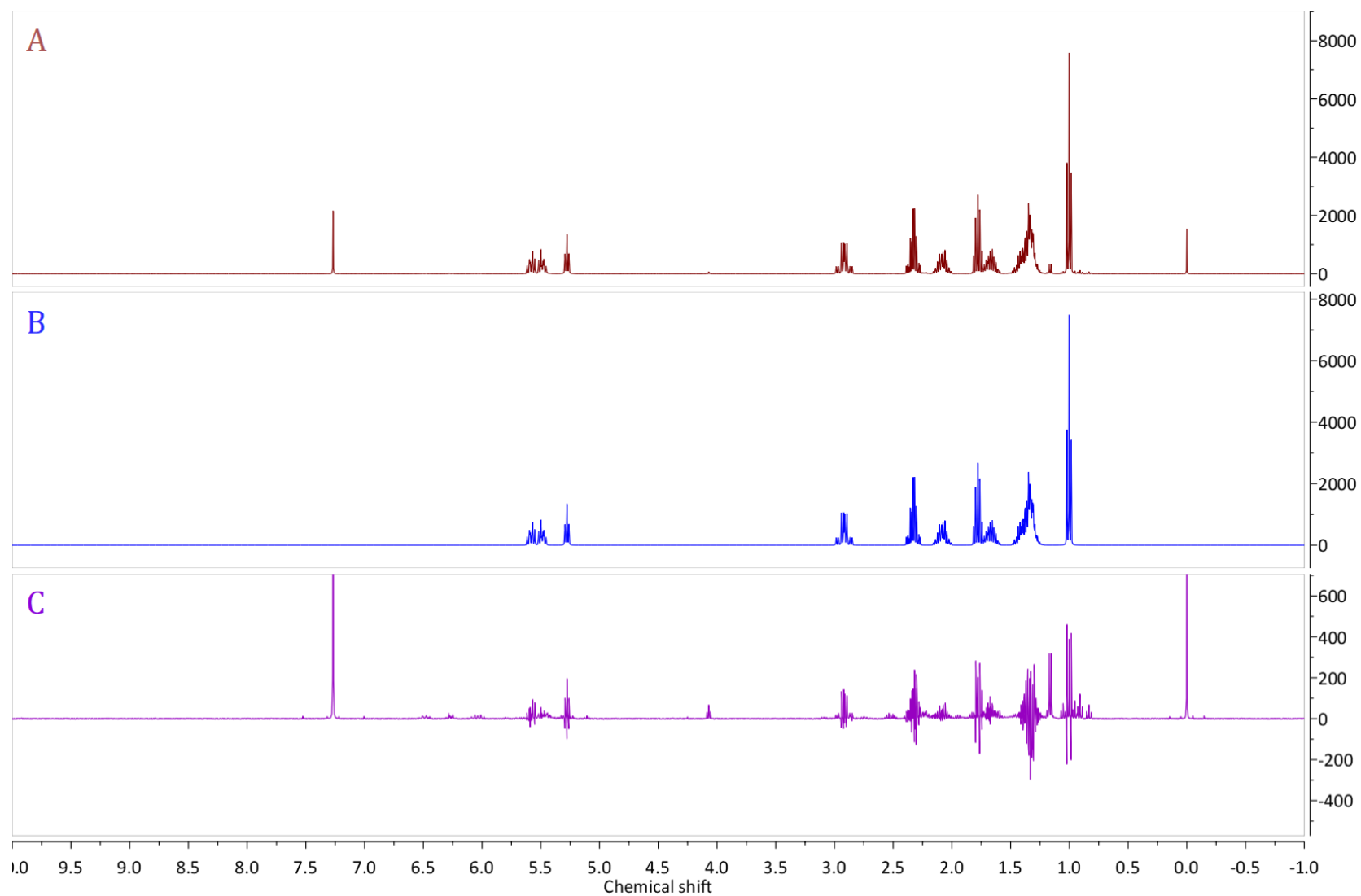
Slika S23. MS (EI, 70 eV) jedinjenja **36**



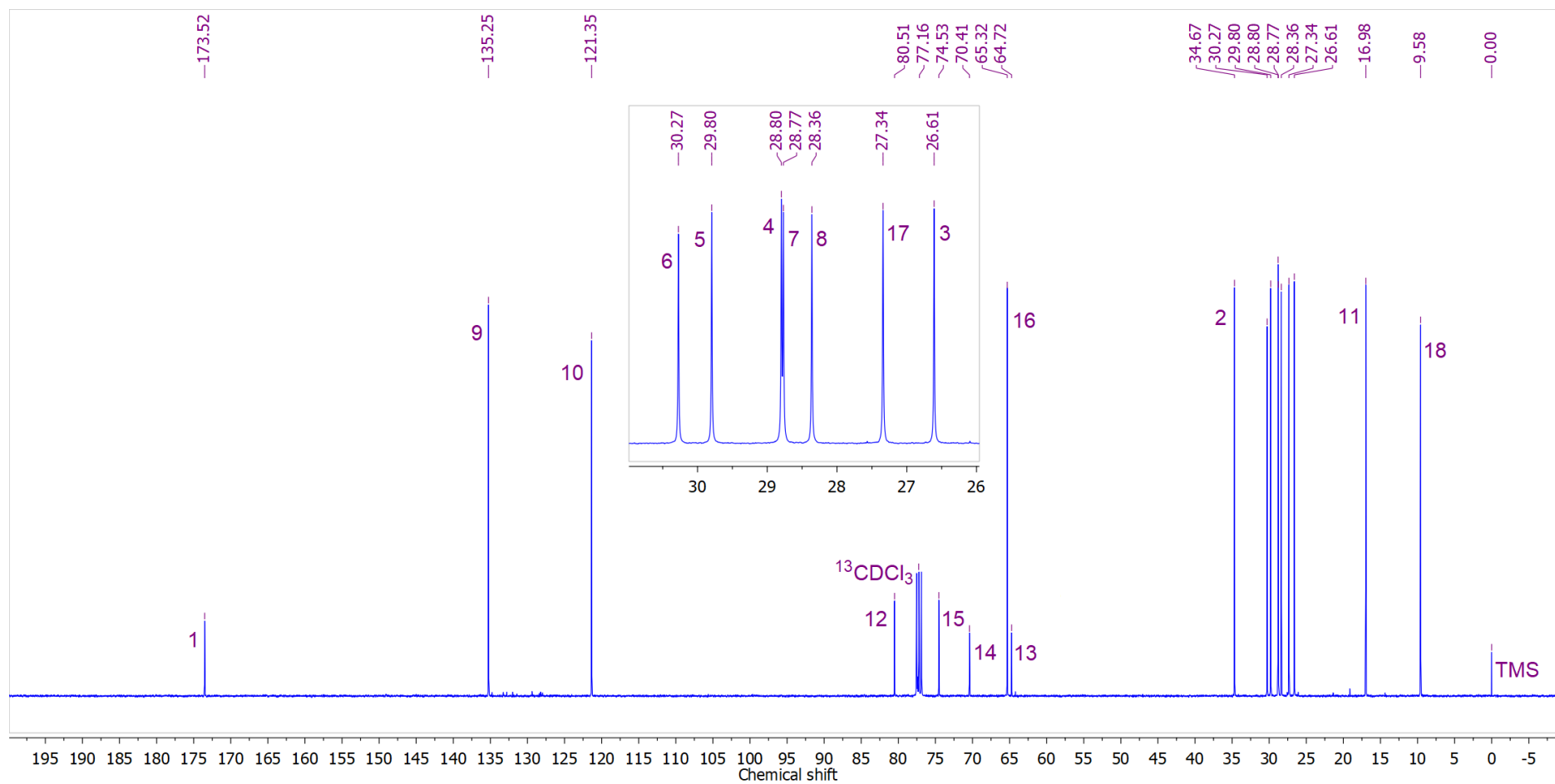
Slika S24. Ključne HMBC- i NOESY-interakcije za određivanje strukture jedinjenja **36**



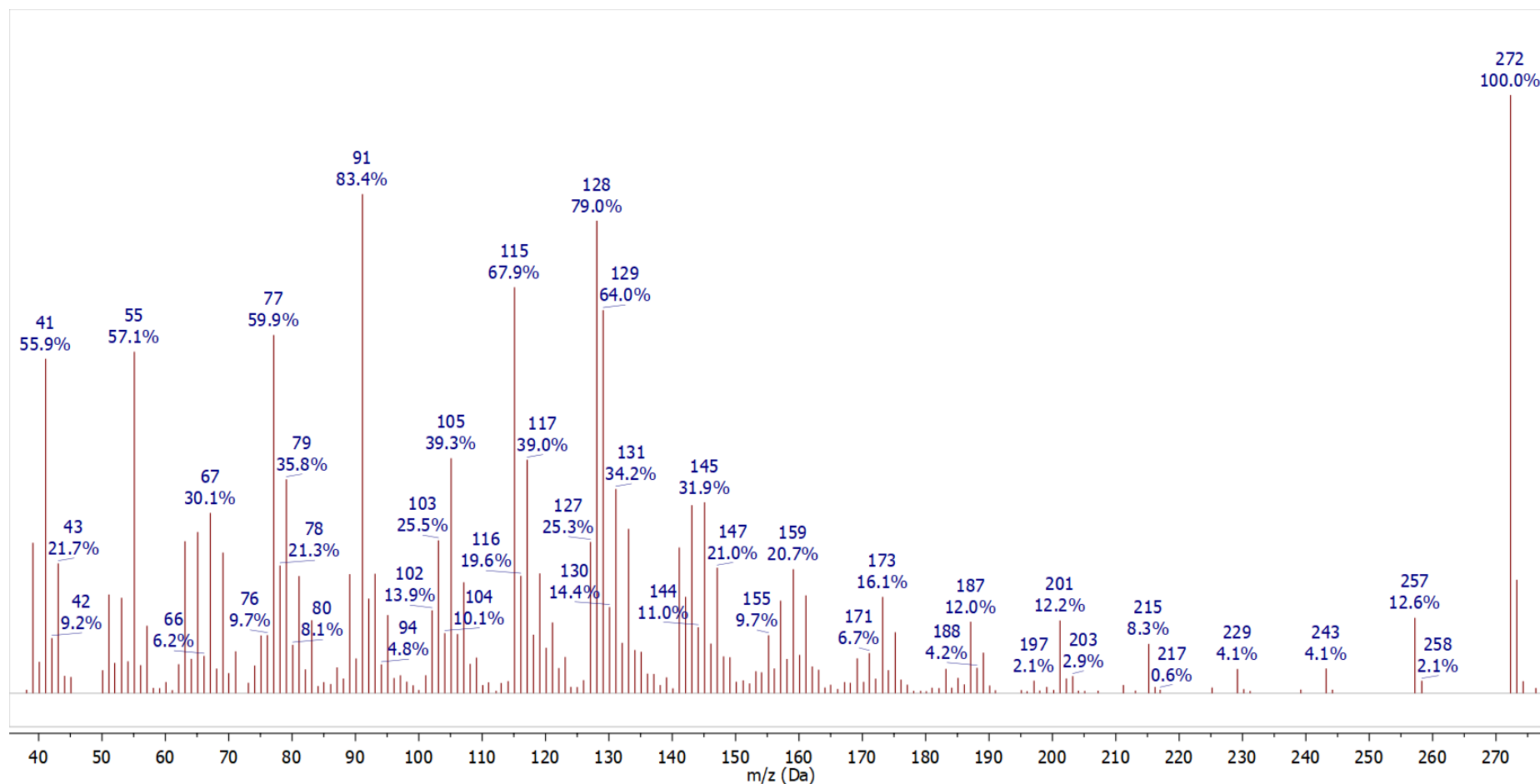
Slika S25. ^1H NMR-spektar (400 MHz, CDCl_3) jedinjenja 37 i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala



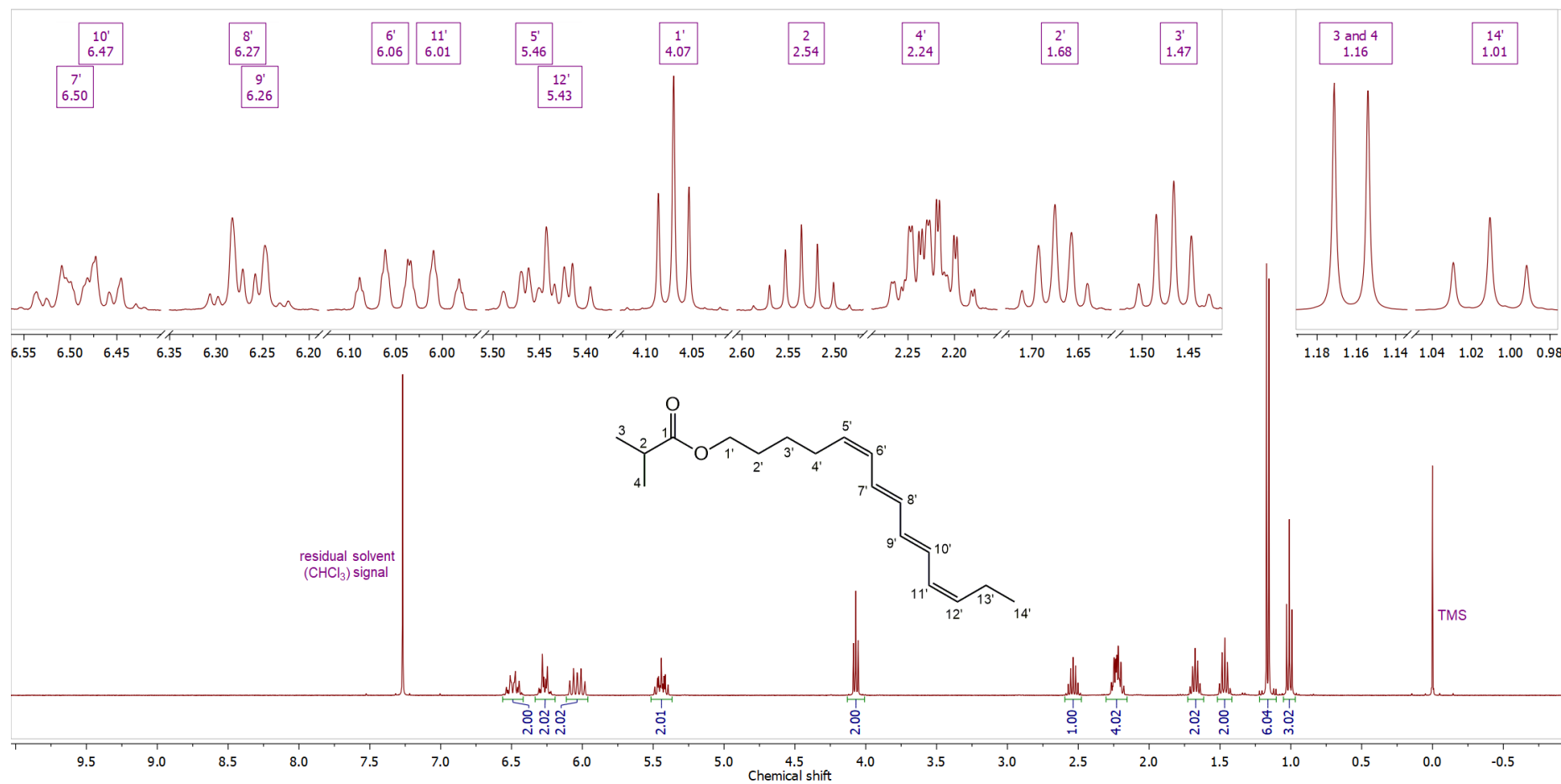
Slika S26. A) Eksperimentalni ^1H NMR-spektar jedinjenja 37; B) Simulirani ^1H NMR-spektar jedinjenja 37; C) Razlika između eksperimentalnog i simuliranog spektra jedinjenja 37



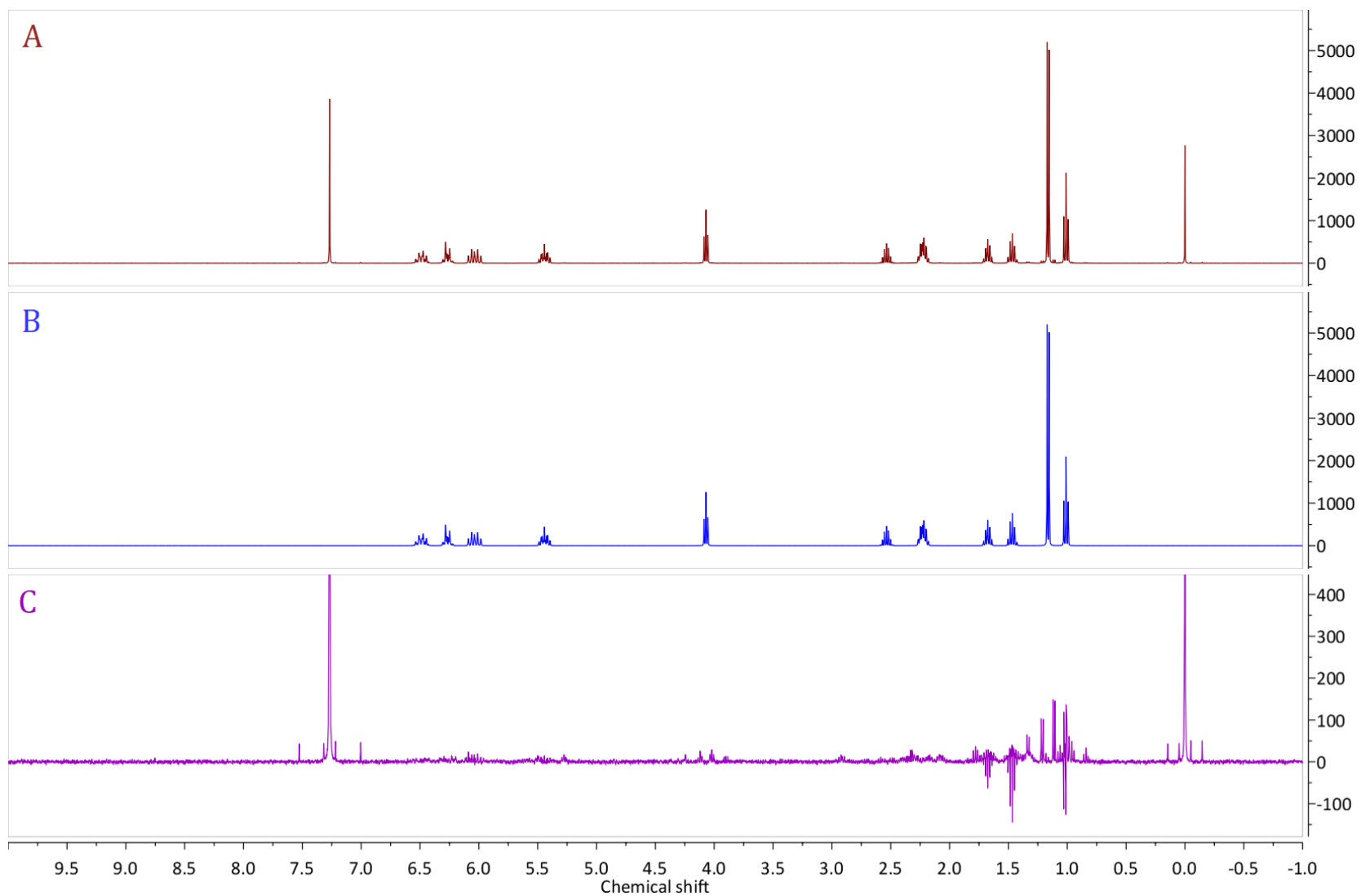
Slika S27. ^{13}C NMR-spektar (100,6 MHz, CDCl_3) jedinjenja **37** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala



