

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET

Dijana Krstić-Milošević

HEMIJSKO ISPITIVANJE FARMAKOLOŠKI AKTIVNIH
SEKUNDARNIH METABOLITA NEKIH VRSTA RODA
GENTIANA

- Doktorska disertacija –

Beograd, 2008.

Ova disertacija je urađena u laboratorijama Centra za instrumentalnu analizu Hemijskog fakulteta i Centra za hemiju IHTM-a u Beogradu, u saradnji sa Institutom za biološka istraživanja "Siniša Stanković" i Institutom za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić".

Zhvaljujem se svom mentoru dr Slobodanu Milosavljeviću na velikoj pomoći, strpljenju i razumevanju tokom svih ovih godina. Veliku zahvalnost dugujem dr Ivani Aljančić koja je uvek imala vremena i uvek bila spremna da mi pomogne u eksperimentalnom radu i analizi rezultata. Dr Vlatki Vajs hvala za idealne laboratorijske uslove, za korisne savete, optimizam i podršku koju mi je pružala.

Posebno se zahvaljujem dr Nebojši Menkoviću i dr Katarini Šavikin uz koje sam napravila prve korake u fitohemijskim istraživanjima, koji su predložili temu ove disertacije i koji su mi pokazali lepotu terenskih istraživanja.

Veliko hvala dr Mihajlu Spasiću za sve što je učinio za mene proteklih godina, za svaku korisnu sugestiju i podršku, kad god mi je bila potrebna.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj najboljoj prijateljici dr Teodori Janković za neizmernu i nesebičnu pomoć u dobrim i lošim vremenima, za kolegijalnost koja nema granica, za moralnu podršku. Bez njene pomoći ovaj rad nikad ne bih privela kraju.

Ovom prilikom želim da se zahvalim i svim divnim ljudima sa Hemijskog fakulteta i IHTM-a koji su bili uz mene i čija je dragocena pomoć nemerljiva: dr Veletu Teševiću, dr Iris Đorđević, dr Snežani Trifunović, mr Ljubodragu Vujisiću, mr Dejanu Gođevcu, Miroslavu Novakoviću, Marini Todosijević i Dejanu Vučetiću. Posebno hvala mr Ivanu Vučkoviću koji je uvek imao strpljenja za moja smisljena i besmislena pitanja iz NMR spektroskopije.

Biološke efekte na modelu pasuljevog žiška ispitivali su dr Dragana Milanović i dr Duško Blagojević, dok su antimikrobne aktivnosti određivale dr Marina Soković i mr Ana Ćirić. Svima njima se najtoplije zahvaljujem.

Mojim roditeljima i sestri neizmerno hvala za bezgraničnu pomoć, podršku i razumevanje koje me je pratilo godinama unazad. I na kraju, posebnu zahvalnost dugujem svom bratu Miloradu Stojanovskom na njegovom potpunom angažovanju u tehničkoj pomoći pri pisanju ovog rada i vremenu koje mi je posvetio.

SADRŽAJ

UVOD	1
1.1. Klasifikacija roda <i>Gentiana</i>	3
1.1.1. Rod <i>Gentiana</i> L.	4
1.2. Hemijski sastav biljnih vrsta roda <i>Gentiana</i>	16
1.2.1. Ksantoni	16
Ksantonski- <i>O</i> -glikozidi	19
Ksantonski- <i>C</i> -glikozidi.....	22
1.2.1.1. Biosinteza ksantona.....	25
1.2.1.2. Biološka svojstva ksantona	29
1.2.2. Iridoidi.....	33
1.2.2.1. Biosinteza iridoida	37
1.2.2.2. Biološke aktivnosti iridoida.....	39
1.2.3. Flavonoidi	41
1.2.3.1. Biosinteza flavonoida	44
1.2.3.2. Biološka svojstva flavonoida	46
1.3. Reaktivne kiseonične vrste i sistem zaštite od oksidacionih oštećenja	49
1.4. Hemotaksonomija.....	52
NAŠI RADOVI.....	55
2.1. CILJ RADA.....	57
2.2. Analiza hemijskog sastava vrste <i>Gentiana dinarica</i>	58
2.2.1. Hemijska analiza nadzemnog dela.....	59
2.2.1.1. GENCIOPIKRIN (1)	61
2.2.1.2. SVERCIAMARIN (2).....	63
2.2.1.3. IZOORIJENTIN-4'- <i>O</i> -GLUKOZID (3).....	67
2.2.2. Hemijska analiza korena.....	72
2.2.2.1. AMAROGENCIN (4)	73
2.2.2.2. NORSVERCIANIN-1- <i>O</i> -PRIMVEROZID (5)	76
2.2.2.3. IZOORIJENTIN (6).....	81
2.2.2.4. NORSVERCIANIN-8- <i>O</i> -PRIMVEROZID (7)	85
2.2.2.5. NORSVERCIANIN-1- <i>O</i> -GLUKOZID (8)	89
2.2.2.6. GENCIOZID (9).....	94
2.3. Analiza hemijskog sastava vrste <i>G. kochiana</i>	98
2.3.1. Hemijska analiza nadzemnog dela.....	98
2.3.1.1. GENCIAKOHIANIN (10)	101
2.3.1.2. GENCIAKAULEIN (11)	105
2.3.1.3. GENCIAKAULEIN-1- <i>O</i> -PRIMVEROZID (12)	108
2.3.1.4. GENCIAKAULEIN-1- <i>O</i> -GLUKOZID (13)	112
2.4. Analiza hemijskog sastava vrste <i>G. utriculosa</i>	116
2.4.1. Hemijska analiza nadzemnog dela.....	116
2.4.1.1. DEKUZATIN-1- <i>O</i> -PRIMVEROZID (14).....	118
2.4.1.2. LANCERIN (15)	122
2.4.1.3. IZOVITEKSIN (16).....	126
2.4.1.3. IZOVITEKSIN (16).....	126
2.4.1.4. 1,8-DIHIDROKSI-3-METOKSI-7- <i>O</i> -PRIMVEROZID (17).....	130
2.4.1.6. IZOORIJENTIN-3'- <i>O</i> -GLUKOZID (19)	138
2.5. Usporedni prikaz hemijskog sastava vrsta roda <i>Gentiana</i>	142

2.5.1. Hemijski sastav vrste <i>G. dinarica</i>	142
2.5.2. Hemijski sastav vrste <i>G. kochiana</i>	143
2.5.4. Hemijski sastav vrste <i>G. lutea</i>	146
2.5.5. Hemijski sastav vrste <i>G. asclepiadea</i>	148
2.5.6. Hemijski sastav vrste <i>G. pneumonanthe</i>	149
2.5.7. Hemijski sastav vrste <i>G. verna</i>	150
2.5.8. Hemijski sastav vrste <i>G. tergestina</i>	152
2.6. Hemotaksonomski značaj izolovanih jedinjenja	154
2.7. Biološki efekti izolovanih jedinjenja	157
2.7.2. Ispitivanje antiradikalske aktivnosti na modelu pasuljevog žiška ...	161
2.7.3. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti.....	166
2.7.3.1. Detekcija antimikrobne aktivnosti bioautografskom TLC metodom	166
2.7.3.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti mikrodilucionom metodom	168
EKSPERIMENTALNI DEO	169
3.1. Rastvarači i aparati.....	171
3.2. Analiza hemijskog sastava vrste <i>Gentiana dinarica</i>	172
3.2.1. <i>G. dinarica</i> , analiza nadzemnog dela	172
3.2.1.1. Butanolni ekstrakt	172
3.2.1.1.1. Izolovanje sekoiridoida.....	173
3.2.2. <i>G. dinarica</i> , analiza korena	175
3.3. Ispitivanje hemijskog sastava vrste <i>Gentiana kochiana</i>	177
3.3.1. Etarski ekstrakt.....	177
3.3.2. Butanolni ekstrakt	178
3.4. Ispitivanje hemijskog sastava vrste <i>Gentiana utriculosa</i>	179
3.4.1. Butanolni ekstrakt	180
3.5. Biološki efekti izolovanih jedinjenja	184
3.5.1. Ispitivanje antiradikalske aktivnosti.....	184
3.5.2. Ispitivanje antiradikalske aktivnosti na modelu pasuljevog žiška ...	184
3.5.2.1. Žrtvovanje životinja i priprema uzoraka	184
3.5.2.2. Određivanje aktivnost endogenih antioksidativnih enzima	185
3.5.2.3. Statistička obrada rezultata	185
3.5.3. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti.....	185
3.5.3.1. Bioautografska TLC metoda za detekciju antimikrobne aktivnosti	185
3.5.3.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti mikrodilucionom metodom	186
3.5.3.3. Mikrodiluciona metoda	186
3.5.3.4. Hranljive podloge	187
IZVOD	189
ABSTRACT	193
LITERATURA.....	197

UVOD

1.1. Klasifikacija roda *Gentiana*

Familiji Gentianaceae pripadaju jednogodišnje ili višegodišnje većinom zeljaste biljke¹. Mogu se naći na svim kontinentima osim na Antartiku². Preko 1600 vrsta ove familije je klasifikovano u 87 rodova. Rod *Gentiana* L. je najveći i obuhvata preko 400 biljnih vrsta³. Pripada redu *Gentianales*, nadredu *Gentiananae*, podklasi *Asteridae*, klasi *Magnoliopsida*.⁴

Po nekim geološkim podacima vrste roda *Gentiana* su postojale još u tercijarnom dobu i pretpostavlja se da je Azijski kontinent, najverovatnije, njihova postojbina⁵. Uprkos širokoj rasprostranjenosti, biljke ovog roda nemaju veliku sposobnost migracije. Skoro 92% azijskih vrsta raste samo na tom kontinentu. *G. algida* je izuzetak koji je migrirao u Severnu Ameriku. Jedine vrste koje su migrirale u više zona su *G. acaulis* i *G. verna*. Kasnije su pronađene ne samo na Alpima, nego i u Siberiji, na Kavkazu, pa čak i u Severnoj Americi.

Glavna zona rasprostranjenosti vrsta roda *Gentiana* su planine severne temperaturne zone i Andi u Severnoj Americi. Najviše ih raste u Aziji (312 vrsta), manje ih ima u Evropi (29) i Severnoj i Centralnoj Americi (35), a retke su u Južnoj Americi (3), Africi (2 vrste, i to samo u Maroku) i jedna u istočnoj Australiji^{6, 7}. Može se reći da postoje dve centralne oblasti u kojima se javljaju vrste roda *Gentiana*: prva su planine jugo-zapadne Kine i susedne severo-istočne Burme, gde raste 190 vrsta od kojih su 98 endemske vrste. Druga oblast su Alpi i Pirineji sa 29 vrsta uključujući i 17 endemskih. Većina vrsta raste na visinama većim od 1000m nm. Koliko su dobri "alpinisti" pokazuje činjenica da su neke vrste pronađene na Mont Everestu na visini od 5500 metara. *G. urnula* je ekstremna vrsta koja raste na Himalajima na visinama od 4000-6000m nm. U nižim predelima mogu se naći samo neke vrste, dok ih na Arktiku ima jako malo.

Vrste roda *Gentiana* su po svojoj lekovitosti poznate još iz doba antike. Ilirski kralj Gencije, iz II veka pre naše ere, preporučivao je vrstu *G. lutea* kao lek protiv kuge. Prema legendi, Hermes je pokazao kralju biljku čiji su koren i list bili lekoviti. U čast kralju Genciju, biljka, a potom i ceo rod su dobili ime *Gentiana*.

Vrstama roda *Gentiana* pripadaju uglavnom višegodišnje, ređe jednogodišnje ili dvogodišnje biljke. Neke imaju uspravno, a neke poleglo stablo sa obično naspramnim listovima. Cvetovi su aktinomorfni, krupni i intenzivno obojeni. Većina vrsta ovog roda ima plave cvetove, ali se mogu naći i beli, žuti, crveni, pa čak i zeleni.

1.1.1. Rod *Gentiana* L.

Prema Flori Evrope⁸, vrste roda *Gentiana* su klasifikovane u sledeće sekcije:

Sekcija **GENTIANA**

G. lutea L.

- a) subsp. *lutea*
- b) subsp. *symphyandra*

G. punctata L.

G. panonica Scop.

G. purpurea L.

G. burseri Lapeyr.

- a) subsp. *burseri*
- b) subsp. *villarsii*

Sekcija **PNEUMONANTHE** (Gled.) Link.

G. asclepiadea L.

G. pneumonanthe L.

Sekcija **FRIGIDA** Kusn.

G. frigida Haenke in Jacq.

G. froelichii Jan ex Reichenb.

Sekcija **CRUCIATA** Gaudin.

G. cruciata L.

- a) subsp. *cruciata*
- b) subsp. *phlogifolia*

G. decumbens L.

Sekcija **CHONDROPHYLLAE** Bunge.

G. postrata Haenke in Jacq.

G. pyrenaica L.

G. boryi Boiss.

G. septemfida Pallas.

Sekcija **MEGALANTHE** Gaudin.

G. acaulis Perennials.

G. clusii Perr. & Song

G. occidentalis Jakowatz.

G. ligustica R. de Vilmorin & Chopinet

G. acaulis L.

G. alpina Vill.

G. dinarica G. Beck

G. angustifolia Vill.

Sekcija **CALATHIANAE** Froelich.

G. verna L.

a) subsp. *verna*

b) subsp. *pontica*

c) subsp. *tergestina*

G. bachyphylla Vill.

a) subsp. *bachyphylla*

b) subsp. *favratii*

G. pumila Jacq.

a) subsp. *pumila*

b) subsp. *delphinensis*

G. bavarica L.

G. rostanii Reuter ex Verlot

G. terglouensis Hacq.

a) subsp. *terglouensis*

b) subsp. *schleicheri*

G. nivalis L.

G. utriculosa L.

U Srbiji raste 11 vrsta ovog roda¹: *G. lutea*, *G. punctata*, *G. cruciata*, *G. asclepiadea*, *G. pneumonanthe*, *G. kochiana*, *G. dinarica*, *G. verna*, *G. tergestina*, *G. utriculosa* i *G. nivalis*.

***G. lutea* L.**, u narodu poznata kao lincura



Slika 1: *G. lutea* L.

Višegodišnja, glatka biljka sa vrlo kratkim debelim rizomom. Stablo jednostavno, 45-140 cm visoko, uspravno. Cvetovi veliki, žuti, na dugim peteljka, u mnogocvetnim zbijenim cvastima, postavljenim bočno na glavnoj osovini. Krunica koturasto raširena. Cveta od juna do avgusta. Raste na pašnjacima, na planinskim prevojima, na stenovitim padinama, u šikarama. Rasprostranjena u centralnoj i južnoj Evropi, Maloj Aziji. Pripada južno srednjoevropko-alpijskom flornom elementu.

***G. kochiana* Perr. et Song.** (sinonimi *G. acaulis* L., *G. acaulis* var. *latifolia* Gr. Et Godr.), u narodu poznata kao velemun.



Slika 2: *G. kochiana* Perr. et Song.

Višegodišnja, glatka biljka, sa kosim rizomom, ljutog ukusa. Stablo kratko, pri osnovi sa rozetom prizemnih listova. Listovi na stablu malobrojni, samo 1-2 para, eliptični, zašiljeni. Cvetovi petomerni, krunica velika, levkasto-zvonasta, tamno plave boje sa maslinastozelenim pegama sa unutrašnje strane. Cveta od aprila do avgusta. Raste na pašnjacima i suvim utrinama, na siparima u četinarskim šumama, od 1700-3000 m. Češća na glinovitim zemljištima, siromašnim u kreču. Rasprostranjena na Pirinejskom i Balkanskom poluostrvu, Alpi, Karpati, Bosna, južna Srbija, Bugarska. Pripada južnoevropsko-alpijskom flornom elementu. U Srbiji: Kopaonik, Rtanj, na Kosovu - Starac, Đaravica, Mokra gora, Kurvala, Ločanska dolina.

***G. dinarica* Beck** (sinonim *G. acaulis* L. var. *dinarica* Beck), narodni naziv volemun



Slika 3: *G. dinarica* Beck

Višegodišnja biljka sa kratkim jednocvetnim stablom. Prizemni listovi sakupljeni u rozetu. Cvetovi na vrhu stabla, usamljeni. Krunica levkasto zvonasta, 5-7 cm duga, tamno plava. Cveti od aprila do avgusta. Raste na siromašnim suvim pašnjacima u subalpijskom i alpijskom regionu, samo na krečnjačkoj podlozi. Rasprostranjena na Dinarskim Alpima, južnim Karpatima, Bosni i Hercegovini i Albaniji. U Srbiji do sada kostatovana samo na Kosovu - Lumbardska planina, Greben.

***G. utriculosa* L.** , narodni naziv vid, jutarnjica



Slika 4: *G. utriculosa* L.

Jednogodišnja zeljasta biljka, stablo uspravno, razgranato od osnove ili u gornjem delu, jednocvetno ili višecvetno. Prizemni listovi sakupljeni u rozetu. Cvetovi na kratkim peteljčkama postavljeni na vrhu stabla ili bočno. Krunica drškoliko-tanjirasta, tamno plave boje, spolja često zelenkasta. Cveti od maja do avgusta. Raste na vlažnim livadama, naročito u planinskom i subalpijskom regionu. Češća na krečnjačkom zemljištu. Rasprostranjena u srednjoj i južnoj Evropi, Erdelj. Pripada apeninsko-balkanskom flornom elementu. U užoj Srbiji raste na Kopaoniku, Staroj planini, Suvoj planini, Zlatiboru, Maljenu, Divčibare, Povlen, Jablanik, Golija, Tara, Čajniče, Valjevo, Užice. Na Kosovu- Đaravica, Bogičevica, Nedžinat.

***G. cruciata* L.**, u narodu poznata kao prostrel, sirištara



Slika 5: *G. cruciata* L.

Višegodišnja glatka biljka. Stablo visoko do 60 cm pri osnovi sa rozetom prizemnih listova. Iz pazuha listova svake godina izbija veći broj poluspravnih stabala gusto pokrivenih listovima. Cvetovi po pravilu 4-merni, ređe 5-merni, skupljeni u pзуhu listova ili na vrhu stabla u obliku ćube. Krunica tučkasto-zvonasta, plave boje, spolja zelenkasta. Cveta od jula do oktobra. Nastanjuje suve livade i pašnjake, sunčane padine, ivice šuma. Češća na krečnjačkoj podlozi. Rasprostranjena u centralnoj i južnoj Evropi, Maloj Aziji, Kavkazu, zapadnom Sibiru i Turkestanu. Pripada evroazijskom-kontinentalnom-subalpijskom flornom elementu. U Srbiji je rasprostranjena na Svrljiškim planinama, Sićevačkoj klisuri, Rtnju, Ozrenu, Suvoj planini, Staroj planini, Vlasini. U Vojvodini- na području Fruške gore, a na Kosovu- okolina Peći i Ločanska dolina.

***G. asclepiadea* L.**, narodni naziv- svećica, trava od žutice



Slika 6: *G. asclepiadea* L.

Višegodišnja glatka biljka bez rozete prizemnih listova. Rizom snažno razvijen. Stabla brojna, uspravna i gusto pokrivena listovima. Cvetovi veliki, na kratkim peteljka. Krunica tučkasto-zvonasta, tamno plave boje, iznutra sa crvenoljubičastim pegama i uzdužnim svetlim linijama. Cveta od jula do oktobra. Raste po pašnjacima, ivicama šuma, na glinovitim vlažnim livadama, zastupljena na krečnjaku i silikatu. Česta u smrčevim šumama, na pašnjacima i livadama od pojasa planinske bukove šuma do iznad granice šume. Rasprostranjenje: južna i srednja Evropa, kavkaske planine. Pripada srednjoevropskom (subalpijskom) flornom elementu. U Srbiji vrlo česta na planinama uže Srbije: Suva planina, Stara planina, Kopaonik, Zlatibor, Medvednik, Stolovi, Rudnik, oko Pirota i Užica. Na Kosovu: Dečanska planina, Greben, Đeravica.

***G. punctata* L.**, u narodu poznata kao arnautski raven



Slika 7: *G. punctata* L

Višegodišnja, glatka biljka, sa rizomom dugim i do 1metar. Stablo uspravno, jednostavno, prizemni listovi kratki. Listovi u gornjem delu naspramni, zašiljeni, široki. Cvetovi upadljivi, sakupljeni na vrhu stabla. Krunica zvonasta, blede žute boje sa tamno ljubičastim pegama. Cveti od jula do oktobra. Nastanjuje kamenite pašnjake, utrine, četinarske šume od 1400–2500m. Češća na krečnjaku i glinovitim zemljištima. Rasprostranjena u centralnoj Evropi i na Balkanskom poluostrvu. Pripada srednjoevropsko- alpijskom flornom elementu. U Srbiji se raste na Staroj planini, i na Kosovu- Đeravica, Starac, Žljeb, Koprivnik, Nedžinat, Kurvala, Derviš, Kom, Dečani.

G. pneumonanthe L., narodni naziv mala svećica



Slika 8: *G. pneumonanthe* L.

Višegodišnja glatka biljka, bez rozete prizemnih listova. Stablo uspravno, gusto pokriveno listovima. Cvetovi upadljivo lepi, usamljeni ili po 2-10 skupljeni u pazuhu gornjih listova ili na vrhu stabla. Krunica tučkasto-zvonasta, tamno plave boje, iznutra sa pet tačkastih zelenih pruga. Cveta od jula do oktobra. Raste na peščanim i glinovitim zemljištima, na ravnim tresavama, u nizijama i planinskim vrhovima. Rasprostranjena skoro u čitavoj Evropi, na Kavkazu i umerenoj Aziji. Pripada evroazijsko-evrosibirskom flornom elementu. U Srbiji naseljava planinske predele Vlasine, Zlatibora, G. Milanovac, Kragujevac, područje Fruške Gore i na Kosovu oko Peći.

***G. verna* L.**, narodni naziv kaluđerak, otodavka



Slika 9: *G. verna* L.

Višegodišnja glatka biljka sa kratkim uspravnim stablom, za vreme cvetanja jako izduženim. Listovi rozete veći od listova stabla. Cvetovi obično pojedinačni, terminalni. Krunica drškoliko-tanjirasta, intenzivno plave boje. Cveti od marta do juna, ponekad u julu i avgustu po drugi put, a ređe i u toku zime. Raste na suvim livadama i pašnjacima, na stenama, u svetlim šumama, od nizija do subalpijskih vrhova. Rasprostranjena u Evropi i Aziji. Pripada evro-azijsko-alpijskom flornom elementu.

G. tergestina Beck , u narodu - kaluđerakSlika 10: *G. tergestina* Beck

Višegodišnja glatka biljka. Stablo jednostavno, retko razgranato sa jednim cvetonosnim izdankom. Prizemni listovi skupljeni u rozetu. Cvetovi obično pojedinačni, terminalno postavljeni. Čašica cevasta ljubičasto obojena. Cveta od aprila do juna. Nastanjuje suve pašnjake i livade iznad šumskog pojasa, krečne stene, četinarske šume. Rasprostranjena na Pirinejskom, apeninskom i Balkanskom poluostrvu (izuzev Grčke i Turske), u Hrvatskoj, Dalmaciji. Pripada pontsko-ilirskom flornom elementu. Retka u užoj Srbiji, na Kosovu rasprostranjenija- Kurvala, Bogičevica, Derviš, Nedžinat, Maja Rosulija.

G. nivalis L., narodni naziv- snežni srčanikSlika 11: *G. nivalis* L.

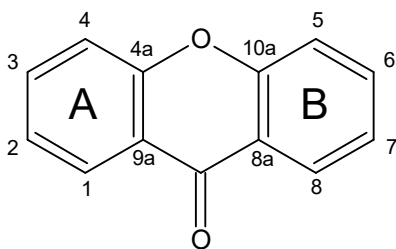
Jednogodišnja, vrlo nežna, glatka biljka. Stablo nežno, jako tanko, obično od osnove granato. Prizemni listovi skupljeni u proređenu rozetu. Cvetovi mali, zvezdoliko rašireni na kratkoj peteljci, raspoređeni na vrhu grana. Krunica drškoliko-tanjirasta, tamno plave boje. Cveta od juna do avgusta. Raste na livadama i pašnjacima, u svetlim šumama, na ravnim tresavama, u subalpijskom i alpijskom regionu (1700-2600 m). Pretežno na krečnjačkom terenu ali i na silikatu. Rasprostranjena u Evropi, Balkansko poluostrvo, Mala Azija, severna Amerika. Pripada evropsko-alpijskom flornom elementu. U Srbiji je do sada konstatovana samo na Kosovu- Đaravica, Bogičevica, Starac, Marijaš, Hajla.

1.2. Hemijski sastav biljnih vrsta roda *Gentiana*

Zbog svoje raznovrsnosti, lekovitosti i farmakološkog značaja, vrste roda *Gentiana* su već duže vreme predmet mnogobrojnih fitohemijskih istraživanja kao potencijalni izvori lekovitih sirovina. Farmakološki aktivne komponente koje su izolovane iz vrsta ovog roda pripadaju grupi sekoiridoida, flavonoida i ksantona.

1.2.1. Ksantoni

Ksantoni su jedinjenja koja nastaju kao proizvod sekundarnog metabolizma kod viših biljaka, gljiva, paprati i lišajeva⁹. Pripadaju grupi polifenolnih jedinjenja, dibenzo- γ -pironske strukture¹⁰ (slika 12).



Slika 12: Osnovna struktura ksantona

Prvi ksanton, gentizin, izolovan je 1821.god. iz vrste *G. lutea*. Od tada do danas, iz viših biljaka, paprati, gljiva i lišajeva, izolovan je veliki broj različitih ksantonskih jedinjenja. Praktično svi do sada poznati ksantoni su dobijeni, ili se nalaze, u samo osam familija: Gentianaceae, Guttiferae, Polygalaceae, Leguminosae, Lythraceae, Moraceae, Loganiaceae i Rhamnaceae¹¹. Familije sa najvećim brojem ksantona su Gentianaceae i Guttiferae.

Na osnovu strukture ksantoni su podeljeni u pet glavnih grupa⁹:

prosti ksantoni

- mono-supstituisani
- di-supstituisani
- tri-supstituisani
- tetra-supstituisani
- penta-supstituisani

heksa-supstituisani

ksantonski glikozidi

O- glikozidi

C- glikozidi

prenilovani ksantoni

ksantonolignoidi

ksantoni sa neobičnim tipom supstitucije

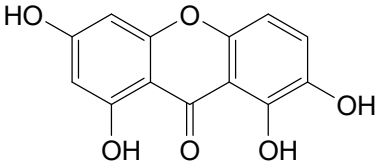
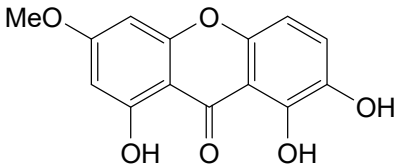
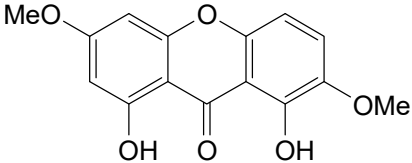
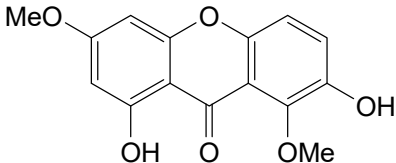
Prosti ksantoni

Većina do sada identifikovanih ksantona pripada ovoj grupi. U zavisnosti od stepena supstitucije podeljeni su u šest podgrupa (mono-, di-, tri-, tetra-, penta- i heksa-supstituisani). Kao supstituenti javljaju se OH i OCH₃ grupe. U familiji Gentianaceae najzastupljeniji su tetra-supstituisani ksantoni¹².

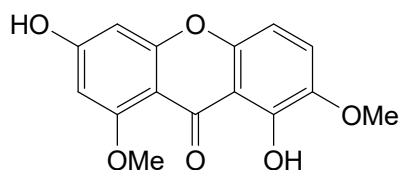
Prvi podaci o tetra-supstituisanim ksantonima datiraju iz 1855.god. kada je iz vrste *Garcinia mangostana* izolovan ksanton mangostin⁹. Uprkos brojnim pokušajima, njegova prava struktura je određena tek stotinak godina kasnije. Prvi tetra-supstituisan ksanton čija je struktura opisana u literaturi je 1,5,8-trihidroksi-3-metoksi ksanton, izolovan iz vrste *Swertia japonica* 1942.godine¹³. Od tada pa do 1995.godine, oko 115 tetrasupstituisanih ksantona je prezentovano u literaturi. U današnje vreme preko 230 ovih jedinjenja je opisano u literaturi⁹.

U tabeli 1 je prikazana distribucija tetra-supstituisanih ksantona u okviru roda *Gentiana*¹⁴.

Tabela 1: Tetra-supstituirani ksantoni u rodu *Gentiana*

ksanton	biljna vrsta	literatura
<p>1,3,7,8-(OH)₄ ksanton, norcvercianin</p> 	<p><i>G. bavarica</i> <i>G. verna</i></p>	<p>15, 16 17</p>
<p>1,7,8-(OH)₃-3-(OMe) ksanton, genciakohianin</p> 	<p><i>G. bavarica</i> <i>G. verna</i> <i>G. clussi</i> <i>G. angustifolia</i> <i>G. kochiana</i> <i>G. brachyphylla</i> <i>G. favrati</i> <i>G. barbata</i> <i>G. nivalis</i></p>	<p>15, 16 17 18 17 19 20 20 21 20</p>
<p>1,8-(OH)₂-3,7-(OMe)₂ ksanton</p> 	<p><i>G. barbata</i> <i>G. kochiana</i></p>	<p>21, 22 23</p>
<p>1,7-(OH)₂-3,8-(OMe)₂ ksanton, genciakaulein</p> 	<p><i>G. bavarica</i> <i>G. schleicheri</i> <i>G. rostani</i> <i>G. favrati</i> <i>G. brachyphylla</i> <i>G. verna</i> <i>G. nivalis</i> <i>G. utriculosa</i> <i>G. kochiana</i> <i>G. angustifolia</i> <i>G. alpina</i> <i>G. clussi</i></p>	<p>16 20 20 20 20 24 20 20 23 18 18 18</p>

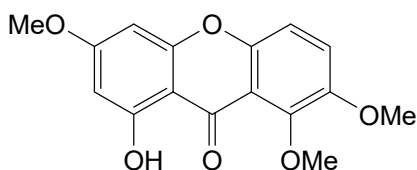
3,8-(OH)₂-1,7-(OMe)₂ ksanton
izogenciakaulein



G. kochiana

19

1-(OH)-3,7,8-(OMe)₃ ksanton
dekuzatin



G. brachyphylla

20

G. rostani

20

G. schleicheri

20

G. bavarica

15

G. clussi

18

G. alpina

18

G. angustifolia

18

G. kochiana

19

G. utriculosa

20

G. nivalis

20

G. verna

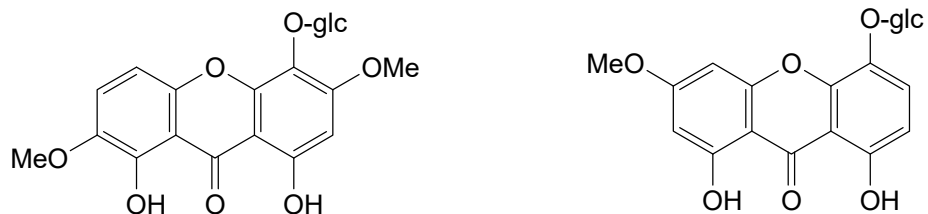
24

Ksantonski glikozidi

Ksantonski glikozidi su jedinjenja koja čine ksantoni za koje je vezana šećerna komponenta. U zavisnosti od prirode glikozidne veze ova jedinjenja mogu biti *O*-glikozidi i *C*-glikozidi. Kod *C*-glikozida šećerna komponenta je direktno vezana za ksantonski molekul C-C kovalentnom vezom tako da se ova jedinjenja ne mogu hidrolizovati. Za razliku od njih, kod *O*-glikozida šećerna jedinica je *O*-glikozidnom vezom vezana za ksanton, pa je samim tim moguća hidroliza.