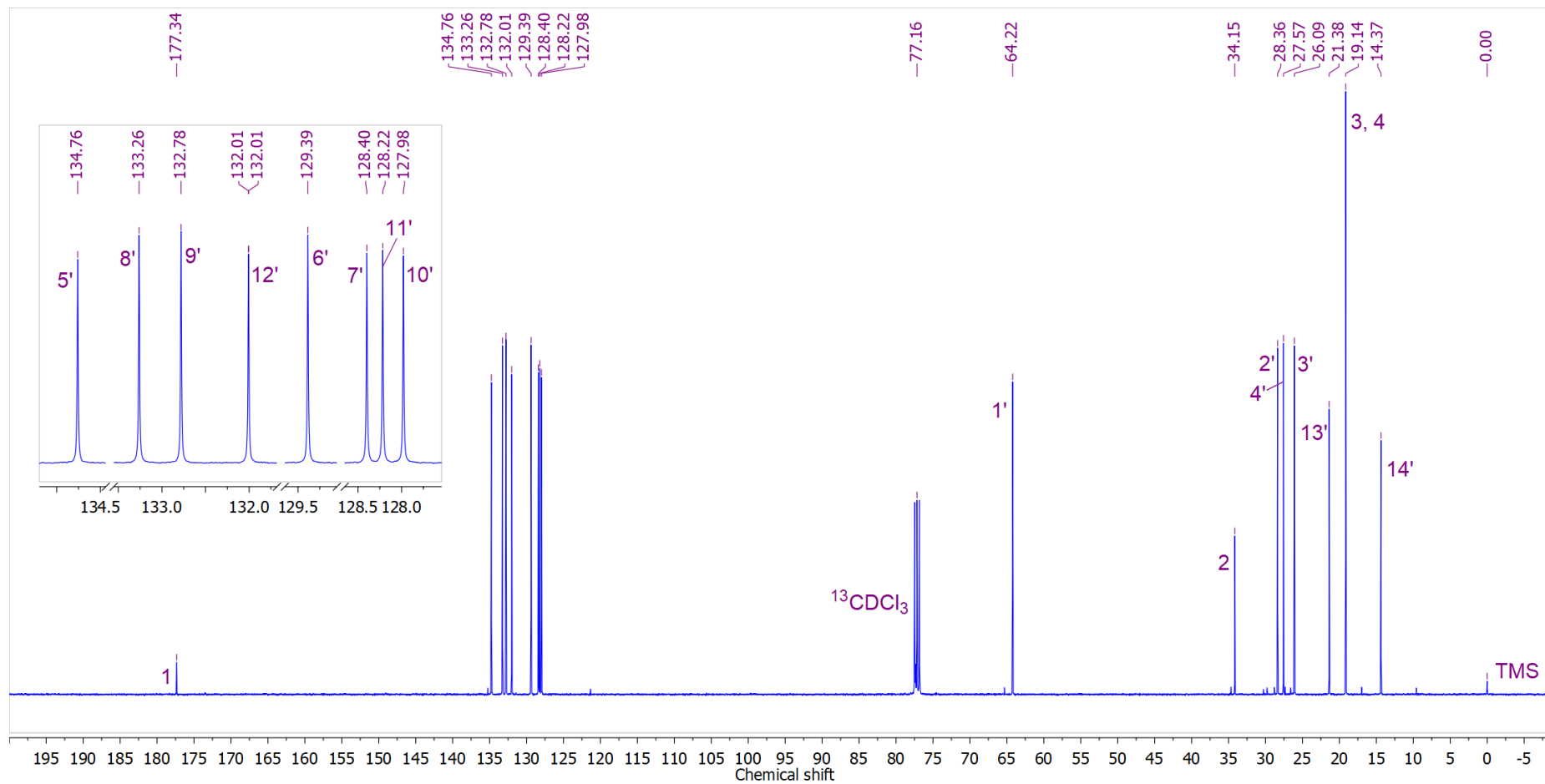
Slika S28. MS (EI, 70 eV) jedinjenja 37



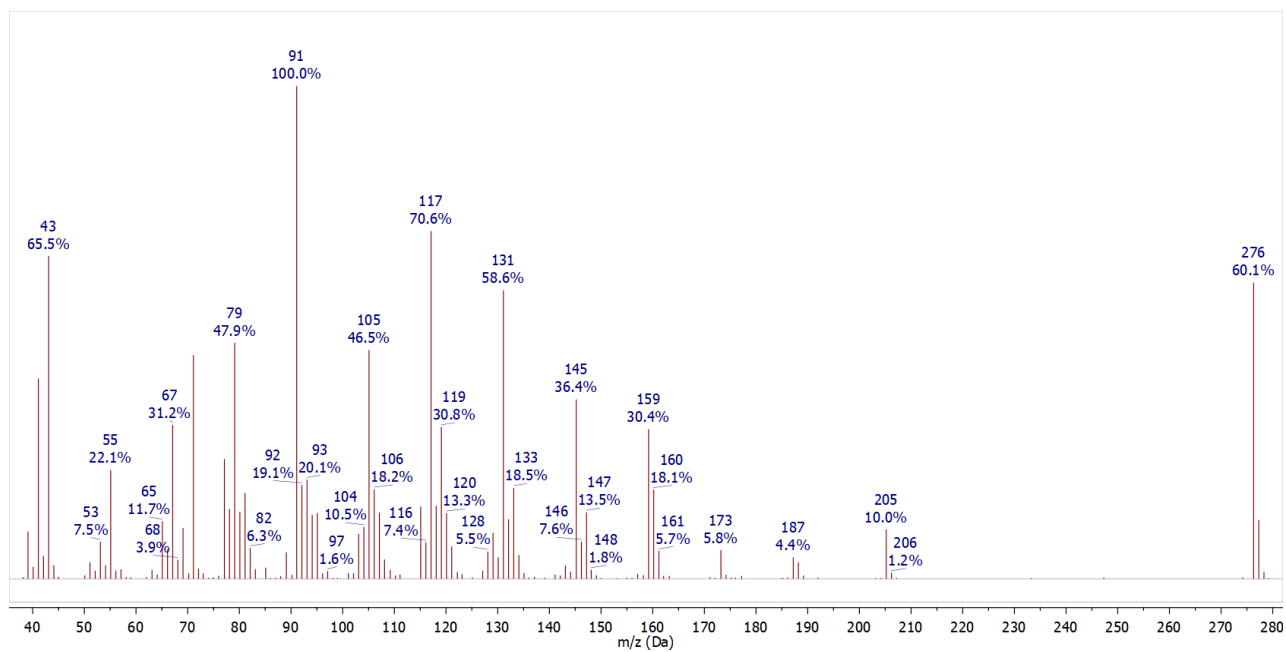
Slika S29. ¹H NMR-spektar (400 MHz, CDCl₃) jedinjenja **38** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala



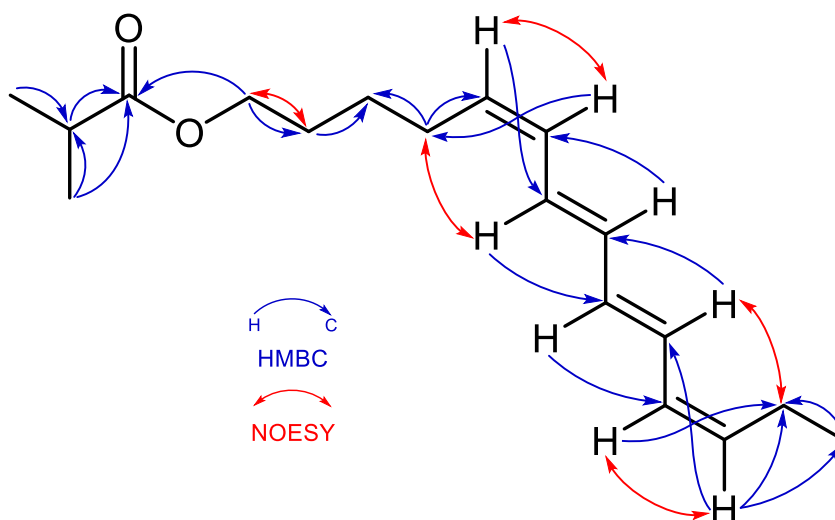
Slika S30. A) Eksperimentalni ^1H NMR-spektar jedinjenja **38**; B) Simulirani ^1H NMR-spektar jedinjenja **38**; C) Razlika između eksperimentalnog i simuliranog spektra jedinjenja **38**



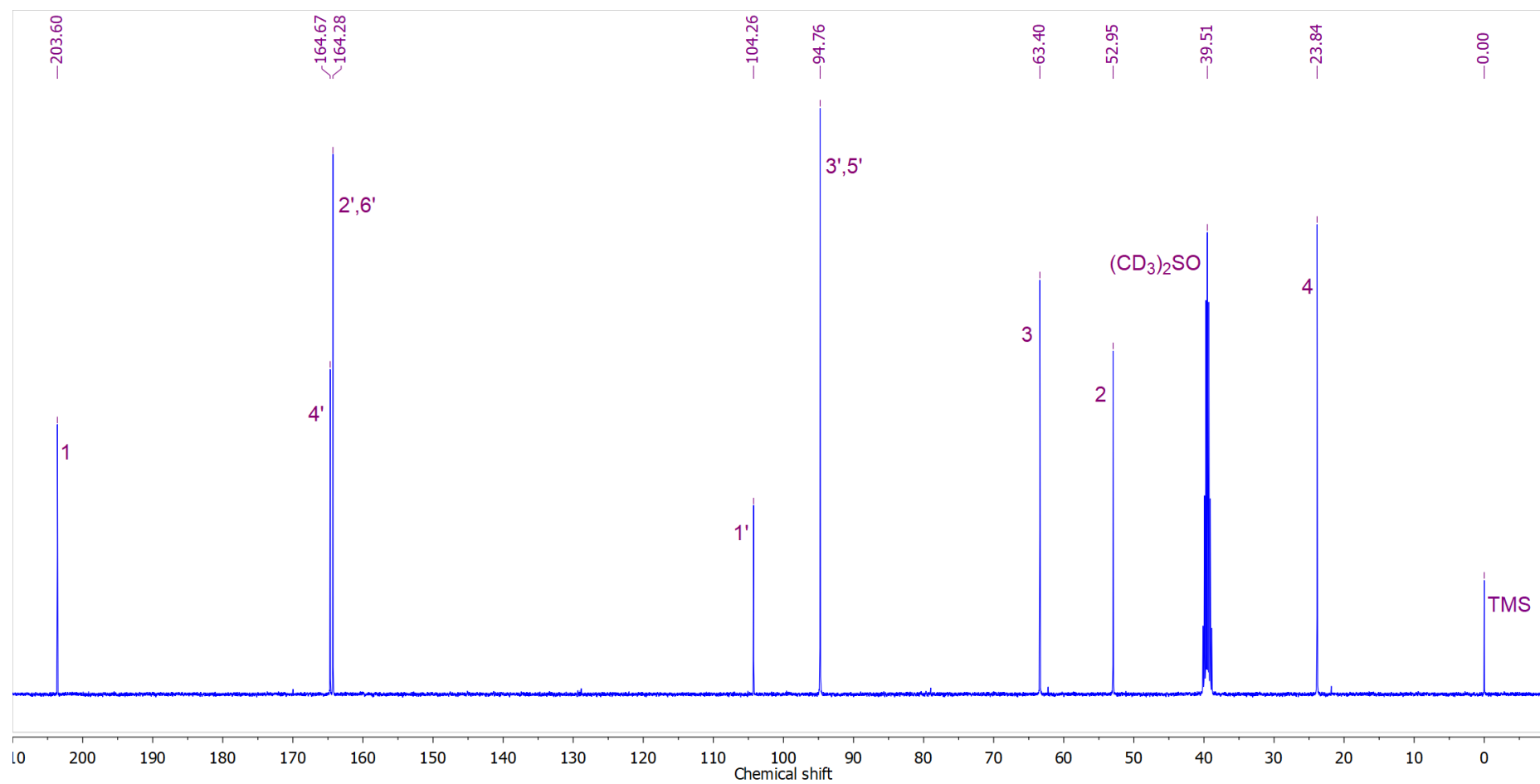
Slika S31. ^{13}C NMR-spektar (100,6 MHz, CDCl_3) jedinjenja **38** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala



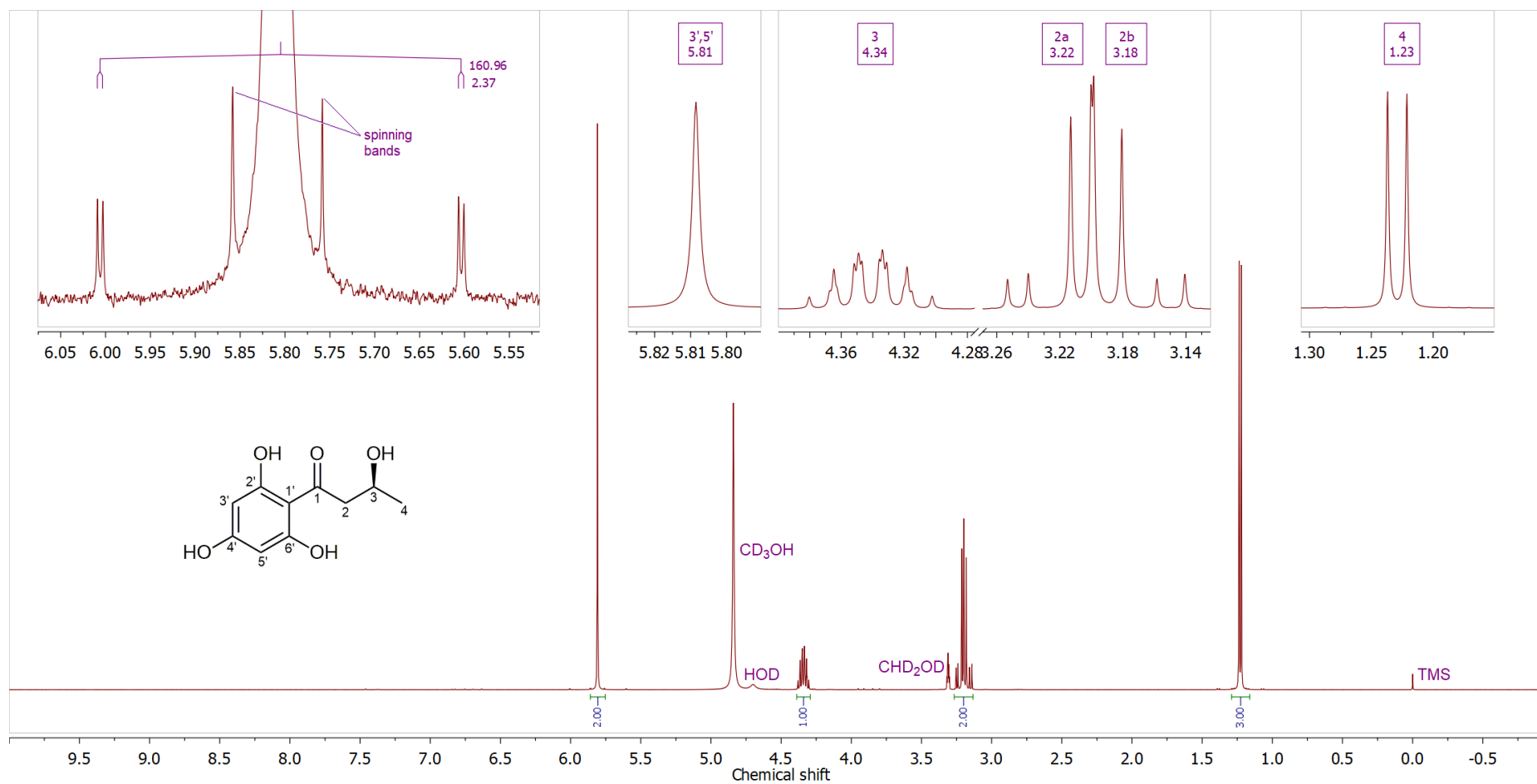
Slika S32. MS (EI, 70 eV) jedinjenja **38**



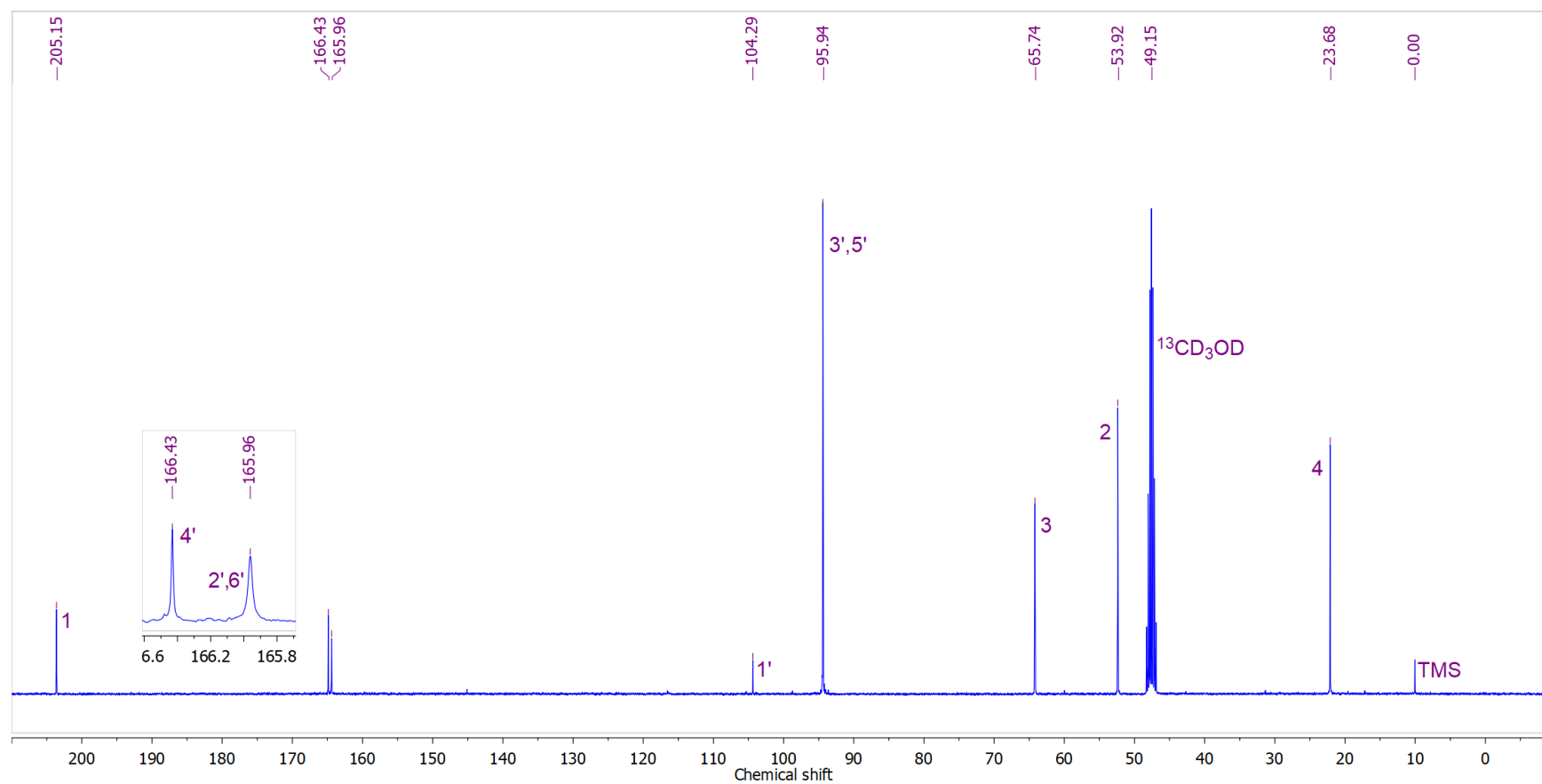
Slika S33. Ključne HMBC- i NOESY-interakcije za određivanje strukture jedinjenja **38**



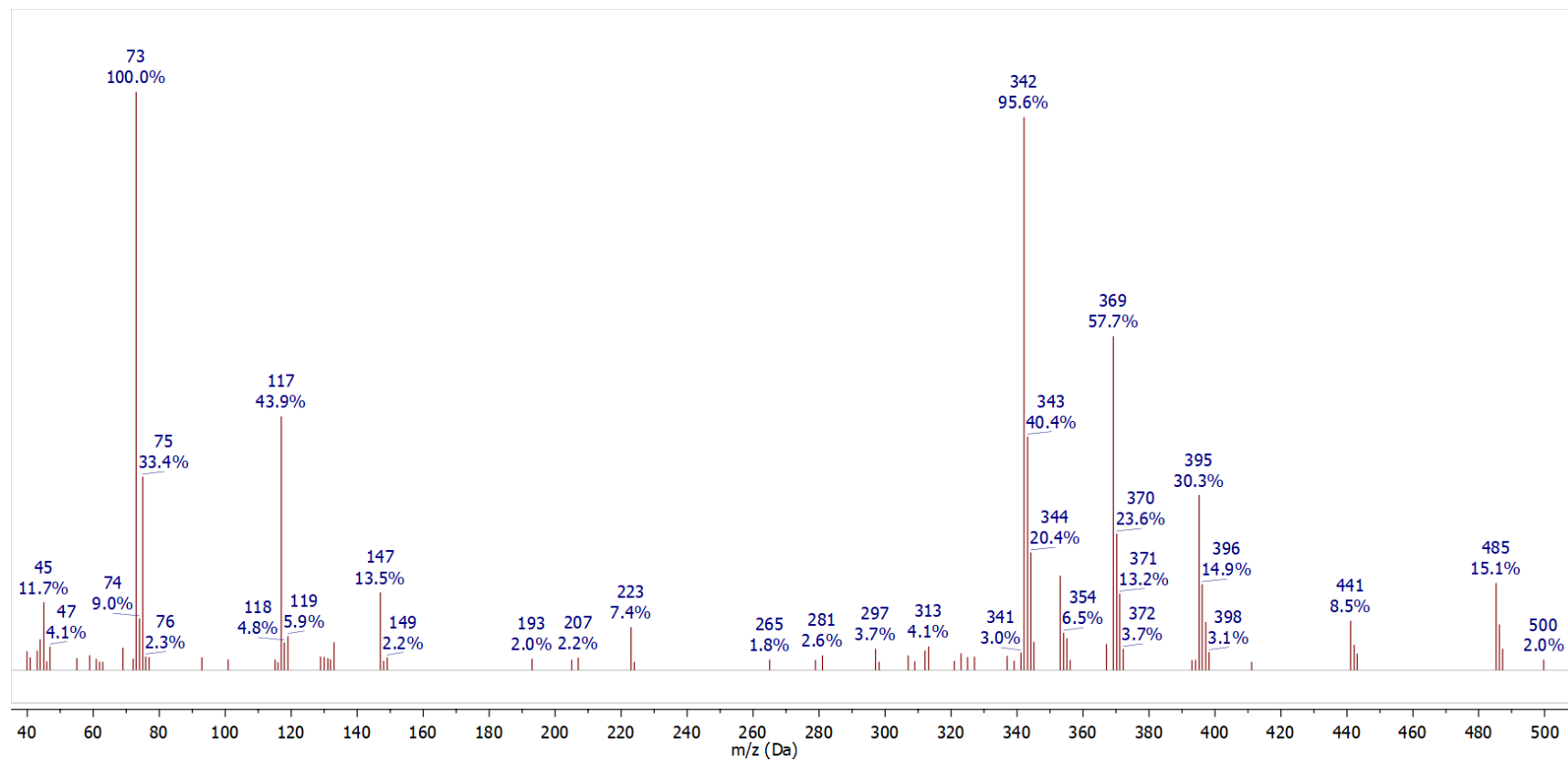
Slika S34. ¹³C NMR-spektar (100,6 MHz, (CD₃)₂SO) jedinjenja **39** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala



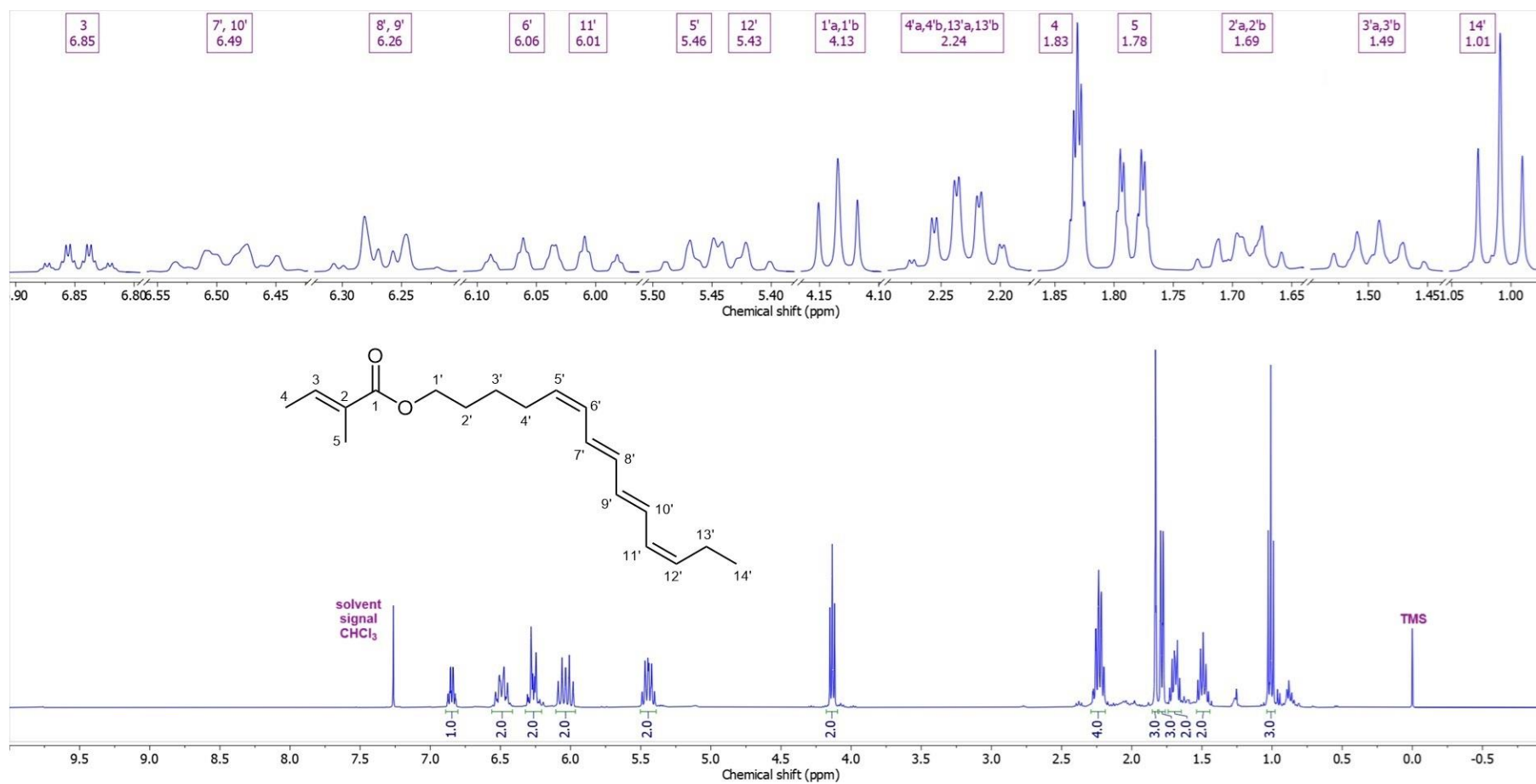
Slika S35. ¹H NMR-spektar (400 MHz, CD₃OD) jedinjenja **39** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala



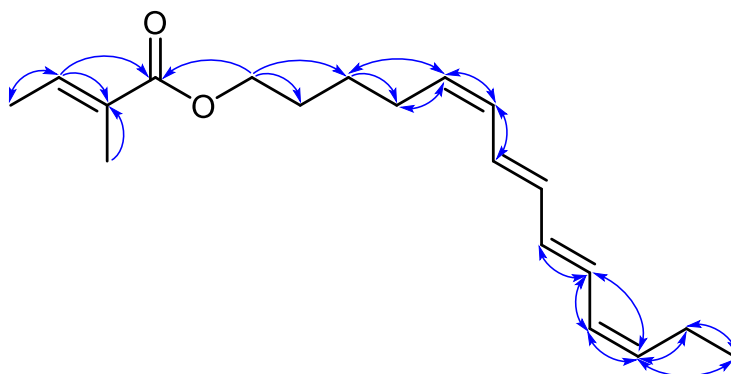
Slika S36. ^{13}C NMR-spektar (100,6 MHz, CD_3OD) jedinjenja **39** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala



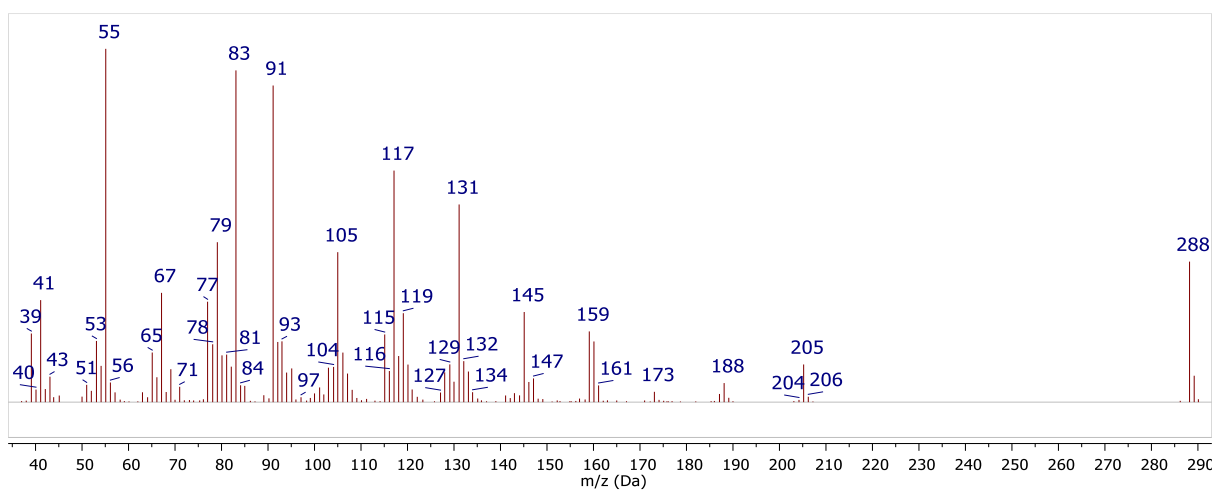
Slika S37. MS (EI, 70 eV) sililovanog derivata jedinjenja **39**



Slika S38. ^1H NMR-spektar (400 MHz, CDCl_3) jedinjenja **40** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala



Slika S39. Ključne HMBC- i NOESY-interakcije za određivanje strukture jedinjenja **40**



Slika S40. MS (EI, 70 eV) jedinjenja **40**

[Mass Spectrum]

Data: MS-BFS-1 Date: 25-Sep-2023 13:18

Instrument : MStation

Sample: -

Note: -

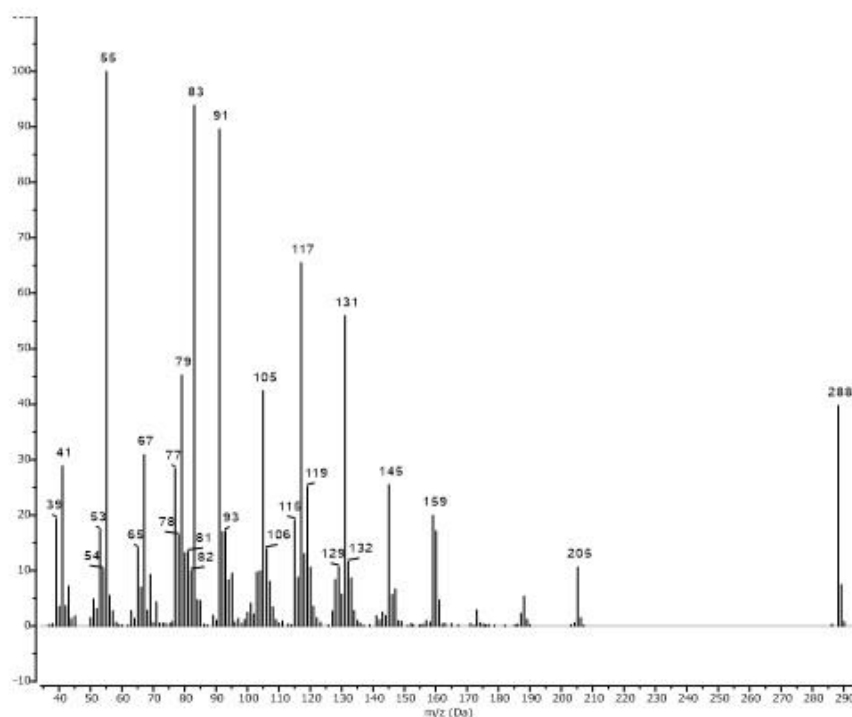
Inlet : Direct Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Normal Ion [MF linear]

RT : 6.55 min Scan# : 40 Temp : -

BP: m/z 55 Int. : 85320

Output m/z range : 30 to 295 Cut Level : 0.00%



Data: MS-BFS-1 Date: 25-Sep-2023 15:48

Instrument : MStation

Sample: -

Note: -

Inlet : Direct Ion Mode : EI+

RT : 6.55 min Scan# : 40

Elements : C 19/0, H 28/0, O 2/0

Mass Tolerance : 1000ppm, 5mmu if m/z < 5, 50mmu if m/z > 50

Unsaturation (U.S.) : -0.5 -20.0

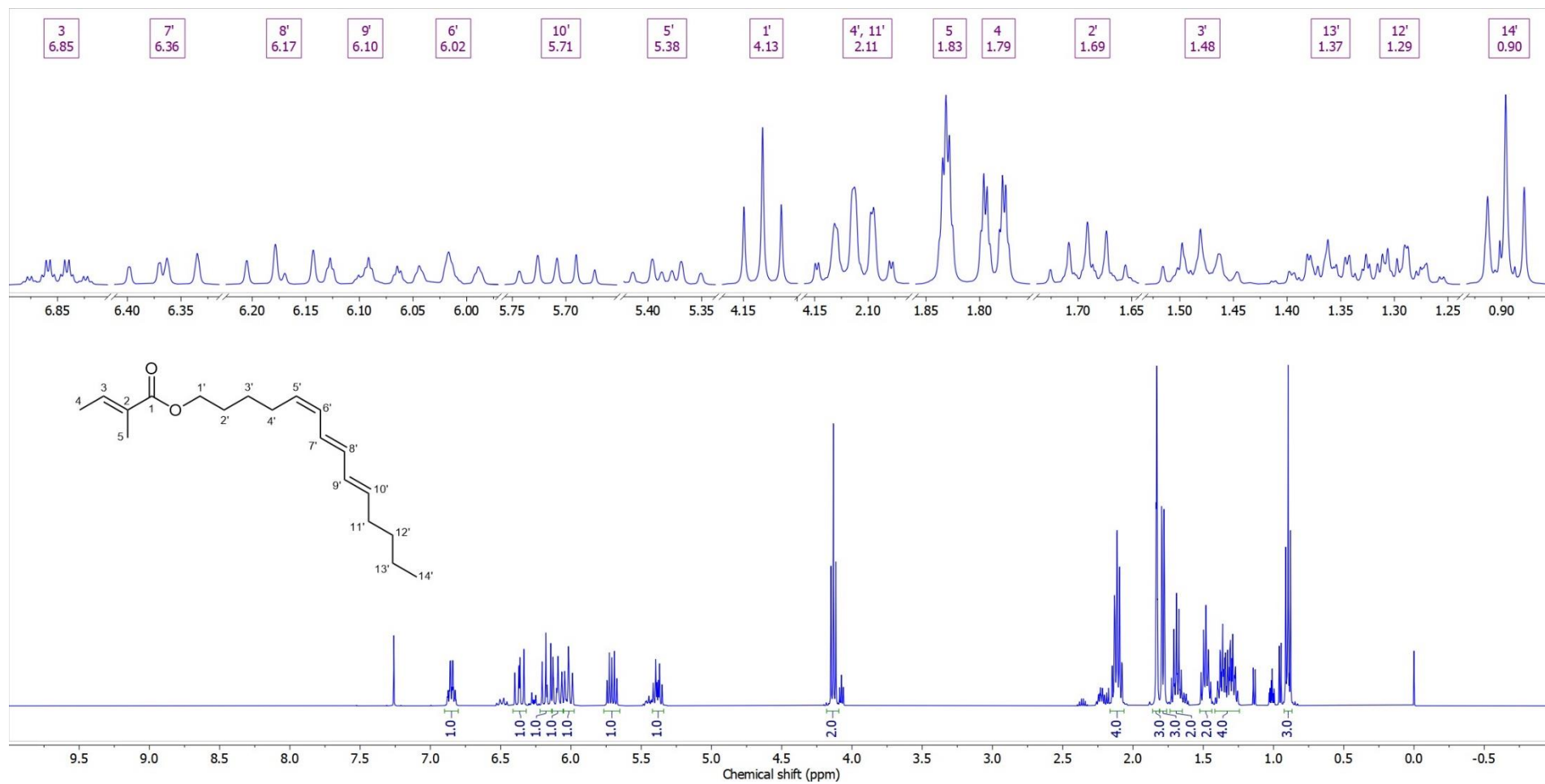
	Observed m/z	Int%	Err [ppm / mmu]	U.S.	Composition
1	288.2094	39.77	+ 1.7 / + 0.5	6	C19 H28 O2