Ksantonski-*O*-glikozidi

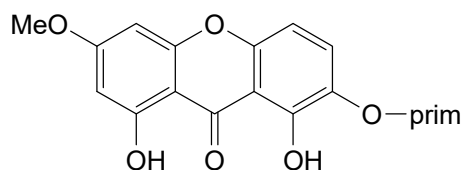
O-glikozidni ksantoni se češće javljaju u biljkama nego *C*-glikozidi. Prisutni su uglavnom u porodici Gentianaceae. Posebno su karakteristični za rodove *Gentiana*, *Swertia* i *Gentianella*. Pronađeni su i u nekim vrstama rodova *Hoppea* i *Canscora*. Jedina do sada poznata biljka koja ne pripada porodici Gentianaceae, a proizvodi *O*-glikozid je *Iris ensata* (Iridaceae)¹⁰. Šećerna komponenta je uglavnom vezana u položaju 1, ali može biti i u položajima 3,4,5,7 i 8. Slika 13 prikazuje ksantonske *O*-glikozide sa šećernim jedinicama vezanim u položaju 5, izolovane iz vrsta *Tripterispermum taiwanese* i *Swertia japonica*.

Slika 13: Ksantonski *O*-glikozidi

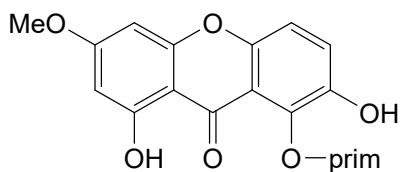
Ksantonski *O*-glikozidi su najčešće tetra-supstisuani sa 1,3,5,8 ili 1,3,7,8 poretom supstitucije. Ređe se sreću tri-supstisuani. U Tabeli 2 je prikazana distribucija 1,3,7,8-tetra-supstisuanih ksantonskih *O*-glikozida u okviru roda *Gentiana*.

Tabela 2: Tetrasupstisuani ksantonski *O*-glikozidi u rodu *Gentiana*

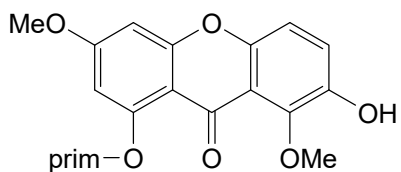
ksanton	biljna vrsta	literatura
3,7,8-(OH) ₃ -1- <i>O</i> -primverozid norsvercianin-1-<i>O</i>-primverozid		
	<i>G. bavarica</i> <i>G. dinarica</i> <i>G. verna</i>	25 26 27
3-(OMe)-7,8-(OH) ₂ -1- <i>O</i> -glukozid genciakohianin 1-<i>O</i>-glukozid		
	<i>G. verna</i>	20, 24

1,8-(OH)₂-3-OMe-7-O-primverozid

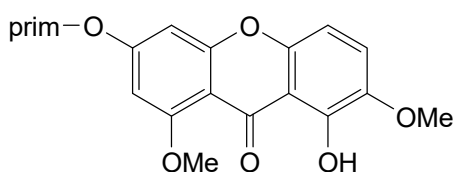
<i>G. clussi</i>	18
<i>G. alpina</i>	18
<i>G. verna</i>	24

3-(OMe)-1,7-(OH)₂- 8-O-primverozid
genciakohianin-8-O-primverozid

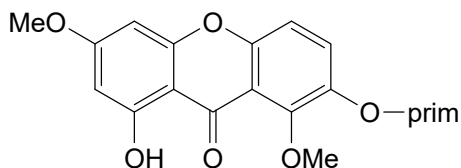
<i>G. alpina</i>	18
<i>G. kochiana</i>	19, 23
<i>G. bavarica</i>	28, 16

7-(OH)-3,8-(OMe)₂-1-O-primverozid
sverciaperenin-1-O-primverozid

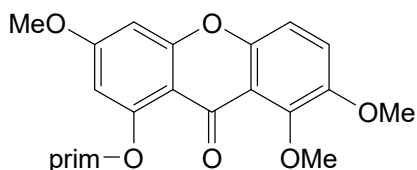
<i>G. verna</i>	20, 24, 17
<i>G. bavarica</i>	15, 16

8-(OH)-1,7-(OMe)₂-3-O-primverozid
izogenciakaulein-3-O-primverozid

<i>G. clussi</i>	18
<i>G. alpina</i>	18
<i>G. angustifolia</i>	18
<i>G. kochiana</i>	19, 23

 1-(OH)-3,8-(OMe)₂-7-*O*-primverozid
genciakaulein-7-*O*-primverozid


<i>G. clussi</i>	18
<i>G. alpina</i>	18
<i>G. angustifolia</i>	29
<i>G. kochiana</i>	30, 23

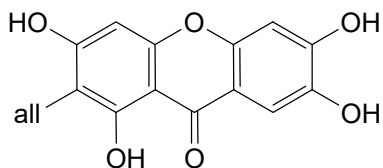
 3,7,8-(OMe)₃-1-*O*-primverozid
dekuzatin-1-*O*-primverozid


<i>G. verna</i>	24, 16
<i>G. bavarica</i>	15, 16

Monosaharidni ksantonski-*O*-glikozidi kao šećernu komponentu uglavnom imaju β-D-glukozu, mada se u nekim vrstama roda *Gentianella* može naći i D-fruktoza³¹. U rodovima *Gentiana* i *Swertia* kao disaharidi sreću se primveroza, genciobioza i rutinoza. Primveroza se sastoji od ksiloze i glukoze : [β-D-ksilopiranozil-(1→6)-β-D-glukopiranoza]. Genciobioza ima dve β-D-glukopiranoze vezane 1→6 glikozidnom vezom, a kod rutinoze α-L-ramnopiranoza je 1→6 glikozidnom vezom povezana sa β-D-glukopiranozom. Gencianoza [β-D-glukopiranozil-(1→6)-α-D-glukopiranozil-(1→2) -β-D-fruktofuranosa] je trisaharid koji se sreće u rodovima *Gentiana* i *Swertia*.

Ksantonski-*C*-glikozidi

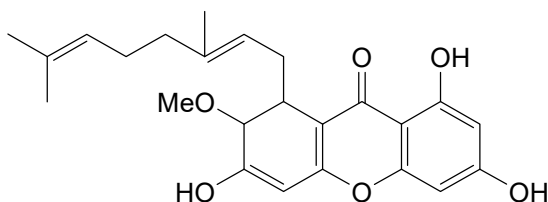
U poređenju sa *O*-glikozidima, *C*-glikozidi su prisutni u mnogo manjem broju biljaka. Najrasprostranjeniji ksantonski *C*-glikozid je mangiferin (Tabela 3) koji je prisutan u brojnim angiospermama, ali je takođe vrlo prisutan i u papratima³². Kod svih *C*-glikozidnih ksantona OH grupe se nalaze u položajima 1 i 3, dok se šećerne jedinice vezuju u položaju 2 ili 4. Šećerna komponenta je najčešće glukoza, ali je iz vrste *Hymenophyllum dilatatum* izolovan ksanton dilatatin (Slika 14) koji kao šećernu jedinicu ima alozu vezanu za ksantonski prsten¹⁰.

Slika 14: *dilatatin*Tabela 3: Mangiferin u vrstama roda *Gentiana*

ksanton	biljna vrsta	literatura
1,3,6,7-(OH) ₄ -2- <i>C</i> -glukozid mangiferin		
	<i>G. cruciata</i>	33
	<i>G. lutea</i>	34
	<i>G. pneumonanthe</i>	35
	<i>G. asclepiadea</i>	36
	<i>G. utriculosa</i>	20
	<i>G. nivalis</i>	20
	<i>G. verna</i>	20, 24, 17

Prenilovani ksantoni

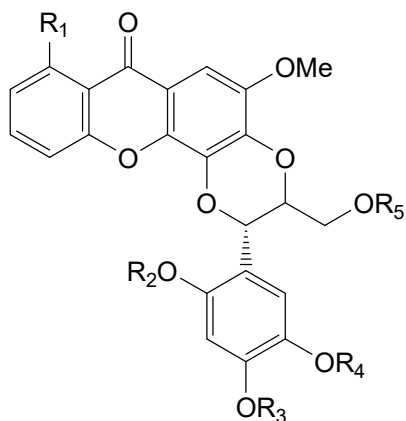
Prenilovani ksantoni su karakteristični za biljne vrste iz familije Guttiferae. Ova grupa ksantona ima izopentenil i geranil supstituente. Prenilovani i odgovarajući piranoksanтони su prisutni i u rodovima *Maclura* i *Cudrania* (Moraceae)¹⁰. Tipičan predstavnik ove grupe ksantona je rubraksanton pronađen u vrsti *G. pyrifera* (Slika 15)



Slika 15: Rubraksanton

Ksantonolignoidi

Ovo je retka grupa jedinjenja koja su uglavnom prisutna u familijama Guttiferae i Hypericaceae. Među prvim izolovanim ksantonolignoidima su kadensin A i B iz vrste *Caraipa densiflora*¹⁰.



Kadesin A

$R_1 = \text{OH}$

$R_2 = R_4 = R_5 = \text{H}$

$R_3 = \text{Me}$

Kadesin B

$R_1 = \text{OH}$

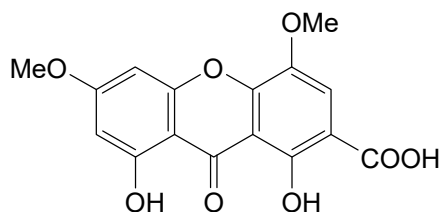
$R_2 = \text{OMe}$

$R_3 = \text{Me}$

$R_4 = R_5 = \text{H}$

Ksantoni sa neobičnim tipom supstitucije

Ovi ksantoni su izolovani iz različitih biljaka i lišajeva i zbog karakterističnog tipa supstitucije se ne mogu klasifikovati na uobičajeni način. Tipičan predstavnik ove grupe ksantonskih jedinjenja je 7-karboksil-1,8-dihidroksi-3,5-dimetoksi ksanton (Slika 16) koji je izolovan iz vrste *Saponaria vaccaria*¹⁰.



Slika 16: Ksanton iz vrste *Saponaria vaccaria*

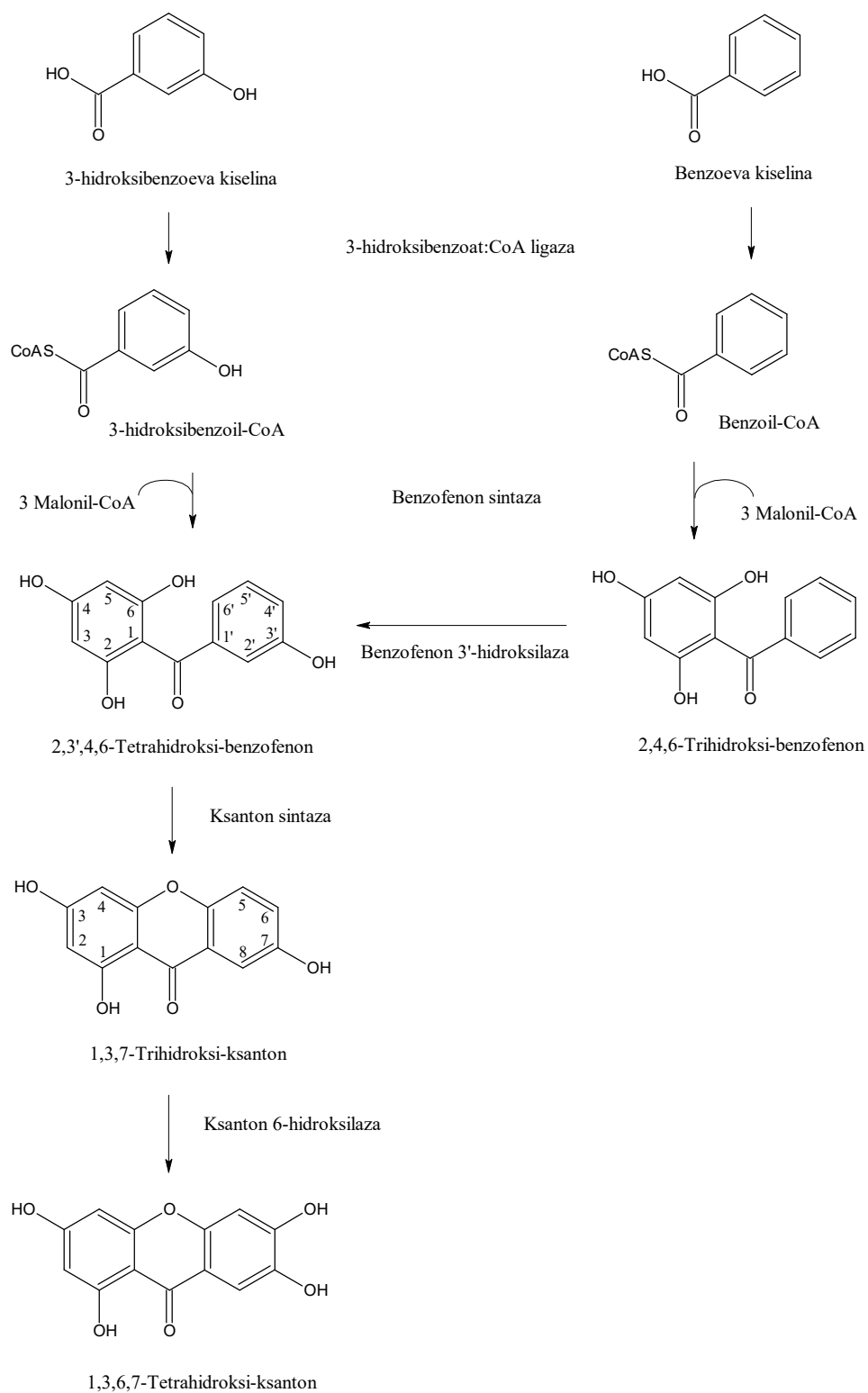
1.2.1.1. Biosinteza ksantona

U većini grupa fenolnih jedinjenja danas je poznato biosintetsko poreklo ugljenikovih atoma. Sinteza ovih jedinjenja počinje od fenilalanina, preko šikimi kiseline do *p*-kumarinske kiseline i *p*-kumaroil CoA, odakle se put račva ka pojedinim klasama fenolnih jedinjenja (flavonoidi, kumarini, hinoni, lignini).

Kod gljiva, do sinteze ksantona dolazi prvenstveno acetatnim putem. Šikimatni put je favorizovan kod viših biljaka, kod kojih često dolazi do objedinjavanja ova dva biosintetska puta, što je slučaj u biosintezi flavonoida i ksantona.

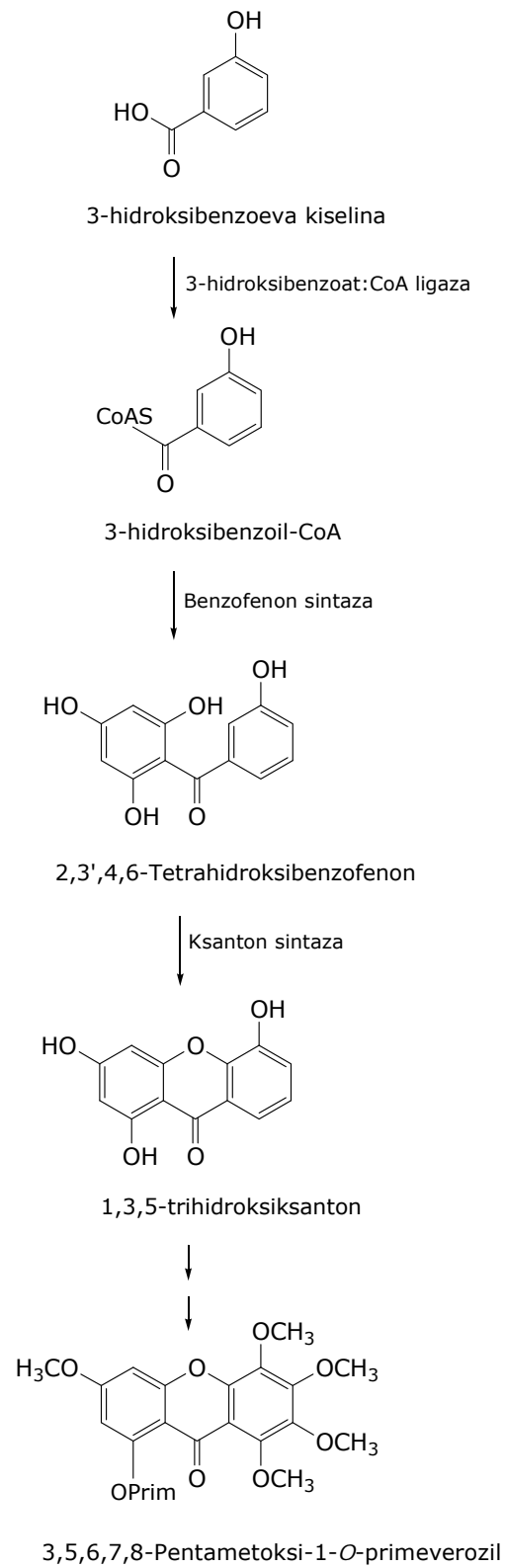
Proučavanjem biosinteze ksantona u suspenziji kulture ćelija vrsta *Centaurium erythraea* (Gentianaceae) i *Hypericum androsaemum* (Hypericaceae) potvrđeno je da je osnovni korak u biosintezi ksantona formiranje C13 skeleta, odnosno, formiranje glavnog intermedijera 2,3',4,6-tetrahidroksi benzoifenona³⁷.

Startni molekul u ćelijskoj kulturi *C. erythraea* je 3-hidroksibenzojeva kiselina. Međutim, u kulturi ćelija *H. androsaemum* postoji alternativni put u biosintezi ključnog intermedijera 2,3',4,6-tetrahidroksi benzoifenona³⁸. Korišćenjem obeleženih prekursora (benzojeva i 3-hidroksibenzojeva kiselina) utvrđeno je da se kod ove vrste kao početni molekuli u biosintezi javljaju benzojeva kiselina i 3-hidroksibenzojeva kiselina. Oba ova molekula su supstrati za enzim 3-hidroksibenzoat: CoA ligazu koja ih prevodi u estere benzoil-CoA i 3-hidroksibenzoil-CoA³⁹. Enzim benzoifenon sintaza iz *H. androsaemum* pokazuje veću supstratnu specifičnost za benzoil-CoA. Kondenzacijom benzoil-CoA sa tri molekula malonil-CoA nastaje 2,4,6-trihidroksi benzoifenon. Utvrđeno je da se mikrozomalna citohrom P₄₅₀ monooksigenaza vezuje za 2,4,6-trihidroksi benzoifenon i da katalizuje njegovu hidroksilaciju u položaju 3'. Ovaj enzim, nazvan benzoifenon 3'-hidroksilaza, ne hidroksiluje položaj 3 u benzojevoj kiselini, niti u cinamičnoj kiselini, odnosno nije uključen u početne korake u biosintezi ksantona (Slika 17). Nastali 2,3',4,6-tetrahidroksi benzoifenon se intramolekulski kupluje pri čemu nastaje 1,3,7-hidroksi ksanton koji se potom pod uticajem ksanton 6-hidroksilaze (citohrom P₄₅₀ monooksigenaza⁴⁰) prevodi u 1,3,6,7-tetrahidroksi ksanton³⁷.



Slika 17: Biosinteza ksantona u kulturi ćelija *H. androsaemum*³⁸

U vrsti *C. erythraea*, jedini prekursor u biosintezi ksantona je 3-hidroksibenzoeva kiselina. Pošto benzoeva kiselina i fenilalanin nisu inkorporirani u ksantonski skelet, pretpostavlja se da se 3-hidroksibenzoeva kiselina formira direktno iz šikimatnog puta³⁸. Ovo je kasnije i potvrđeno proučavanjem retrobiosinteze u kulturi korenova vrste *Swertia chirata* (Gentianaceae)⁴¹. Enzim 3-hidroksibenzoat : CoA ligaza prevodi 3-hidroksibenzoovu kiselinu u 3-hidroksibenzoil-CoA, koji se potom kondenzuje sa tri molekula malonil-CoA i nastaje 2,3',4,6-tetrahidroksi benzofenon³⁷ (Slika 18). Reakciju katalizuje enzim benzofenon sintaza. Potom se tetrahidroksi-benzofenon regioselektivno kupluje, pri čemu dolazi do intramolekulskog oksidativnog kuplovanja u *orto* položaju u odnosu na 3'-OH grupu. Benzofenon se ciklizuje i nastaje 1,3,5-trihidroksi ksanton. Reakcija ciklizacije benzofenona je katalizovana membranskim enzimom ksanton sintazom za čiju aktivnost je neophodno prisustvo NADPH i O₂ što indikuje povezanost sa citohromom P₄₅₀. Zato se pretpostavlja da je ksanton sintaza u stvari citohrom P₄₅₀ oksidaza. Nastali ksanton je supstrat za ksanton 6-hidroksilazu koja ga prevodi u 1,3,5,6-tetrahidroksi ksanton koji dalje podleže reakcijama hidroksilacije i/ili metilacije.



Slika 18: Biosintetski put ksantona u kulturi ćelija *C. erythraea* ³⁷

1.2.1.2. Biološka svojstva ksantona

Familija Gentianaceae obuhvata veliki broj biljnih vrsta koje se od davnina koriste u tradicionalnoj medicini mnogih naroda. Karakteristične biološki i farmakološki aktivne komponente u porodici Gentianaceae su ksantoni, iridoidi i flavonoidi.

Zbog značajnih fitohemijskih osobina svojih konstituenata, biljke iz ove familije su predmet brojnih farmakoloških ispitivanja. Mnogobrojna istraživanja ksantona značajna su i sa hemotaksonomskog aspekta.

Poslednjih decenija ksantoni predstavljaju veoma važnu klasu supstituisanih heterocikla. Biološka aktivnost ove grupe jedinjenja je povezana sa njihovom tricikličnom strukturom, ali veoma zavisi i od vrste i/ili položaja različitih supstituenata. Danas je poznato da brojni biljni proizvodi koji se regularno koriste kao hemoterapeutske agensi, sadrže ksantone kao aktivne komponente¹⁰.

Tako na primer, vodeni ekstrakt vrste *Mangyfera indica* je komercijalizovan i koristi se u preventivne svrhe kao antioksidant za poboljšanje opšteg stanja organizma. Pokazano je da je glavna komponenta u ovom ekstraktu ksanton mangiferin⁴². Koren vrste *Polygala tenuifolia* tzv. "yuanzhi" je dobro poznat tradicionalni kineski lek koji se koristi kao ekspektorans, a pokazuje i sedativno dejstvo. Iz ove vrste su izolovana četiri ksantonska *O*-glukozida nazvana poligalaksantoni⁴³.

Ksantoni kao inhibitori monoamino-oksidge (MAO)

Ksantoni su prve supstance biljnog porekla za koje je pokazano da inhibitorno deluju na MAO enzime, *in vitro*^{44,45}. Monoamino-oksidge je enzim vezan za spoljašnju stranu membrane mitohondrija a katalizuje oksidativnu deaminaciju endogenih amina. Postoje dve izoforme ovog enzima: MAO A i MAO B, koje se razlikuju po supstratnoj specifičnosti, osetljivosti prema inhibitorima i aminokiselinskoj sekvenci⁴⁶. U ljudskom organizmu zastupljenost obe forme je približno jednaka, osim u placenti gde je prisutna samo MAO A⁴⁷ i trombocitima i limfocitima gde je prisutna samo MAO B⁴⁸. MAO A katalizuje deaminaciju serotonina i noradrenalina, dok je dopamin supstrat za oba enzima⁴⁹. Inhibitori MAO enzima sprečavaju razgradnju serotonina, noradrenalina i dopamina u ćelijama. Inhibicijom MAO A enzima selektivno se pojačava transmisija noradrenalina i serotonina u CNS-u, što se manifestuje kao antidepresivni efekat.

Iz vrste *Swertia purpurascens* izolovani su prvi ksantoni koji su pokazali da deluju stimilirajuće na CNS kod miševa i pacova. To su bili tetra-supstituisani ksantoni i mangiferin⁵⁰. Kasnije, 80-tih godina prošlog veka potvrđeno je da ksantoni imaju

veliki potencijal za MAO inhibiciju^{44,45}. Ispitivano je nekoliko vrsta ksantona iz familije Gentianaceae i Guttiferae pri čemu je pokazano da zavisno od položaja i vrste supstituenata u molekulu ksantona, postoji razlika u izoenzimskoj selektivnosti. Gentizin i njegov 3-*O*-glukozid pokazuju afinitet za obe forme enzima, dok genciakaulein ima veći afinitet prema MAO A. Belidifolin, demetilbelidifolin i metilbelidifolin - 1,3,5,8-tetrasupstituisani ksantoni iz vrste *G. lactea* su bolji inhibitori MAO A enzima⁵¹.

Iz vrste *G. kochiana* 1,3,7,8-tetrasupstituisani ksantoni genciakaulein i genciakohianin takođe imaju značajnu sposobnost inhibicije MAO enzima (posebno MAO A)⁵²

Eksperimenti u kojima je detaljnije ispitivan uticaj položaja supstituenata na MAO inhibiciju su pokazali da disupstituisani ksantoni sa 1,3-, 1,6- i 1,8- poretkom supstitucije, imaju visok afinitet za MAO A enzim⁵³. Uvođenjem trećeg supstituenta u položaje 7 ili 8 afinitet 1,3-dihidroksi ksantona se menja i postaje selektivniji prema MAO B, dok se dodavanjem supstituenta u položaje 5 ili 6 afinitet 1,3-dihidroksi ksantona za MAO A bitno ne menja. Ovi eksperimenti su pokazali da 1,3,5,8- i 1,3,6,8-tetrasupstituisani ksantoni imaju sličan afinitet za obe forme enzima, kao i da vrsta supstituenta (-OH, -OCH₃ ili grupa sa većim brojem C atoma) bitno utiče na selektivnost.

Novijim istraživanjima u kojima je ispitivano 59 prirodnih i sintetiskih ksantona, došlo se do sledećih zaključaka⁵⁴:

- 1,3-disupstituisani ksantoni pokazuju afinitet prvenstveno za MAO A
- ksantoni sa -OH grupom u položaju 1 i -OCH₃ grupom u položaju 3 pokazuju veći afinitet za MAO A od ksantona sa -OCH₃ grupom u položaju 1 i -OH grupom u položaju 3
- supstituent u položaju 2 nema uticaj na selektivnost
- ksantoni sa -OH grupom u položaju 5 vezuju se za MAO A sa većim afinitetom od ksantona sa -OCH₃ grupom u položaju 5.

Prisustvo metoksi supstituenata je bitno u procesu distribucije u organizmu, jer su ksantoni sa OH grupom u položaju 3 jonizovani na fiziološkom pH, čime se smanjuje prolazak kroz membranu.

Još uvek se ne zna kojim mehanizmom ksantoni inhibiraju MAO enzime. Aktuelna je teorija po kojoj MAO inhibitori interaguju sa FAD kofaktorom i tako remete normalan prenos elektrona do enzima⁵⁵.

Novija istraživanja pokazuju da ksantoni inhibitorno utiču i na aktivnost acetilholin-esteraze. Metanolni ekstrakt listova *G. campestris* koji sadrži 3,5,8-trisupstituisane ksantone belidifolin, norsvercianolin i svercianolin, pokazuje značajnu sposobnost inhibicije acetilholin-esteraze⁵⁶.

Takođe, neki predstavnici 1,3,5-trisupstituisanih i 1,3,7,8-tetrasupstituisanih i prenilovanih ksantona inhibiraju acetilholin-esterazu, pri čemu je preduslov za aktivnost prisustvo lipofilnih sporednih nizova u molekulu, a ne sam ksantonski skelet⁵⁷.

Ksantoni kao antioksidanti

Ksantoni kao polifenolna jedinjenja su predmet brojnih istraživanja zbog svoje važne antioksidativne uloge, odnosno uloge donatora elektrona. Njihova antioksidativna zaštita se ogleda u uklanjanju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) koje dovode do ireverzibilnih oštećenja i destrukcije ćelijskih komponenti, što dalje dovodi do pojave zapaljenskih procesa, kancera, i drugih obolenja. Među mnoštvom jedinjenja biljnog porekla, trenutno su najaktuelnija istraživanja na jedinjenjima koja sadrže kateholnu grupu, zato što se ova grupa može oksidovati u enzimskim ili neenzimskim reakcijama pri čemu nastaje hinonski tip prooksidanta koji je važan u prevenciji kancera i apoptoze⁵⁸. Poslednjih decenija u istočnoazijskim zemljama kao što su Koreja, Kina i Japan, koren vrste *Cudrania tricuspidata* predstavlja najvažniji narodni lek protiv kancera i gastritisa, a takođe ima i antiinflamatorno i antioksidativno dejstvo⁵⁹. Iz ove vrste je izolovano osam ksantona sa kateholnom grupom, za koje se sa sigurnošću može reći da su odgovorni za ovakvu biološku aktivnost. Iz iste vrste kasnije su izolovani i prenilovani flavonoidi. Pokazano je da ovi ksantoni i flavonoidi imaju antioksidativnu aktivnost *in vitro* na LDL proteine, da inhibiraju produkciju NO i ekspresiju iNOS u RAW264,7 ćelijama⁶⁰. Takođe, inhibitorno deluju na humanu mikrozomalnu ACAT-1 ili ACAT-2 (acil CoA: holesterol-aciltransferaza), za koju se zna da zajedno sa LDL proteinima ima krucijalnu ulogu u nastanku i napredovanju ateroskleroze i hiperholesterolemije.

Druge biološke aktivnosti ksantona

U cilju ispitivanja potencijalne antitumorske i imunomodulatorske aktivnosti ksantona, sintetisana je serija mono-, di- i tri-supstituisanih ksantona. Proučavani su *in vitro* efekti ovih ksantona na rast humanih tumorskih ćelijskih linija, kao i na mitogeni odgovor humanih T limfocita na fitohemaglutinin (PHA)⁶¹. Utvrđeno je da su efekti ksantona uslovljeni vrstom, položajem i brojem supstituenata u ksantonskom molekulu. Najveće inhibitorno dejstvo na rast

tumorskih ćelija pokazao je 1,3-dihidroksi-2-metil ksanton. Disupstituisani 2-hidroksi-1-metoksi ksanton i 3,4-dihidroksi ksanton su imali najveći antiproliferativni efekat na T limfocite.

Ksantoni pokazuju i antifugalnu⁶² i antibakterijsku aktivnost. Iz malezijske vrste *Garcinia nigrolineata* (Guttiferae) izolovano je nekoliko ksantona među kojima je i 1,3,5-trisupstituisani nigrolineaksanton N⁶³. Ovaj ksanton ima značajnu antibakterijsku aktivnost na meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA). U odnosu na standard vankomicin, čija je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) 2µg/ml, za ksanton je ova vrednost iznosila 4µg/ml.

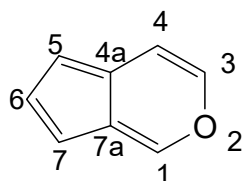
Poslednjih godina veliki broj istraživanja je posvećen pronalaženju prirodnih proizvoda sa HIV inhibitornom aktivnošću. Tako je pronađeno da ekstrakt kore biljne vrste *Maclura tinctoria* (Moraceae) pokazuje antiviralnu aktivnost *in vitro*⁶⁴. Iz ekstrakta ove biljke su izolovani prenilovani ksantoni, makluraksanton B i makluraksanton C koji su pokazali značajni HIV-inhibitorski potencijal. Ovi ksantonski molekuli sadrže kateholne grupe koje povećavaju inhibitornu aktivnost. Sverciafrančezid (flavon-ksanton dimer) iz vrste *Swertia franchetiana* inhibitorno deluje na HIV-reverznu transkriptazu⁶⁵.