Slika S41. HRMS spektar jedinjenja **40**

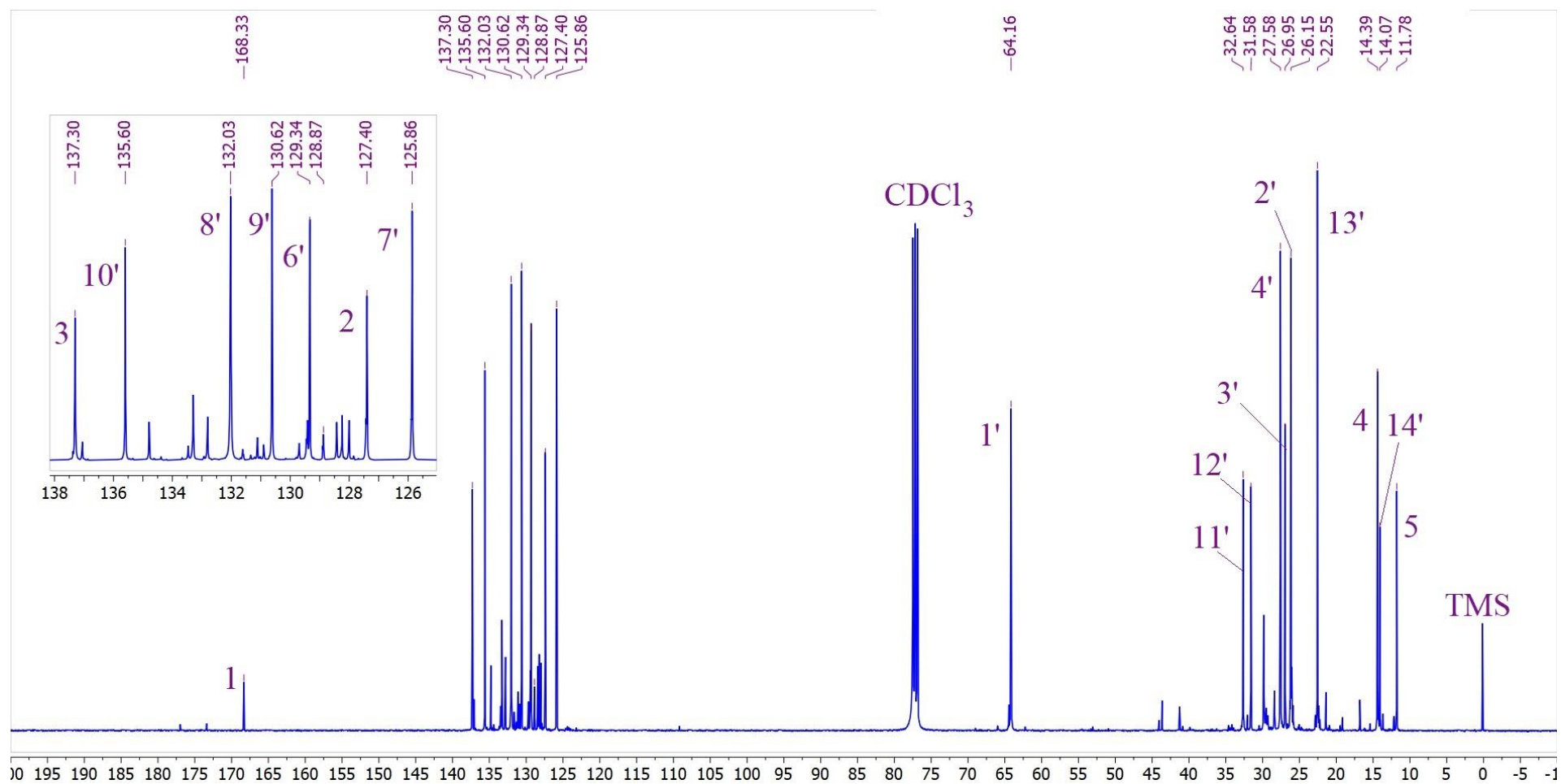
Tabela S3. ^1H (400 MHz) i ^{13}C (100.6 MHz) NMR-spektralni podaci (CDCl_3) jedinjenja **40** i **41** (NMR-parametri su određeni spinskom simulacijom)

40			41		
Pozicija	δ_{H} (m, J^1 (Hz), Integral)	δ_{C}	Pozicija	δ_{H} (m, J (Hz), Integral)	δ_{C}
1	/	168,32	1	/	168,33
2	/	128,87	2	/	128,85
3	6,8468 (qq, $^3J_{3,4} = 7,1$, $^4J_{3,5} = 1,4$, 1 H)	137,07	3	6,8500 (qq, $^3J_{3,4} = 7,0$, $^4J_{3,5} = 1,5$, 1 H)	137,30
4	1,7846 (d, $^3J_{3,4} = 7,1$, 3 H)	14,45	4	1,7860 (dq, $^3J_{3,4} = 7,0$, $^5J_{4,5} = 1,2$, 3 H)	14,39
5	1,8308 (d, $^4J_{3,5} = 1,4$, 3 H)	12,17	5	1,8312 (dq, $^4J_{3,5} = 1,5$, $^5J_{4,5} = 1,2$, 3 H)	11,78
1'a	4,1343 (dd, $^3J_{1'a,2'b} = 7,7$, $^3J_{1'a,2'a} = 5,5$, 1 H)	64,39	1'a	4,1320 (dd, $^3J_{1'a,2'b} = ^3J_{1'a,2'a} = 7,0$, 1 H)	64,16
1'b	4,1343 (dd, $^3J_{1'b,2'a} = 7,7$, $^3J_{1'b,2'b} = 5,5$, 1 H)		1'b	4,1320 (dd, $^3J_{1'b,2'a} = ^3J_{1'b,2'b} = 7,0$, 1 H)	
2'a	1,6932 (dddd, $^3J_{2'a,3'b} = 9,8$, $^3J_{1'b,2'a} = 7,7$, $^3J_{2'a,3'a} = 5,6$, $^3J_{1'a,2'a} = 5,5$, 1 H)	28,44	2'a	1,6900 (dddd, $^3J_{2'a,3'b} = 9,0$, $^3J_{1'b,2'a} = ^3J_{1'a,2'a} = 7,0$, $^3J_{2'a,3'a} = 5,0$, 1 H)	26,15
2'b	1,6932 (dddd, $^3J_{2'b,3'a} = 9,8$, $^3J_{1'a,2'b} = 7,7$, $^3J_{2'b,3'b} = 5,6$, $^3J_{1'b,2'b} = 5,5$, 1 H)		2'b	1,6900 (dddd, $^3J_{2'b,3'a} = 9,0$, $^3J_{1'a,2'b} = ^3J_{1'b,2'b} = 7,0$, $^3J_{2'b,3'b} = 5,0$, 1 H)	
3'a	1,4922 (dddd, $^3J_{2'b,3'a} = ^3J_{3'a,4'b} = 9,8$, $^3J_{2'a,3'a} = ^3J_{3'a,4'a} = 5,6$, 1 H)	26,23	3'a	1,4820 (dddd, $^3J_{2'b,3'a} = ^3J_{3'a,4'b} = 9,0$, $^3J_{2'a,3'a} = ^3J_{3'a,4'a} = 5,0$, 1 H)	26,95
3'b	1,4922 (dddd, $^3J_{2'a,3'b} = ^3J_{3'b,4'a} = 9,8$, $^3J_{2'b,3'b} = ^3J_{3'b,4'b} = 5,6$, 1 H)		3'b	1,4820 (dddd, $^3J_{2'a,3'b} = ^3J_{3'b,4'a} = 9,0$, $^3J_{2'b,3'b} = ^3J_{3'b,4'b} = 5,0$, 1 H)	
4'a	2,2263 (dddd, $^3J_{3'b,4'a} = 9,8$, $^3J_{4'a,5'} = 7,8$, $^3J_{3'a,4'a} = 5,6$, $^4J_{4'a,6'} = 1,7$, 1 H)	27,61	4'a	2,1210 (dddd, $^3J_{3'b,4'a} = 9,0$, $^3J_{4'a,5'} = 7,3$, $^3J_{3'a,4'a} = 5,0$, $^4J_{4'a,6'} = 1,3$, 1 H)	27,58
4'b	2,2263 (dddd, $^3J_{3'a,4'b} = 9,8$, $^3J_{4'b,5'} = 7,8$, $^3J_{3'b,4'b} = 5,6$, $^4J_{4'b,6'} = 1,7$, 1 H)		4'b	2,1210 (dddd, $^3J_{3'a,4'b} = 9,0$, $^3J_{4'b,5'} = 7,3$, $^3J_{3'b,4'b} = 5,0$, $^4J_{4'b,6'} = 1,3$, 1 H)	
5'	5,4562 (dddd, $^3J_{5',6'} = 11,0$, $^3J_{4'a,5'} = ^3J_{4'b,5'} = 7,8$, $^4J_{5',7'} = -1,7$, 1 H)	134,76	5'	5,3827 (dddd, $^3J_{5',6'} = 10,8$, $^3J_{4'a,5'} = ^3J_{4'b,5'} = 7,3$, $^4J_{5',7'} = -0,8$, 1 H)	132,03
6'	6,0612 (dddd, $^3J_{5',6'} = ^3J_{6',7'} = 11,0$, $^4J_{4'a,6'} = ^4J_{4'b,6'} = 1,7$, $^4J_{6',8'} = -0,7$, 1 H)	129,39	6'	6,0170 (dddd, $^3J_{6',7'} = 11,4$, $^3J_{5',6'} = 10,8$, $^4J_{4'a,6'} = ^4J_{4'b,6'} = 1,3$, $^4J_{6',8'} = -0,7$, 1 H)	129,34
7'	6,5020 (dddd, $^3J_{7',8'} = 15,2$, $^3J_{6',7'} = 11,0$, $^4J_{5',7'} = -1,7$, $^4J_{7',9'} = -0,8$, $^5J_{7',10'} = -0,6$, 1 H)	128,40	7'	6,3642 (dddd, $^3J_{7',8'} = 14,8$, $^3J_{6',7'} = 11,4$, $^4J_{5',7'} = -0,8$, $^4J_{7',9'} = -0,7$, 1 H)	125,86
8'	6,2700 (dddd, $^3J_{7',8'} = 15,2$, $^3J_{8',9'} = 12,0$, $^4J_{8',10'} = -0,8$, $^4J_{6',8'} = -0,7$, 1 H)	133,27	8'	6,1730 (dddd, $^3J_{7',8'} = 14,8$, $^3J_{8',9'} = 10,8$, $^4J_{8',10'} = -0,7$, $^4J_{6',8'} = -0,7$, 1 H)	132,03
9'	6,2599 (dddd, $^3J_{9',10'} = 15,2$, $^3J_{8',9'} = 12,0$, $^4J_{7',9'} = -0,8$, $^4J_{9',11'} = -0,7$, 1 H)	132,83	9'	6,0980 (dddd, $^3J_{9',10'} = 15,0$, $^3J_{8',9'} = 10,8$, $^4J_{7',9'} = -0,7$, $^4J_{9',11'a} = ^4J_{9',11'b} = 1,3$, 1 H)	130,62
10'	6,4780 (dddd, $^3J_{9',10'} = 15,2$, $^3J_{10',11'} = 11,0$, $^4J_{10',12'} = 1,0$, $^4J_{8',10'} = -0,8$, $^5J_{7',10'} = -0,6$, 1 H)	128,04	10'	5,7092 (dddd, $^3J_{9',10'} = 15,0$, $^3J_{10',11'a} = ^3J_{10',11'b} = 6,9$, $^4J_{8',10'} = -0,7$, 1 H)	135,60
11'	6,0093 (dddd, $^3J_{10',11'} = ^3J_{11',12'} = 11,0$, $^4J_{11',13'a} = ^4J_{11',13'b} = 1,6$, $^4J_{9',11'} = -0,7$, 1 H)	128,25	11'a	2,1050 (dddd, $^3J_{10',11'a} = 6,9$, $^3J_{11'a,12'a} = ^3J_{11'a,12'b} = 7,2$, $^4J_{9',11'a} = 1,3$, 1 H)	32,64
			11'b	2,1050 (dddd, $^3J_{10',11'b} = 6,9$, $^3J_{11'b,12'a} = ^3J_{11'b,12'b} = 7,2$, $^4J_{9',11'b} = 1,3$, 1 H)	
12'	5,4346 (dddd, $^3J_{11',12'} = 11,0$, $^3J_{12',13'a} = ^3J_{12',13'b} = 7,8$, $^4J_{10',12'} = 1,0$, 1 H)	132,10	12'a	1,2930 (dddd, $^3J_{12a',13'b} = 9,0$, $^3J_{11'a,12'a} = ^3J_{11'b,12'a} = 7,2$, $^3J_{12a',13'a} = 5,0$, 1 H)	31,58
			12'b	1,2930 (dddd, $^3J_{12b',13'a} = 9,0$, $^3J_{11'a,12'b} = ^3J_{11'b,12'b} = 7,2$, $^3J_{12b',13'b} = 5,0$, 1 H)	
13'a	2,2367 (ddd, $^3J_{12',13'a} = 7,8$, $^3J_{13'a,14'} = 7,5$, $^4J_{11',13'a} = 1,6$, 1 H)	21,39	13'a	1,3670 (ddd, $^3J_{12b',13'a} = 9,0$, $^3J_{13'a,14'} = 7,0$, $^3J_{12a',13'a} = 5,0$, 1 H)	22,55
13'b	2,2367 (ddd, $^3J_{12',13'b} = 7,8$, $^3J_{13'b,14'} = 7,5$, $^4J_{11',13'b} = 1,6$, 1 H)		13'b	1,3670 (ddd, $^3J_{12a',13'b} = 9,0$, $^3J_{13'b,14'} = 7,0$, $^3J_{12b',13'b} = 5,0$, 1 H)	
14'	1,0092 (t, $^3J_{13'a,14'} = ^3J_{13'b,14'} = 7,5$, 3 H)	14,38	14'	0,8964 (t, $^3J_{13'a,14'} = ^3J_{13'b,14'} = 7,0$, 3 H)	14,07

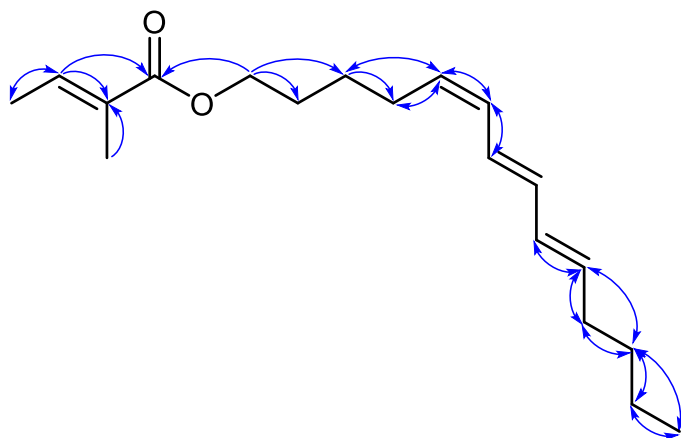
¹ Konstante kuplovanja su određene u eksperimentima selektivnog homodekuplovanja i potpunom spinskom simulacijom.