Novija istraživanja pokazuju da ksantoni mogu naći primenu i u lečenju gastrointestinalnih poremećaja jer inhibitorno deluju na želudačnu H⁺,K⁺-ATP-azu⁶⁶. Želudačna H⁺,K⁺-ATP-aza je membranski enzim koji se nalazi u apikalnoj membrani parijetalnih ćelija koje "pumpaju" protone u želudačni lumen koristeći energiju dobijenu od hidrolize ATP. Inhibicija ovog enzima dovodi do inhibicije sekrecije želudačne kiseline. Prenilovani ksantoni izolovani iz meksičke vrste *Calophyllum brasiliense* su pokazali značajan stepen inhibicije H⁺,K⁺-ATP-aze *in vitro* pri čemu i u ovom slučaju broj i položaj OH grupa u ksantonskom molekulu utiče na njegovu inhibitornu aktivnost.

Treba napomenuti da su ksantoni dobri antimalarijski agensi⁶⁷, da imaju antihipertenzivnu aktivnost⁶⁸ i kardioprotektivno dejstvo⁶⁹, da pokazuju vazodilatirajuće efekte⁷⁰, imaju značajan antimutageni potencijal na bakteriju *Salmonella typhimurium*⁷¹. Tetra-supstituisani ksantoni iz rodova *Swertia* i *Canscora* pokazuju antituberkulostatsku aktivnost^{72, 73}. Iz vrste *S. japonica* i *S. chirata* su izolovani ksantoni koji snižavaju nivo šećera u krvi pacova. Zbog svih ovih bioloških aktivnosti, poslednjih godina ksantoni se sve više izučavaju. Istraživanja su usmerena ka određivanju mehanizma njihovog farmakološkog dejstva na biohemijskom nivou.

1.2.2. Iridoidi

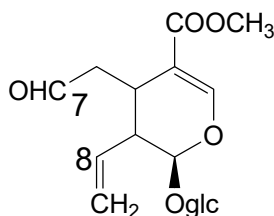
Iridoidi su klasa prirodnih monoterpenkih jedinjenja koji su široko rasprostranjeni u biljnom svetu. Do danas je pronađeno preko 1200 različitih iridoida i sekoiridoida u šezdesetak biljnih familija, između kojih i u familiji Gentianaceae⁷⁴. Osnovni skelet iridoida čini ciklopentan-(c)-piranska struktura koja je izgrađena od 9 ili 10 ugljenikovih atoma, ređe 8. U prirodi se javljaju kao glikozidi ili estri⁷⁵.



Slika 19: ciklopentan -(c)- piran

Po svojoj hemijskoj strukturi iridoidi su klasifikovani u grupu monocikličnih monoterpena. U biljkama su nađeni uglavnom u obliku glukoziida a u familiji Gentianaceae iridiodni glukoziidi su većinom isključivo derivati loganina, obaveznog biosintetskog prekursora sekoiridoida⁷⁴.

Naziv sekoiridoidi potiče od latinske reči "seco, secare" što znači otvoriti, prekinuti. Ova jedinjenja imaju otvoren osnovni iridoidni prsten između C-7 i C-8.

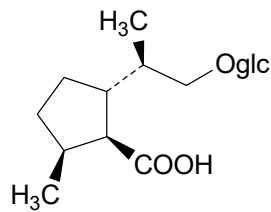


Slika 20: sekologanin

Sekoiridoidi se javljaju u sledeće četiri familije: Gentianaceae, Apocinaceae, Rubiaceae i Oleaceae⁷⁵. Sverciamarin, sverozid i genciopikrin su sekoiridoidi široko rasprostranjeni u vrstama rodova *Gentiana* i *Centaurium*.

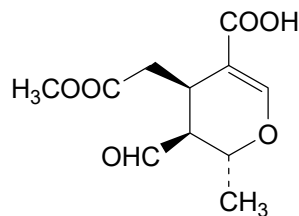
Na osnovu hemijskih osobina i biosinteze, iridoidna jedinjenja se klasifikuju u sledeće grupe:

iridoidi, koji se dele na: **a)** iridoide sa 9 C atoma u osnovnom skeletu i **b)** iridoide sa 10 C atoma u osnovnom skeletu. Nepetariacid je monociklični iridoid sa 10 C atoma u osnovnom skeletu, izolovan iz vrste *Nepeta cataria* (Lamiaceae)



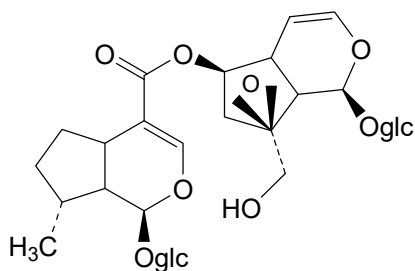
Slika 21: Nepetariacid

sekoiridoidi, koji mogu biti sekoiridoidni aglikoni i glikozidi. Iz vrste *Syringa amurensis* (Oleaceae) izolovan je aglikon siramuraaldehid. Tipični sekoiridoidni glukozidi su sverciamarin, sverozid i genciopikrin.



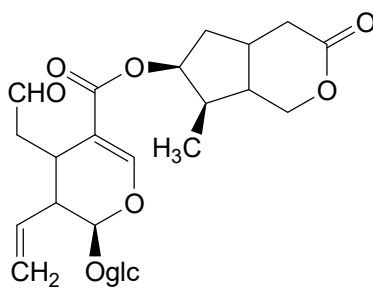
Slika 22: Metil siramuraaldehid

dimerni iridoidi, jedinjenja kao argiliosid izolovan iz vrste *Argyllia radiata* (Bignoniaceae) u kojima su dva iridoidna molekula povezana estarskom vezom (C6→ C11")



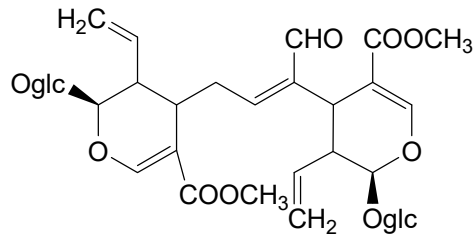
Slika 23: Argiliosid

bisglikozidni iridoidi i sekoiridoidi – ova jedinjenja se sastoje od sekoiridoidne jedinice i iridoidnog laktona sa C 9 skeletom, koji su povezani estarskom vezom.



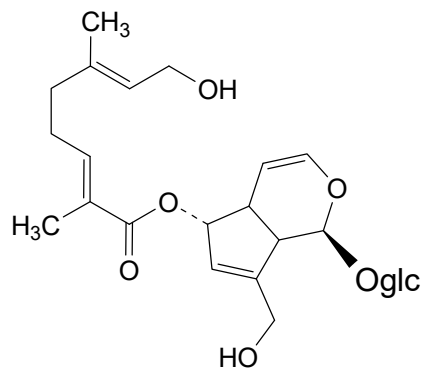
Slika 24: Abeliosid

dimerni sekoirodoidi – centaurosid, izolovan iz vrste *C. erythraea* je prvi bis-sekoiridoid povezan C-C vezom



Slika 25: Centaurozid

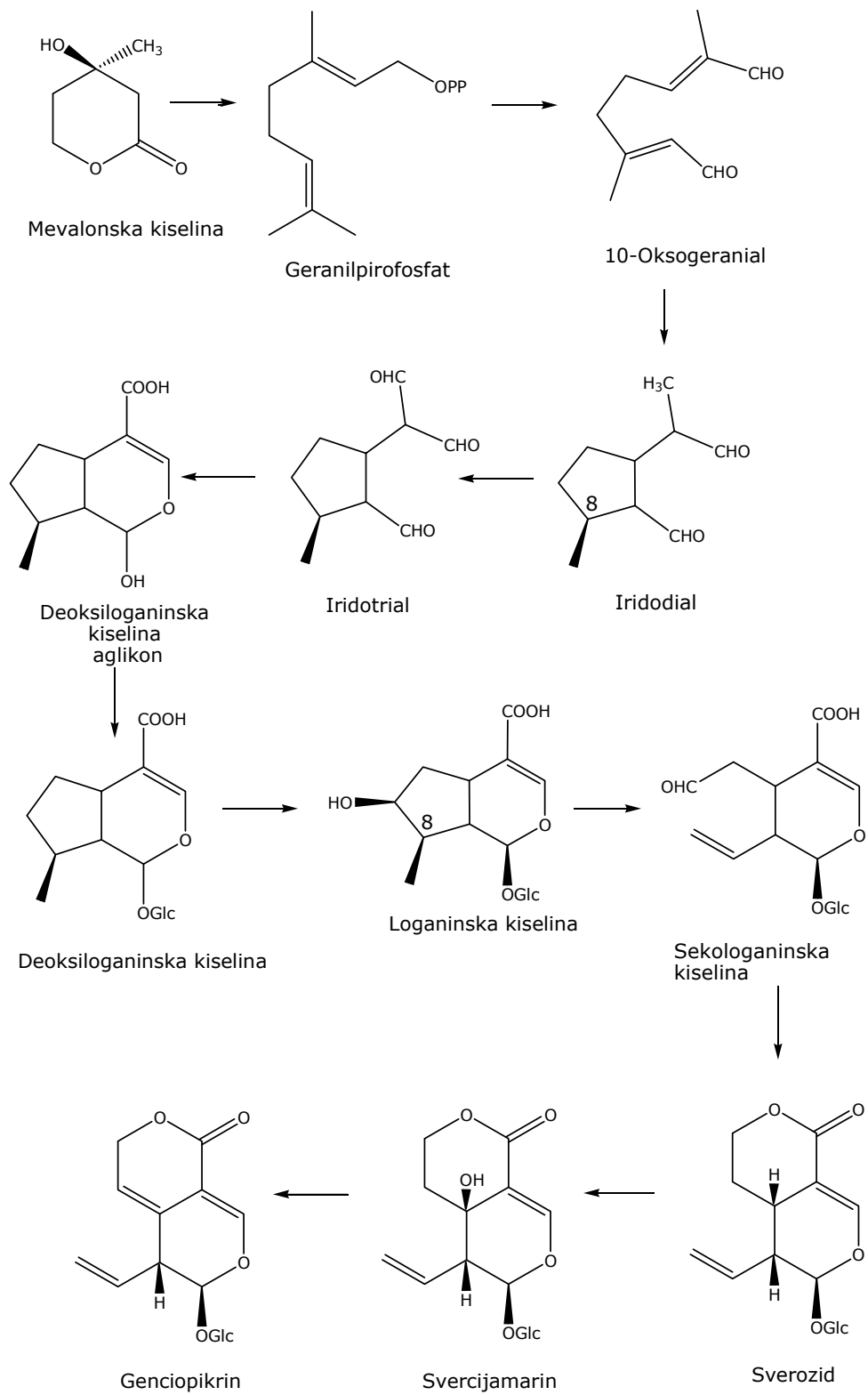
iridoidi konjugovani sa monoterpenima- amarelosid je prvo jedinjenje ovog tipa izolovano iz vrste *Tecoma dirysantha* (Bignoniaceae). Sastoji se iz 6-epiaukubina koji je estarski povezan sa monoterpenom geraniol-tipa.



Slika 26: Amarelosid

1.2.2.1. Biosinteza iridoida

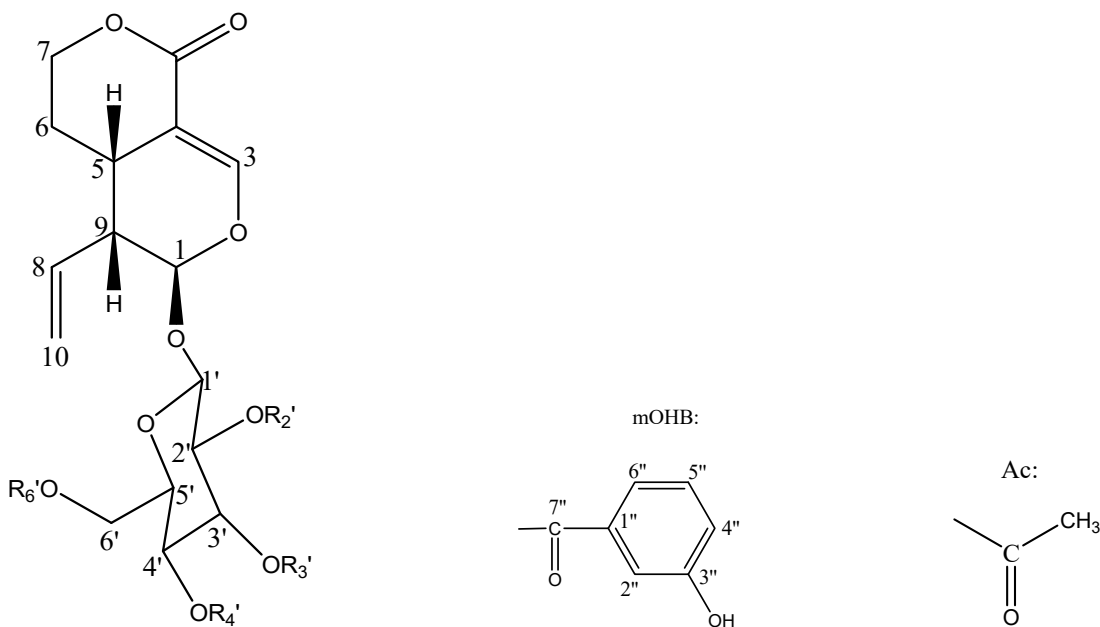
Danas je poznato da molekuli terpena potiču od tri molekula acetil-CoA koji se kondenzuju, a potom redukuju gradeći mevalonsku kiselinu. Dva molekula mevalonske kiseline reakcijama fosforilacije, izomerizacije i polimerizacije formiraju osnovni prekursor u biosintezi iridoida - geraniol-pirofosfat⁷⁶. Dalji put biosinteze ide u pravcu ciklizacije u iridodial, iz koga preko intermedijera iridotriala i deoksiloganinske kiseline nastaje sekologaninska kiselina. Za biljne vrste porodice Gentianaceae je karakteristično da se od ovog stupnja biosinteza odvija sledećim redosledom: sverozid → sverciamarin → genciopikrin⁷⁴. U eksperimentima sa ¹⁴C obeleženom mevalonskom kiselinom dokazano je da su sverozid i sverciamarin prekursori u biosintezi genciopikrina. Koliko su ova tri sekoiridoida rasprostranjena u porodici Gentianaceae pokazuje činjenica da su pronađeni u svakoj vrsti u kojoj su traženi. Slika 27 prikazuje biosintetski put iridoida u porodici Gentianaceae.



Slika 27: Biosinteza iridoida u familiji Gentianaceae⁷⁴

1.2.2.2. Biološke aktivnosti iridoida

Lekovitost biljaka porodice Gentianaceae je poznata od davnina. Njihova najčešća upotreba u narodnoj medicini je kao gorko sredstvo (amara pura). Gorčina potiče upravo od prisustva iridoidnih jedinjenja kao što je amarogencin, jedinjenje sa najvećom gorčinom. Plodovi vrste *C. erythraea*⁷⁷, pored sekoiridoida sverciamarina, sverozida i genciopikrina, sadrže i veoma gorke *m*-hidroksi-benzoil estre sverozida: centapikrin i dezacetilcentapikrin čija gorčina prelazi vrednost 1:10⁶. Mono *m*-hidroksi-benzoil estri sverozida, koji su nazvani decentapiktin A, B, i C (izolovani iz vrste *C. littorale*), za razliku od centapikrina i dezacetilcentapikrina, nemaju toliku gorčinu. Može se zaključiti da je acetilovanje OH grupe vezane za C atom u položaju 2, uslov za jako gorak ukus.



	R₂'	R₃'	R₄'	R₆'
Sverozid	H	H	H	H
Centapikrin	<i>m</i> OHB	Ac	H	H
Dezacetilcentapikrin	<i>m</i> OHB	H	H	H
Decentapikrin A	H	<i>m</i> OHB	H	H
Decentapikrin B	H	H	<i>m</i> OHB	H
Decentapikrin C	H	H	H	<i>m</i> OHB

Koren *G. lutea*, bogat sadržajem sekoiridoida sverciamarina, sverozida i genciopikrina, je veoma popularan sastojak mnogih biljnih preparata za poboljšanje varenja. Gorki glikozidi iz ove vrste pokazuju holagogno i hepatoprotektivno dejstvo, dok je za antiinflamatorno dejstvo odgovorna loganinska kiselina⁷⁸.

*Gentianae scabrae radix*⁷⁹, *Gentianae lutea radix*, *Gentianae macrophylla radix* su biljne sirovine koje se godinama koriste u Japanu za razne stomadne probleme, a izuzetno su bogate sekoiridoidnim jedinjenjima⁸⁰.

Tradicionalne kineske lekovite vrste *G. macrophylla*⁸¹ i *G. algida*⁸² se od davnina koriste u lečenju hepatitisa, konstipacije, reume (koren *G. macrophylla*) i pneumonije (cela biljka vrste *G. algida*). Fitohemijska istraživanja su pokazala da su ove biljke bogate sadržajem sekoiridoida, acil-sekoiridoida i aromatičnih kiselina. Sekoiridoid kurarinon izolovan iz *G. macrophylla* inhibitorno deluje na rast humane patogene gljivice *Candida albicans*⁸¹.

Sekoiridoidni glukozidi sverciamarin i sverozid, koji su izolovani iz mnogih vrsta rodova *Gentiana* i *Swertia*, pokazuju antibakterijsku aktivnost na sledeće bakterijske sojeve: *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Citrobacter freundii* i *Escherichia coli*⁸³. Dok sverciamarin pokazuje aktivnost protiv *Proteus mirabilis* i *Serratia marcescens*, sverozid inhibira rast *Staphylococcus epidermidis*.

Za razliku od sverciamarina i sverozida, za genciopikrin je karakteristično da pokazuje antifugalno dejstvo na gljivicu *Penicillium expansum*, ali samo u prisustvu enzima β -glukozidaze⁸⁴. Ovo nije neuobičajena osobina. Mnogi glikozidi su aktivni samo u prisustvu njihove specifične glikozidaze koja raskida šećernu komponentu, što znači da su aglikoni odgovorni za biološku aktivnost.

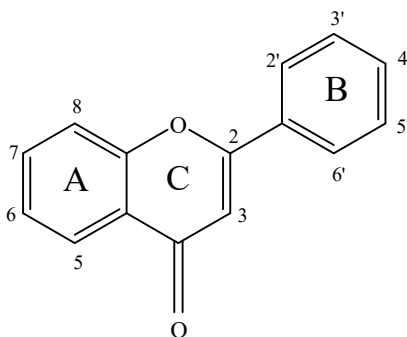
Za genciopikrin je pokazano da je glavna spazmolitička komponenta u metanolnom ekstraktu vrste *G. spathacea*⁸⁵. Utvrđeno je da genciopikrin iz ove vrste inhibira spontane kontrakcije glatke muskulature tankog creva kod zamoraca. Takođe, ovaj monoterpenski glukozid blokira kontrakcije izazvane histaminom, acetilholinom, BaCl_2 i KCl , što ukazuje da ovo jedinjenje ometa influks kalcijuma u ćelije glatkih mišića.

1.2.3. Flavonoidi

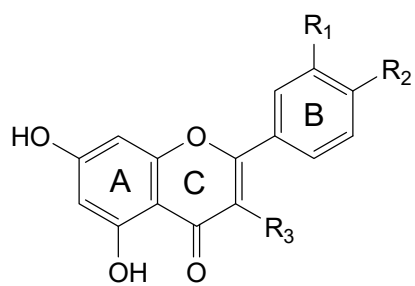
Da bi bile sposobne da efikasno odgovore na konstantne promene u okolini koja ih okružuje, biljke koriste svoje ogromne metaboličke kapacitete za produkciju velikog broja različitih sekundarnih metabolita. Primarni biosintetski putevi ostaju očuvani u biljnim klasama tako da je broj osnovnih skeleta ograničen. Oni se potom modifikuju nizom specifičnih reakcija pri čemu nastaju brojni sekundarni metaboliti.

Flavonoidi predstavljaju veliku grupu polifenolnih sekundarnih metabolita koja je široko rasprostranjena u biljnom carstvu od mahovina do angiospermi. Ima ih u listovima, semenima, cvetovima, kori stabla, i igraju važnu ulogu u različitim biološkim procesima. Pored uloge pigmenta u cvetovima i plodovima, flavonoidi predstavljaju atraktante za insekte, učestvuju u fertilizaciji i odbrani biljke od različitih bolesti, uključeni su u UV zaštitu⁸⁶.

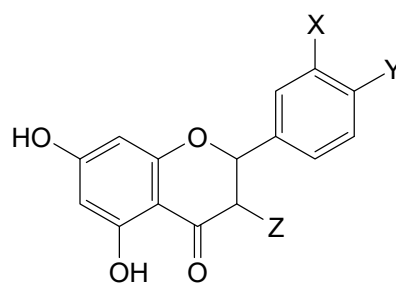
Do danas je opisano više od 8000 različitih flavonoida i taj broj je još uvek u porastu⁸⁷. Po definiciji, svi oni sadrže isti osnovni skelet, flavan nukleus, koji se sastoji od dva aromatična prstena sa po 6 ugljenikovih atoma (prsten A i B) koji su međusobno povezani preko heterocikla koji sadrži 3 C atoma (prsten C).



U zavisnosti od stepena oksidacije i poretka supstitucije centralnog C prstena, flavonoidi se mogu podeliti u različite grupe kao što su: flavanoni, izoflavoni, flavoni, flavonoli, flavanoli i antocijanini. U okviru svake grupe, jedinjenja se međusobno razlikuju u poretku supstitucije u prstenu A i B. Velika raznolikost u flavonoidnoj strukturi nastaje i kao posledica modifikacija u osnovnom skeletu pod uticajem enzima glikozil-transferaze, metil-transferaze i acil-transferaze.

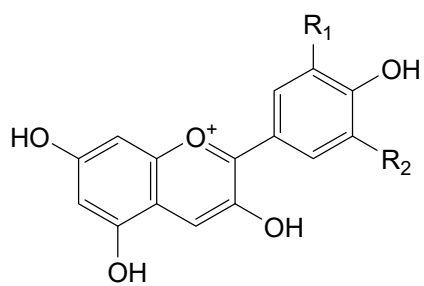


Flavonol i flavon

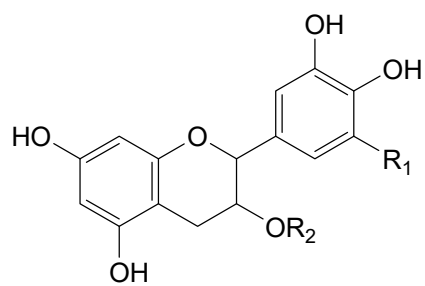


Flavanon

flavonol	R₁	R₂	R₃
Kvercetin	OH	OH	OH
kempferol	H	OH	OH
Galangin	H	H	OH
flavon	R₁	R₂	R₃
Luteolin	OH	OH	H
Apigenin	H	OH	H
Hrisin	H	H	H
flavanon	X	Y	Z
Taksifolin	OH	OH	OH
Hesperetin	OH	OCH ₃	H
naringenin	H	OH	H



Antocijanidin



Flavanol

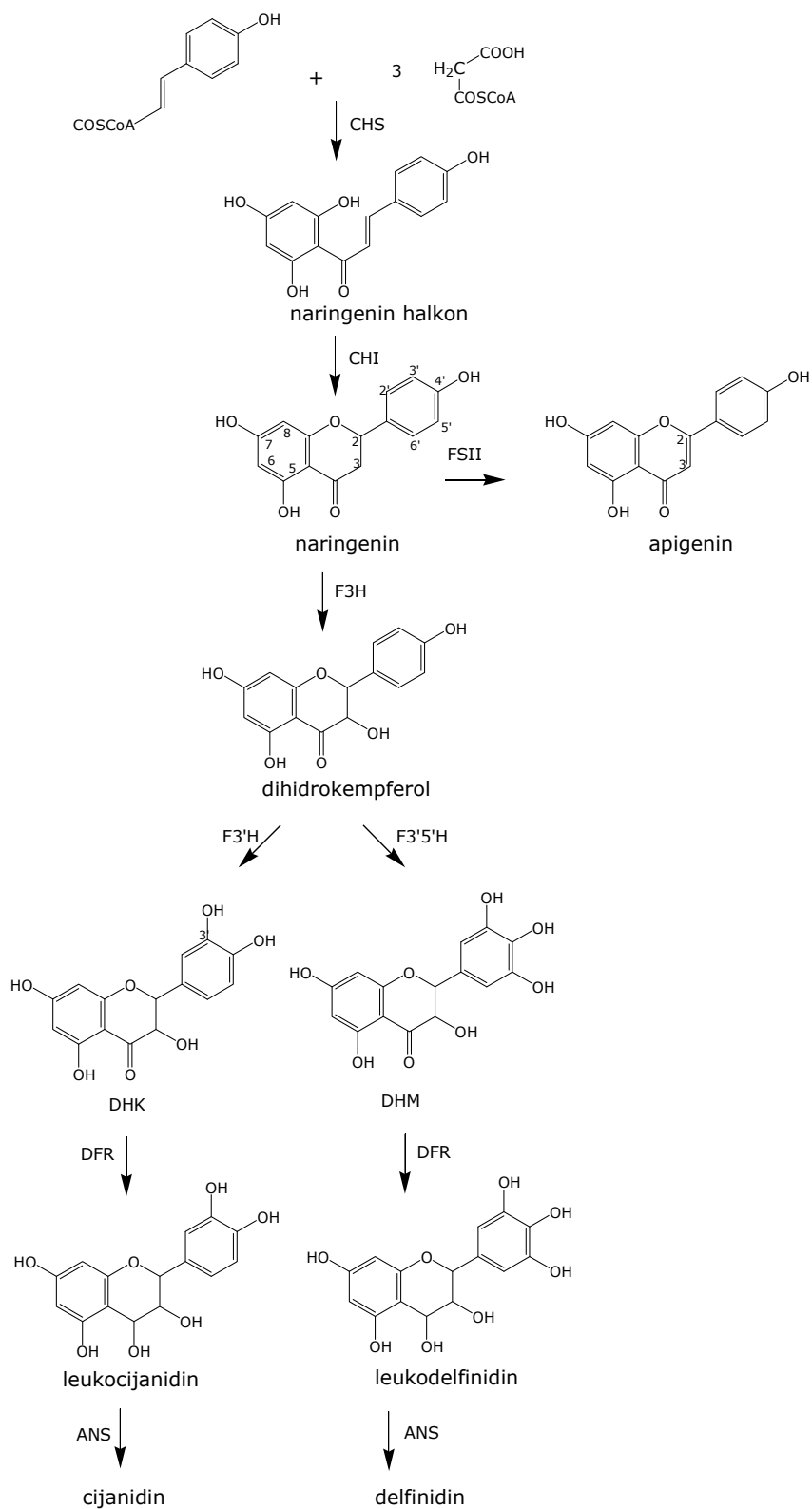
antocijanidin	R₁	R₂
Delfinidin	OH	OH
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃
Cijanidin	OH	H
Pelargonidin	H	H
flavanol	R₁	R₂
Katehin	H	H
Epikatehin	H	H
Epikatehin-3-galat	OH	H

1.2.3.1. Biosinteza flavonoida

Prekursori u biosintezi većine flavonoida su malonil CoA i *p*-kumaroil-CoA⁸⁸. Prvi ključni korak u biosintezi je kondenzacija *p*-kumaroil-CoA sa 3 molekula malonil CoA, koja je katalizovana enzimom halkon-sintazom (CHS), pri čemu nastaje naringenin halkon. Pod uticajem enzima halkon-izomeraze (CHI), naringenin halkon se stereospecifično ciklizuje i nastaje flavanon naringenin. Hidroksilacijom flavanona u položaju C-3 u prisustvu enzima flavanon 3-hidroksilaze (F3H) nastaje dihidrokempferol koji dalje može biti hidroksilovan ili u položaju 3' ili u oba položaja 3' i 5' (B prsten).

Dihidrokvercetin (DHK) je proizvod hidroksilacije u položaju 3' koju katalizuje enzim flavonoid 3'-hidroksilaza (F3'H). Sledeći korak je hidroksilacija u položajima 3' i 5' koju katalizuje flavonoid 3',5'-hidroksilaza (F3',5'H) koja je odgovorna i za konverziju DHK u dihidromiricetin (DHM), jedinjenje neophodno u sintezi delfinidina. Enzim dihidroflavonol-4-reduktaza (DFR) katalizuje stereospecifičnu redukciju dihidroflavanola, preko intermedijera leukocijanidina, do antocijanina. Za vrste roda *Gentiana*, odnosno, za jedinstveno plavu boju njihovih cvetova, od velikog značaja je enzim antocijanidin sintaza (ANS), koji prevodi bezbojni leukocijanidin u obojeni antocijanidin i leukodelfinidin u plavo obojeni delfinidin. Skoro svi antocijanini dalje podležu različitim modifikacijama kao što su glikozilacija i acilacija u prisustvu enzima UDP-glukozid: flavonoid 3-O-glukoziltransferaza (3GT) i UDP-glukozid:3'-O-glukoziltransferaza (3'GT). Ove reakcije modifikuju antocijanin sa dve aromatične acil grupe stvarajući genciodelfinidin – jedinjenje koje daje upečatljivo plavu boju cvetovima⁸⁹.

Na drugoj strani biosintetskog puta za koji je ključan enzim flavon sintaza II (FSII), dolazi do uvođenja dvostruke veze između C-2 i C-3, pri čemu od flavanona naringenina nastaje flavon apigenin⁸⁸. Biohemijskim istraživanjima FSII je identifikovana kao mikrozomalna citohrom P₄₅₀ monooksigenaza⁹⁰.



Slika 28: Biosintetski put flavonoida

1.2.3.2. Biološka svojstva flavonoida

Reaktivne kiseonične vrste (ROS): superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot -}$), peroksid jon (O_2^{2-}) i hidroksil radikal (OH^{\cdot}), promenom oksidativnog balansa u ćeliji prouzrokuju oštećenja na makromolekulima kao što su proteini, DNK i lipidi⁹¹. Na ovaj način ROS su direktno ili indirektno uključene u nastanak i razvoj mnogih bolesti – kancera, srčanih oboljenja, moždanih disfunkcija, kao i procesa starenja^{92,93}. Zbog svega toga, zaštita organizma od oksidativnih oštećenja ima veliki značaj. Pored endogenih odbrambenih antioksidanata (peroksidaze, katalaze, superoksid dismutaze) koji održavaju ćelijsku homeostazu, važni su i egzogeni antioksidanti⁸⁷. Ova jedinjenja pripadaju biljnim polifenolima, široko su rasprostranjeni u biljkama, vrlo često u visokim koncentracijama, a uključuju fenole, fenolne kiseline, flavonoide, tanine i lignane.

Decenijama unazad, flavonoidi kao što su flavoni, flavonoli i izoflavoni, su predmet brojnih istraživanja zbog svojih potencijalnih hemopreventivnih osobina. Najčešće proučavani flavonoidi su kvercetin, luteolin, kempferol, apigenin i genistein⁹⁴. Rezultati mnogih ispitivanja pokazuju da flavonoidi mogu da deluju kao antioksidanti i kao "čistači" slobodnih radikala. Sklonost flavonoida da ispoljavaju antioksidativne efekte su pripisane prvenstveno njihovoj hemijskoj strukturi i sposobnosti da budu donatori elektrona. Za antiradikalnu aktivnost esencijalno je prisustvo *orto* dihidroksi strukture u B prstenu i C-2 – C-3 dvostruke veze konjugovane sa karbonilnom grupom na C-4 atomu u C prstenu^{95,96}. *In vitro* proučavanja su pokazala da su brojni flavonoidi mnogo efikasniji antioksidanti od vitamina E i C. Tako na primer, flavonol kvercetin pokazuje pet puta veću totalnu antioksidativnost od vitamina E i C mereno u odnosu na trolox ekvivalent⁹⁷.

Pored antioksidativne aktivnosti flavonoidi pokazuju inhibitorno dejstvo na enzime koji su odgovorni za nastanak reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) kao što su ciklooksigenaze, lipooksigenaze, monooksigenaze, glutation S-transferaze⁸⁷. Takođe, flavonoidi inhibiraju i ksantin oksidaze⁹⁸ i protein kinaze C koje su uključene u produkciju superoksid anjona⁹⁹.

U novije vreme veliki broj istraživanja je usmeren na određivanje zavisnosti strukture flavonoida i njihove aktivnosti. U ispitivanju sposobnosti flavonoida da inhibiraju ključne enzime u mitohondrijalnoj respiraciji došlo se do zaključka da su: C-2 – C-3 dvostruka veza, C-4 keto grupa i 3',4',5'- trihidroksi supstitucija u B prstenu, izuzetno bitne odlike da bi flavonoid pokazao jako inhibitorno dejstvo na NADH-oksidge¹⁰⁰.

Polihidroksi supstituisani flavonoidi imaju izraženu anti-lipoperoksidantnu aktivnost na mitohondrijalnoj membrani, ali isto tako i veliku sposobnost da utiču na mitohondrijalnu respiraciju¹⁰¹. Ovi flavonoidi takođe pokazuju i visoku prooksidantnu aktivnost. Pokazano je da isti flavonoidi mogu da se ponašaju kao antioksidanti i kao prooksidanti u zavisnosti od koncentracije i izvora slobodnih radikala. U prisustvu Cu^{2+} jona, flavonoidi koji inače predstavljaju zaštitu od peroksil i hidrosil radikala, ponašaju se kao prooksidanti¹⁰². Međutim, ova bakrom inicirana prooksidantna aktivnost flavonoida nema veliki značaj *in vivo* gde su joni bakra u velikoj meri izolovani od okolne fiziološke sredine. Sa druge strane, prisustvo dvovalentnog gvožđa može da ubrza prooksidantne efekte *in vivo*, ali helirajuće dejstvo flavonoida teoretski može da modifikuje ovaj proces. Visoke koncentracije askorbata smanjuju flavonoidima izazvano stvaranje ROS-a u *in vitro* uslovima, tako da se smatra da vitamin C može da promeni prooksidantnu sklonost flavonoida *in vivo*.

Neki 7-hidroksi flavoni deluju inhibitorno na ksantin oksidazu⁹⁸. Preciznije, pokazano je da jedinjenja sa takvom strukturom mogu da budu kompetitivni inhibitori ksantin oksidaze jer C-7 OH grupa flavona može da zauzme mesto C-2 ili C-6 OH grupi ksantina u aktivnom mestu enzima. Sa druge strane C-4' OH ili C-4' OMe supstitucija u 7-hidroksi flavonu nije strukturno pogodna i ne uklapa se u aktivno mesto, tako da nema inhibitorno dejstvo.

Pored antioksidativne aktivnosti, flavonoidi pokazuju i antidijabetske efekte¹⁰³. Istraživanja koja su rađena na pacovima su pokazala, da iako kvercetin nema efekat na nivo glukoze u plazmi normalnih životinja, značajno smanjuje nivo glukoze u plazmi životinja kod kojih je dijabetes izazvan streptozocinom. Pretpostavka je da kvercetin utiče na regeneraciju pankreasnih ostrvaca i najverovatnije povećava oslobađanje insulina kod pacova sa streptozocin indukovanim dijabetesom.

Najnovija istraživanja pokazuju da kvercetin može da interaguje sa ćelijskim membranama i da menja njihove strukturne i dinamičke osobine¹⁰⁴. Integrisanjem u membranu, kvercetin dovodi do promena u rasporedu molekula u lipidnom matriksu što ima za posledicu promenjenu fluidnost membrane. Na taj način ovaj flavonoid može da indukuje ili da inhibira membranski zavisne regulatorne mehanizme.

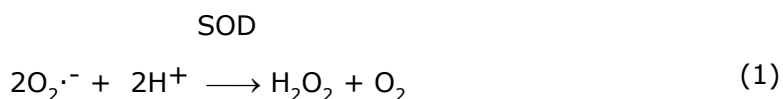
Flavonoidi poseduju i antiinflamatornu aktivnost zahvaljujući sposobnosti da inhibiraju ključna mesta u metabolizmu arahidonske kiseline: ciklooksigenazu i/ili 5-lipooksigenazu¹⁰⁰. U ispitivanjima na leukocitima pacova pronađeno je da glavni flavonoidi iz vrste *Tanacetum parthenium* inhibiraju oba enzima sa sličnim potencijalom. Novija ispitivanja na različitim inflamatornim modelima su pokazala

da je rutin efikasan u hroničnim procesima kao što je artritis, dok su flavanoni hesperidin i hesperetin jedinjenja koja su efektivna kod neurogenih inflamacija izazvanih ksilenom i najefikasniji su u subhroničnim procesima¹⁰⁵.

Svi ovi podaci opravdavaju neprekidno interesovanje savremene nauke za biološke aktivnosti flavonoida, za njihovu raznolikost u pogledu hemijske strukture i farmakoloških dejstava, kao i za pojavu velikog broja preventivnih preparata na bazi flavonoida.

1.3. Reaktivne kiseonične vrste i sistem zaštite od oksidacionih oštećenja

Tokom respiracije jednoelektronskom redukcijom molekuskog kiseonika, kod aerobnih organizama dolazi do stvaranja superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$). Nastali $O_2^{\cdot-}$ je reaktivniji od molekuskog kiseonika i nizom lančanih radikalskih reakcija može dovesti do oksidacionih oštećenja. Zaštita u ćeliji je obezbeđena prisustvom grupe enzima – superoksid-dismutaze (SOD)(EC 1.15.1.1.), koji katalizuju reakciju prevođenja $O_2^{\cdot-}$ do vodonik-peroksida i molekuskog kiseonika (1)¹⁰⁶.

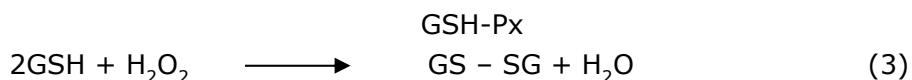


U zavisnosti od metala koji sadrže u aktivnom centru molekula, SOD se dele na: bakar, cink sadržavajuću (Cu,Zn SOD ili SOD-1), mangan sadržavajuću (Mn SOD), gvožđe sadržavajuću (Fe SOD) i ekstracelularnu (Ec SOD) koja sadrži Cu i Zn ali ima drugačiju aminokiselinsku sekvencu od SOD-1.

Vodonik-peroksid (nastao dismutacijom superoksid radikala) je jak oksidacioni agens, pa se enzimski razgrađuje dejstvom katalaze (CAT)(E.C. 1.11.1.6.) (2)¹⁰⁷.



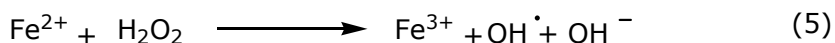
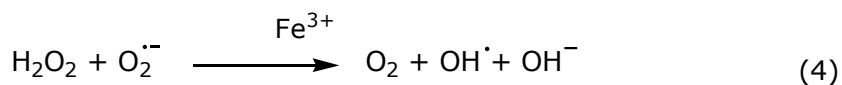
Pri nižim koncentracijama nastali vodonik peroksid uklanja glutation peroksidaza (GSH-Px)(EC 1.11.1.9.) koja sadrži selen u aktivnom centru¹⁰⁸. Reakcija je zavisna od glutationa (GSH):



Glutation-S-transferaza (GST)(EC 2.5.1.18) je multi funkcionalan enzim i ima tri osnovne funkcije:

- omogućava detoksikaciju mnogih endogenih supstanci, ksenobiotika, kao i metabolita nastalih u oksidacionom metabolizmu
- ima ulogu vezujućeg proteina, vezujući se za organske anjone, steroide, steroidne metabolite, razne lekove. Osnovna funkcija ovog reverzibilno vezujućeg fenomena je olakšan imtraćelijski transport povećanjem njihove rastvorljivosti u vodi, što predstavlja funkcionalan ekvivalent ekstraćelijskom albuminu.
- Ima mogućnost kovalentnog vezivanja sa karcinogenima i drugim potencijalno štetnim molekulima.

Ovakav način zaštite od oksidacionih oštećenja je efikasan i predstavlja prvu liniju odbrane. Međutim, Fentonovom reakcijom¹⁰⁹ (5) i/ili Haber-Weiss-ovom¹¹⁰ (4) može doći do nastajanja hidroksil radikala ($\cdot\text{OH}$) za koji ne postoji adekvatna enzimaska zaštita. Za njegovo uklanjanje je odgovorna askorbinska kiselina (AsA) u hidrosolu, i vitamin E u lipofilnim odeljcima, koji dominantno zaustavlja lančane radikalske reakcije u membranama i sprečava nastajanje lipidnih peroksida. Sa ovih osam antioksidativnih komponenti (iako broj molekula antioksidativne uloge nije time konačan) postiže se adekvatna zaštita na nivou bazalnog metabolizma i smanjuje se mogućnost nastajanja ćelijskih povreda.



Slobodno-radikalska teorija starenja

Kao što je već pomenuto, reaktivne vrste kiseonika uzrokuju nastanak oksidativnih oštećenja u ćelijama. Kako je njihovo nastajanje stalan proces i kako je prisutan u svim organizmima, nastanak i akumulacija oksidativnih oštećenja se smatra generalnim uzrokom starenja i smrti, a formuliše se kao slobodno-radikalska teorija starenja¹¹¹. Ova teorija pretpostavlja da su slobodno radikalske reakcije zajednički uzrok starenju tj. da su one uključene u stvaranje starosnih promena zajedno sa faktorima sredine, bolestima i unutrašnjim procesom starenja. Starenje se, prema toj teoriji, definiše kao akumulacija degenerativnih promena odgovornih za izmene koje prate odmakle godine i njima pridruženo progresivno povećanje verovatnoće nastajanja bolesti i smrti¹¹². Proces starenja su mali u početku života, ali brzo rastu sa starošću usled eksponencijalne prirode slobodno-radikalskih procesa¹¹³.

1.4. Hemotaksonomija

Za biljne vrste porodice Gentianaceae, kao što je već pomenuto, karakteristično je prisustvo iridoida, flavonoida i ksantona. Ispitivanja u cilju određivanja hemotaksonomskog značaja ovih jedinjenja pokazala su da je, što se iridoida tiče, biosintetski put koji vodi od sverozida do sverciamarina i genciopikrina, univerzalan u okviru porodice Gentianaceae⁷⁴. Najmanje je jedno od ovih jedinjenja ili njihovih derivata, pronađeno u gotovo svim ispitivanim vrstama.

Kad su u pitanju ksantoni, kod viših biljaka postoji korelacija između pozicije supstituenata u ksantonskom jezgru i pripadnosti biljne vrste određenoj porodici, rodu ili sekciji. Poredak supstitucije ksantona je uniforman u okviru određene sekcije što je od velikog značaja za hemotaksonomiju¹¹⁴. Danas je najdetaljnije izučena distribucija ksantona u porodici Gentianaceae. Ksantoni, za razliku od iridoida, nisu prisutni u svim vrstama ove porodice. Identifikovano je preko 100 različitih ksantona iz 110 vrsta i 20 rodova. U osnovi, značaj ksantona kao hemotaksonomskih markera je ograničen na rodove *Swertia*, *Gentiana*, *Gentianella* i *Centaurium*⁷⁴, u kojima se ova jedinjenja sreću veoma često.

U okviru roda *Gentiana* istraživanja ksantonskih jedinjenja u sekcijama *Gentiana*, *Pneumonanthe*, *Megalanthe* i *Calathianeae*¹⁶ su pokazala da se biljne vrste sekcije *Gentiana* odlikuju prisustvom 1,3,7- trisupstituisanih ksantona, da sekciju *Pneumonanthe* karakteriše prisustvo ksantonskog-C-glukozida mangiferina, dok se ksantonski heterozidi sa 1,3,7,8- poretком supstitucije javljaju samo kod vrsta sekcija *Calathianeae* i *Megalanthe* i kod *Gentianella ciliata* (*Crossopetalum*).

Za razliku od C-glukozida (najzastupljeniji mangiferin) koji su široko rasprostranjeni u angiospermama pa zbog toga nemaju hemotaksonomski značaj, ksantonski O-glikozidi su značajni hemotaksonomski markeri, posebno za rod *Gentiana*, gde se najčešće javljaju. Tako na primer za sekciju *Calathianeae* je karakteristično da preovlađuju ksantonski 1-O-primverozidi, dok su ksantonski 3-O- i 7-O-primverozidi prisutni u vrstama sekcije *Megalanthe*.

Od flavonskih C-glukozida u rodu *Gentiana* najprisutniji su izoorijentini i izoviteksin¹¹⁵ za razliku od roda *Gentianella* gde je izoviteksin zamenjen svertizinom.

U slučaju ugljenih hidrata, odnosno šećernih jedinica koje su vezane za ksantonsko jezgro, u rodu *Gentiana* su prisutne glukoza i fruktoza od monosaharida; primveroza, genciobioza i rutinoza od disaharida i gencianoza od

trisaharida. Smatra se da su ksantonski glukozidi, koji su karakteristični za rod *Gentianella*, evolutivno napredniji u odnosu na ksantonske primverozide koji se javljaju u rodovima *Gentiana* i *Swertia*³¹.

U novije vreme, na osnovu tipa ksantona i poretka supstitucije, rodovi familije Gentianaceae su svrstani u 4 grupe⁷⁴:

I grupa – obuhvata rodove koji sadrže biosintetski primitivne ksantone (tri-supstituisane ksantone) i/ili 1,3,7,8-tetra-supstituisane ksantone. To su: *Anthlocleista*, *Blackstonia*, *Gentianopsis*, *Macrocarpaea* i *Orphium*.

II grupa – rodovi u kojima su prisutni ksantoni sa srednjim (intermedijernim) stepenom biosintetskog napretka (1,3,7,8- i 1,3,5,8-tetra-supstituisani ksantoni) – *Comastoma*, *Gentiana*, *Gentianella*, *Lomatogonium*, *Swertia* i *Tripterospermum*.

III grupa – obuhvata rodove *Frasera*, *Halenia* i *Veratrilla* koji sadrže biosintetski naprednije ksantone (tetra- i penta-supstituisane) čiji su prekursori ksantoni iz II grupe

IV grupa – su rodovi koji su se specijalizovali za produkciju heksa-supstituisanih ksantona – *Canscora*, *Centaurium*, *Chironia*, *Eustoma*, *Hoppea* i *Ixhantus*

NAŠI RADOVI

2.1. CILJ RADA

U flori naših planinskih prostora rod *Gentiana* je zastupljen sa 11 vrsta koje su hemijski nedovoljno istražene. U radu su ispitivane: *G. dinarica*, *G. kochiana*, *G. utriculosa*, *G. lutea*, *G. pneumonanthe*, *G. asclepiadea*, *G. verna* i *G. tergestina*. Do sada, na ovim vrstama nije bila primenjena potpunija fitohemijska analiza. Stoga je osnovni cilj ovog rada ispitivanje pomenutih vrsta u svetlu njihovih hemijskih, bioloških i farmakoloških osobenosti.

Svim eksperimentalnim radovima u laboratoriji prethodila su terenska istraživanja koja obuhvataju pronalaženje biljnih vrsta i prikupljanje biljnog materijala na planinama. Tako su otkrivena prirodna staništa reliktno-endemične dinarsko-apeinske vrste, *G. dinarica* koja do sada nije pronađena u Srbiji. Po literaturnim podacima ova vrsta nije fitohemijski proučavana i sa tog aspekta je nepoznata. Jedini podaci koji se mogu naći u literaturi su vezani za citogenetička istraživanja koja ovu vrstu jasno diferenciraju od vrste *G. acaulis* (syn. *G. kochiana*) sa kojom je često zamenjivana zbog morfološke sličnosti i pogrešne determinacije¹¹⁶. Zato je jedan od glavnih ciljeva ovog rada bio i detaljno ispitivanje njenog hemijskog sastava.

Sekundarni metaboliti koje proizvode vrste roda *Gentiana* pripadaju grupi sekoiridoida, flavonoida i ksantona. Kako savremena istraživanja pokazuju, ksantoni kao sekundarni metaboliti biljaka poseduju različita farmakološka dejstva. Ispitivanja koja se danas izvode na polju prirodnih ksantona imaju veliku važnost na planu iznalaženja novih lekovitih preparata. Zbog toga je značajan cilj ovog rada izolovanje sekundarnih metabolita iz prikupljenog biljnog materijala, sa posebnim osvrtom na ksantonska jedinjenja. Posebna pažnja je posvećena određivanju strukture izolovanih jedinjenja savremenim instrumentalnim tehnikama.

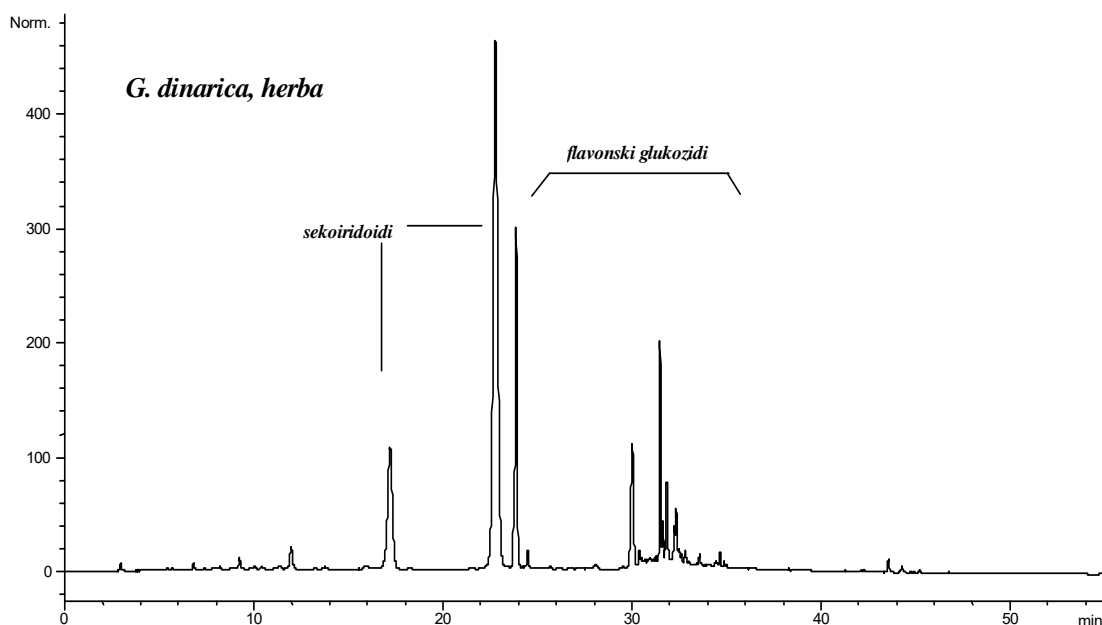
Pored analize sekundarnih metabolita, istraživanja u ovom radu su usmerena i na ispitivanje potencijalnih bioloških efekata izolovanih jedinjenja kao što su antiradikalska i antimikrobna aktivnost.

Još jedan od važnih ciljeva fitohemijskog istraživanja roda *Gentiana* je doprinos kompletiranju farmakognosijskih izučavanja familije Gentianaceae u Srbiji.

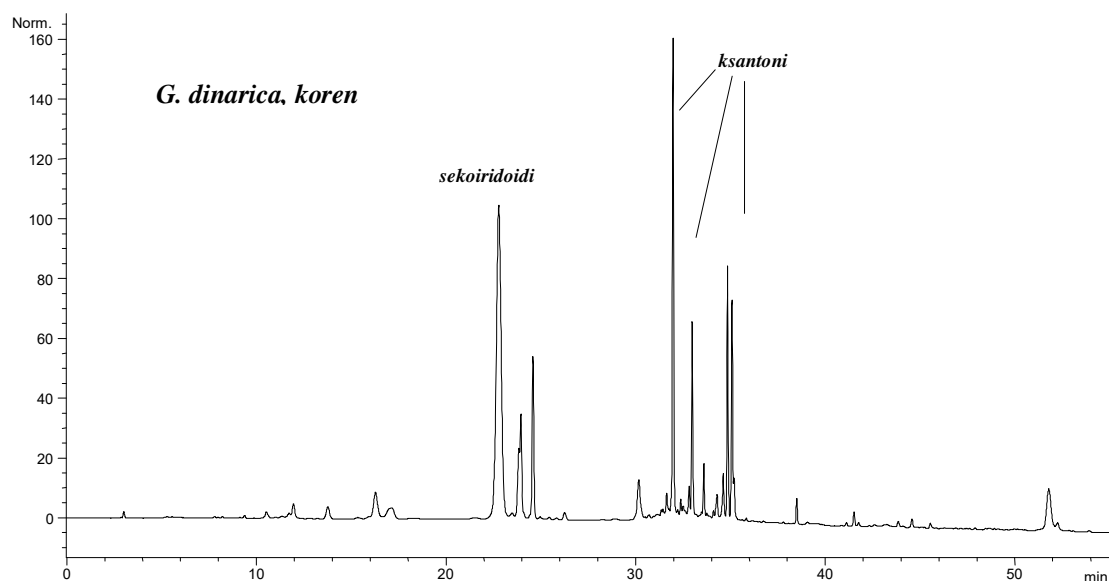
2.2. Analiza hemijskog sastava vrste *Gentiana dinarica*

G. dinarica je reliktno-endemična vrsta koja je do sada u Srbiji (prema Flori Srbije¹) konstatovana samo na Kosovu. U toku terenskih istraživanja na teritoriji nacionalnog parka "Tara" i njegovog zaleđa, u toku leta 2000. i 2001. godine, konstatovana je na dva nova lokaliteta - Zvezda (1230 m) i Veliki Kraj (1330 m), gde je i sakupljen biljni materijal za analizu.

Posle sušenja, nadzemni delovi biljaka su odvojeni od korena, samleveni i ekstrahovani metanolom. HPLC metodom je urađena preliminarna analiza hemijskog sastava ovih početnih ekstrakata. Na osnovu retencionih vremena i karakterističnih UV spektara komponenti, utvrđeno je da su u nadzemnim delovima prisutna skoiridoidna jedinjenja i flavonoidi (flavonski glukozidi), dok je koren bogat ksantonima. Slika 29 prikazuje hromatograme metanolnih ekstrakata nadzemnog dela i korena vrste *G. dinarica*.



Slika 29: Hromatogram metanolnog ekstrakata nadzemnog dela vrste *G. dinarica*



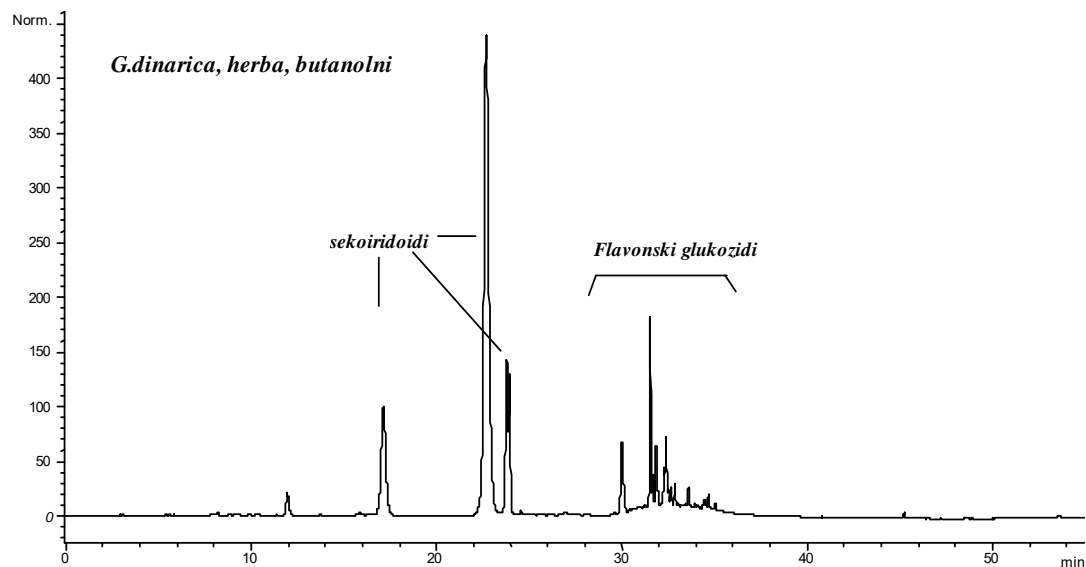
Slika 30: Hromatogram metanolnog ekstrakata korena vrste *G. dinarica*

Pošto nema literaturnih podataka o detaljnijoj fitohemijskoj analizi biljne vrste *G. dinarica*, jedan od glavnih ciljeva ovog rada bila je izolacija i identifikacija aktivnih komponenti.

2.2.1. Hemijska analiza nadzemnog dela

Sirovi metanolni ekstrakt (poglavlje 3.2.1.) nadzemnog dela vrste *G. dinarica* je rastvoren u vodi, a potom reekstrahovan rastvaračima rastuće polarosti: etrom, etil-acetatom i *n*-butanolom. Dobijeni ekstrakti su upareni. HPLC analiza je pokazala da svi ekstrakti sadrže iste sekoiridoide i flavonske glukozide samo u različitim koncentracijama. Najveći sadržaj ovih komponenti detektovan je u butanolnom ekstraktu.

Slika 31 prikazuje hromatogram butanolnog ekstrakta.

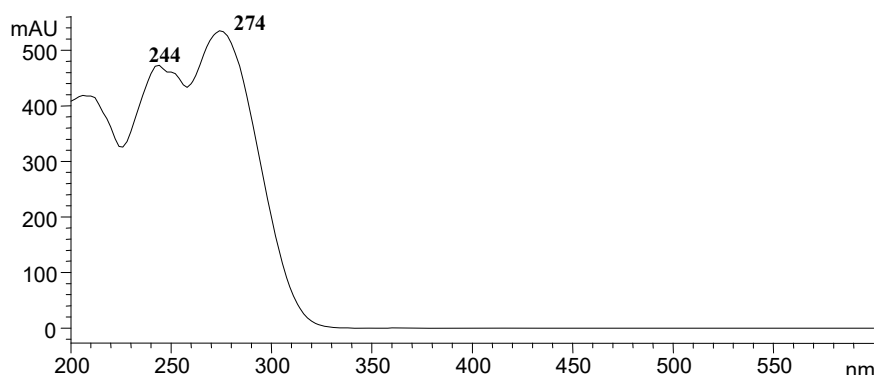


Slika 31: Hromatogram butanolnog ekstrakta nadzemnog dela *G. dinarica*

Da bi se razdvojili sekoiridoidi i flavonoidi, butanolni ekstrakt je frakcionisan "dry-column flash" hromatografijom na silika gelu, pri čemu je za eluiranje korišćena smeša CH_2Cl_2 – MeOH (poglavlje 3.2.1.) Dobijene frakcije su potom dalje rehromatografisane pri čemu su izolovana tri jedinjenja: genciopikrin (1), sverciamarin (2) i izoorijentin-4'-*O*-glukozid (3).

2.2.1.1. GENCIPIKRIN (1)

Rehromatografijom na koloni silika gela iz frakcije 39-41 (poglavlje 3.2.1.1.1.) izolovano je sekoiridoidno jedinjenje (1), čija je struktura određena spektroskopskim metodama. Na slici 32 je prikazan UV spektar ovog jedinjenja sa karakterističnim apsorpcionim maksimumima na 244 i 274 nm, a u Tabeli 4 su dati spektralni podaci.



Slika 32: UV spektar genciopikrina u MeOH ($\lambda = 260$ nm, $R_t = 21,6$ min)

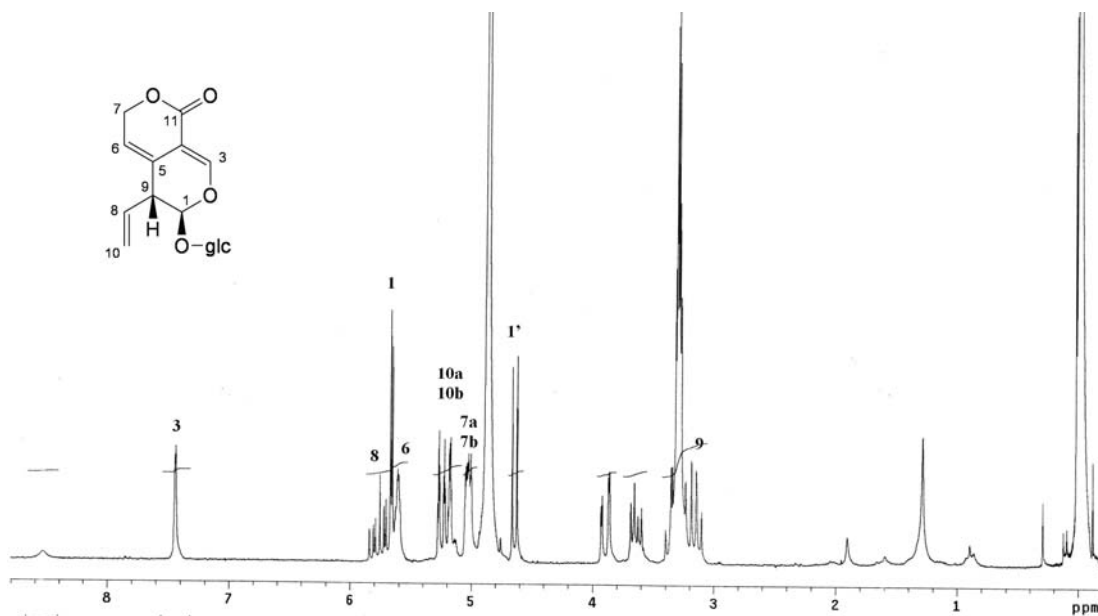
U ^1H NMR spektru genciopikrina (Slika 33) na δ 7,44 uočava se dublet vinilnog protona H-3 sa daljinskom konstantom sprežanja $^5J = 1$ Hz. Vinilni proton H-8 daje trostruki dublet zbog vicinalnih sprežanja sa H-10a ($^3J_{\text{trans}} = 17,2$ Hz), H-10b ($^3J_{\text{cis}} = 10,4$ Hz) i H-9 ($^3J_{8,9} = 6,8$ Hz). Na δ 5,63 nalazi se dublet protona H-1 ($^3J = 2,8$ Hz). Signal anomernog protona H-1' je takođe dublet na 4,64 ppm sa vicinalnom konstantom sprežanja $^3J_{1,1'} = 7,8$ Hz, karakterističnom za *O*-glikozidno vezani šećer. Signali alilnog protona H-9, vinilnih protona H-10a,10b i protona metilenske grupe H-7a i H-7b su multipleti.