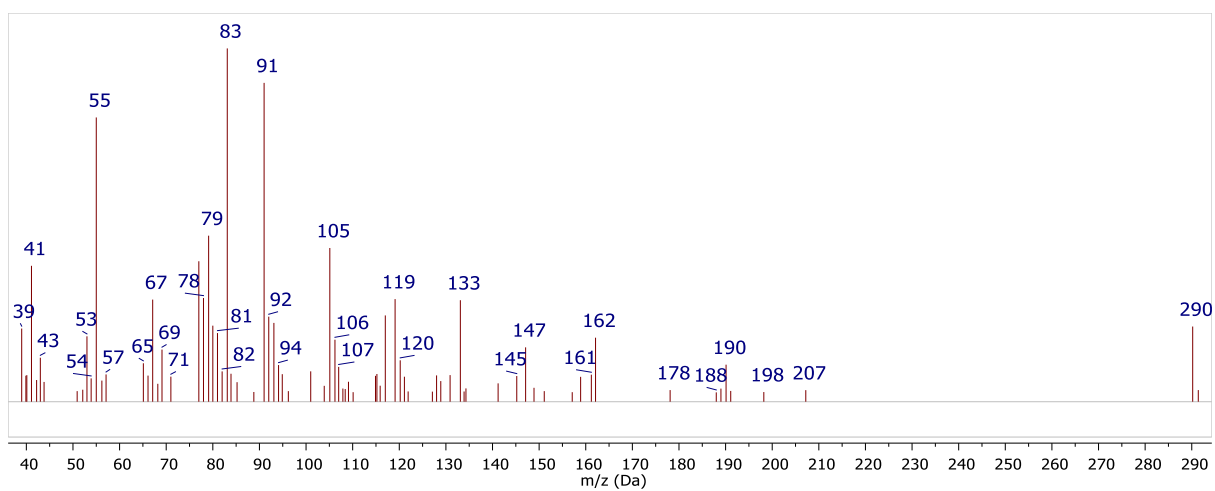
Slika S42. ¹H NMR-spektar (400 MHz, CDCl₃) jedinjenja **41** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala



Slika S43. ^{13}C NMR-spektar (100,6 MHz, CDCl_3) jedinjenja **41** i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala



Slika S44. Ključne HMBC- i NOESY-interakcije za određivanje strukture jedinjenja **41**



Slika S45. MS (EI, 70 eV) jedinjenja **41**

[Mass Spectrum]

Data: MS-BFS-2 Date: 1-Oct-2023 10:39

Instrument : MStation

Sample: -

Note: -

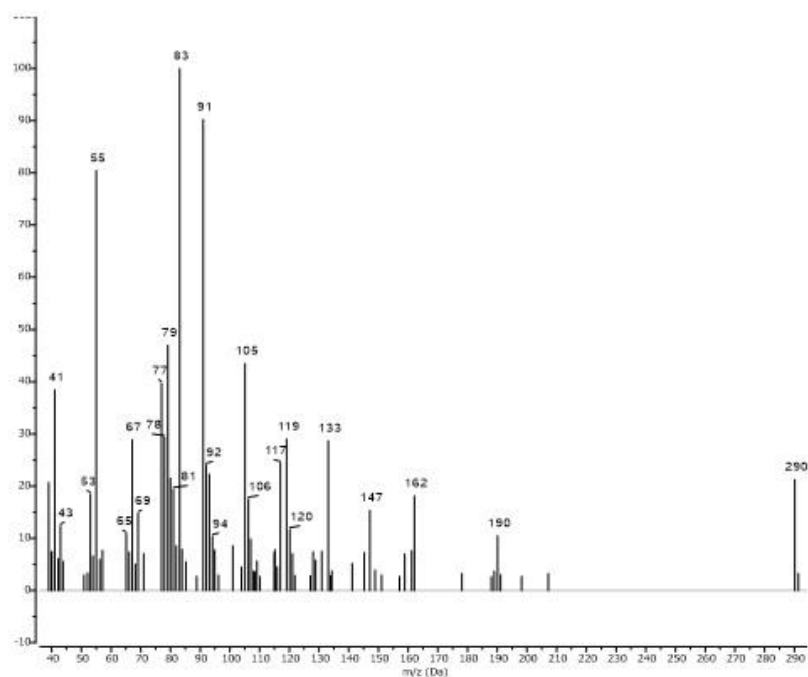
Inlet : Direct Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Normal Ion [MF linear]

RT : 6.28 min Scan# : 38 Temp : -

BP: m/z 83 Int. : 5732

Output m/z range : 35 to 295 Cut Level : 0.00%



Data: MS-BFS-2 Date: 1-Oct-2023 11:58

Instrument : MStation

Sample: -

Note: -

Inlet : Direct Ion Mode : EI+

RT : 6.28 min Scan# : 38

Elements : C 19/0, H 30/0, O 2/0

Mass Tolerance : 1000ppm, 5mmu if m/z < 5, 50mmu if m/z > 50

Unsaturation (U.S.) : -0.5 -20.0

	Observed m/z	Int%	Err [ppm / mmu]	U.S.	Composition
1	290.2251	21.28	+ 1.7 / + 0.5	5	C19 H30 O2

Slika S46. HRMS spektar jedinjenja 41

[Mass Spectrum]

Data: MS-BFS-6 Date: 28-Oct-2023 15:28

Instrument : MStation

Sample: -

Note: -

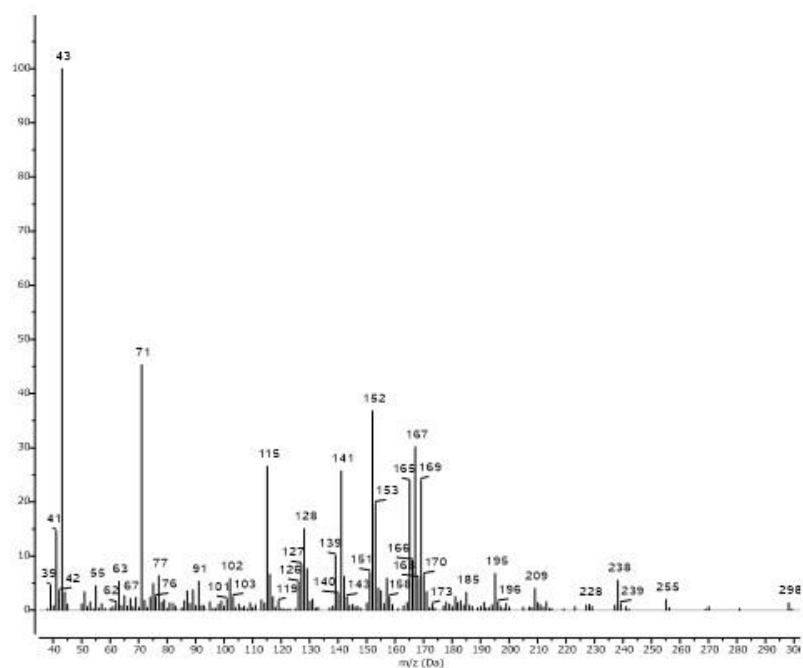
Inlet : Direct Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Normal Ion [MF linear]

RT : 7.76 min Scan# : 49 Temp : -

BP: m/z 43 Int : 75544

Output m/z range : 35 to 305 Cut Level : 0.00%



Data: MS-BFS-6 Date: 28-Oct-2023 17:53

Instrument : MStation

Sample: -

Note: -

Inlet : Direct Ion Mode : EI+

RT : 7.76 min Scan# : 49

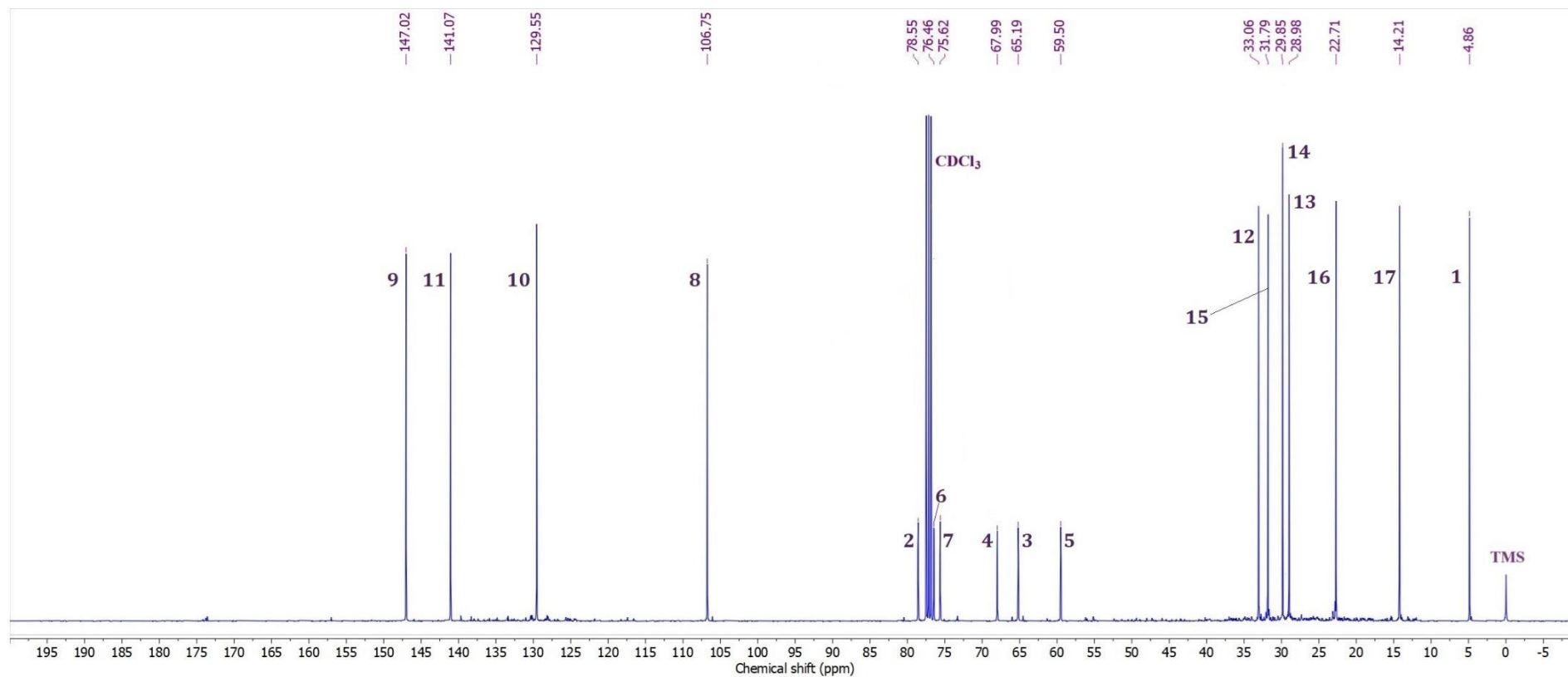
Elements : C 19/0, H 22/0, O 3/0

Mass Tolerance : 1000ppm, 5mmu if m/z < 5, 50mmu if m/z > 50

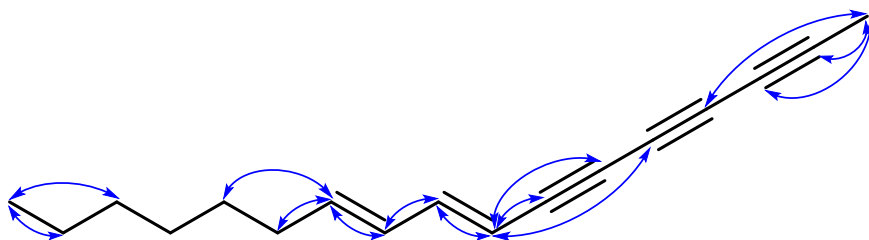
Unsaturation (U.S.) : -0.5 -20.0

	Observed m/z	Int%	Err [ppm / mmu]	U.S.	Composition
1	298.1574	2.1	+ 1.7 / + 0.5	9	C19 H22 O3

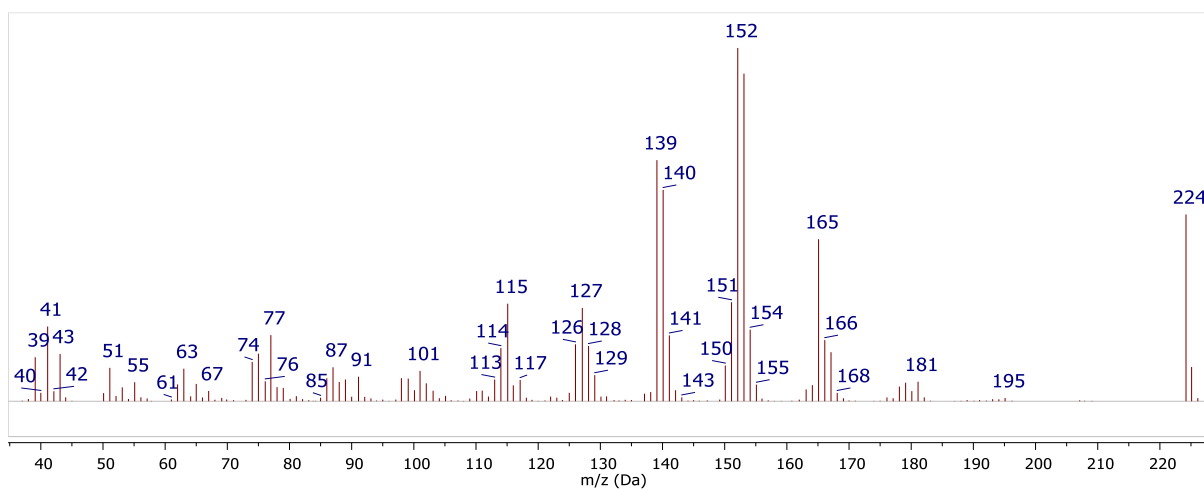
Slika S47. HRMS spektar jedinjenja 45



Slika S49. ^{13}C NMR-spektar (100,6 MHz, CDCl_3) jedinjenja **47** sa asignacijom signala



Slika S50. Ključne HMBC- i NOESY-interakcije za određivanje strukture jedinjenja **47**



Slika S51. MS (EI, 70 eV) jedinjenja **47**

[Mass Spectrum]

Data: MS-BFG-8 Date: 15-Aug-2023 18:37

Instrument : MStation

Sample: -

Note: -

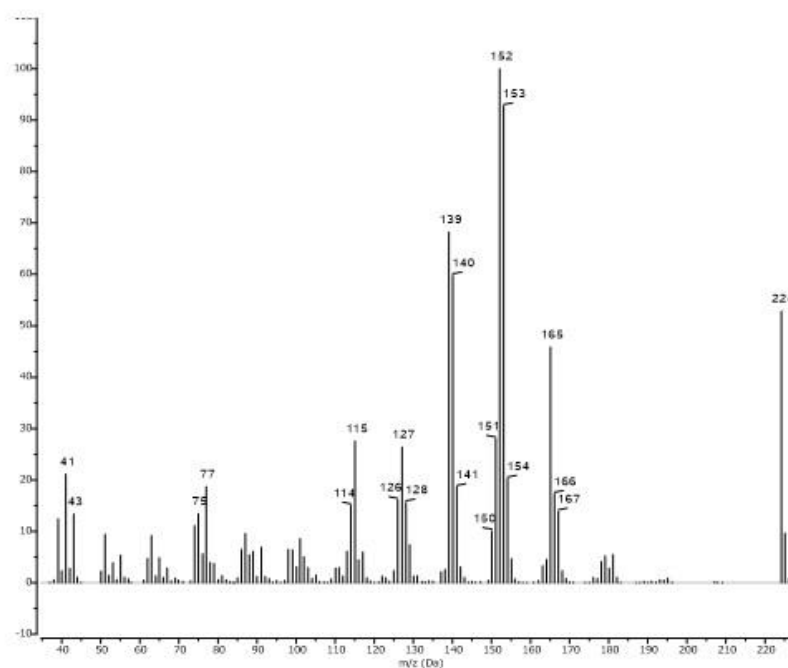
Inlet : Direct Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Normal Ion [MF linear]

RT : 6.01 min Scan# : 36 Temp : -

BP: m/z 152 Int. : 162752

Output m/z range : 35 to 230 Cut Level : 0.00%



Data: MS-BFG-8 Date: 15-Aug-2023 21:09

Instrument : MStation

Sample: -

Note: -

Inlet : Direct Ion Mode : EI+

RT : 6.01 min Scan# : 36

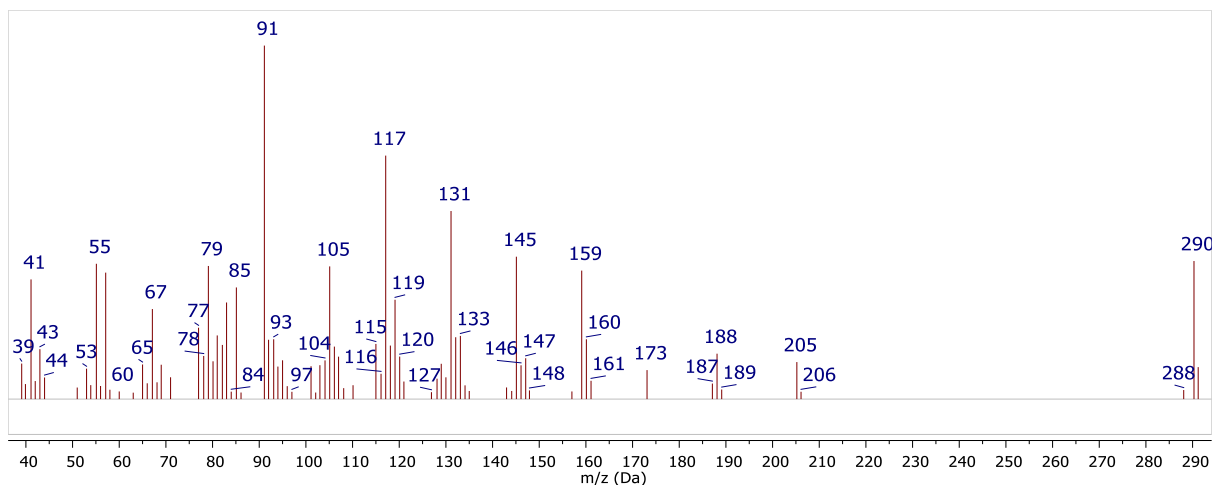
Elements : C 17/0, H 20/0

Mass Tolerance : 1000ppm, 5mmu if m/z < 5, 50mmu if m/z > 50

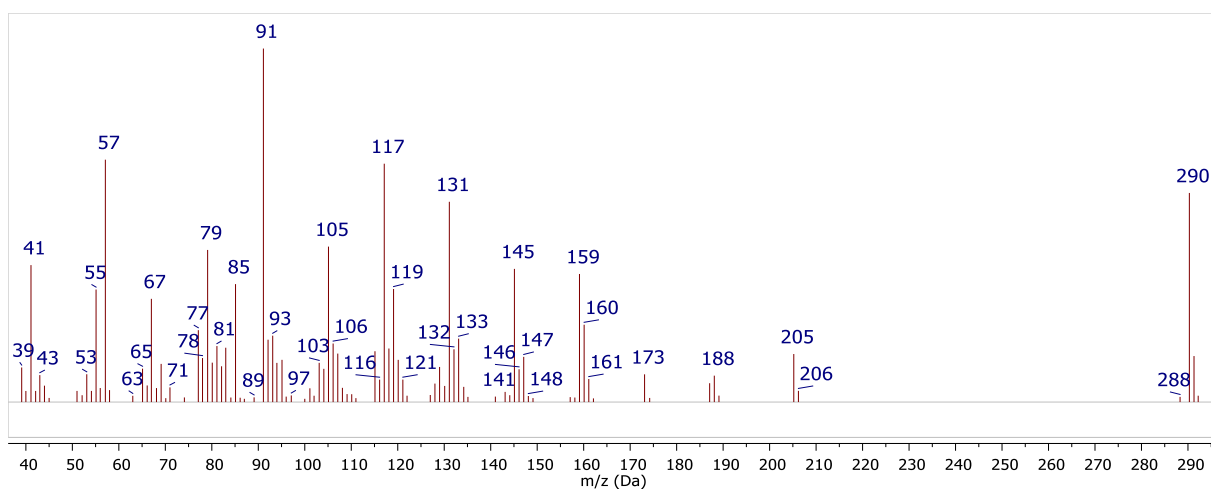
Unsaturation (U.S.) : -0.5 -20.0

	Observed m/z	Int%	Err [ppm / mmu]	U.S.	Composition
1	224.1570	52.90	+ 2.2 / + 0.5	8	C17 H20