U CI masenom spektru na m/z 357 uočava se molekulski jon $[\text{M}+\text{H}]^+$ koji odgovara molekularnoj masi genciopikrina od 356. Podaci u ^1H NMR spektru su u skladu sa podacima iz literature za genciopikrin^{117, 118, 119, 120}

Tabela 4: ^1H NMR (200MHz) genciopikrina u CD_3OD

H	δ_{H} , mult., J (Hz)
1	5,63 d (2,8)
3	7,44 d (1)
6	5,61 m
7a	5,03 m
7b	4,93 m
8	5,77 ddd (17,2; 10,4; 6,8)
9	3,14 m
10a	5,22 m
10b	5,19 m
Glc	
1'	4,64 d (7,8)
2'*	3,20
3', 4'*	3,30-3,40 m
5'	3,45 m
6'a	3,89 dd (12,0; 2,0)
6'b	3,64 dd (11,8; 5,6)

*Signali su preklapljeni

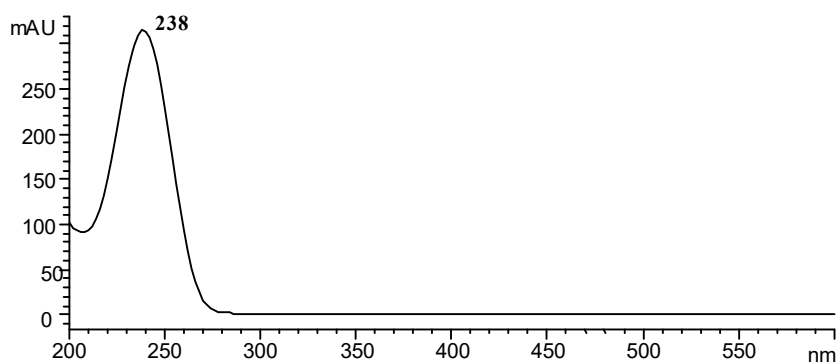
Slika 33: ^1H NMR (CD_3OD) spektar genciopikrina

Genciopikrin:

5-etenil-6-(β -D-glukopiranozil-oksi)-5,6-dihidro-1H,3H-pirano[3,4-c]piran-1-on je ranije izolovan iz vrste *Gentiana asclepiadea*¹¹⁷ i *G. scabra*.⁸⁰

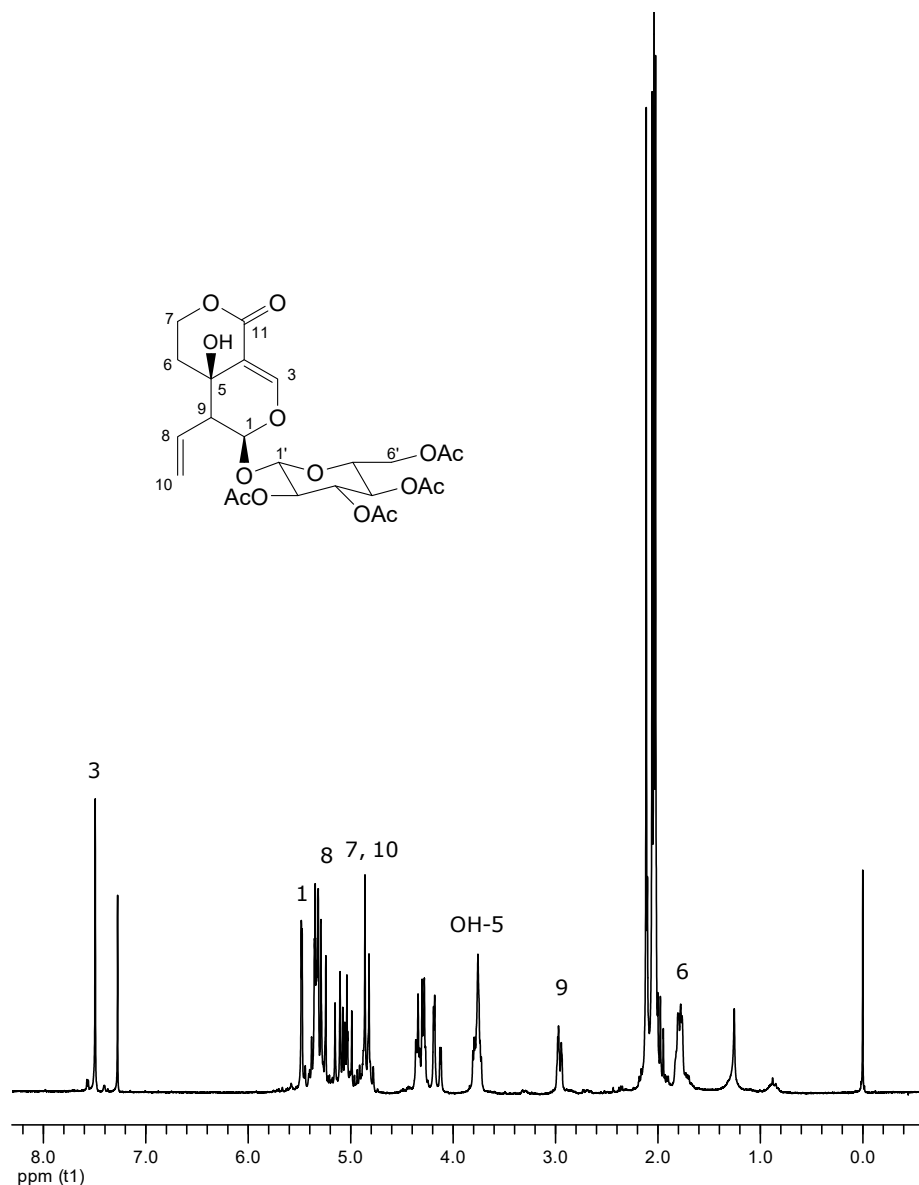
2.2.1.2. SVERCIAMARIN (2)

Ovo je drugi sekoiridoid izolovan rehromatografijom iz frakcije 17-30. Njegova struktura je određena spektroskopskim metodama.



Slika 34: UV spekter sverciamarina u MeOH ($\lambda = 260$ nm, Rt =17,1 min)

Snimljeni H^1 NMR i MS spektri su ukazivali na strukturu sverciamarina, ali zbog nedostatka literaturnih podataka za protonski NMR spekter, struktura sverciamarina nije potvrđena, pa je sverciamarin derivatizovan acetilovanjem. Ovo je klasična metoda strukturne analize koja obuhvata hemijsku transformaciju izolovanog jedinjenja u cilju dobijanja derivata sa već poznatom strukturom. Acetilovane su sve -OH grupe na šećernoj komponenti (poglavlje 3.2.1.1.1.) sverciamarina, pri čemu je dobijen tetraacetil-sverciamarin za koga postoje spektralni podaci u literaturi.

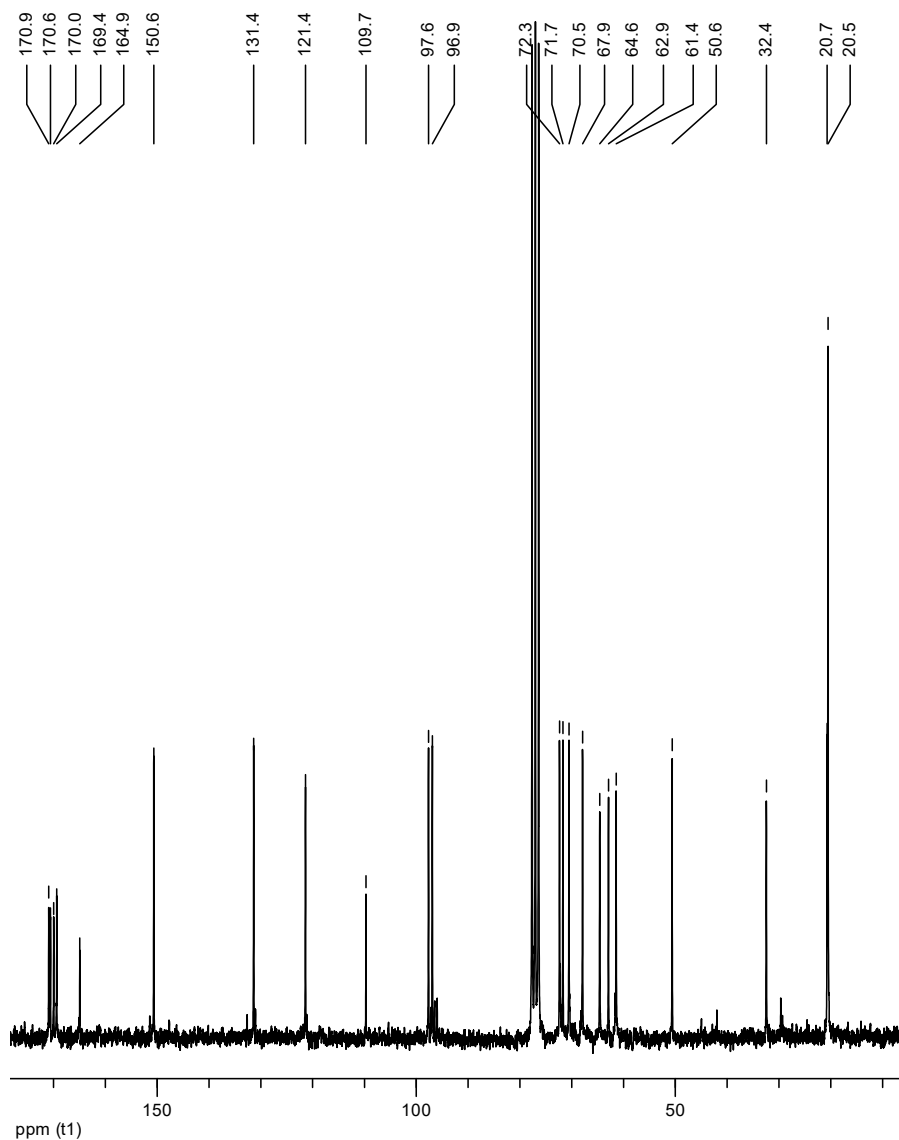
Slika 35: ¹H NMR (CDCl₃) spektar tetraacetil-sverciamarina

U ¹H NMR spektru (Slika 35, Tabela 5) na δ 7,49 nalazi se singlet od vinilnog protona H-3. Proton H-1 daje dublet na 5,47 ppm. Signali vinilnih protona H-8 i H-10, metilenske grupe H-6a i H-6b i alinog protona H-9 su složeni multiplieti. Prošireni signal na 3,75 ppm je od protona iz OH-5. Singleti protona acetatnih grupa nalaze se u uskom opsegu od 1,97 do 2,05 ppm.

Tabela 5: ^1H (200 MHz) i ^{13}C (50 MHz) NMR tetraacetil-sverciamarina u CDCl_3

H/C	δ_{H} , mult., J (Hz)	δ_{C}
1	5,47 d (1,4)	97,62 (96,88)
2	-	-
3	7,49 s	150,60
4	-	109,69
5	-	62,89
6 (H-6a, H-6b)	1,76-1,80 m	32,41
7 (H-7a, H-7b)	4,80-4,86 m	64,58
8	4,98-5,38 m	131,38
9	2,94-2,97 m	50,60
10 (H-10a, H-10b)	4,80-4,86 m	121,36
11	-	164,93
OH-5	3,75 s	-
4 x OCOCH ₃	2,05;2,03;2,02;1,97 s	-
Glc		
1'	*	96,88 (97,62)
2'	*	70,51
3'	4,98-5,15 m	71,68
4'	4,98-5,15 m	67,89
5'	*	72,33
6'	4,18-4,29 m	61,41
-OCOCH ₃	-	20,5
-OCOCH ₃	-	170,6

*Signali su preklapljeni



Slika 36: ^{13}C NMR (CDCl_3) spektar tetraacetil-sverciamarina

U ^{13}C NMR spektru (Slika 36, Tabela 5) signali ugljenika glukoze (C-2', C-3', C-4' i C-5') su na hemijskom pomeranju od 65-73 ppm. Signal ugljenika C-6' za koga su vezana dva vodonika je na δ 61,4. Karbonilni ugljenik C-11 ima signal na 164,9 ppm, dok su signali ugljenika acetatnih grupa na δ 20,5 ($-\text{OCO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$) i 170,6 ($-\text{O}\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$).

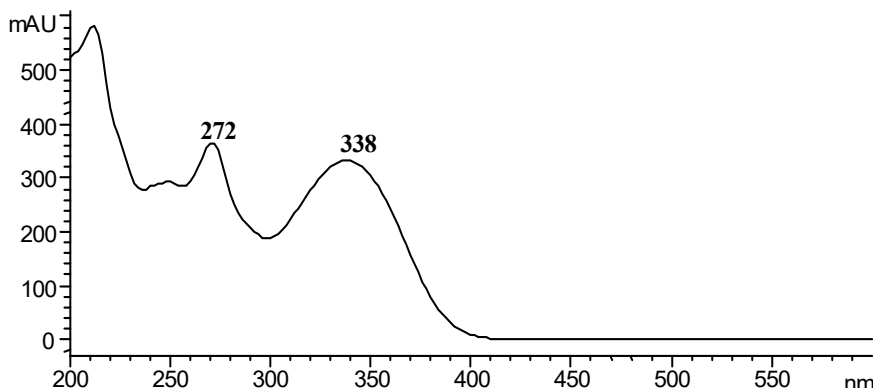
CI maseni spektar daje molekularni jon $[\text{M}+\text{H}]^+$ na m/z 375 što odgovara molekularnoj masi sverciamarina od 374.

Spektralni podaci su u skladu sa podacima iz literature za sverciamarin¹²¹.

Sverciamarin: 4,4a,5,6-tetrahidro-4aa-hidroksi-1-okso-5 β -vinil-1H,3H-pirano[3,4-c]piran-6-il- β -D-glukopiranozid je ranije izolovan iz vrste *Gentiana alpina*¹²², *G. lactea*, *G. lutea*, *G. macrophylla*, *G. punctata* i *G. scabra*⁷⁴.

2.2.1.3. IZOORIJENTIN-4'-O-GLUKOZID (3)

Iz frakcija 6 i 7, (dobijenih iz butanolnog ekstrakta posle "dry - column flash" hromatografije na silika gelu) rehromatografijom na stubu poliamida (poglavlje 3.2.1.1.1.) izolovano je jedinjenje (3) koje po obliku UV spektra i karakterističnim UV maksimumima odgovara flavonu. Intenzivne apsorpcione trake u oblasti od 240-280 nm i 300-380 nm, su tipične za UV spektar flavona¹²³.



Slika 37: UV spektar izoorientin-4'-O-glukozida u MeOH
($\lambda = 260$ nm, $R_t = 23.8$ min)

UV spektroskopija je metoda koja ima veliku primenu u određivanju strukture jedinjenja. Ova metoda pruža informacije o tipu supstitucije u jedinjenjima čiji je skelet izgrađen od ugljenikovih atoma. Međutim, mnoga jedinjenja imaju vrlo sličnu strukturu pa je njihova karakterizacija pomoću UV spektara nedovoljna.

Derivatizacija reagensima koji dovode do pomeranja apsorpcionih UV-maksimuma i do povećanja ili smanjenja inteziteta apsorpcije je neophodna, jer omogućuje da se odredi položaj slobodnih OH grupa u molekulu¹²⁴.

U Tabeli 6 je prikazano pomeranje apsorpcionih-UV maksimuma posle dodatka odgovarajućih reagenasa.

Tabela 6: UV spektri izoorijentin-4'-O-glukozida posle dodatka reagenasa

	λ_{max} (nm)
MeOH	272, 334
+ AlCl ₃	281, 295, 351, 389
+ HCl	282, 293, 349, 392
+ NaOAc	278, 360
+ NaOMe	268, 382

Dodatak AlCl₃ dovodi do batohromnog pomeranja apsorpcionih traka, što ukazuje na prisustvo *orto*-OH grupa i/ili slobodnu OH grupu u položaju 5. Pošto HCl nema uticaj na spektar, znači da u molekulu nema *orto*-OH grupa. Dodatkom NaOAc došlo je do batohromnog pomaka apsorpcionih traka čime se dokazuje prisustvo slobodne OH grupe u položaju 7.

UV spektri su u skladu sa literaturnim podacima za izoorijentin-4'-O-glukozid.¹²⁵

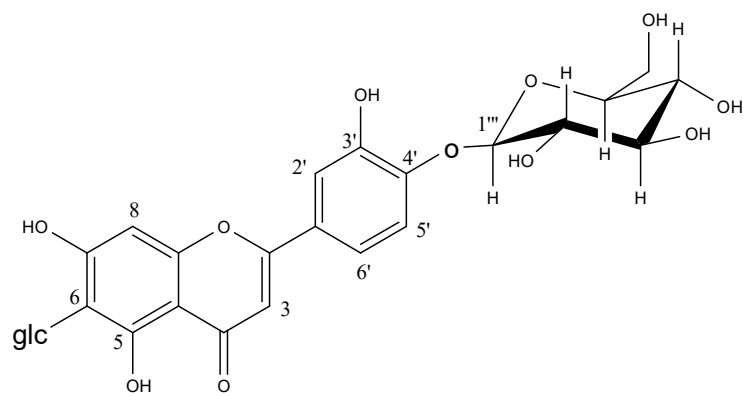
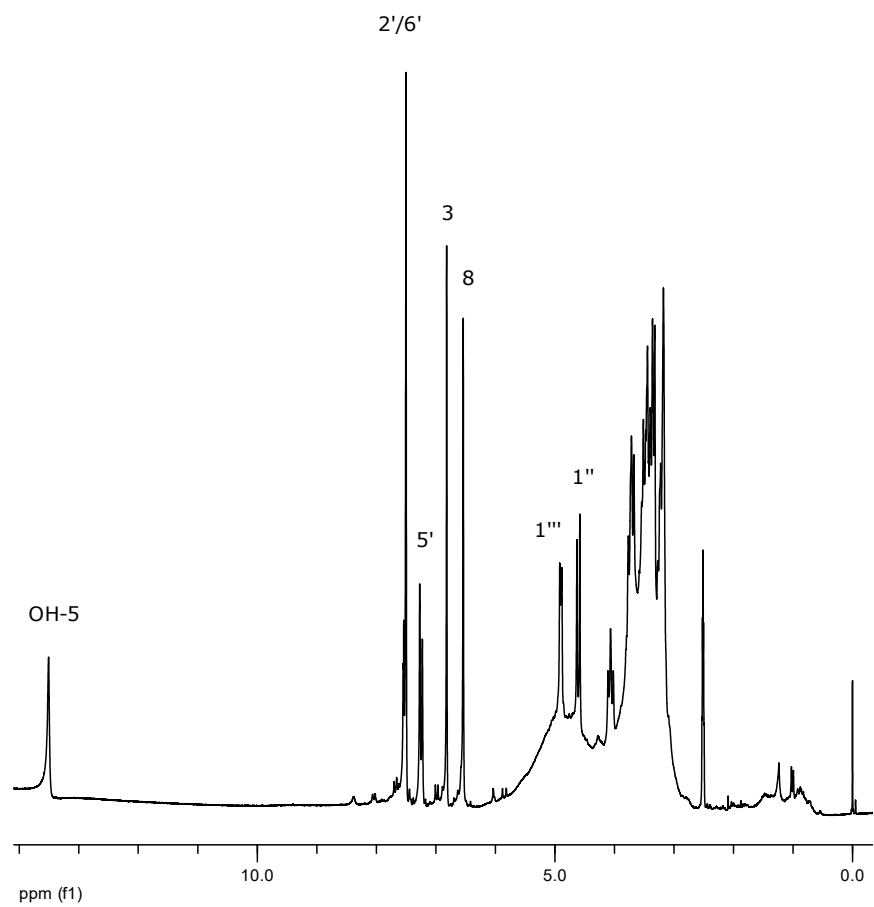
U ¹H NMR spektru (Tabela 7, Slika 38) na hemijskom pomeranju 6-8 ppm uočavaju se signali protona koji su vezani za aromatično jezgro. Signali na δ 3-5 ppm potiču od protona iz šećera i u velikoj meri su preklopljeni. Jasno su izdvojeni dubleti anomernih protona šećera. Na δ 4,52 ($^3J_{1'',2''} = 9,6$ Hz) nalazi se dublet anomernog protona glukoze koja je C-glikozidnom vezom vezana za aromatično jezgro, dok je na δ 4,90 ($^3J_{1''',2'''} = 6,8$ Hz) dublet anomernog protona iz O-glikozidno vezane glukoze. Na δ 6,53 i 6,81 nalaze se singleti protona H-8 i H-3. Dublet na δ 7,24 sa konstantom sprežanja $^3J_{5',6'} = 9,0$ Hz potiče od H-5'.

Tabela 7: ^1H (200 MHz) i ^{13}C (50 MHz) NMR izoorijentirani-4'-O-glukozida u DMSO- d_6

H/C	δ_{H} , mult., J (Hz)	δ_{C}
2	-	162,9
3	6,81 s	104,1
4	-	182,0
5	-	156,6
6	-	109,3
7	-	162,9
8	6,53 s	94,1
9	-	160,9
10	-	101,4
1'	-	124,9
2'	7,54 d (2,0)	113,7
3'	-	147,3
4'	-	148,7
5'	7,24 d (9,0)	116,2
6'	7,51 m (8,0; 2,0)	118,5
OH-5	13,50 s	-
Glc		
1''	4,52 d (9,6)	81,7
2''	*	70,7
3''	*	73,4
4''	*	70,3
5''	*	79,2
6''	*	61,5
Glc		
1'''	4,90 d (6,8)	101,4
2'''	*	73,4
3'''	*	76,1
4'''	*	69,9
5'''	*	
6'''	*	60,9

*Signali su preklapljeni na $\delta_{\text{H}} = 3 - 4$ ppm

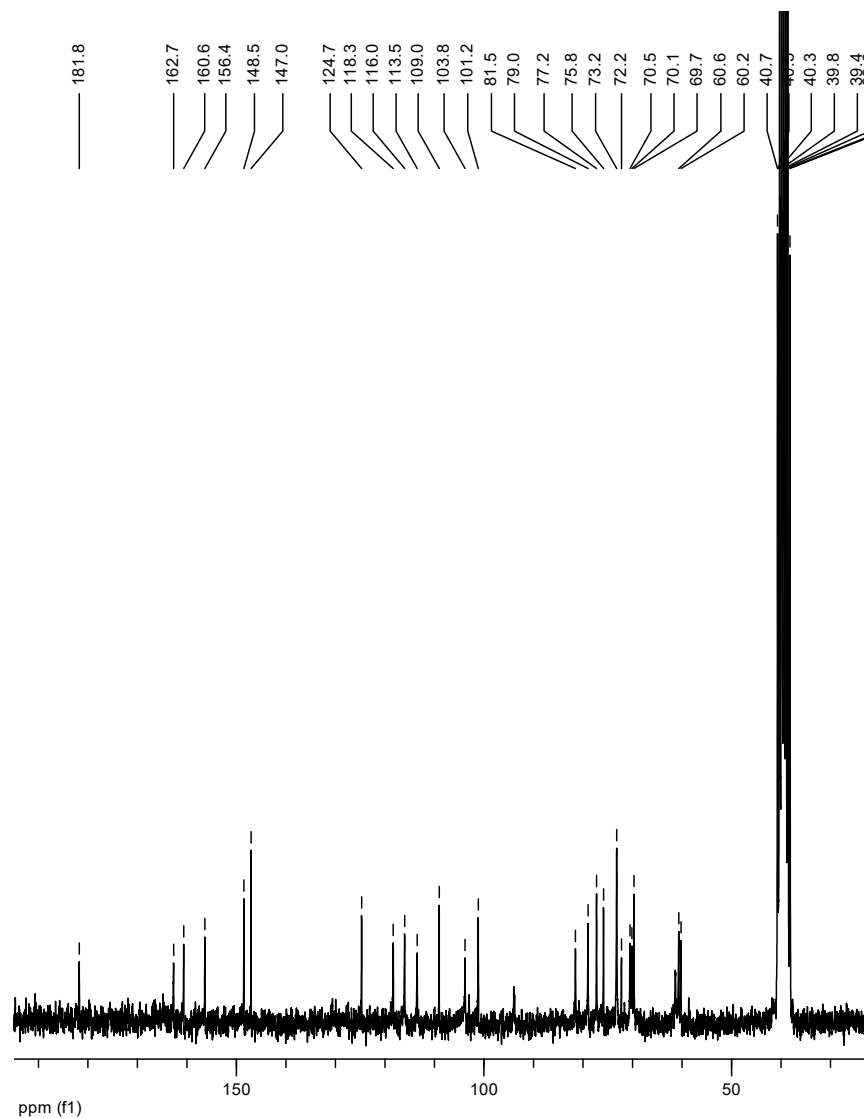
Na δ 7,51 nalazi se multiplet: dublet od H-2' ($^4J_{2',6'} = 2,0$ Hz) i dvostruki dublet od H-6' sa konstantama sprežanja $^3J_{5',6'} = 8$ Hz i $^4J_{2',6'} = 2,0$ Hz. Na δ 13,50 nalazi se signal koji daje proton iz OH-5 grupe koja je vezana helatnom vodoničnom vezom za karbonil.



Slika 38: ^1H NMR (DMSO- d_6) spektar i strukturna formula izoorijentin-4'-*O*-glukozida

U ^{13}C NMR spektru (Tabela 7, Slika 39) u oblasti 60-80 ppm nalaze se signali ugljenika glukoze. Anomerni ugljenik glukoze koja je C-glikozidnom vezom vezana za aromatični prsten nalazi se na δ 81,7 ppm, dok se anomerni ugljenik iz O-glikozidno vezane glukoze nalazi na 101,4 ppm. Između 140-180 ppm su signali aromatičnih ugljenika za koje su vezani kiseonici: C-2, C-4, C-5, C-7, C-9, C-3' i C-4'.

Spektralni podaci su u skladu sa podacima iz literature^{125, 126, 127}

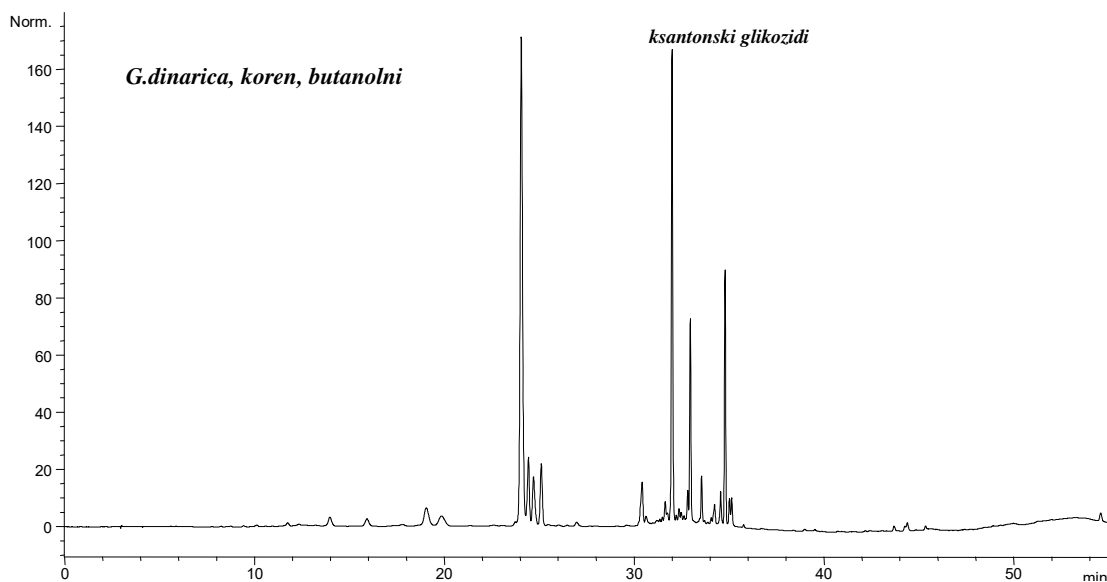


Slika 39: ^{13}C NMR (DMSO- d_6) spektar izoorientin-4'-O-glukoziida

Izoorijentin-4'-*O*-glukozid, flavonski heterozid, je ranije izolovan iz vrste *Gentiana lutea*¹²⁵, kao i iz nekih američkih vrsta roda *Gentiana*: *G. affinis*, *G. algida* i *G. calycosa*¹²⁸.

2.2.2. Hemijska analiza korena

Sirovi metanolni ekstrakt korena (poglavlje 3.2.2.) je sukcesivno reekstrahovan rastvaračima rastuće polarnosti: dietil-etrom, etil-acetatom i n-butanolom. Urađena je HPLC analiza ovih ekstrakata. Jedino je u hromatogramu butanolnog ekstrakta detektovan značajan sadržaj sekoiridoidnih, flavonskih i ksantonskih komponenti što se vidi na slici 40

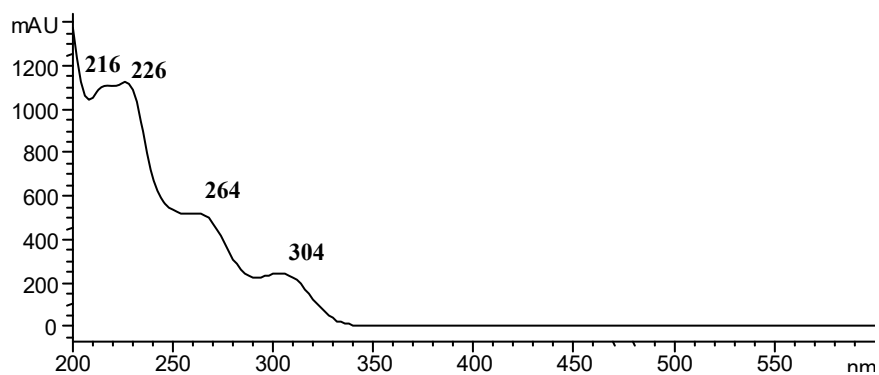


Slika 40: Hromatogram butanolnog ekstrakta korena vrste *G. dinarica*

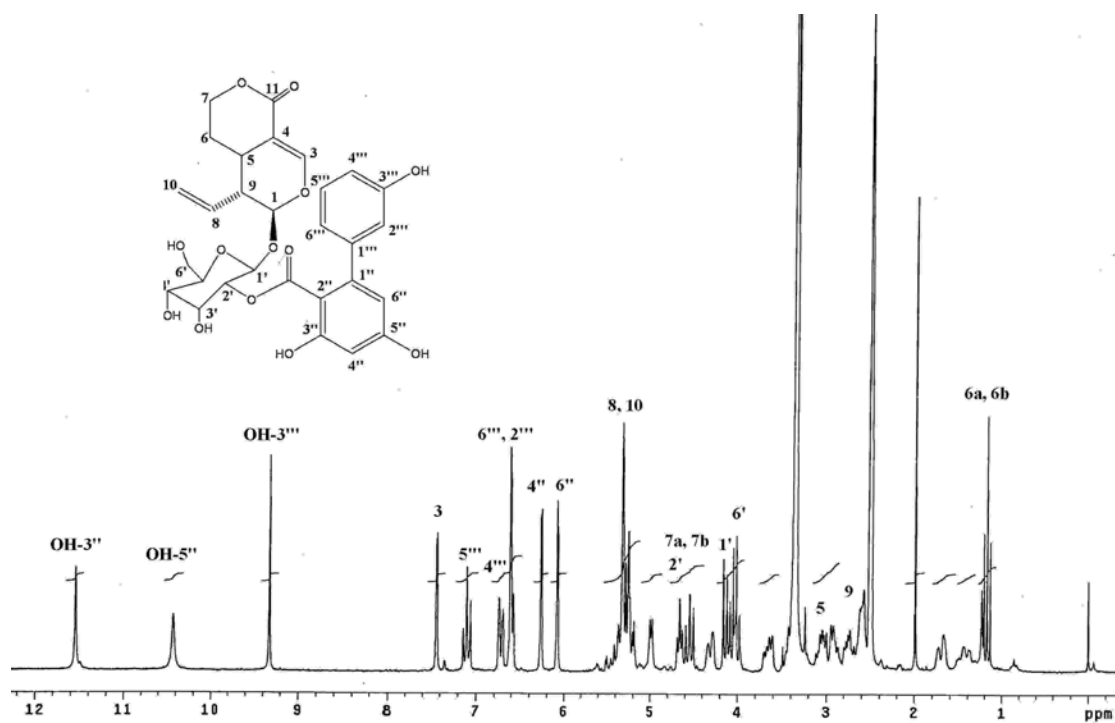
Butanolni ekstrakt je frakcionisan na koloni poliamida eluiranjem smešom voda-metanol (poglavlje 3.2.2.). Dobijeno je više frakcija iz kojih su potom izolovana čista jedinjenja.

2.2.2.1. AMAROGENCIN (4)

Iz frakcije 31-33 (poglavlje 3.2.2.) izolovano je jedinjenje (4) čija je struktura određena spektroskopskim metodama.



Slika 41: UV spektar amarogencina u MeOH ($\lambda = 260$ nm, $R_t = 34.8$ min)



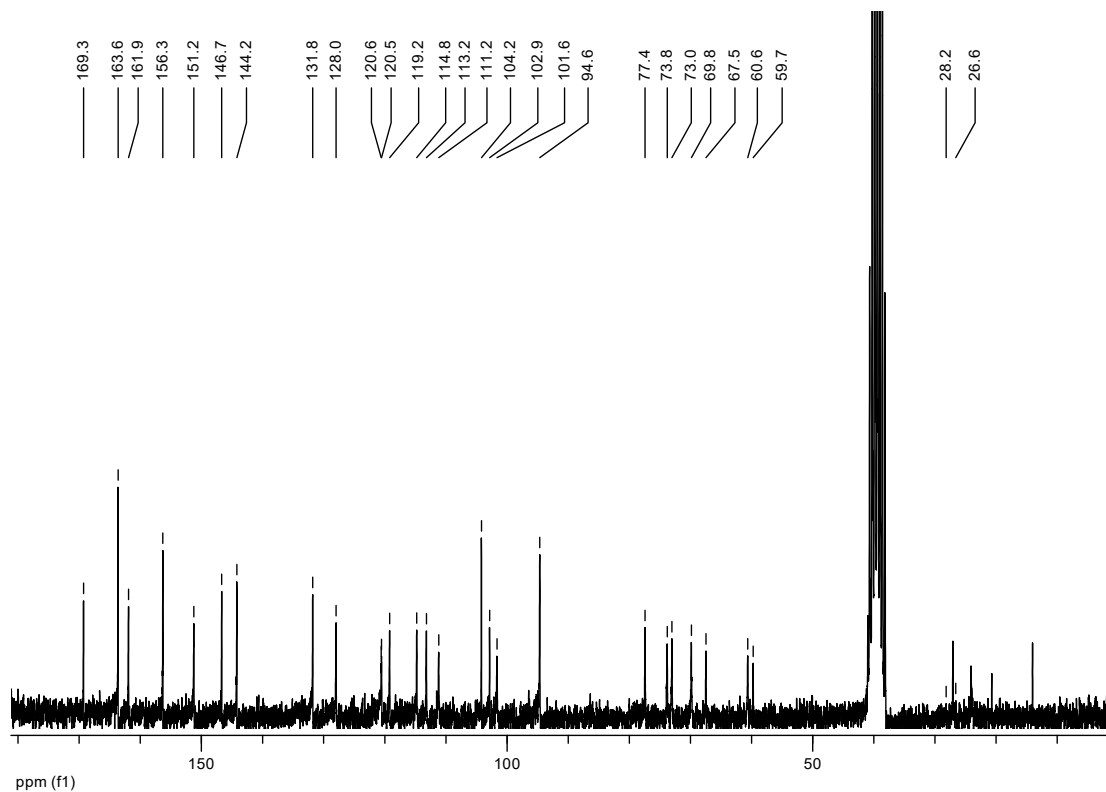
Slika 42: ¹H NMR (DMSO-d₆) spektar amarogencina

Tabela 8: ^1H (200 MHz) i ^{13}C (50 MHz) NMR amarogencina u DMSO- d_6

H/C	δ_{H} , mult., J (Hz)	δ_{C}
1	*	94,9
3	7,44 d (1,8)	151,5
4	-	101,9
5	2,99-3,04 m	27,3
6 (H-6a, H-6b)	1,13-1,23 m	24,3
7 (H-7a, H-7b)	4,15-4,69 m	67,7
8	5,18-5,32 m	132,1
9	2,72-2,77 m	*
10 (H-10a, H-10b)	5,18-5,32 m	120,7
11	-	169,5
Glc		
1'	4,13 d (7,8)	101,9
2'	*	74,1
3'	*	73,3
4'	*	70,1
5'	*	77,7
6'	3,97-4,08 m	60,9
1''	-	144,5
2''	-	104,4
3''	-	162,2
4''	6,26 d (2,4)	103,1
5''	-	163,9
6''	6,07 d (2,2)	111,4
1'''	-	146,9
2'''	*	113,4
3'''	-	156,6
4'''	*	115,0
5'''	7,10 t (8,0)	128,2
6'''	6,71 d (7,6)	119,5
CO	-	169,5

*Signali su preklapljeni

U ^1H NMR spektru amarogencina se uočavaju singleti na 9,32, 10,42 i 11,54 ppm koji potiču od protona OH grupa. Dublet vinilnog protona H-3 je na δ 7,44. Proton H-5''' daje triplet na 7,10 zbog sprežanja sa protonima H-4''' i H-6''. Dublet na δ 6,71 sa vicinalnom konstantom sprežanja $^3J = 7,6$ Hz daje proton H-6''' zbog sprežanja sa protonom H-5'''. Druga dva dubleta na 6,26 i 6,07 ppm, sa daljinskim konstantama sprežanja 2,4 i 2,2 Hz, su od protona H-4'' i H-6''. Anomerni proton glukoze daje dublet na 4,13 ppm. Signali vinilnih protona H-8 i H-10, metilenskih grupa H-6a,6b i H-7a,7b su složeni multipleti.



Slika 43: ^{13}C NMR (DMSO- d_6) spektar amarogencina

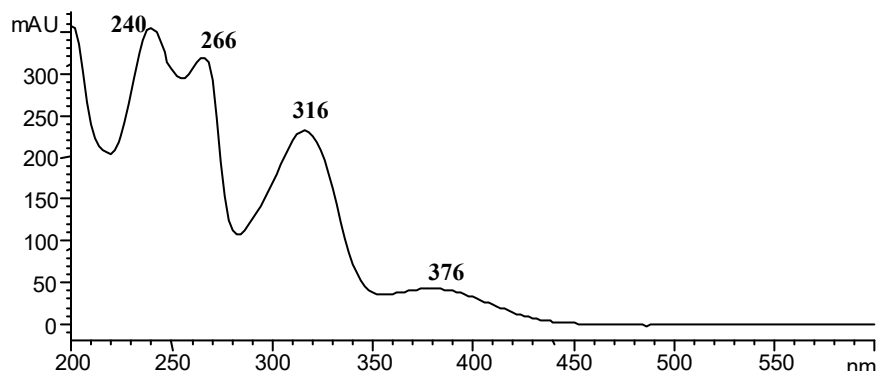
Podaci iz ^1H i ^{13}C NMR spektara su u skladu sa literaturnim podacima za amarogencin¹²⁹.

U CI masenom spektru uočava se molekularni jon ($M+1$) na m/z 587 što odgovara molekularnoj formuli $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{O}_{13}$.

Amarogencin je ranije izolovan iz vrste *Swertia japonica*¹³⁰.

2.2.2.2. NORSVERCIANIN-1-O-PRIMVEROZID (5)

Iz frakcije 39-43 (poglavlje 3.2.2.) posle uklanjanja rastvarača, dobijeno je jedinjenje (5) čija je struktura određena spektroskopskim metodama.



Slika 44: UV spekter norsvercianin-1-O-primverozida u MeOH
($\lambda = 260$ nm, $R_t = 31.9$ min)

Ovakav oblik UV spektra je karakterističan za ksantonska jedinjenja. Nezavisno od strukturnih razlika, UV spektri prirodnih ksantona imaju četiri intenzivne apsorpcione trake čiji je opseg talasnih dužina u sledećim oblastima: 335-410 nm (I traka), 300-345 nm (II traka), 245-270 nm (III traka) i 225-245 nm (IV traka). Ukoliko ksanton ima 1,3,5,8 poredak supstitucije u njegovom UV spektru se pojavljuje još jedna (slabija) apsorpciona traka u oblasti od 274-278 nm¹¹.

Slobodne OH grupe u položajima 3 ili 6 se detektuju dodatkom slabe baze NaOAc koji dovodi do batohromnog pomeranja u oblasti 300-345 nm uz porast intenziteta apsorpcije. Ukoliko je OH grupa u položaju 3 ili 6 blokirana, UV spekter se ne menja.

Dodatkom AlCl_3 gradi se kompleks sa *orto*-hidroksilnim grupama, kao i sa OH grupama koje su u *peri* položaju u odnosu na karbonilnu grupu (1 ili 8), pri čemu dolazi do batohromnog pomaka u oblasti III trake uz smanjenje intenziteta apsorpcije. U prisustvu HCl, kompleks sa *orto*-hidroksilnim grupama se razgrađuje, dok je kompleks sa keto grupom stabilan.

Dodatkom NaOMe jonizuju se sve slobodne OH grupe (osim onih koje su u položajima 1 i 8), tako da dolazi do batohromnog pomeranja u oblasti I i II apsorpcione trake.

U Tabeli 9 je prikazano pomeranje apsorpcionih maksimuma izolovanog ksantona posle dodavanja reagenasa.

Tabela 9: UV spektri norsvercianin-1-O-primverozida posle dodatka reagenasa

	λ_{max} (nm)
MeOH	240, 267, 317, 366
+ AlCl ₃	246, 278, 345, 430
+ HCl	245, 278, 343, 430
+ NaOAc	240, 263, 354
+NaOMe	242, 262, 349, 412

Batohromno pomeranje u oblasti III trake sa 267 na 278 nm, posle dodatka AlCl₃, ukazuje na prisustvo slobodnih OH grupa u položajima 1 i/ili 8.

Dodatkom HCl spektar se ne menja čime se potvrđuje prisustvo slobodne OH grupe u peri položaju u odnosu na karbonilnu grupu.

NaOAc dovodi do batohromnog pomaka II trake sa 317nm na 354nm uz povećanje inteziteta apsorpcije, što ukazuje na postojanje slobodne OH grupe u položaju 3. Prisustvo slobodnih OH grupa u molekulu dokazuje i dodatak NaOMe, koji batohromno pomera trake I i II (sa 317 i 366 nm - na 349 i 412 nm). Spektri su u skladu sa podacima iz literature¹³¹

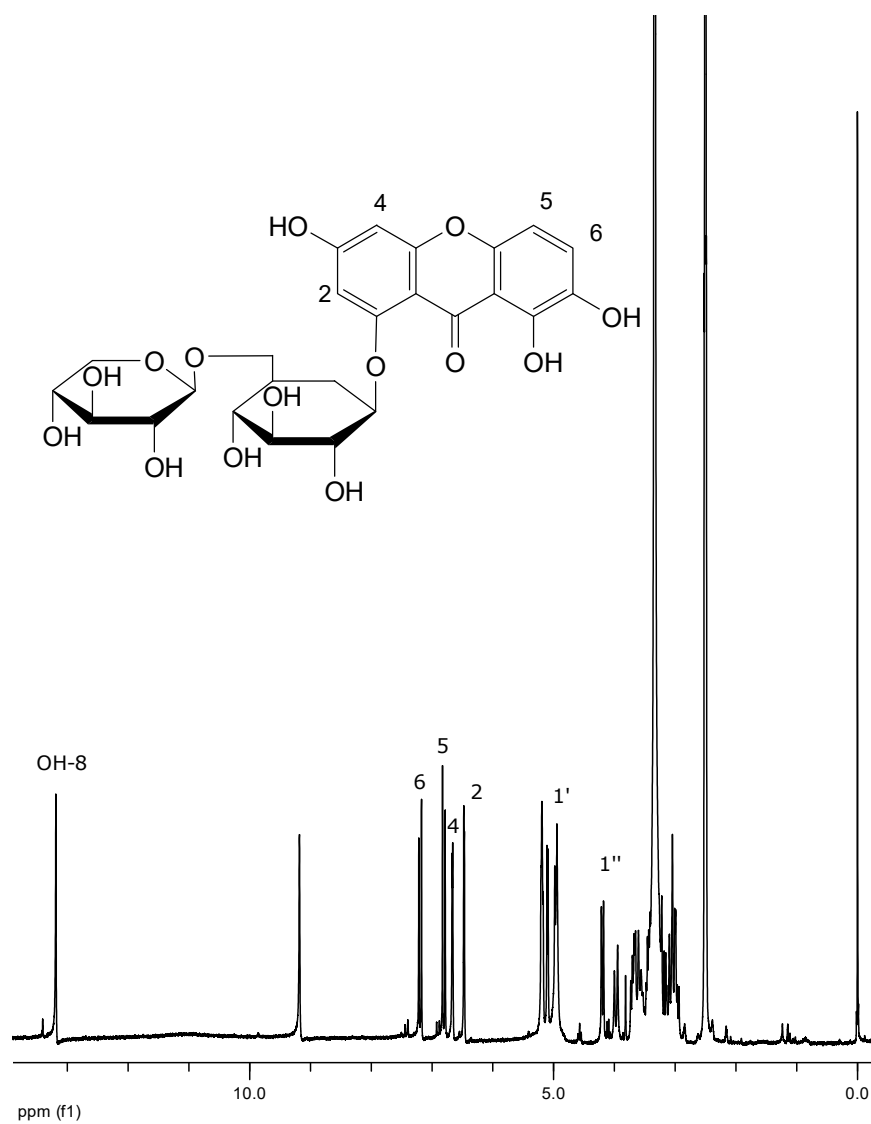
Tabela 10: ^1H (200 MHz) i ^{13}C (50 MHz) NMR norsvercianin-1-*O*-primverozida u DMSO-d_6

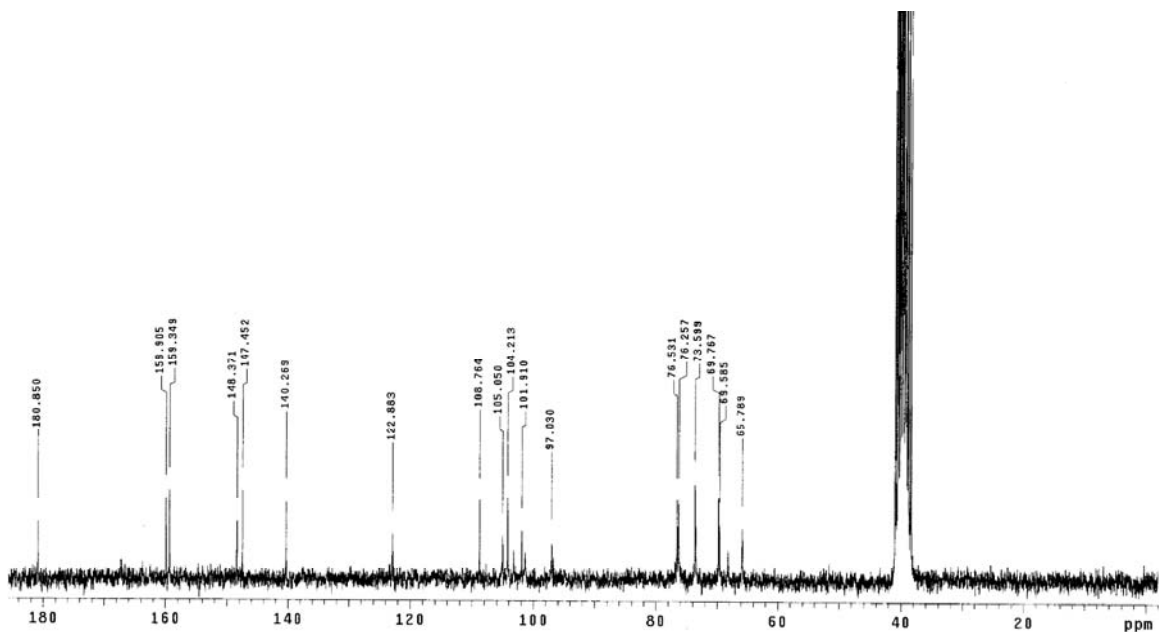
H/C	δ_{H} , mult., J (Hz)	δ_{C}
1	-	159,9
2	6,12 d (2,0)	**
3	-	**
4	6,63 d (2,0)	97,0
4a	-	159,3
5	6,77 d (9,0)	105,5
6	7,16 d (8,8)	122,8
7	-	140,2
8	-	147,4
8a	-	108,7
9	-	180,8
9a	-	104,2
10a	-	148,3
OH-8	13,3 s	-
Glc		
1'	4,91 d (7,0)	101,9
2'	*	73,5
3'	*	76,5
4'	*	69,5
5'	*	76,5
6'	*	68,6
Xyl		
1''	4,21 d (7,0)	**
2''	*	73,5
3''	*	76,2
4''	*	69,6
5''	*	**

* Signali su preklapljeni na $\delta_{\text{H}} = 3 - 4$ ppm **Signali se ne vide zbog male koncentracije uzorka

U ^1H NMR spektru uočavaju se signali koji potiču od protona aglikona i protona šećera. Na hemijskom pomeranju od 6 do 8 ppm nalaze se signali aromatičnih protona. Dublet protona H-2 je na 6,36 ppm sa daljinskom konstantom sprežanja $^4J_{2,4} = 1,8$ Hz. Drugi dublet sa konstantom sprežanja $^4J_{2,4} = 2,0$ Hz je na δ 6,63 i potiče od protona H-4. Na δ 6,67 je dublet protona H-5 sa vicinalnom konstantom sprežanja $^3J_{5,6} = 8,8$ Hz, dok se dublet protona H-6 nalazi na δ 7,16 ($^3J_{5,6} = 9,0$ Hz). Signali protona šećera su preklapljeni u oblasti od 3 do 4 ppm. Anomerni proton glukoze se uočava na δ 4,91 ($^3J_{1',2'} = 7,0$ Hz), dok je anomerni proton ksiloze na δ 4,21 ($^3J_{1'',2''} = 7,0$ Hz). Proton OH-8 grupe, koja je vezana za karbonilnu grupu vodoničnom vezom, ima signal na δ 13,3 ppm.

Spektralni podaci su poređeni sa podacima za norsvercianin-1-*O*-glukozid¹³²

Slika 45: ^1H NMR (DMSO-d_6) spektar norsvercinin-1-*O*-primverozida



Slika 46: ^{13}C NMR (DMSO- d_6) spektar norsvercianin-1-*O*-primverozida

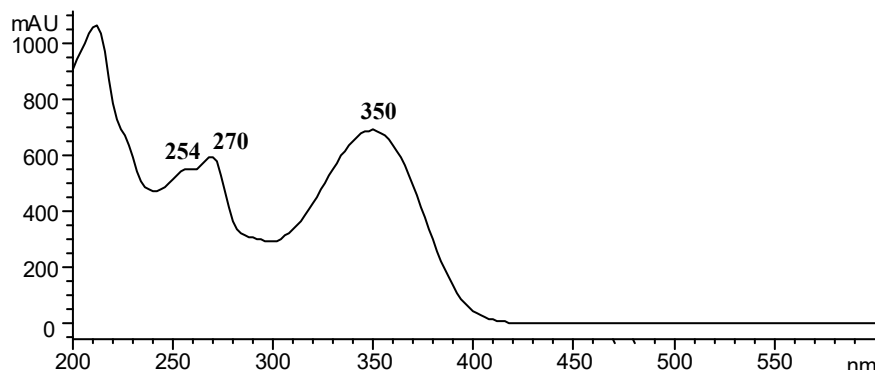
U ^{13}C NMR spektru (Slika 46, Tabela 10) između 60 i 80 ppm nalaze se signali ugljenika šećera. Anomerni ugljenik glukoze ima signal na δ 101,9, a ksiloze na 104,0 ppm. Ugljenikovi atomi za koje je vezan kiseonik: C-1, C-3, C-4a, C-7, C-8 i C-10a, imaju hemijska pomeranja u oblasti od δ 140-170 ppm. Na δ 180,8 ppm nalazi se signal za karbonilni ugljenik koji je helatno vezan za OH grupu.

Spektralni podaci su upoređivani sa literaturnim podacima za 7,8-dihidroksi-3-metoksi-1-*O*-primverozil ksanton, koji ima vrlo sličnu strukturu¹³³.

Norsvercianin-1-*O*-primverozid ili 3,7,8-trihidroksi-1-*O*-primverozil ksanton, je ranije izolovan iz vrsta *Gentiana bavarica* i *G. verna*¹⁶.

2.2.2.3. IZOORIJENTIN (6)

Iz frakcije 48-51 (poglavlje 3.2.2.) izolovano je jedinjenje (6) čija je struktura određena spektroskopskim metodama.



Slika 47: UV spekter izoorijentina u MeOH ($\lambda = 260$ nm, $R_t = 30.2$ min)

U tabeli 11 su prikazana pomeranja UV maksimuma izolovanog jedinjenja posle dodatka reagenasa.

Tabela 11: UV spektri izoorijentina posle dodatka reagenasa

	λ_{max} (nm)
MeOH	254, 271, 350
+ AlCl ₃	274, 303, 330, 424
+ HCl	278, 296, 358, 382
+ NaOAc	240, 272, 367

Po izgledu osnovnog UV spektra (u MeOH) u kome se uočavaju dve intenzivne apsorpcione trake, može se zaključiti da je izolovano jedinjenje flavon. Batohromno pomeranje apsorpcionih maksimuma posle dodavanja AlCl₃ ukazuje na prisustvo slobodne OH grupe u položaju 5. Pošto je kompleks sa AlCl₃ nestabilan u kiseljoj sredini, flavon ima *orto*-hidroksilne grupe u molekulu.

Dodatak NaOAc dovodi do batohromnog pomeranja u oblasti II trake što ukazuje na prisustvo slobodnih OH grupa u požaju 4' i 7'.

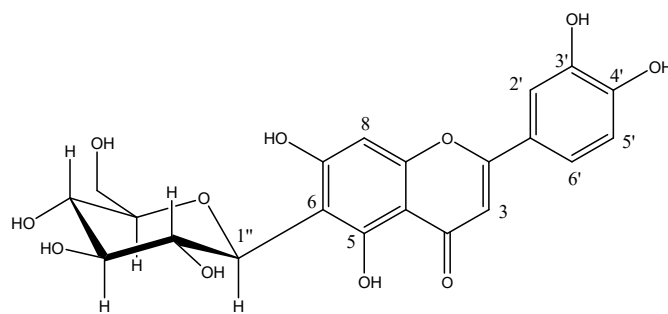
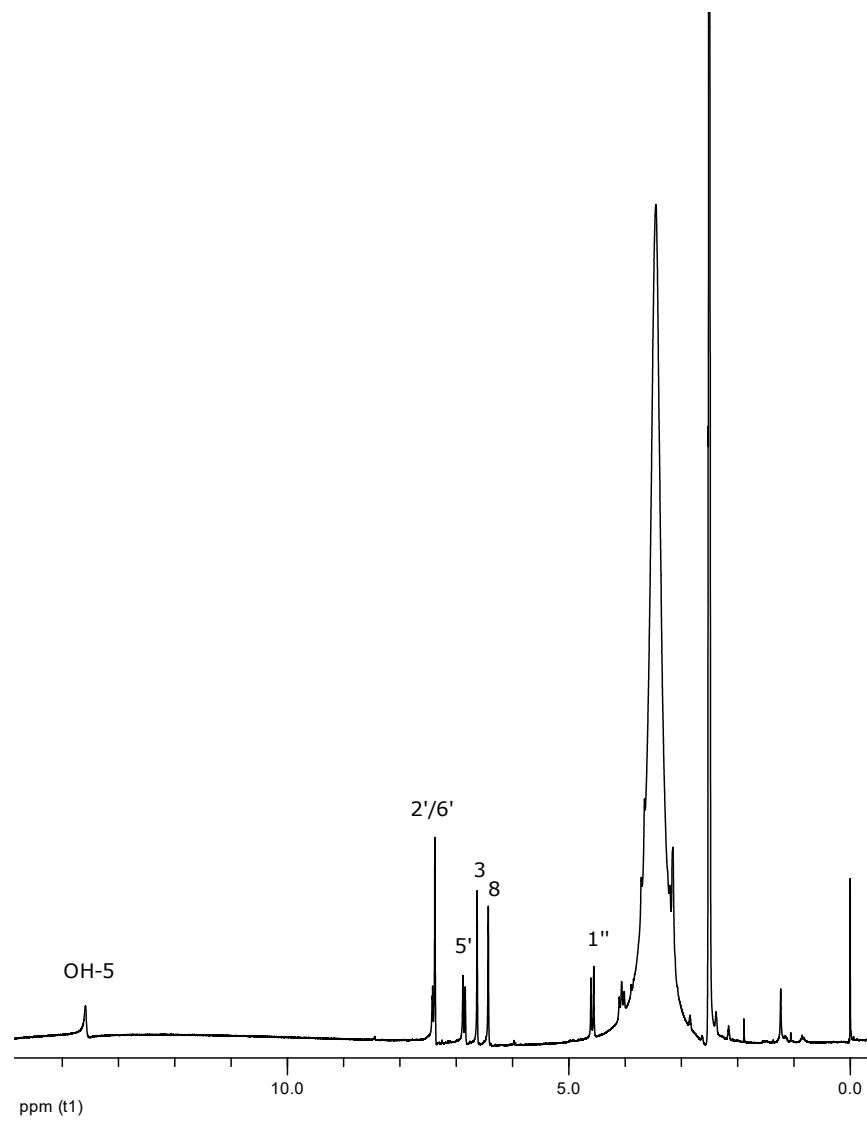
Dobijeni UV spektri su u skladu sa literaturnim podacima¹²⁶.

Tabela 12: ¹H (200 MHz) i ¹³C (50 MHz) NMR izoorjentina u DMSO-d₆

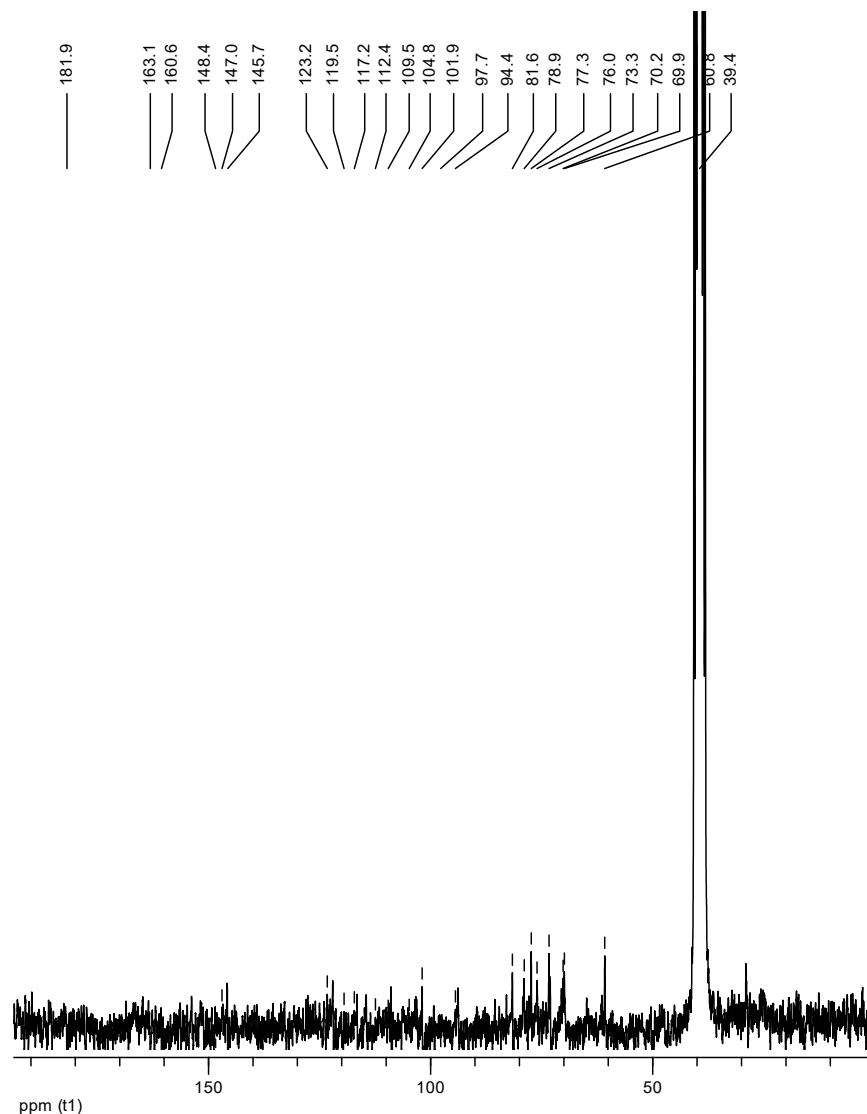
H/C	δ _H , mult., J (Hz)	δ _C
2	-	163,1
3	6,62 s	104,8
4	-	181,9
5	-	**
6	-	109,5
7	-	**
8	6,42 s	94,4
9	-	160,6
10	-	101,9
1'	-	123,3
2'	7,40 m	112,4
3'	-	145,7
4'	-	148,4
5'	6,86 d (8,0)	117,2
6'	7,40 m (8,0; 2,0)	119,5
OH-5	13,6 s	-
Glc		
1"	4,58 d (9,6)	81,6
2"	*	69,9
3"	*	73,3
4"	*	70,2
5"	*	78,9
6"	*	**

* Signali su preklapljeni **Signali se ne vide zbog male koncentracije uzorka

¹H NMR spektar (Slika 48, Tabela 12) je sličan spektru izoorijentina-4'-O-glukozida. Uočavaju se singleti protona H-3 i H-8 na δ 6,62 i 6,42. Proton H-5' daje dublet na 6,86 ppm sa vicinalnom konstantom sprežanja ³J_{5'6'} = 8,0 Hz. Na δ 7,40 nalazi se multiplet koji sadrži dublet protona H-2' i dvostruki dublet koji daje proton H-6' zbog sprežanja sa protonima H-2' i H-5'. Dublet anomernog protona glukoze koja je C-glikozidnom vezom vezana za aromatično jezgro je na 4,58 ppm. Singlet na δ 13,6 potiče od protona OH-5 grupe.



Slika 48: ^1H NMR (DMSO-d_6) spektar i strukturna formula izoorjentina



Slika 49: ^{13}C NMR (DMSO- d_6) spektar izoorijentina

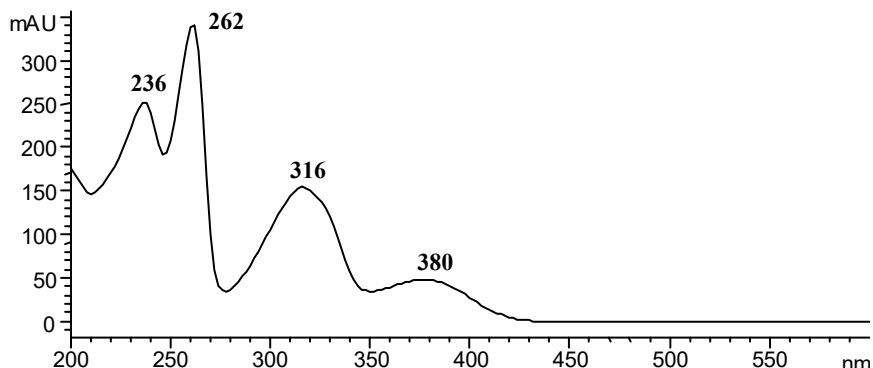
U ^{13}C NMR spektru izoorijentina (Slika 49, Tabela 12) u oblasti 140-180 ppm nalaze se signali aromatičnih ugljenika za koje su vezani kiseonici. Ugljenici glukoze daju signale između 60-80 ppm. Na δ 81,6 je signal anomernog ugljenika šećera koji je C-glikozidno vezan za ksantonsko jezgro.

Spektralni podaci su u skladu sa literaturnim^{126, 127}.

Izoorijentin (5,7,4'-trihidroksi-6-C-glukozil flavon) je pronađen i u drugim vrstama roda *Gentiana*: *G. lutea*¹²⁵, *G. asclepiadea*¹³⁴, *G. affinis*¹²⁸, *G. algida*, *G. calycosa*.

2.2.2.4. NORSVERCIANIN-8-O-PRIMVEROZID (7)

Iz frakcije 52 sa poliamidne kolone (poglavlje 3.2.2.), dobijeno je jedinjenje (7) čija je struktura određena spektroskopskim metodama.