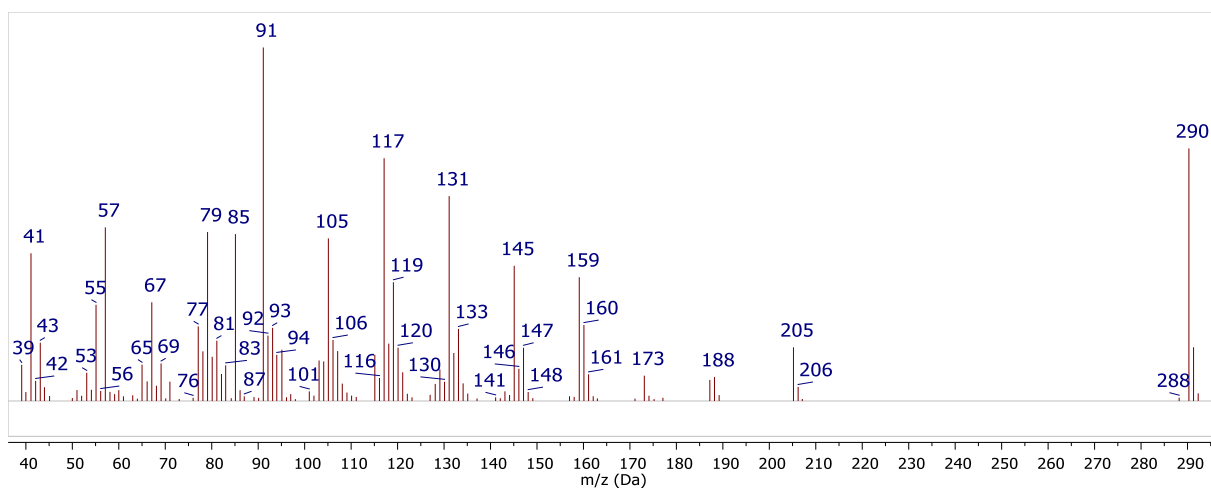
Slika S52. HRMS spektar jedinjenja **47**



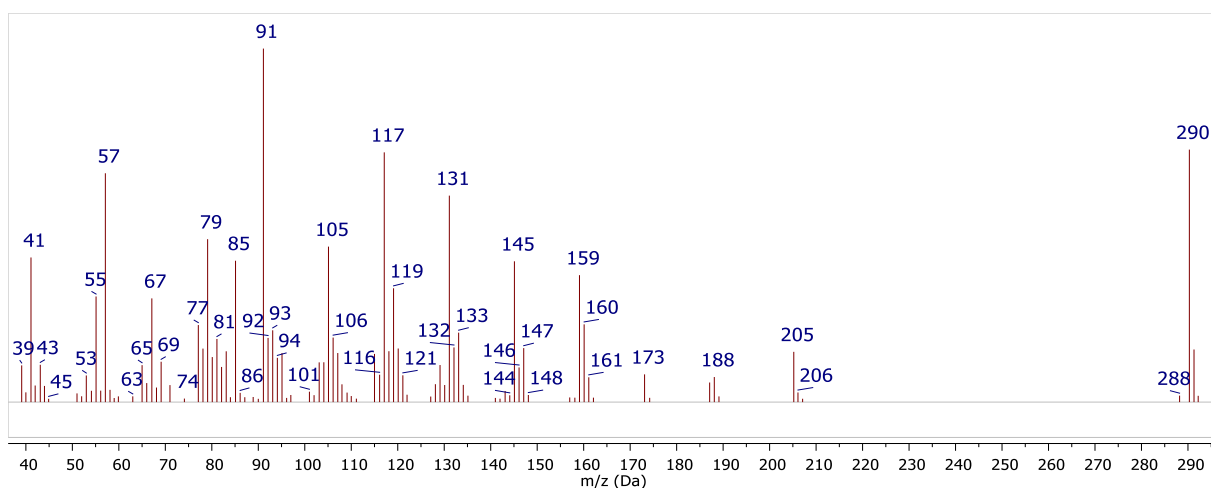
Slika S53. MS (EI, 70 eV) stereoizomera 1 prealtaestra B



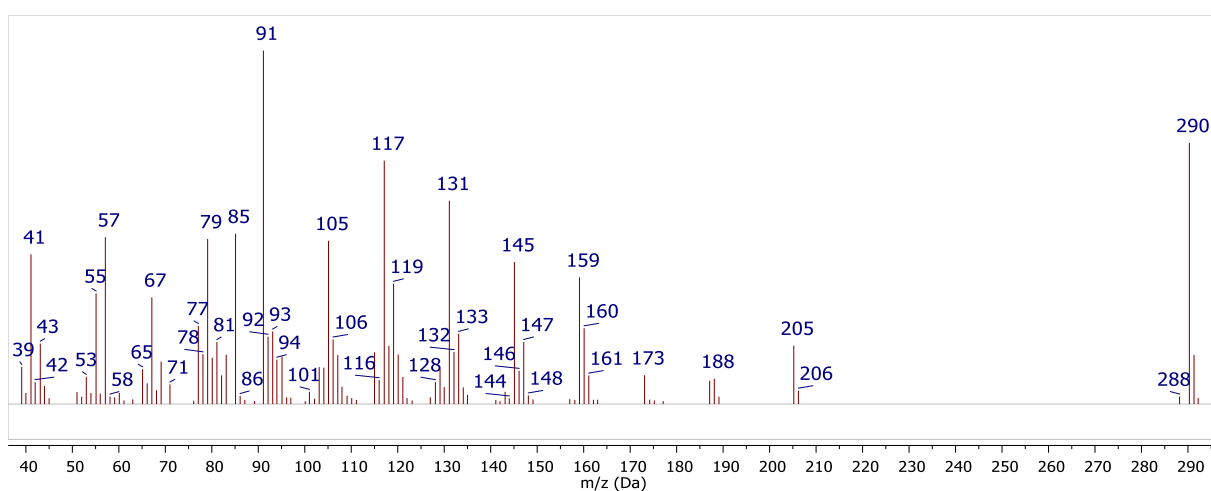
Slika S54. MS (EI, 70 eV) stereoizomera 2 prealtaestra B



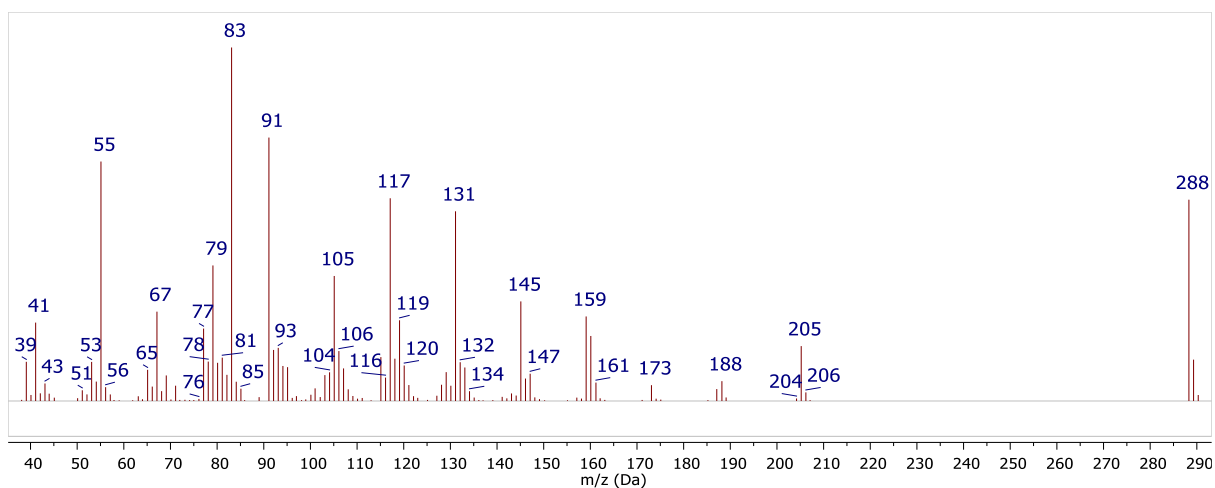
Slika S55. MS (EI, 70 eV) stereoizomera 3 prealtaestra B



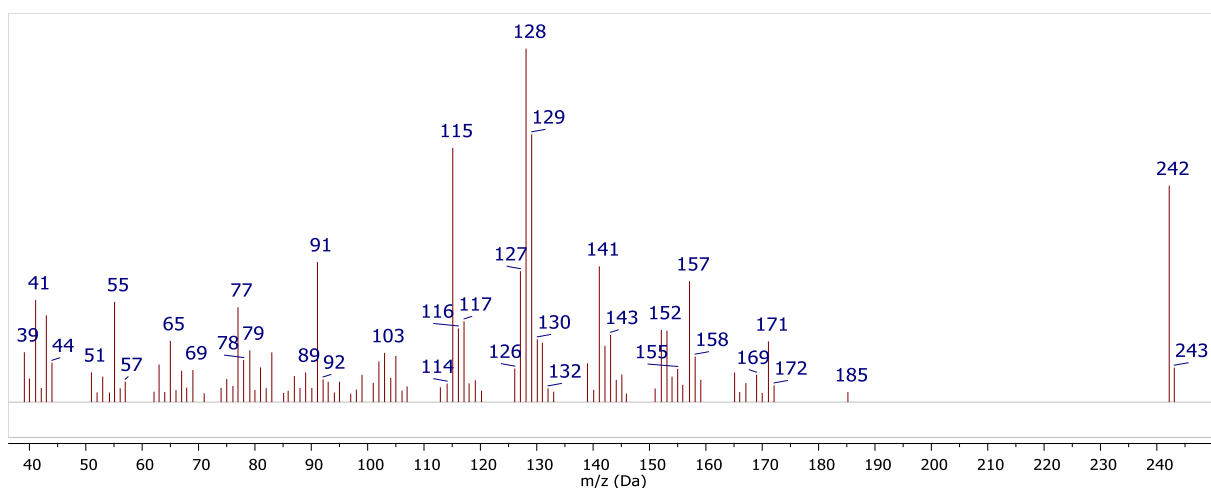
Slika S56. MS (EI, 70 eV) stereoizomera 4 prealtaestra B



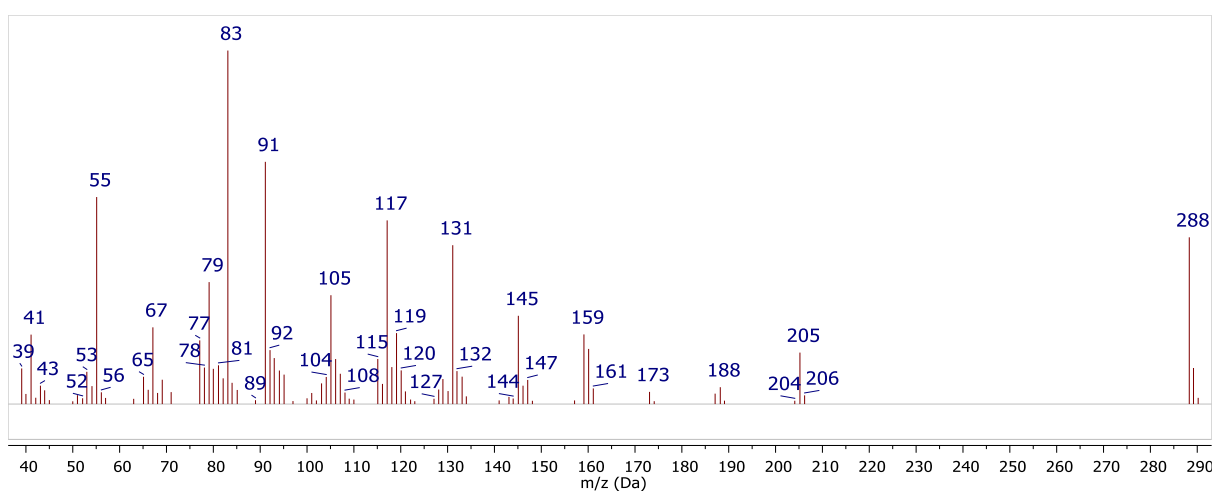
Slika S57. MS (EI, 70 eV) stereoizomera 5 prealtaestra B



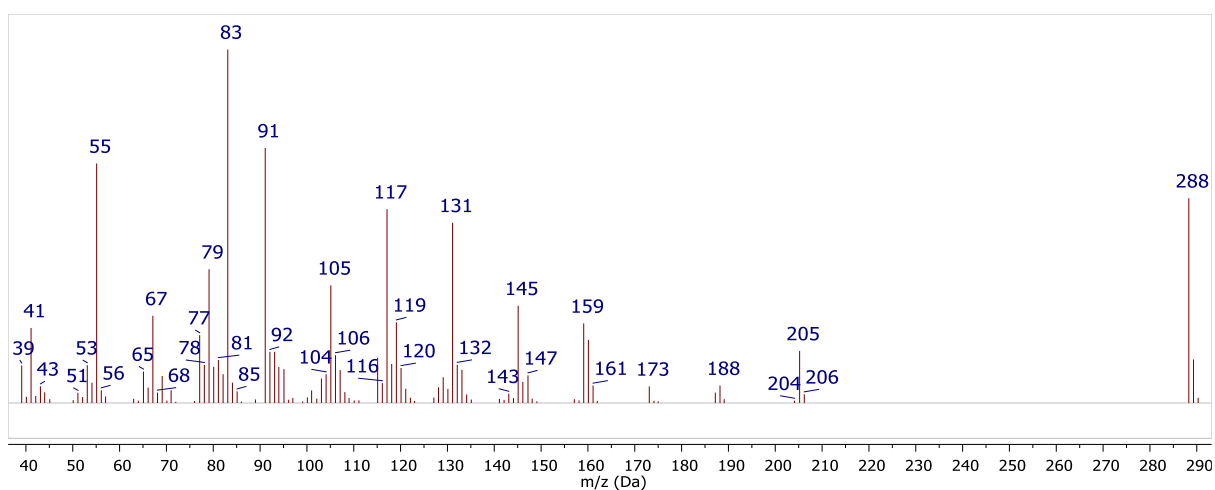
Slika S58. MS (EI, 70 eV) stereoizomera 1 jedinjenja **40**



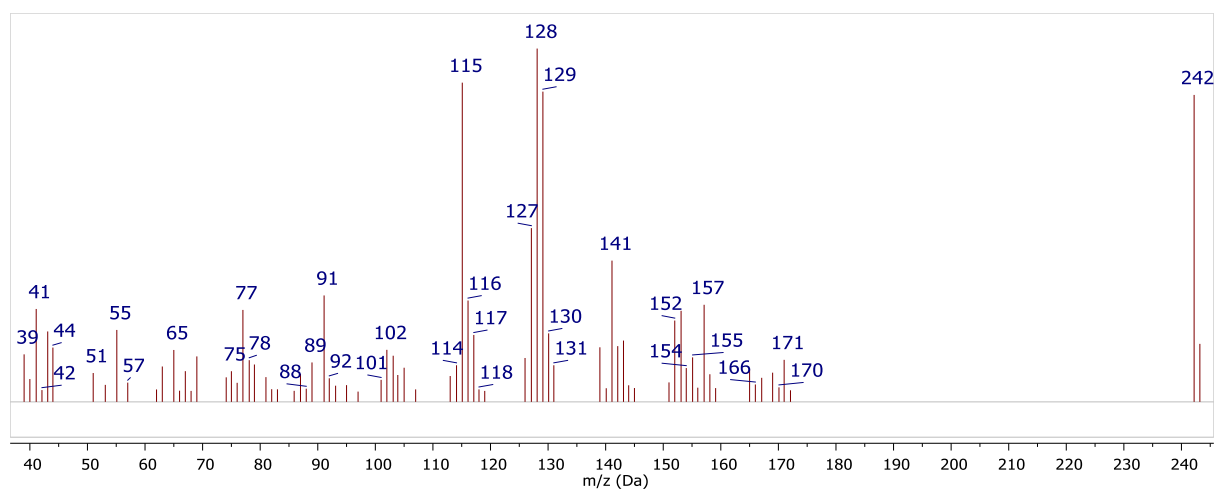
Slika S59. EI (70 eV) MS (EI, 70 eV) stereoisomera 1 jedinjenja **50**



Slika S60. MS (EI, 70 eV) stereoisomera 2 jedinjenja **40**



Slika S61. MS (EI, 70 eV) stereoisomera 3 jedinjenja **40**



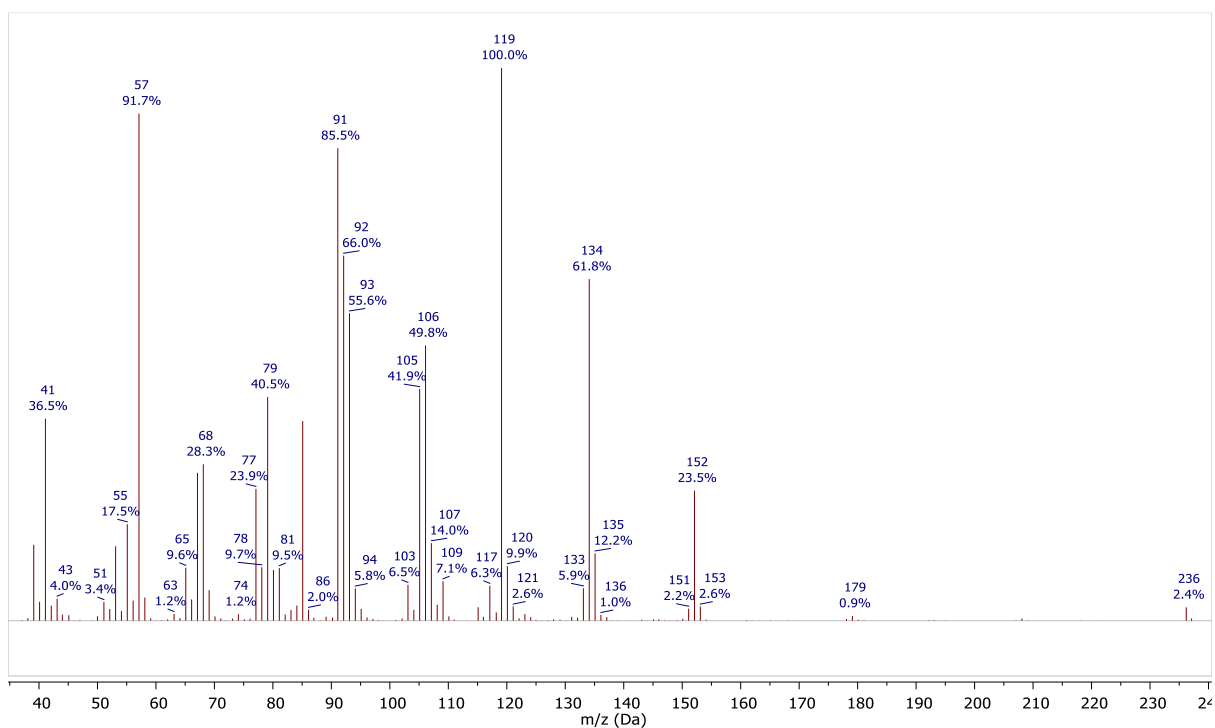
Slika S62. MS (EI, 70 eV) stereoizomera 2 jedinjenja **50**

Tabela S4. ^1H (400 MHz) i ^{13}C (100,6 MHz) NMR-spektralni podaci (CDCl_3) jedinjenja **44** (NMR-podaci su određeni spinskom simulacijom)