Slika 50: UV spektar norsvercianin-8-O-primverozida u MeOH
($\lambda = 260$ nm, $R_t = 32,9$ min)

Tabela 13: UV spektri norsvercianin-8-O-primverozida posle dodatka reagenasa

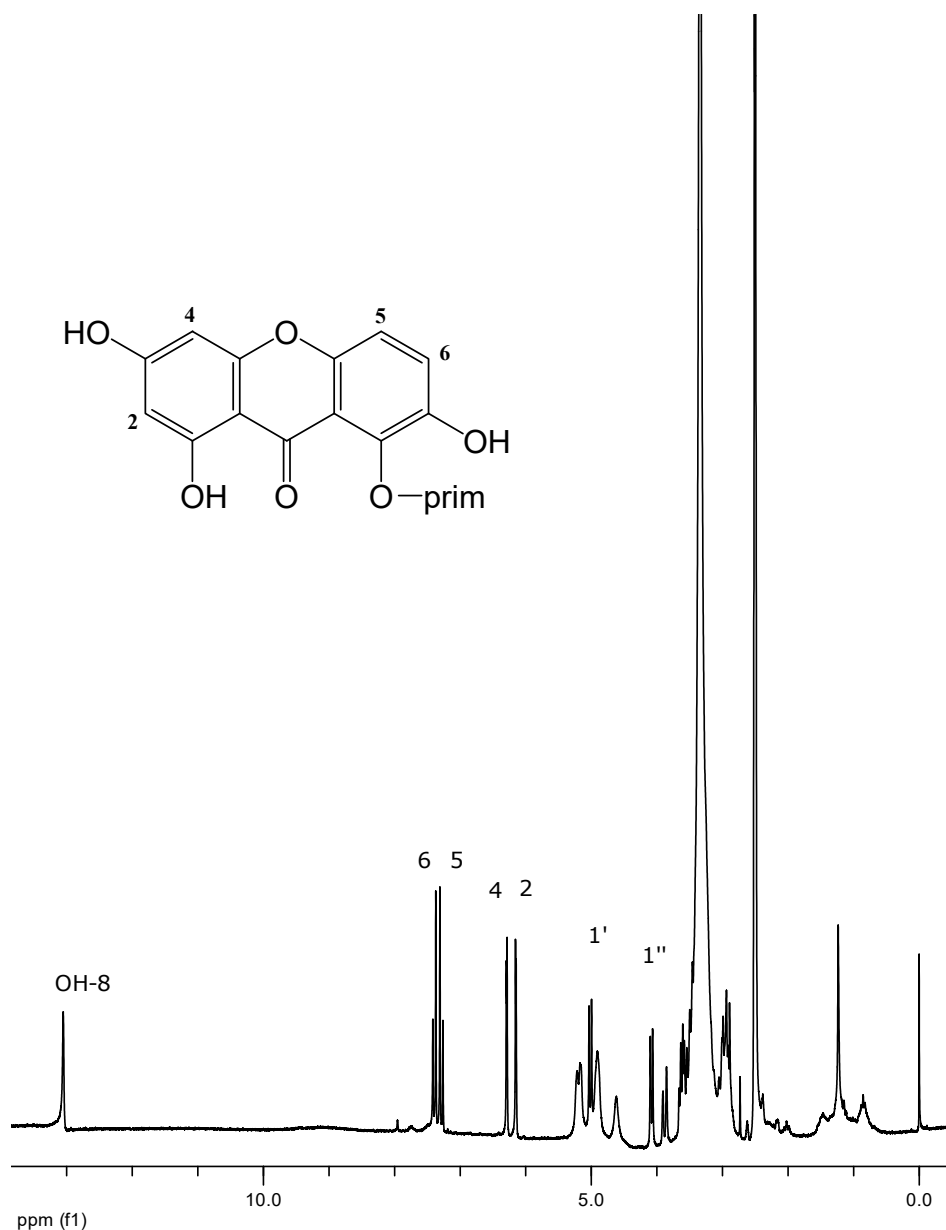
	λ_{max} (nm)
MeOH	236, 262, 317, 374
+ AlCl ₃	233, 275, 332, 376
+ HCl	233, 275, 329, 372
+ NaOAc	264, 260, 352

Na osnovu UV spektra snimljenog u MeOH koga karakterišu 4 intenzivne apsorpcione trake, može se zaključiti da je izolovano jedinjenje ksanton sa 1,3,7,8 poretkom supstitucije. U prisustvu AlCl₃ batohromno se pomeraju apsorpcioni maksimumi u oblasti II i III trake što ukazuje na postojanje slobodne OH grupe u položaju 1 i/ili 8. HCl ne utiče na spektar čime se potvrđuje prisustvo slobodne OH grupe u *peri* položaju u odnosu na karbonilnu grupu. Dodatak NaOAc je doveo do batohromnog pomaka u II traci sa 317 na 352 nm, što je dokaz za prisustvo slobodne OH grupe u položaju 3.

Tabela 14: ^1H (200 MHz) i ^{13}C (50 MHz) NMR norsvercianin-8-O-primverozida u DMSO-d_6

H/C	δ_{H} , mult., J (Hz)	δ_{C}
1	-	163,2
2	6,12d (2,0)	98,6
3	-	167,1
4	6,26 d (2,0)	93,7
4a	-	157,1
5	7,28 d (9,3)	114,5
6	7,38 d (9,3)	125,0
7	-	146,4
8	-	141,8
8a	-	114,5
9	-	180,2
9a	-	102,3
10a	-	149,7
OH-8	13,04 s	-
Glc		
1'	5,01 d (7,6)	103,8
2'	*	73,5
3'	*	76,4
4'	*	69,7
5'	*	76,4
6'	*	68,1
Xyl		
1''	4,09 d (7,0)	104,7
2''	*	73,9
3''	*	76,4
4''	*	69,7
5''	*	65,7

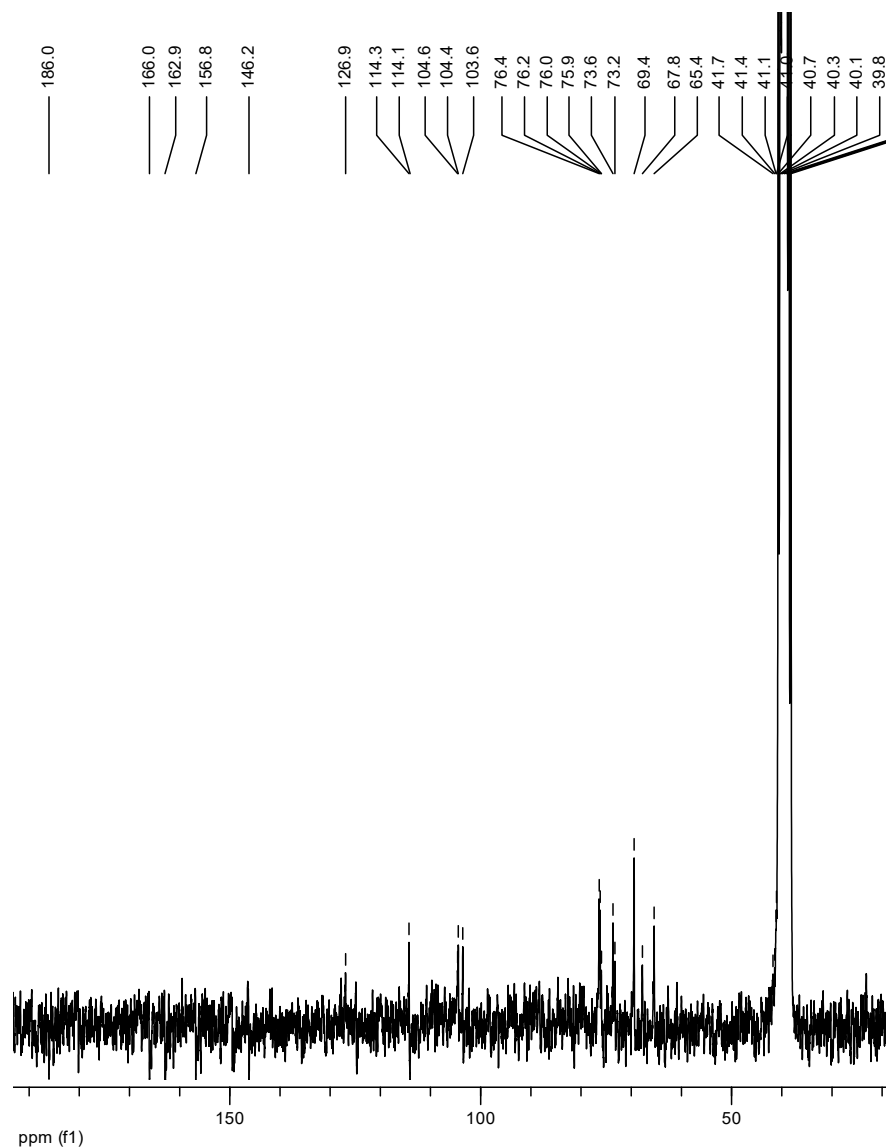
* Signali su preklapljeni na $\delta_{\text{H}} = 2,8\text{-}3,9$ ppm



Slika 51: ^1H NMR (DMSO- d_6) spektar norsvercianin-8-O-primverozida

^1H NMR spektar ovog jedinjenja je sličan spektru prethodno izolovanog norsvercianin-1-O-primverozida. Dva dubleta na δ 6,12 i 6,26 sa daljinskom konstantom sprezanja $^4J_{2,4} = 2,0$ Hz potiču od aromatičnih protona H-2 i H-4,

dok druga dva dubleta na δ 7,28 i 7,38 potiču od H-5 i H-6. Signal na δ 13,04 ima proton OH grupe koja je u *peri* položaju u odnosu na karbonilnu grupu. Dublet anomernog protona glukoze je na δ 5,01 ($^3J_{1',2'} = 7,6$ Hz). Na δ 4,09 nalazi se dublet anomernog protona ksiloze ($^3J_{1'',2''} = 7,0$ Hz).



Slika 52: ^{13}C NMR (DMSO- d_6) spektar norsvercianin-8-*O*-primverozida

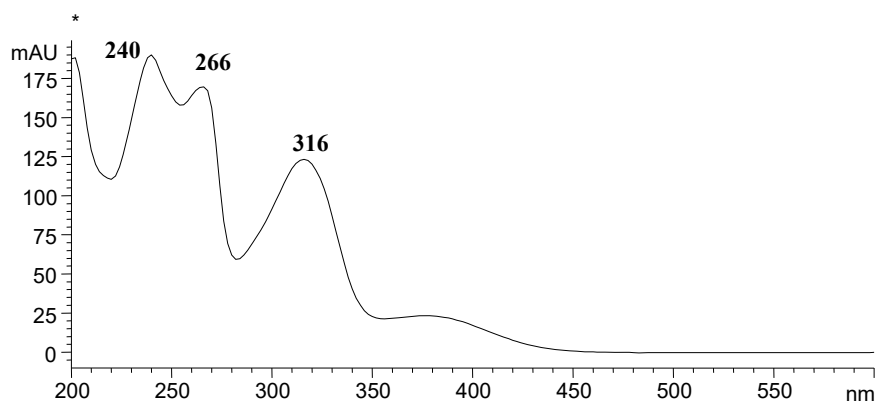
U ^{13}C NMR spektru signal za karbonilni ugljenik je na δ 180,2 ppm. U oblasti spektra od 60 do 80 ppm nalaze se signali za ugljenike šećera. Anomerni ugljenik glukoze ima signal na δ 103,8, a ksiloze na 104,7 ppm.

Dobijeni spektralni podaci su upoređivani sa podacima za norsvercianin-8-*O*-glukozid¹³².

U literaturi, do sada nema podataka da je norsvercianin-8-*O*-primverozid (1,3,7-trihidroksi-8-*O*-primverozil ksanton) izolovan iz neke druge biljne vrste.

2.2.2.5. NORSVERCIANIN-1-*O*-GLUKOZID (8)

Iz frakcije 53-57 rehromatografijom na poliamidnoj koloni (poglavlje 3.2.2.), a potom preparativnom tankoslojnom hromatografijom, izolovano je jedinjenje (8), čija je struktura određena spektroskopskim metodama.



Slika 53: UV spektralni grafikon norsvercianin-1-*O*-glukozida u MeOH
($\lambda = 260$ nm, $R_t = 33,5$ min)

Tabela 15: UV spektri norsvercianin-1-O-glukozida posle dodatka reagenasa

	λ_{max} (nm)
MeOH	239, 265, 316, 380
+ AlCl ₃	245, 277, 345, 423
+ HCl	243, 276, 344
+ NaOAc	238, 263, 354
+ NaOMe	242, 262, 348, 415

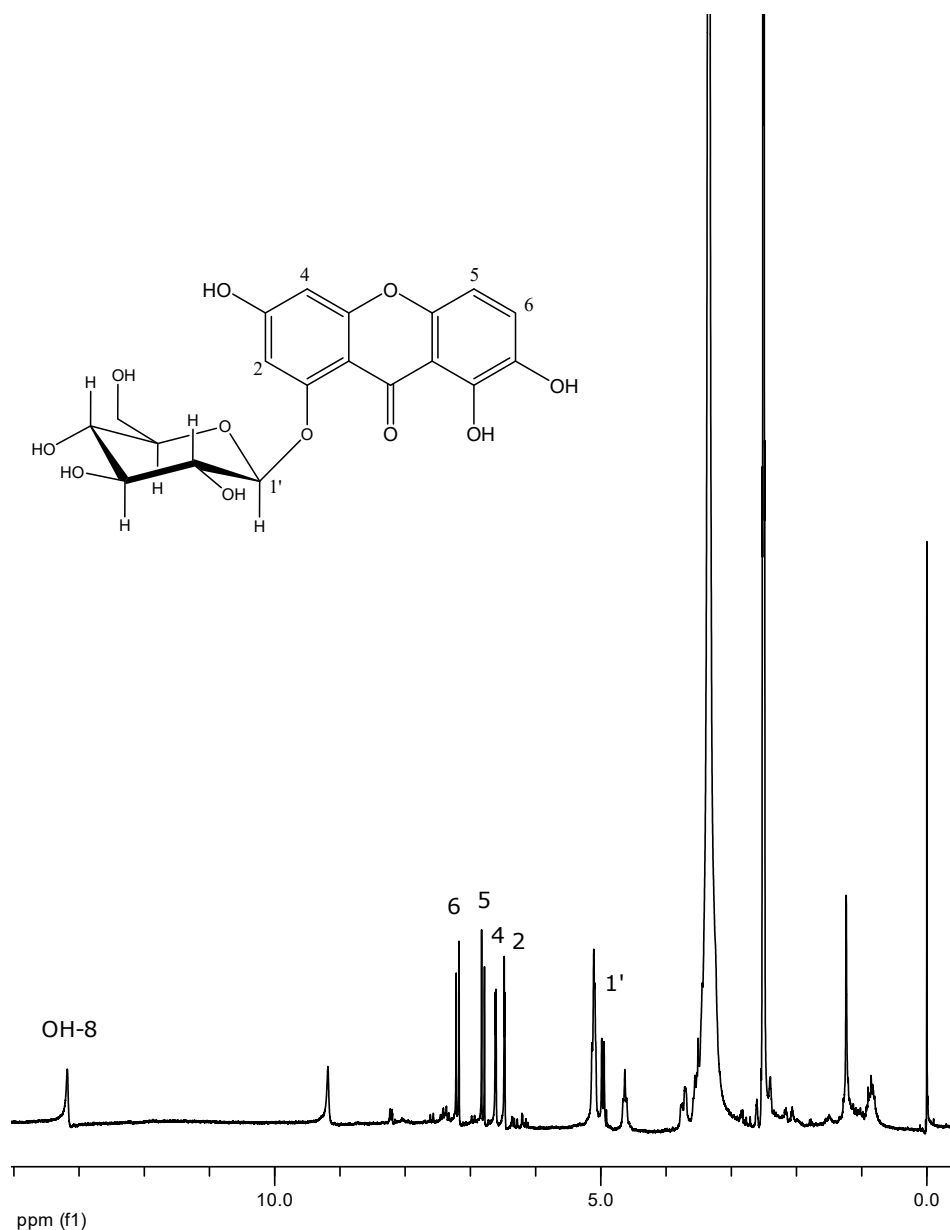
Kao i u prethodnom slučaju, prema osnovnom spektru jedinjenja može se zaključiti da je u pitanju 1,3,7,8 tetra-supstituisani ksanton. Dodatak AlCl₃ a potom HCl dovodi do promena apsorpcionih maksimuma, koje ukazuje na postojanje slobodne OH grupe u *peri* položaju u odnosu na karbonilnu grupu. U prisustvu NaOAc, batohromno se pomera II traka čime se dokazuje postojanje OH grupe u položaju 3.

Tabela 16: ¹H (200 MHz) i ¹³C (50 MHz) NMR norsvercianin-1-O-glukozida u DMSO-d₆

H/C	δ_H , mult., J (Hz)	δ_C
1	-	160,1
2	6,47 d (2,4)	100,2
3	-	165,1
4	6,61 d (2,2)	96,6
4a	-	159,2
5	6,80 d (8,8)	105,2
6	7,19 d (9,0)	123,1
7	-	140,4
8	-	148,3
8a	-	108,8
9	-	181,2
9a	-	101,7
10a	-	147,5
OH-8	13,17 s	-
Glc		
1'	4,96 d (7,2)	104,9
2'	*	73,6
3'	*	77,6
4'	*	69,9
5'	*	76,4
6'	*	60,8

* Signali su preklopljeni na $\delta_H = 3-5$ ppm

^1H NMR spektar (Slika 54, Tabela 16) ovog ksantona je veoma sličan spektru norsvercianin-1-*O*-primverozida. Razlikuju se u delu spektra u kome se nalaze signali protona šećera: ima manje signala i nema dubleta koji potiče od anomernog protona ksiloze. Na δ 4,96 ppm uočava se dublet anomernog protona glukoze sa konstantom sprezanja $^3J_{1,2'} = 7,2$ Hz. Singlet na δ 13,17 odgovara protonu iz OH-8, dok singlet na 9,18 ppm potiče od protona iz OH-7 ili OH-3. Na δ 6,47 i 6,61 nalaze se dubleti sa daljinskim konstantama sprezanja $^4J_{2,4} = 2,4$ Hz (H-2) i $^4J_{2,4} = 2,2$ Hz (H-4). Druga dva dubleta na δ 6,80 i 7,19 imaju vicinalne konstante sprezanja $^3J_{5,6} = 8,8$ Hz (H-5) i $^3J_{5,6} = 9,0$ Hz (H-6).



Slika 54: ^1H NMR (DMSO-d_6) spektar norsvercin-1-*O*-glukozida

^{13}C NMR spektar (Slika 55, Tabela 16) sadrži karakteristične signale na δ 104,9 za anomerni ugljenik glukoze i na δ 181,2 za karbonilni ugljenik. Na δ 60-80 ppm nalaze se signali za ugljenike šećera. Ugljenikovi atomi za koje je vezan kiseonik (C-1, C-3, C-4a, C-7, C-8 i C-10a) imaju pomeranja u oblasti od δ 140-170 ppm.



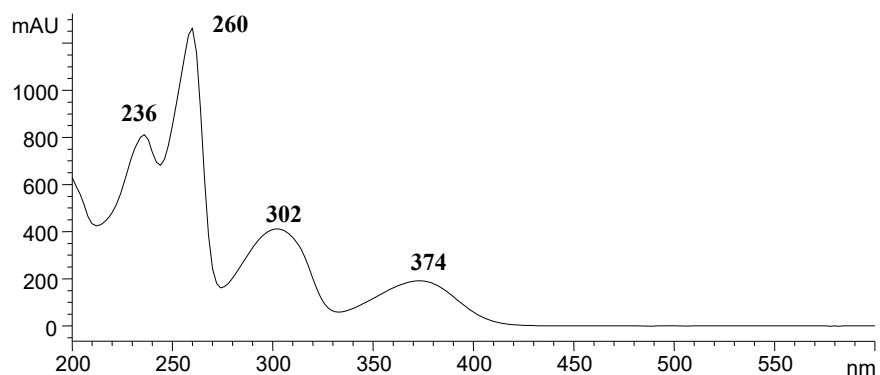
Slika 55: ^{13}C NMR (DMSO- d_6) spektar norsvercianin-1-*O*-glukozida

Spektralni podaci su u skladu sa podacima iz literature za norsvercianin-1-*O*-glukozid¹³².

Ovo jedinjenje, 3,7,8-trihidroksi-1-*O*-glukozil ksanton, je ranije izolovano iz vrste *Gentiana bavarica*¹³¹.

2.2.2.6. GENCIOZID (9)

Posle prečišćavanja butanolnog ekstrakta na koloni poliamida (poglavlje 3.2.2.), dobijena frakcija 37-42 je rehromatografisana i iz frakcije 7-9 je izolovano jedinjenje (9). Struktura je određena spektroskopskim metodama.



Slika 56: UV spektar genciozida u MeOH ($\lambda = 260$ nm, $R_t = 34.6$ min)

Tabela 17: UV spektri genciozida posle dodatka reagenasa

	λ_{\max} (nm)
MeOH	235, 260, 303, 370
+ AlCl ₃	232, 274, 321, 421
+ HCl	232, 274, 315, 420
+ NaOAc	234, 259, 302, 368
+ NaOMe	270, 304, 348, 394

I ovaj osnovni spektar (snimljen u MeOH) nedvosmisleno ukazuje na ksantonsku strukturu. Dodatkom AlCl₃ traka III se batohromno pomerila za 14 nm, a nagrađeni kompleks je stabilizovan u kiseljoj sredini što znači da je u položajima 1 i/ili 8 prisutna OH grupa. Pošto nije došlo do promene spektra posle dodatka NaOAc znači da u položajima 3 i 6 nema slobodnih OH grupa, već da su blokirane metoksi grupom ili šećerom. U prisustvu NaOMe menja se položaj apsorpcionih

maksimuma svih traka, na osnovu čega se zaključuje da su u molekulu prisutne slobodne hidroksilne grupe.

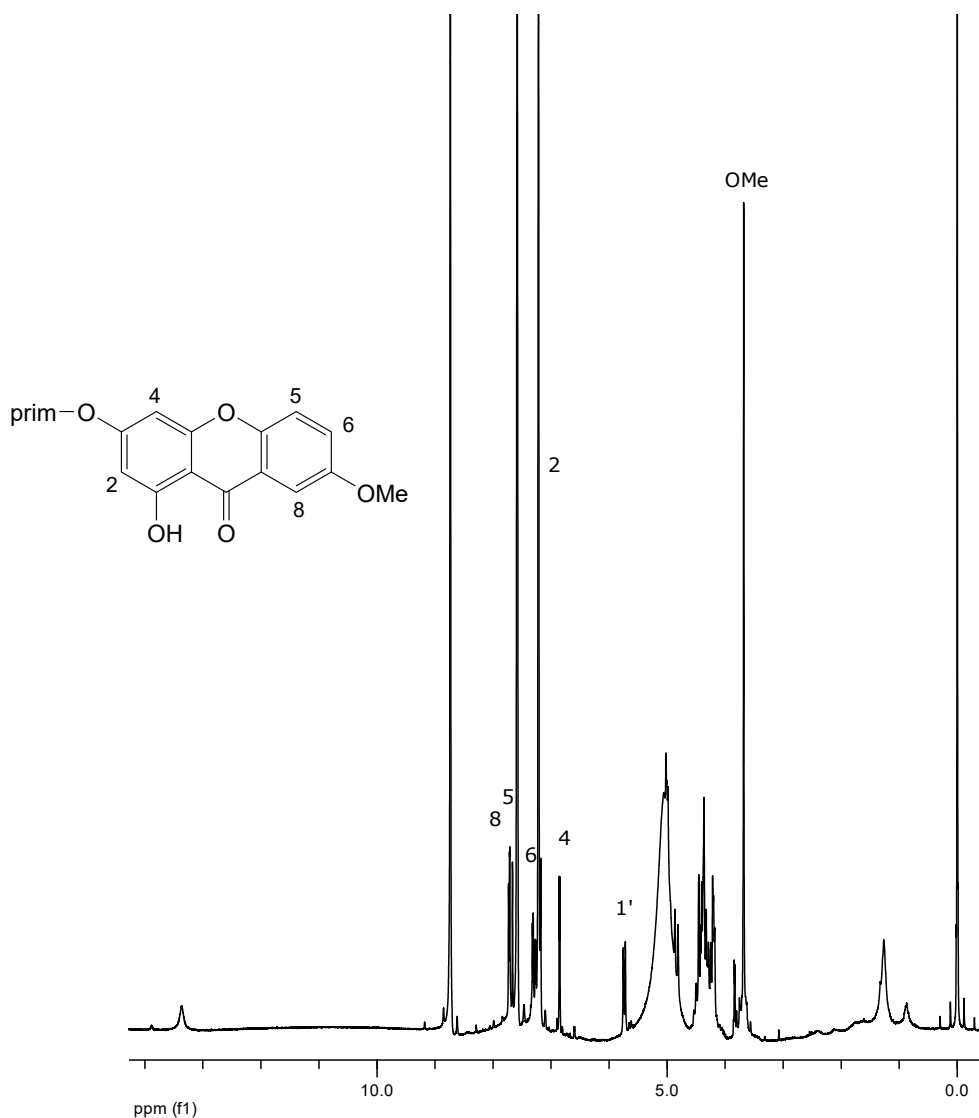
Tabela 18: ^1H (200 MHz) NMR u $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ i ^{13}C (50 MHz) NMR u DMSO-d_6 genciozida

H/C	δH , mult., J (Hz)	δC
1	-	162,5
2	7,18 d (2,2)	98,9
3	-	164,5
4	6,85 d (2,0)	94,6
4a	-	157,5
5	7,68 d (9,4)	119,8
6	7,29 dd (3,2; 9,3)	125,3
7	-	156,1
8	7,72 d (3,4)	105,4
8a	-	120,5
9	-	180,4
9a	-	103,5
10a	-	150,6
OH-1	13,36 s	-
OMe	3,68 s	56,1
Glc		
1'	5,73 d (7,0)	100,1
2'	*	73,6
3'	*	76,7
4'	*	69,7
5'	*	75,8
6'	*	69,7
Xyl		
1''	*	104,5
2''	*	73,2
3''	*	76,5
4''	*	69,7
5''	*	65,8

* Signali su preklapljeni na $\delta\text{H} = 4,1-5,5$ ppm

Za razliku od drugih jedinjenja čiji su ^1H NMR spektri snimani u DMSO-d_6 , spektar ovog ksantona (Slika 57, Tabela 18) je snimljen i u piridinu ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$). Aromatični rastvarači, kao što je piridin ili benzen, omogućavaju da se u ^1H NMR spektrima razdvoje signali koji se inače u nearomatičnim rastvaračima preklapaju. Signali aromatičnih protona H-5, H-6 i H-8 daju delimično razložen multiplet u spektru snimanom u DMSO-d_6 u oblasti 7,4 -7,8 ppm. U spektru snimljenom u $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ovi

signali su razdvojeni: H-5, na δ 7,68 daje dublet sa vicinalnom konstantom sprežanja $^3J_{5,6} = 9,4$ Hz; H-6 na δ 7,29 daje dvostruki dublet ($^3J_{5,6} = 9,3$ Hz i $^4J_{6,8} = 3,2$ Hz); H-8 na δ 7,72 ppm daje dublet sa konstantom sprežanja $^4J_{6,8} = 3,4$ Hz. Dubleti na δ 7,18 i 6,85 ($^4J_{2,4} = 2,2$ Hz i $^4J_{2,4} = 2,0$ Hz) su od protona H-2 odnosno H-4. Singlet na δ 13,36 potiče od protona iz OH-1 grupe. Signal protona OMe grupe je na δ 3,68 ppm. Anomerni proton glukoze se nalazi na δ 5,73 ($^3J_{1',2'} = 7,0$ Hz), dok je signal za anomerni proton ksiloze preklopljen sa signalima za ostale protone šećera u oblasti od 4,1 do 5,5 ppm.



Slika 57: ^1H NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) spektar geniozida

Na δ 180,4 ppm u ^{13}C NMR spektru (Slika 58, Tabela 18) nalazi se signal za karbonilni ugljenik C-9. Između 60 i 80 ppm nalaze se signali ugljenika šećera. Anomerni ugljenik glukoze je na δ 100,1, a ksiloze na 104,5 ppm. Signal za ugljenik iz OMe grupe je na δ 56,1.

Podaci su u skladu sa literaturnim podacima za genciozid¹³⁵.



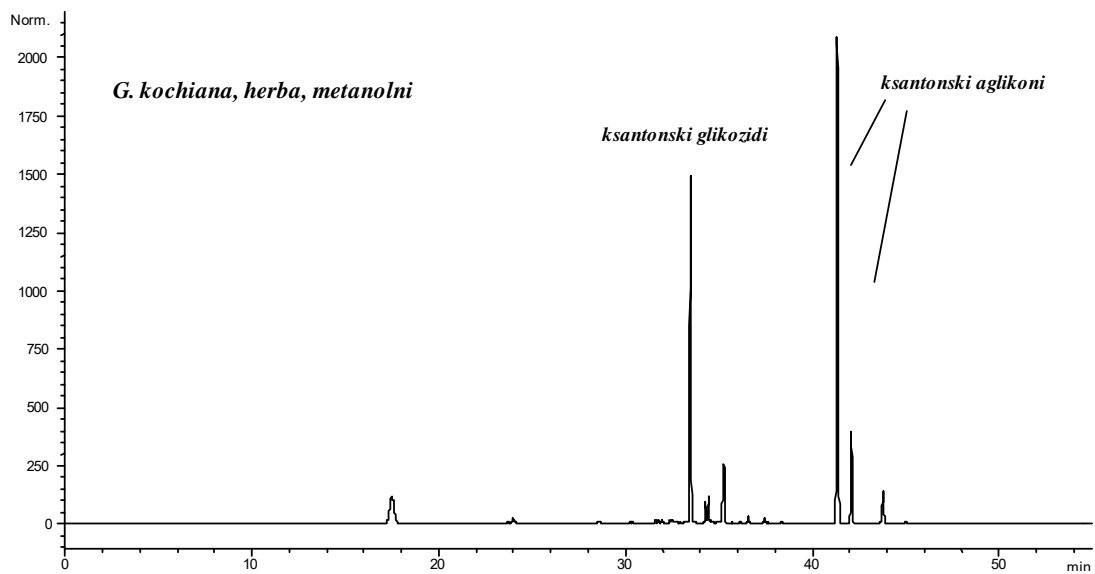
Slika 58: ^{13}C NMR (DMSO- d_6) spektar genciozida

Genciozid, 1-hidroksi-7-metoksi-3-*O*-primverozil ksanton, je izolovan iz vrsta *Gentiana lutea*, *G. panonica*, *G. punctata* i *G. purpurea*¹⁶.

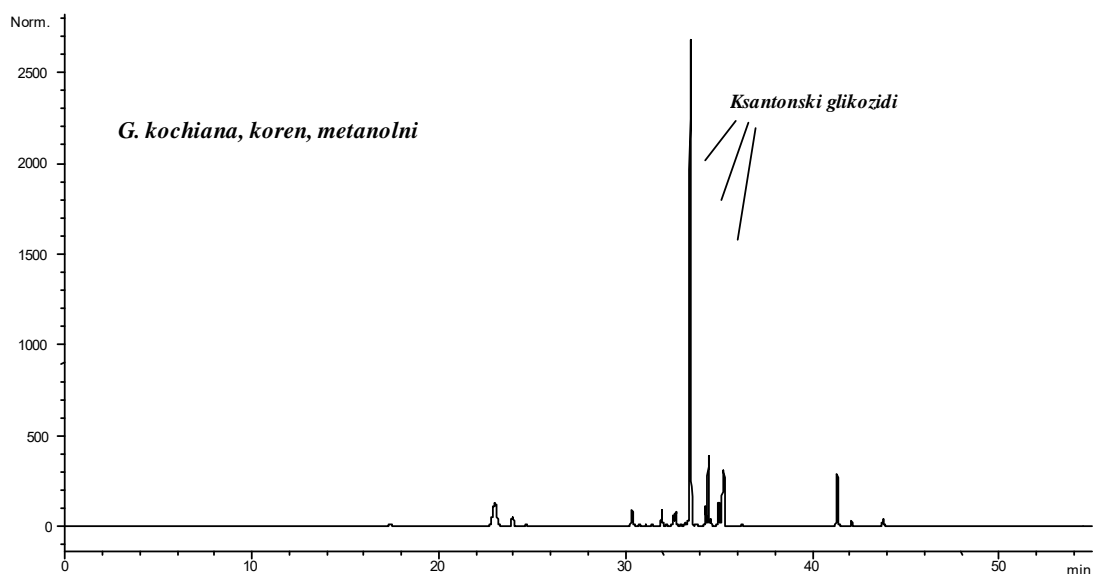
2.3. Analiza hemijskog sastava vrste *G. kochiana*

2.3.1. Hemijska analiza nadzemnog dela

Biljni materijal je sakupljen u fazi cvetanja jula 2002. godine na planini Komovi (2000m nadmorske visine). Posle sušenja na vazduhu nadzemni delovi su odvojeni od korena, samlevani i ekstrahovani metanolom (poglavlje 3.3.). Na slikama 59 i 60 su prikazani hromatogrami metanolnih ekstrakata vrste *G. kochiana*. U hromatogramu nadzemnog dela uočava se prisustvo i ksantonskih glikozida i aglikona, za razliku od korena u kome dominiraju glikozidi.