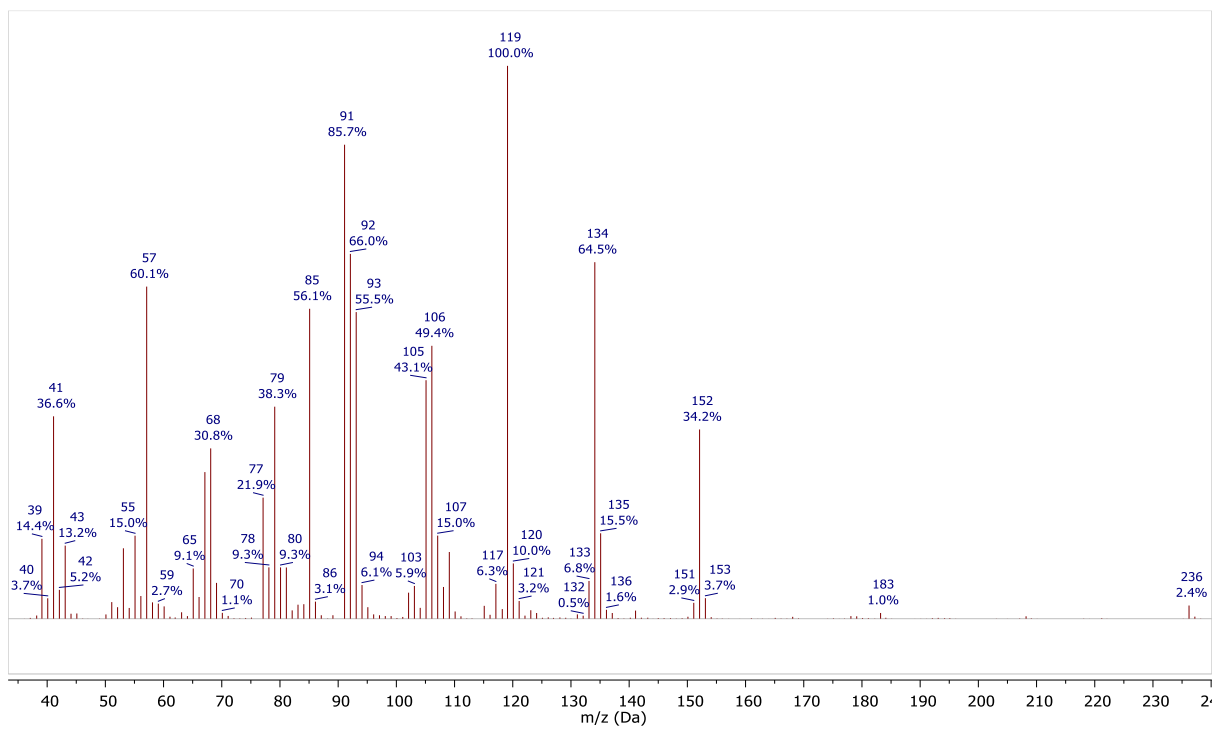
Pozicija	δ_{H} (m, J^1 (Hz), Integral)	δ_{C}
1	/	168,38
2	/	128,90
3	6,8454 (qq, $^3J_{3,4} = 7,1$, $^4J_{3,5} = 1,5$, 1 H)	136,91
4	1,7862 (dq, $^3J_{3,4} = 7,1$, $^5J_{4,5} = 1,2$, 3 H)	14,43
5	1,8314 (dq, $^4J_{3,5} = 1,5$, $^5J_{4,5} = 1,2$, 3 H)	12,15
1'a	4,1138 (dd, $^3J_{1'a,2'b} = ^3J_{1'a,2'a} = 7,0$, 1 H)	64,67
1'b	4,1138 (dd, $^3J_{1'b,2'a} = ^3J_{1'b,2'b} = 7,0$, 1 H)	
2'a	1,6729 (dddd, $^3J_{2'a,3'b} = 9,0$, $^3J_{1'b,2'a} = ^3J_{1'a,2'a} = 7,0$, $^3J_{2'a,3'a} = 5,0$, 1 H)	28,81
2'b	1,6729 (dddd, $^3J_{2'b,3'a} = 9,0$, $^3J_{1'a,2'b} = ^3J_{1'b,2'b} = 7,0$, $^3J_{2'b,3'b} = 5,0$, 1 H)	
3'	1,36 (preklopljeni signali, 2 H)	26,13
4'-7'	1,25-1,40 (preklopljeni signali, 8 H)	28,32- 29,50
8'	2,17 (preklopljeni signali, 2 H)	27,94
9'	5,3927 (dtd, $^3J_{9',10'} = 10,6$, $^3J_{8',9'} = 7,7$, $^4J_{9',11'} = -0,8$, 1 H)	131,99
10'	5,9904 (ddtd, $^3J_{10',11'} = 11,4$, $^3J_{9',10'} = 10,6$, $^4J_{8',10'} = -1,4$, $^4J_{10',12'} = -0,7$, 1 H)	128,80
11'	6,3785 (dddd, $^3J_{11',12'} = 14,8$, $^3J_{10',11'} = 11,4$, $^4J_{9',11'} = -0,8$, $^4J_{11',13'} = -0,7$, 1 H)	126,07
12'	6,1630 (dddd, $^3J_{11',12'} = 14,8$, $^3J_{12',13'} = 10,8$, $^4J_{12',14'} = ^4J_{10',12'} = -0,7$, 1 H)	132,91
13'	6,1050 (ddtd, $^3J_{13',14'} = 15,0$, $^3J_{12',13'} = 10,8$, $^4J_{13',15'} = 1,3$, $^4J_{11',13'} = -0,7$, 1 H)	130,66
14'	5,6992 (dtd, $^3J_{13',14'} = 15,0$, $^3J_{14',15'} = 6,9$, $^4J_{12',14'} = -0,7$, 1 H)	135,29
15'	2,1050 (preklopljeni signali, 2 H)	32,62
16'	1,36 (preklopljeni signali, 2H)	31,58
17'	1,33 (preklopljeni signali, 2H)	22,35
18'	0,8942 (t, $^3J_{17',18'} = 3$ H)	14,06

¹ Konstante kuplovanja su određene u eksperimentima selektivnog homodekuplovanja i potpunom spinskom simulacijom

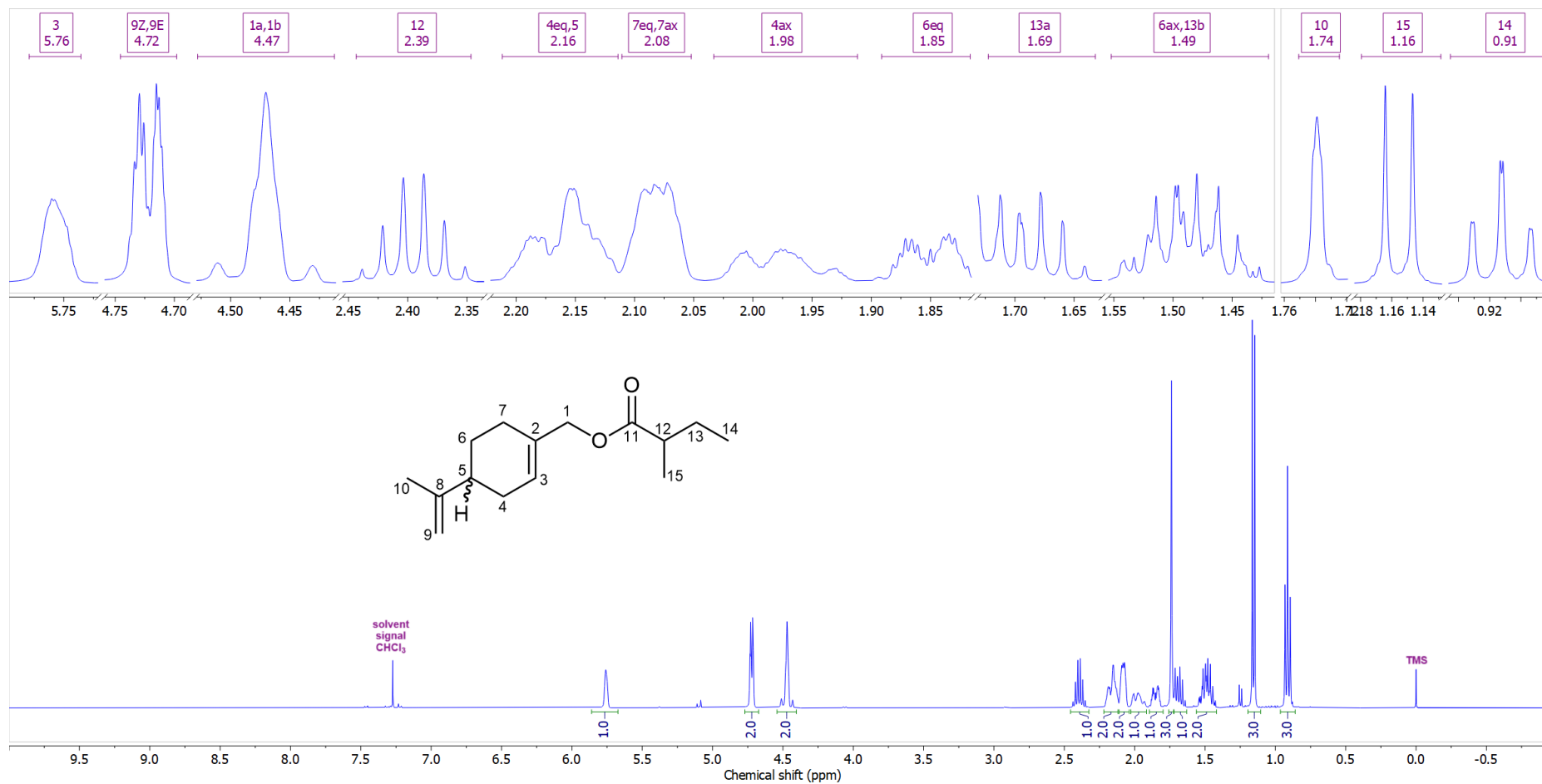
. ² Preklopljeni signali, nisu simulirni.



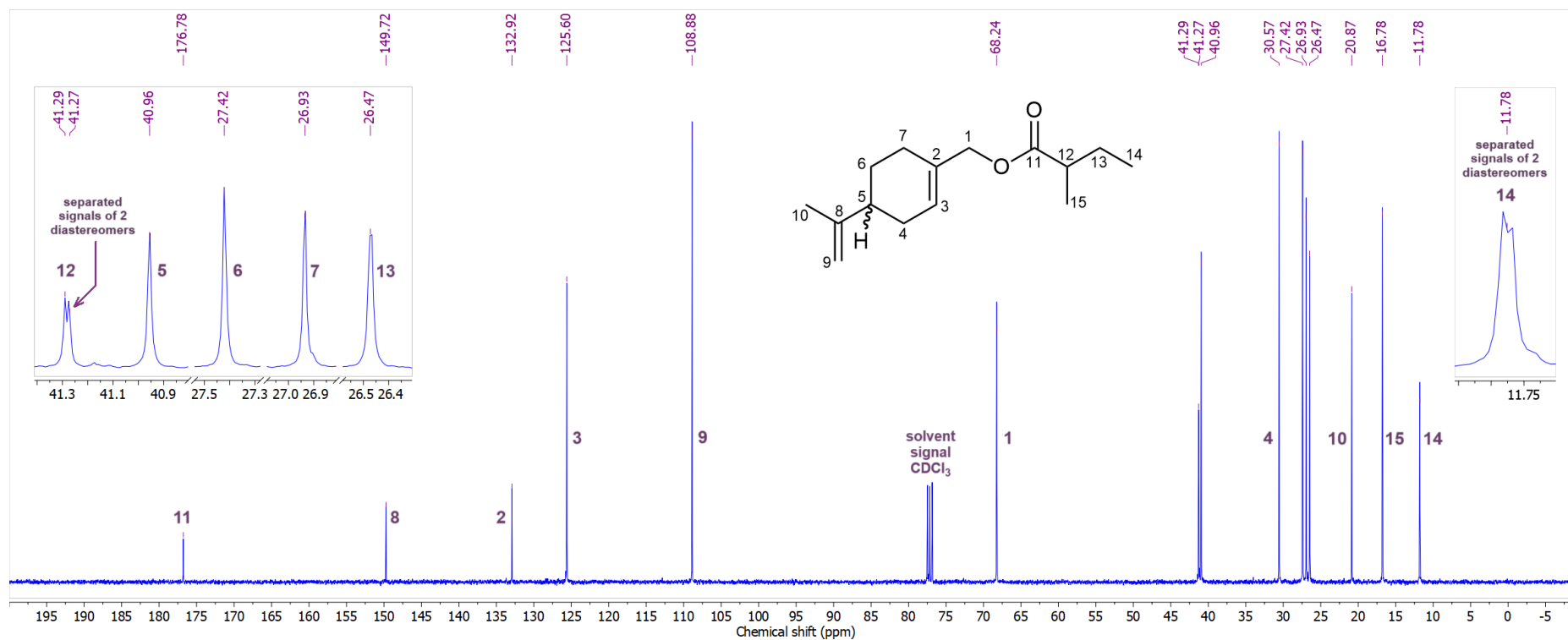
Slika S63. MS (EI, 70 eV) perilil-2-metilbutanoata



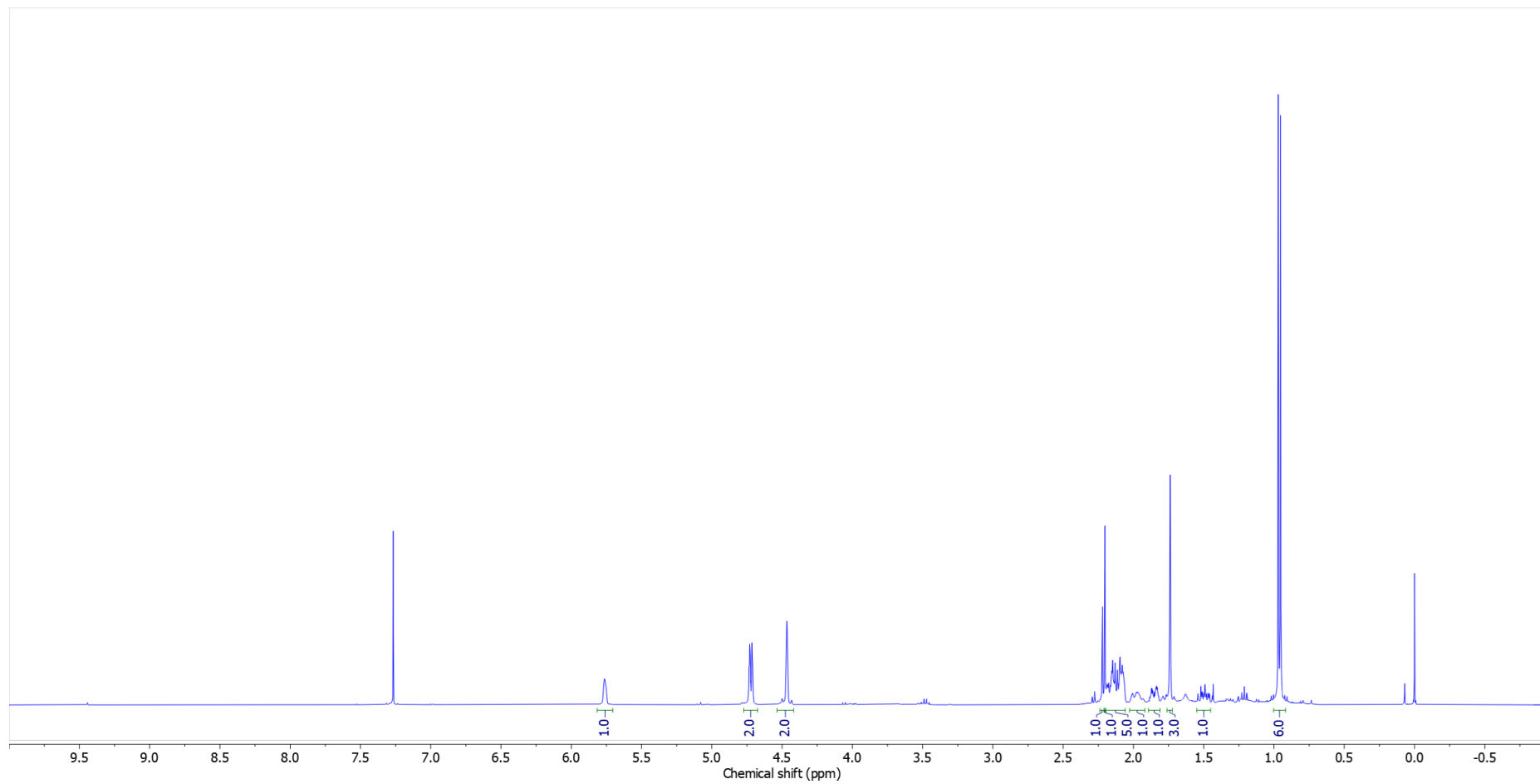
Slika S64. MS (EI, 70 eV) perilil-3-metilbutanoata



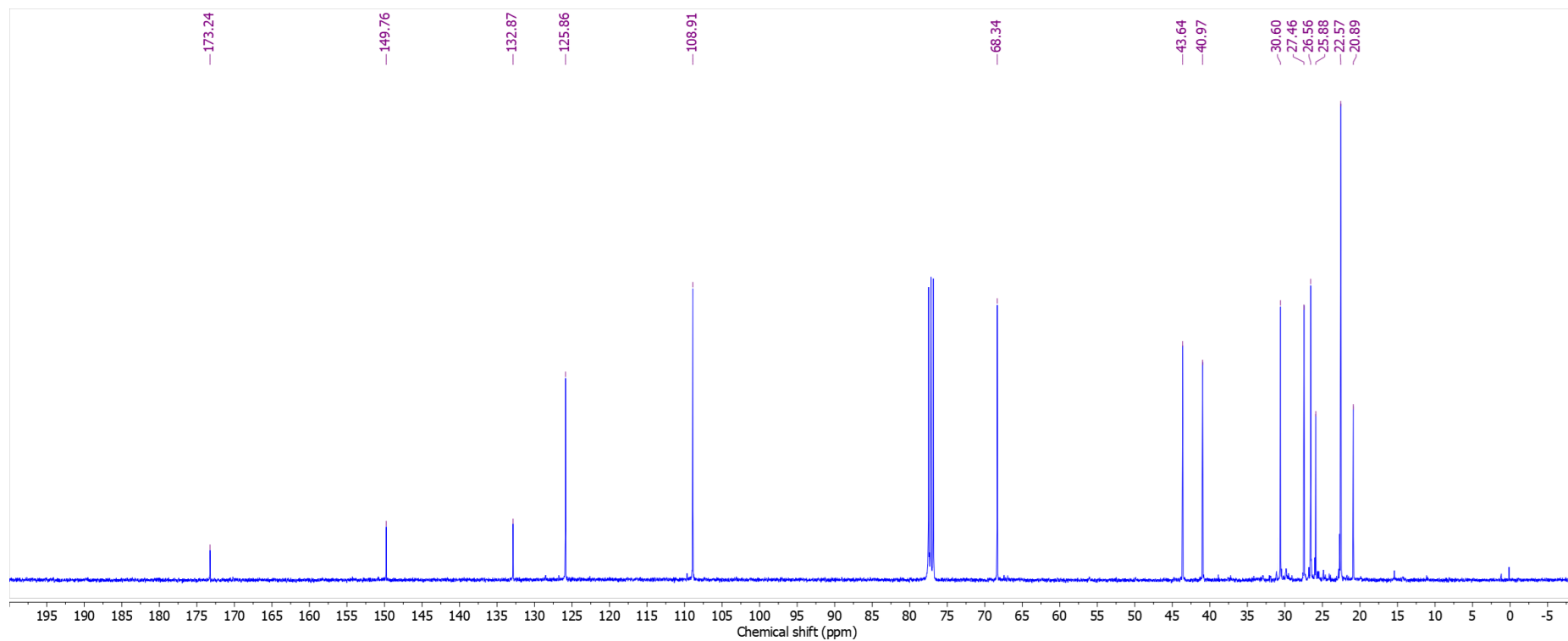
Slika S65. ^1H NMR-spektar (400 MHz, CDCl_3) perill-2-metilbutanoata (smeša diastereomera) i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala



Slika S66. ^{13}C NMR-spektar (100,6 MHz, CDCl_3) perilil-2-metilbutanoata (smeša diastereomera) i odgovarajuća uvećanja sa asignacijom signala



Slika S67. ^1H NMR-spektar (400 MHz, CDCl_3) perilil-3-metilbutanoata



Slika S68. ¹³C NMR-spektar (100,6 MHz, CDCl₃) perilil-3-metilbutanoata

9. Biografija i bibliografija

BIOGRAFIJA – MILICA NEŠIĆ

Milica Nešić (rođ. Stevanović) rođena je u Nišu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Osnovne akademske studije hemije upisala je 2011. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu, koje je završila 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,67. Master akademske studije na istom fakultetu završila je 2016. godine sa prosečnom ocenom 9,85 i ocenom 10 na master radu pod nazivom: „Autooksidacija tetrahidrofurana kao korisna sintetska transformacija”. Doktorske akademske studije upisala je školske 2016/2017. godine i položila sve ispite sa ocenom 10.

Radni odnos na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu zasnovala je 2021. godine kao asistent za naučnu oblast Hemija. Učestvuje u izvođenju vežbi iz Organskih sinteza, Eksperimentalne organske hemije, Odabranih poglavlja organske hemije, i drugih. Takođe, radi kao profesor stručno-teorijskog predmeta (Trasologija) u Prehrambeno-hemijskoj školi u Nišu, na smeru Tehničar za operativnu forenziku. U zimskom semestru školske 2021/2022. bila je angažovana po ugovoru o dopunskom radu na Poljoprivrednom fakultetu u Kruševcu, Univerziteta u Nišu za izvođenje vežbi iz predmeta Opšta i neorganska hemija. Od 2018. do 2021. godine radila je kao istraživač-pripravnik, a zatim i kao istraživač-saradnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom: „Kombinatorne biblioteke heterogenih katalizatora, prirodnih proizvoda, modifikovanih prirodnih proizvoda i njihovih analoga: put ka novim biološki aktivnim agensima“ (OI 172061).

Tokom 2019. godine pohađala je 11. Školu masene spektrometrije pod nazivom Instrumentalne analitičke tehnike u kontroli životne sredine i bezbednosti hrane (Instrumental Analytical Techniques in Environmental and Food Safety Control), koje su organizovali Prirodno-matematički fakultet iz Niša i Univerzitet Pjer i Marija Kiri (Université Pierre et Marie Curie) iz Pariza. Dobitnica je više priznanja, među kojima je Specijalno priznanje Srpskog hemijskog društva za izuzetan uspeh tokom studija, kao i nagrada Fonda „Ana Bjeletić i Ivan Marković” koja se dodeljuje najboljem studentu Departmana za hemiju.

Autor je dva, a koautor još devet naučnih radova objavljenih u međunarodnim časopisima i četiri rada u časopisima nacionalnog značaja.

BIBLIOGRAFIJA – MILICA NEŠIĆ

Radovi u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (M21a):

1. Radulović N., **Stevanović, M.**, Nešić, M., Stojanović, N., Randelović, P., Randelović, V., Constituents of *Bupleurum praealtum* and *Bupleurum veronense* with Potential Immunomodulatory Activity, *J. Nat. Prod.*, **2020**, 83, 2902-2914.
2. Stojanović, N., **Stevanović, M.**, Randjelović, P., Mitić, K., Petrović, V., Sokolović, D., Mladenović, B., Lalić, J., Radulović, N., Low dose of carvacrol prevents rat pancreas tissue damage after L-arginine application, while higher doses cause pancreatic tissue impairment, *Food Chem. Toxicol.*, **2019**, 128, 280-285.

Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21):

1. Nešić, M.S., **Nešić, M.D.**, Zlatković, D., Rodić, M., Lozinsek, M., Radulović, N., One-step introduction of nitrogen-containing functional groups onto aryl methyl ketones: synthesis of α -iminoamidines with tunable biorelevant properties, *J. Org. Chem.*, **2025**. Accepted for publication (10.1021/acs.joc.5c00224).
2. **Nešić, M.D.**, Nešić, M.S., Raca, I.L., Bukleski, M., Radulović, N.S., Unmasking the Aliphatic Repertoire: New Polyunsaturated Metabolites in *Bupleurum falcatum sensu lato* Provide Chemotaxonomic Insights, *Plants*, **2025**, 14, 1432.
3. Dimitrijević, M.Ž., Mladenović, M.Z., **Nešić, M.D.**, Dekić, M.S., Raičević, V.N., Radulović, N.S., New Oxygenated Methoxy-*p*-Cymene Derivatives from Leopard's Bane (*Doronicum columnae* Ten., Asteraceae) Essential Oil: Synthesis Facilitating the Identification of Isomeric Minor Constituents in Complex Matrices, *Molecules*, **2025**, 30, 302.
4. **Nešić, M.D.**, Nešić, M.S., Dimitrijević, M.Ž., Radulović, N.S., Essential Oil Composition of *Bupleurum praealtum* and *Bupleurum affine*: New Natural Constituents, *Plants*, **2024**, 13, 2076.
5. Stojanović N.M., Mitić K.V., **Nešić, M.D.**, Stanković, M., Petrović, V., Baralić, M., Randelović P.J., Sokolović D., Radulović N., Oregano (*Origanum vulgare*) Essential Oil and Its Constituents Prevent Rat Kidney Tissue Injury and Inflammation Induced by a High Dose of L-Arginine, *Int. J. Mol. Sci.*, **2024**, 25, 941.
6. Stojanović N., Mitić K., Randelović P., **Stevanović M.**, Stojilković N., Ilić S., Tričković Vukić D., Sokolović D., Jevtović-Stoimenov T., Radulović N., Thymol

regulates the functions of immune cells in the rat peritoneal cavity after L-arginine-induced pancreatitis, *Life Sci.*, **2021**, 280, 119704.

Radovi u istaknutim međunarodnim časopisima (M22):

1. Dimitrijević, M., Stojanović-Radić, Z., Radulović, N., **Nešić, M.**, Chemical Composition and Antifungal Effect of the Essential Oils of *Thymus vulgaris* L., *Origanum vulgare* L., and *Satureja montana* L. Against Clinical Isolates of *Candida* spp., *Chem. Biodiversity*, **2025**, e202500270.
2. Filipović, G., **Stevanović, M.**, Stojanović-Radić, Z., Obradović, R., Randelović, P., Radulović, N., Choosing the Right Essential Oil for a Mouthwash: Chemical, Antimicrobial and Cytotoxic Studies, *Chem. Biodiversity*, **2020**, 17, e2000748.

Radovi u međunarodnim časopisima (M23):

1. Nešić, M.S., **Nešić, M.D.**, Radulović, N.S., Assignment of NMR spectral data of diastereomeric tetrahydrofuranyl acetals directly from their mixture by spectral simulation, *J. Serb. Chem. Soc.*, **2024**, 89, 1–11.

Radovi u istaknutim nacionalnim časopisima (M52):

1. **Nešić, M.D.**, Raca, I., Radulović, N., Essential-oil composition of plant species of the genus *Bupleurum*, *Facta universitatis - series: Physics, Chemistry and Technology*, 2023, 21, 1-26.
2. Miljković, V., **Nešić, M.**, Gajić, I., Urošević, M., Mrmošanin, J., Miljković, M., Determination of content and antioxidant capacity of natural food colors E160a and E160d in ketchup, *Facta universitatis - series: Physics, Chemistry and Technology*, 2021, 19, 91-98.
3. Miljković, V., **Nešić, M.**, Mrmošanin, J., Gajić, I., Miladinović, B., Stojanović, D., *Rosa canina* L. fruit and jam made of it – natural food colors E160a and E160d content and antioxidant capacity, *Facta universitatis - series: Physics, Chemistry and Technology*, 2022, 20, 79-86.
4. Dimitrijević, M., Stojanović-Radić, Z., Radulović, N., **Nešić, M.**, Pejčić, M., Chemical composition and antifungal effect of the essential oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don against clinical isolates of *Candida* spp., *Biologica nyssana*, 2025, 16, 1-12.

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34):

1. Stojadinović, T., Kanjevac, I., **Nešić, M.S.**, Nešić, M.D., Radulović, N. Surface wax constituents of *Helleborus odorus* Waldst. & Kit. ex Willd.: A source of structurally diverse lipophilic compounds, 15th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Niš (Srbija), Maj, 23-25, 2025, P-152.
2. Kanjevac, I., Stojadinović, T., **Nešić, M.D.**, Nešić, M.S., Radulović, N. Volatile constituents of *Bupleurum affine* Sadler and *Bupleurum prealtum* L., 15th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Niš (Srbija), Maj, 23-25, 2025, P-152.
3. Dimitrijević, M., Mladenović, M., **Nešić, M.D.**, Dekić, M., Raičević, V., Radulović, N. New 2-methoxycuminy l esters from the essential oil of *Doronicum columnae* Ten., 15th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Niš (Srbija), Maj, 23-25, 2025, P-155.
4. Vasić, L.R., **Nešić, M.D.**, Radulović, N. Methyl ketones from the essential oil of *Humulus lupulus* L.: Potential contributors to the aroma and flavor profile of beer, 15th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Niš (Srbija), Maj, 23-25, 2025, P-159.
5. **Nešić M.**, Nešić M., Radulović N., Vladimir Ranđelović, Structure elucidation of new tiglic acid esters from *Bupleurum falcatum* L., 14th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kladovo (Srbija), Jun, 26-29, 2022, P-166.
6. Nešić M., **Nešić M.**, Radulović N., Isolation and identification of secondary metabolites from *Bupleurum affine* Sadler, 14th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kladovo (Srbija), Jun, 26-29, 2022, P-168.
7. Dimitrijević, M., **Nešić, M.**, Radulović, N. Study of the reaction of *p*-cymene with hydrogen peroxide in trifluoroacetic acid and its usage for the identification of *Doronicum columnae* Ten. secondary metabolites, 14th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kladovo (Srbija), Jun, 26-29, 2022, P-169.
8. Dimitrijević, M., **Nešić, M.**, Mladenović, M., Radulović, N., New esters from the essential oil of *Doronicum columnae* Ten., 26th Congress of the Society of Chemists and Technologists of Macedonia (SCTM), Ohrid (N. Macedonia), September 20-23, 2023.

9. Nikola Stojanović, N., Marković, A., Petković, M., **Nešić, M.**, Raičević, V., Stošić, M., Genčić, M., Nikolić, G., Randelović, P., Radulović, N., The role of GABAergic neurotransmission in the anxiolytic action of *Melissa officinalis* essential oil -in silico, in vitro, and in vivo studies, 3rd Regional Congress of Physiological Society, Plitvice (Croatia), September 22-25, 2022.
10. Stojanović, N., Marko, M., **Nešić, M.**, Nikolić, G., Randelović, P., Radulović, N., Involvement of serotonergic neurotransmission in the anxiolytic potential of *Melissa officinalis* essential oil and citronellal, 52nd International Symposium on Essential Oils, Wroclaw (Poland), September 4-7, 2022, P-74.
11. Radulović, N.S., Nešić, **M.D.**, **Nešić, M.S.**, Randelović, V.R., Chemically diverse, highly unsaturated esters and lactones from *Bupleurum veronense* Turra (Apiaceae), 58th Meeting of the Serbian Chemical Society, Beograd (Srbija), June, 9-10, 2022, P-141.
12. Radulović, N., **Stevanović, M.**, Nešić, M., Mosher esters of α -hydroxyesters: Absolute configuration via NMR, 19th Central and Eastern European NMR Symposium & Bruker Users' Meeting CEUM, Timisoara (Romania), September 5-8, 2017, P-27.
13. Nešić, M., **Stevanović, M.**, Fuchs, T., Radulović, N., Essential-oil components of *Bupleurum praealtum* L. Synthesis and spectral characterization of a rare perillyl ester, 48th International symposium on essential oils, Pecs (Hungary), September, 10-13, 2017, P-121.
14. Nešić, M., **Stevanović, M.**, Fuchs, T., Radulović, N., The first report on the chemical composition of the inflorescence essential oil of *Eupatorium cannabinum* L. from Serbia, International symposium on essential oils, Pecs (Hungary), September, 10-13, 2017, P-122.
15. Nešić, M., **Stevanović, M.**, Filipović, S., Radulović, N., What to do with old, autooxidized tetrahydrofuran? Simple, make a perfume out of it, 47th International symposium on essential oils, Nice (France), September, 11-14, 2016, P-78.
16. Radulović, N., Nešić, M., **Stevanović, M.**, NMR spectra assignment of diastereomeric tetrahydrofuranyl acetals directly from mixture of diastereomers using spectral simulation. 18th Central and Easter European Bruker Users' Meeting, Sofia (Bulgaria), September, 18-20, 2016, P-54.
17. Ilić, I., Stojanović, N., Randelović, P., Mitić, K., Sokolović, D., **Stevanović, M.**, Radulović, N., Živković, V., Oregano (*Origanum vulgare*) essential oil prevents L-arginine-induced rat ileum villi damage, 49th International symposium on essential oils

- (Facta Universitatis, Series Physics, Chemistry and Technology Vol. 16, No 1, Special Issue), Niš (Srbija), September, 13-16, 2018, P-90.
18. Sokolović, D., Stojanović, N., Mitić, K., Randelović, P., Popović, D., Karutanović, T., Miljković, N., Lalić, J., **Stevanović, M.**, Radulović, N., Effects of combined thymol and carvacrol application on rat kidney damage parameters after L-arginine application, 49th International symposium on essential oils (Facta Universitatis, Series Physics, Chemistry and Technology Vol. 16, No 1, Special Issue), Niš (Srbija), September, 13-16, 2018, P-91.
 19. **Stevanović, M.**, Nešić, M., Đorđević, M., Radulović, N., The content of α - and β -thujones in essential oils: q-NMR approach, 49th International symposium on essential oils (Facta Universitatis, Series Physics, Chemistry and Technology Vol. 16, No 1, Special Issue), Niš (Srbija), September, 13-16, 2018, P-153.
 20. Stojanović, N., **Stevanović, M.**, Randelović, P., Petrović, V., Sokolović, D., Mitić, K., Mladenović, B., Lalić, J., Radulović, N., Toxicity of carvacrol and its potential in preventing L-arginine-induced pancreatic damage, 49th International symposium on essential oils (Facta Universitatis, Series Physics, Chemistry and Technology Vol. 16, No 1, Special Issue), Niš (Srbija), September, 13-16, 2018, P-160.
 21. **Stevanović, M.**, Radulović, N., A synthetic approach to the identification of (iso)bornyl esters in the essential oil of feverfew (*Tanacetum parthenium* L.), 50th International symposium on essential oils, Vienna (Austria), September, 8-11, 2019, P-53.
 22. Ilic, I., Stojanovic, N., Mitic, K., Randjelovic, P., **Stevanović, M.**, Radivojevic, A., Sokolovic, D., Radulović, N., Thymol, a monoterpenoid phenol, moderately ameliorates high-dose L-arginine-induced rat gastric damage, 50th International symposium on essential oils, Vienna (Austria), September, 8-11, 2019, P-183.
 23. Stojanovic, N., Filipovic, G., **Stevanović, M.**, Randjelovic, P., Stojanovic Radic, Z., Radulovic, N., Three seemingly compositionally identical pine essential oils (*Pinus nigra*, *P. mugo* and *P. sylvestris*) possess differing cytotoxic and antimicrobial potentials, 50th International symposium on essential oils, Vienna (Austria), September, 8-11, 2019, P-184.

Saopštenje sa nacionalnog skupa štampano u celini (M63):

1. Miljković, V., Gajić, I., Mrmošanin, J., **Nešić, M.**, The difference in lycopene and β -carotene content in *Citrus paradisi* fruit and *Rosa canina* dried fruit, 1st International symposium on biotechnology, Čačak (Srbija), 2023, 485-490.

Saopštenja sa domaćih skupova štampana u izvodu (M64):

1. Kanjevac, I.D., Nešić, M.S., **Nešić, M.D.**, Radulović, N.S., Comparison of chemical composition essential oil of three *Pinus* species, 9th Conference of Young Chemists of Serbia, Novi Sad (Srbija), November, 4, 2023, P-138.
2. Stojadinović, T.Z., **Nešić, M.D.**, Nešić, M.S., Radulović, N.S., Chemical composition of essential oils of two *Eucalyptus* species, 9th Conference of Young Chemists of Serbia, Novi Sad (Srbija), November, 4, 2023, P-143.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом:

**СЕКУНДАРНИ МЕТАБОЛИТИ ОДАБРАНИХ ВРСТА РОДА *BUPLEURUM* L.
(ARIACEAE): ИЗОЛОВАЊЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЈА И БИОЛОШКА АКТИВНОСТ**

која је одбрањена на факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 11.7.2025.

Потпис аутора дисертације:



Милица Д. Нешић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**СЕКУНДАРНИ МЕТАБОЛИТИ ОДАБРАНИХ ВРСТА РОДА *BUPLEURUM* L.
(ARIACEAE): ИЗОЛОВАЊЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЈА И БИОЛОШКА АКТИВНОСТ**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 11.7.2025.

Потпис аутора дисертације:


Милица Д. Нешић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

СЕКУНДАРНИ МЕТАБОЛИТИ ОДАБРАНИХ ВРСТА РОДА *BUPLEURUM* L. (ARIACEAE): ИЗОЛОВАЊЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЈА И БИОЛОШКА АКТИВНОСТ

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

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

У Нишу, 11.7.2025.

Потпис аутора дисертације:



Милица Д. Нешић

¹ Аутор дисертације обавезан је да изабере и означи (заокружи) само једну од шест понуђених лиценци; опис лиценци дат је у наставку текста.