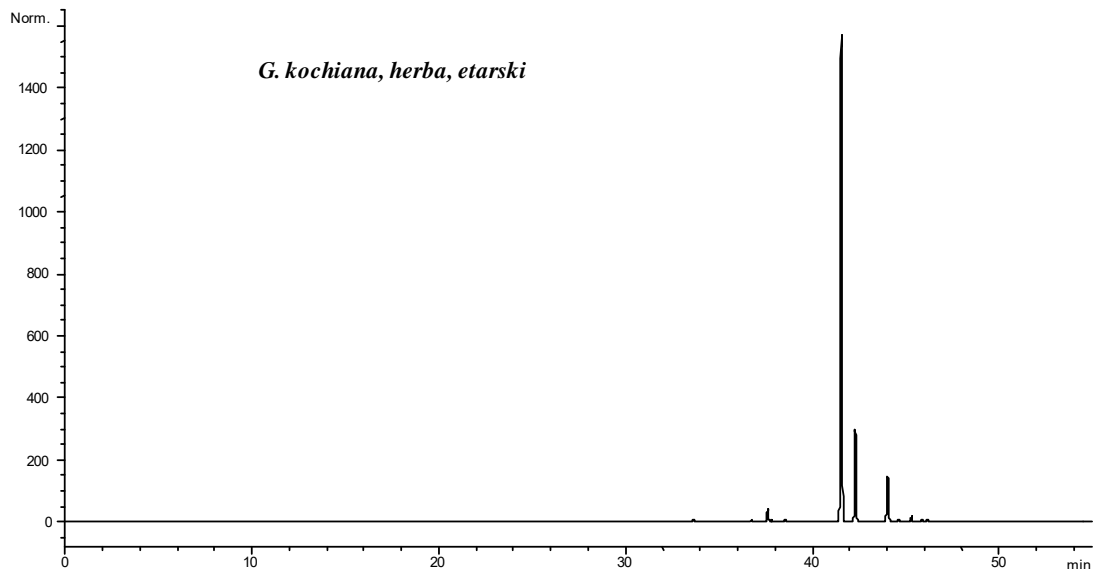
Slika 59: Hromatogram metanolnog ekstrakata nadzemnog dela vrste *G. kochiana*



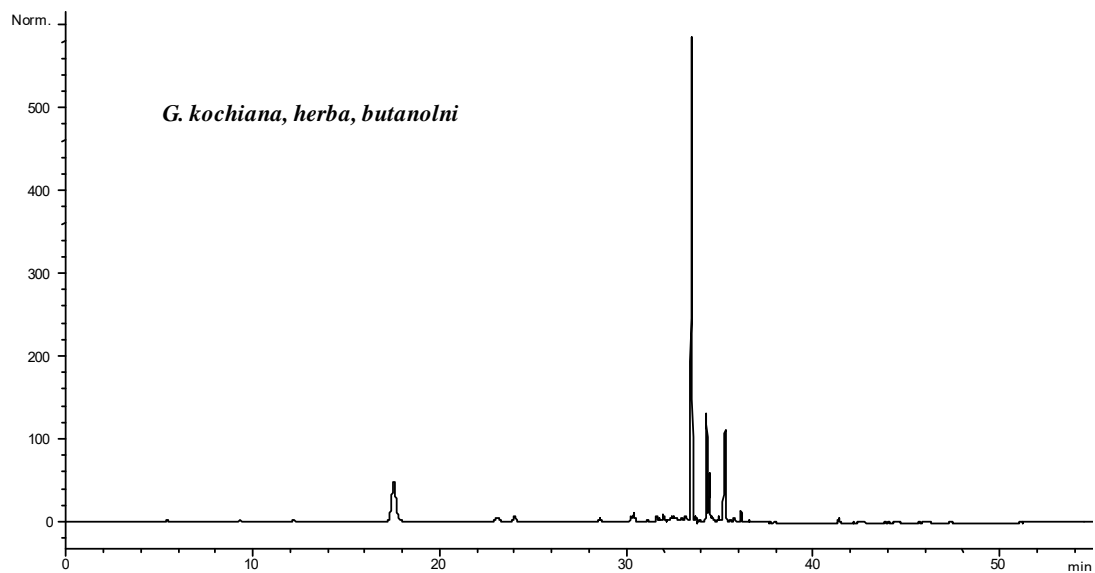
Slika 60: Hromatogram metanolnog ekstrakta korena vrste *G. kochiana*

Sirovi metanolni ekstrakt nadzemnog dela vrste *G. kochiana* je rastvoren u vodi i dalje sukcesivno reekstrahovan etrom, etil-acetatom i *n*-butanolom. Dobijeni ekstrakti su upareni, analizirani HPLC metodom i dalje prečišćavani hromatografskim tehnikama (poglavlje 3.3.) u cilju izolovanja i identifikacije aktivnih komponenti.

HPLC analiza je pokazala da etarski ekstrakt (Slika 61) sadrži samo ksantonske aglikone (pikovi na $R_t = 41 - 46$ min), dok su ksantonski glikozidi (pikovi $R_t = 32 - 37$ min) glavne komponente butanolnog ekstrakta, što je prikazano na slici 62.



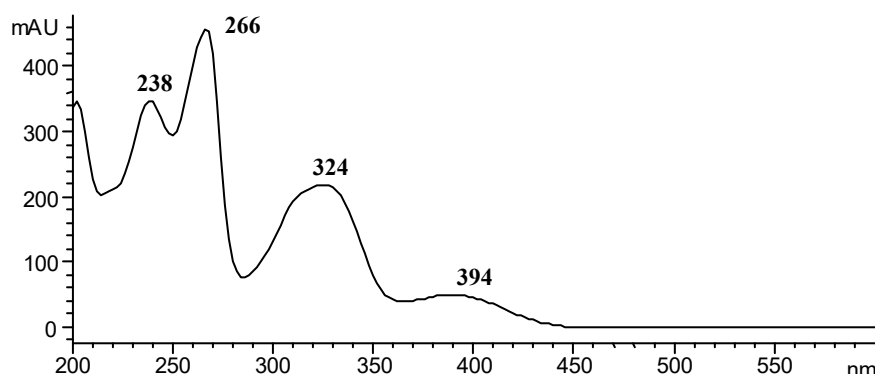
Slika 61: Hromatogram etarskog ekstrakta nadzemnog dela vrste *G. kochiana*



Slika 62: Hromatogram butanolnog ekstrakta nadzemnog dela vrste *G. kochiana*

2.3.1.1. GENCIAKOHIANIN (10)

Etarski ekstrakt je "dry-column flash" hromatografijom na SiO₂ razdvojen na više frakcija (poglavlje 3.3.1.). Iz frakcije 5-6 izolovano je jedinjenje (10) čija je struktura određena spektroskopskim metodama.



Slika 63: UV spekter genciakohianina u MeOH ($\lambda = 260$ nm, $R_t = 42.09$ min)

Tabela 19: UV spektri genciakohianina posle dodatka reagenasa

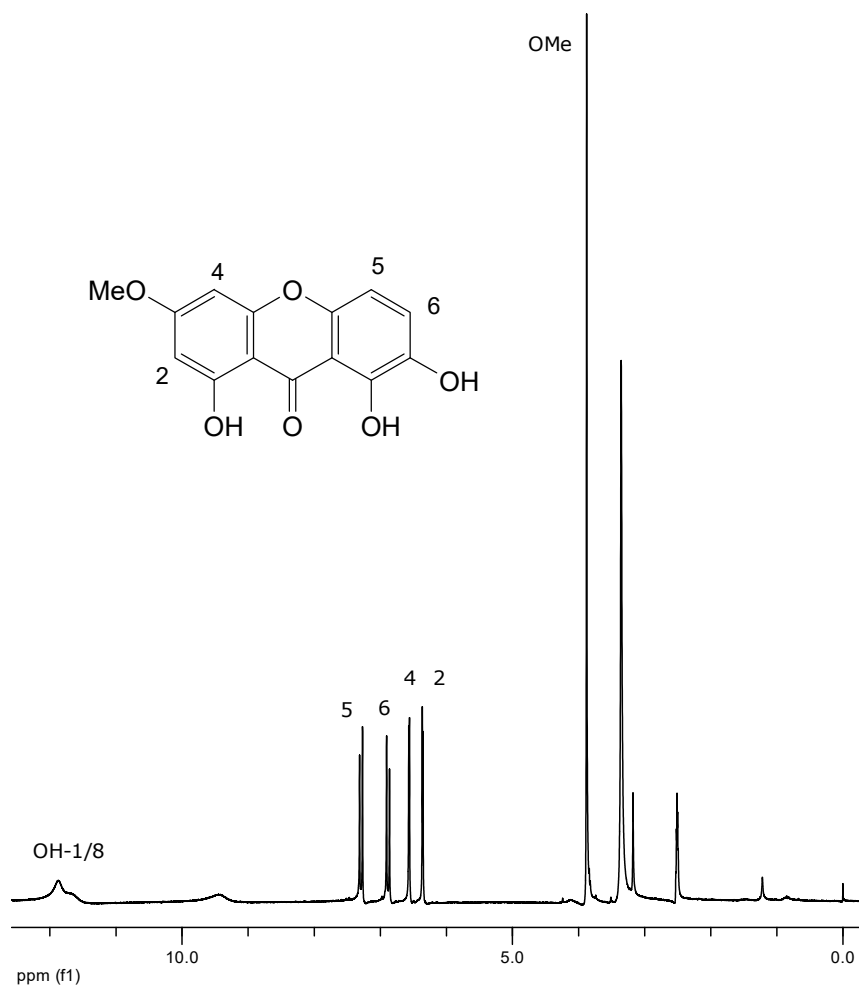
	λ_{max} (nm)
MeOH	236, 267, 327, 390
+ AlCl ₃	245, 278, 356, 452
+ HCl	237, 274, 330, 452
+ NaOAc	238, 267, 325, 391
+ NaOMe	249, 273, 328, 419

Oblik UV spektra sa četiri apsorpciona maksimuma ukazuje na strukturu ksantona. Dodatkom NaOMe ovi maksimumi se batohromno pomeraju što znači da molekul sadrži slobodne OH grupe. I u prisustvu AlCl_3 dolazi do batohromnog pomeranja maksimuma uz smanjenje inteziteta, čime se dokazuje postojanje OH grupa u 1, 8 ili u *orto* položaju. Pošto je kompleks nestabilan po dodatku HCl, potvrđuje se prisustvo *orto* hidroksilnih grupa. NaOAc nema uticaj na spektar, iz čega se zaključuje da je OH grupa u položaju 3 blokirana.

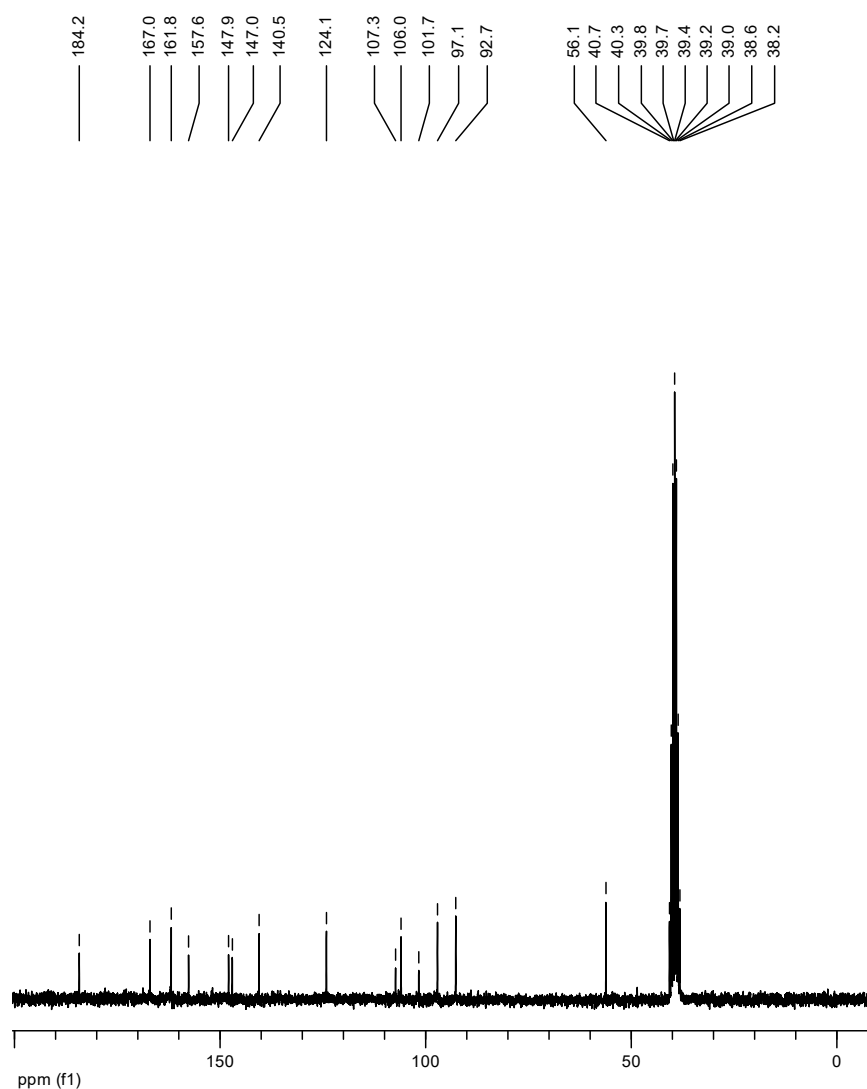
Tabela 20: ^1H (200 MHz) i ^{13}C (50 MHz) NMR genciakohianina u DMSO-d_6

H/C	δ_{H} , mult., J (Hz)	δ_{C}
1		161,8
2	6,35 d (2,2)	97,1
3	-	167,0
4	6,56 d (2,2)	92,7
4a	-	157,6
5	7,29 d (8,8)	140,5
6	6,88 d (9,0)	124,1
7	-	107,3
8	-	147,9
8a	-	106,0
9	-	184,2
9a	-	101,7
10a	-	147,0
OH-1/ OH-8	11,85 s	-
OMe	3,87 s	56,1

Za razliku od prethodnih, u ovom ^1H NMR spektru se ne uočavaju signali protona koji potiču od šećera. Na δ 3,87 se nalazi singlet protona OMe grupe. Dubleti na δ 6,35 i 6,56 sa *meta* konstantama sprezanja $^4J_{2,4} = 2,2$ Hz, potiču od H-2, odnosno H-4. Druga dva dubleta, na δ 7,29 i 6,88 sa vicinalnim konstantama sprezanja $^3J_{5,6} = 8,8$ i $9,0$ Hz, su karakteristična za *orto* protone H-5 i H-6. Signal na 11,85 daju protoni iz OH-1 ili OH-8 grupe. Prošireni signal na 9.41 potiče od OH-7.



Slika 64: ^1H NMR (DMSO- d_6) spektar genciakohianina

Slika 65: ^{13}C NMR (DMSO- d_6) spektar gentiakohianina

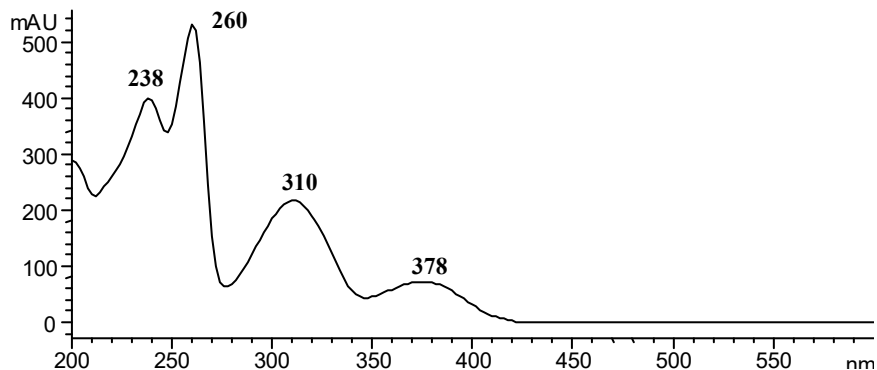
U ^{13}C NMR spektru na hemijskom pomeranju od 107 do 170 ppm nalaze se signali aromatičnih ugljenika za koje su vezani kiseonici. Karbonilni ugljenik (C-9) ima signal na 184,2 ppm. Na δ 56,1 nalazi se signal ugljenika metoksi grupe.

Prikazani NMR spektri su u skladu sa podacima iz literature^{132,17}

Genciakohianin, 1,7,8-trihidroksi-3-metoksi ksanton, je izolovan iz nekoliko vrsta roda *Gentiana*: *G. bavarica*, *G. verna*, *G. clussi*, *G. angustifolia*, *G. barbata* i *G. nivalis*^{9, 14}.

2.3.1.2. GENCIAKAULEIN (11)

Iz frakcije 11-12 (poglavlje 3.3.1.) dobijeno je jedinjenje (11) čija je struktura određena spektroskopskim metodama.



Slika 66: UV spektar genciakauleina u MeOH ($\lambda = 260$ nm, $R_t = 41,2$ min)

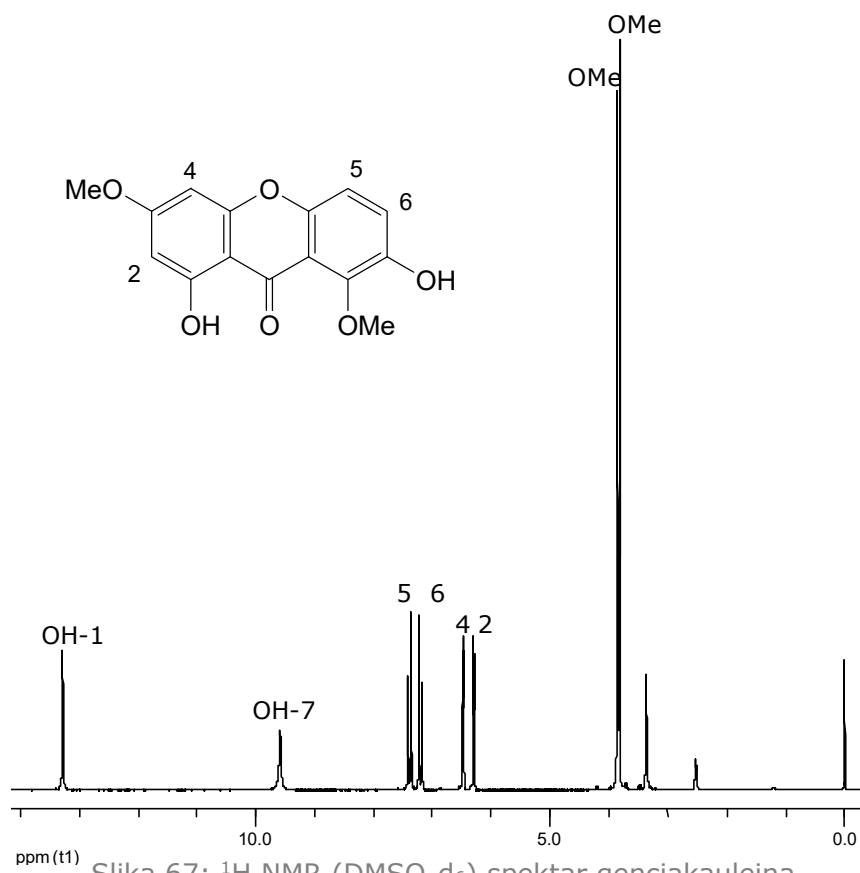
Tabela 21: UV spektri genciakauleina posle dodatka reagenasa

	λ_{\max} (nm)
MeOH	238, 260, 309, 375
+ AlCl ₃	233, 274, 328, 427
+ HCl	233, 274, 328, 427
+ NaOAc	237, 260, 309, 375
+ NaOMe	272, 305, 419

I ovo jedinjenje je, prema izgledu osnovnog spektra, ksanton. Batohromno pomeranje apsorpcionih maksimuma po dodatku NaOMe ukazuje na prisustvo slobodnih OH grupa. AlCl₃ dovodi do promene apsorpcionih maksimuma, što ukazuje na slobodne OH grupe u položajima 1 i/ili 8. U kiseljoj sredini spektar se ne menja čime se zaključuje da nema *ortho* OH grupa. Spektar se ne menja ni dodatkom NaOAc što znači da u položaju 3 nema slobodne hidroksilne grupe.

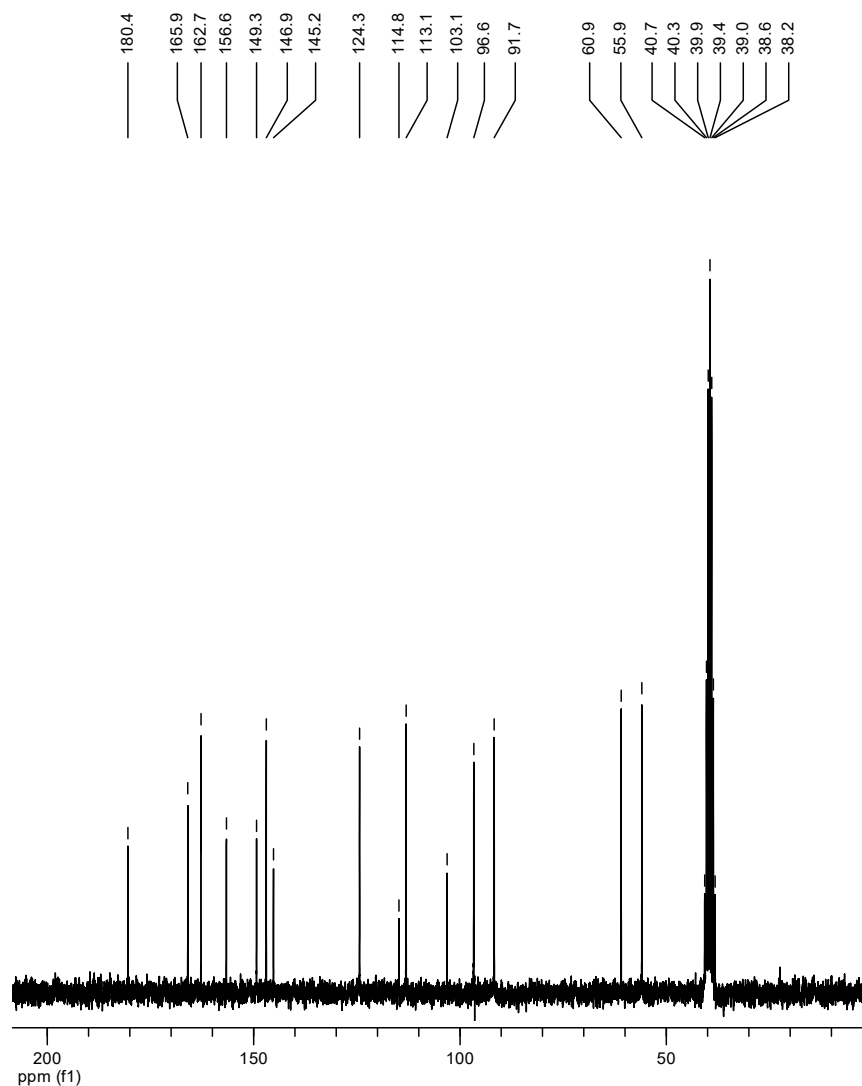
Tabela 22: ^1H (200 MHz) i ^{13}C (50 MHz) NMR genciakauleina u DMSO-d_6

H/C	δ_{H} , mult., J (Hz)	δ_{C}
1		163,0
2	6,29 d (2,2)	96,9
3	-	166,2
4	6,48 d (2,4)	91,9
4a	-	156,8
5	7,38 d (9,2)	145,5
6	7,19 d (9,0)	124,6
7	-	115,0
8	-	149,5
8a	-	113,3
9	-	180,5
9a	-	103,4
10a	-	147,2
OH-1	13,27 s	-
OH-7	9,58 s	-
OMe	3,86 s	61,2
OMe	3,82 s	56,2



^1H NMR spektar ovog ksantona (Slika 67, Tabela 22) je vrlo sličan spektru genciakohianina. Uočavaju se dva signala za metoksi grupe - na δ 3,86 i 3,82. Dubleti protona H-2 i H-4 su na 6,29 i 6,48 ppm. *Orto* protoni H-5 i H-6 imaju dublete na δ 7,38 i 7,19 sa vicinalnim konstantama sprežanja od 9,2 odnosno 9,0 Hz. Singleti protona OH-1 i OH-7 su na δ 13,27 i 9,58.

I ^{13}C NMR spektar (Slika 68, Tabela 22) je veoma sličan spektru genciakohianina samo što se pojavljuje dodatni signal za OMe grupu na δ 60,9 ppm.



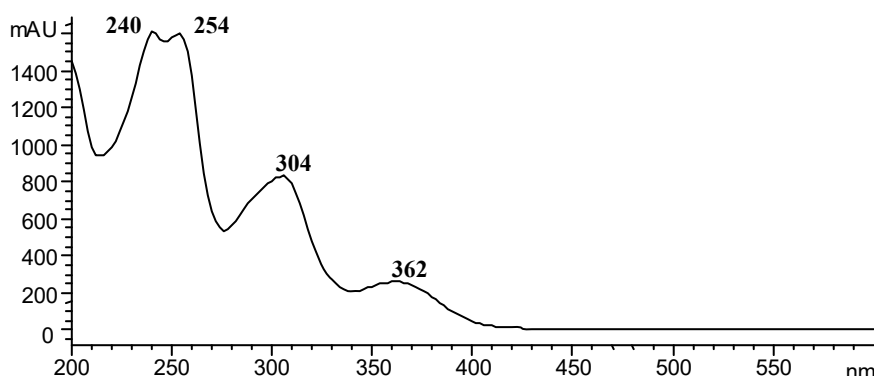
Slika 68: ^{13}C NMR (DMSO- d_6) spektar genciakauleina

Spektralni podaci su u skladu sa podacima iz literature^{17, 132}

Genciakaulein, 1,7-dihidroksi-3,8-dimetoksi ksanton je pronađen i u drugim vrstama roda *Gentiana* - *G. bavarica*, *G. verna*, *G. clussi*, *G. angustifolia*, *G. nivalis*, *G. utriculosa*, *G. alpina*^{9, 14}.

2.3.1.3. GENCIAKAULEIN-1-O-PRIMVEROZID (12)

Butanolni ekstrakt je prečišćavan na poliamidnoj koloni smešom metanol-voda (poglavlje 3.3.2.). Dobijena frakcija 5 je rehromatografisana na koloni poliamida i iz frakcije 1 dobijeno je jedinjenje (12) čija je struktura određena spektroskopskim metodama.



Slika 69: UV spektr genciakaulein-1-O-primverozida u MeOH
($\lambda = 260$ nm, $R_t = 33.4$ min)

Tabela 23: UV spektri genciakaulein-1-O-primverozida posle dodatka reagenasa

	λ_{\max} (nm)
MeOH	241, 251, 303, 361
+ AlCl ₃	240, 251, 304, 359
+ HCl	240, 253, 305, 359
+ NaOAc	240, 251, 303, 361
+ NaOMe	250, 272, 408

I ovo je tipičan UV spektar ksantonskog jedinjenja. Reagensi: AlCl₃, HCl kao ni NaOAc nisu imali uticaj na spektar, pa se može zaključiti da ovaj ksanton nema slobodne OH grupe u položajima 1, 8 i 3. Postojanje slobodne OH grupe potvrđeno je dodatkom NaOMe koji je batohromno pomerio apsorpcione maksimume.

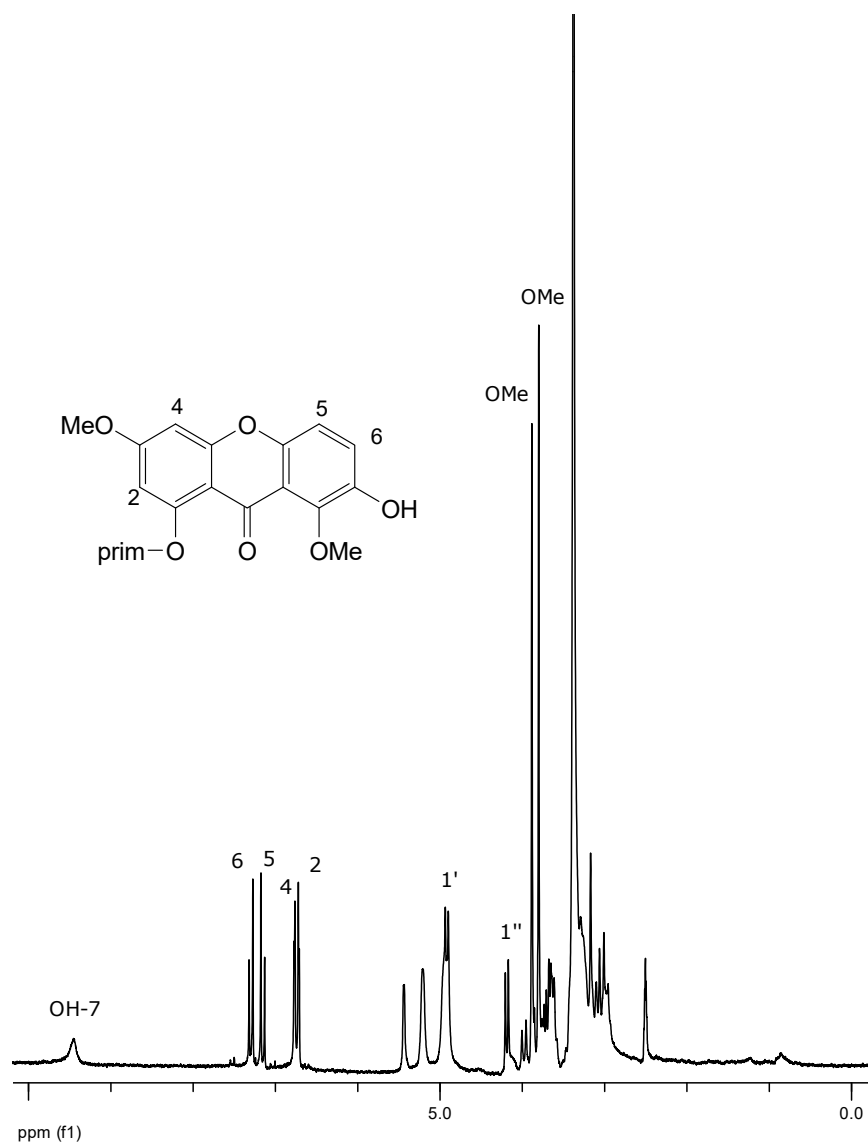
Tabela 24: ¹H (200 MHz) i ¹³C (50 MHz) NMR genciakaulein-1-O-primverozida u DMSO-d₆

H/C	δ _H , mult., J (Hz)	δ _C
1	-	159,3
2	6,71 d (2,2)	100,3
3	-	164,4
4	6,76 d (2,2)	95,1
4a	-	158,0
5	7,14 d (9,2)	117,6
6	7,29 d (8,8)	123,2
7	-	145,4
8	-	147,1
8a	-	112,8
9	-	174,9
9a	-	107,7
10a	-	148,8
OH-7	9,43 s	-
OMe	3,79 s	60,8
OMe	3,88 s	56,0
Glc		
1'	4,91 d (7,6)	102,6
2'	*	73,6
3'	*	76,8
4'	*	69,9
5'	*	76,6
6'	*	68,8
Xyl		
1''	4,18 d (7,0)	104,1
2''	*	73,6
3''	*	76,7
4''	*	69,7
5''	*	65,9

***Signali su preklapljeni**

Pored signala za aromatične protone u ¹H NMR spektru (Slika 70, Tabela 24) uočavaju se i signali protona koji potiču iz šećera. Na δ 4,91 i 4,18 nalaze se dubleti anomernih protona glukoze i ksiloze. Protoni metoksi grupa daju singlete

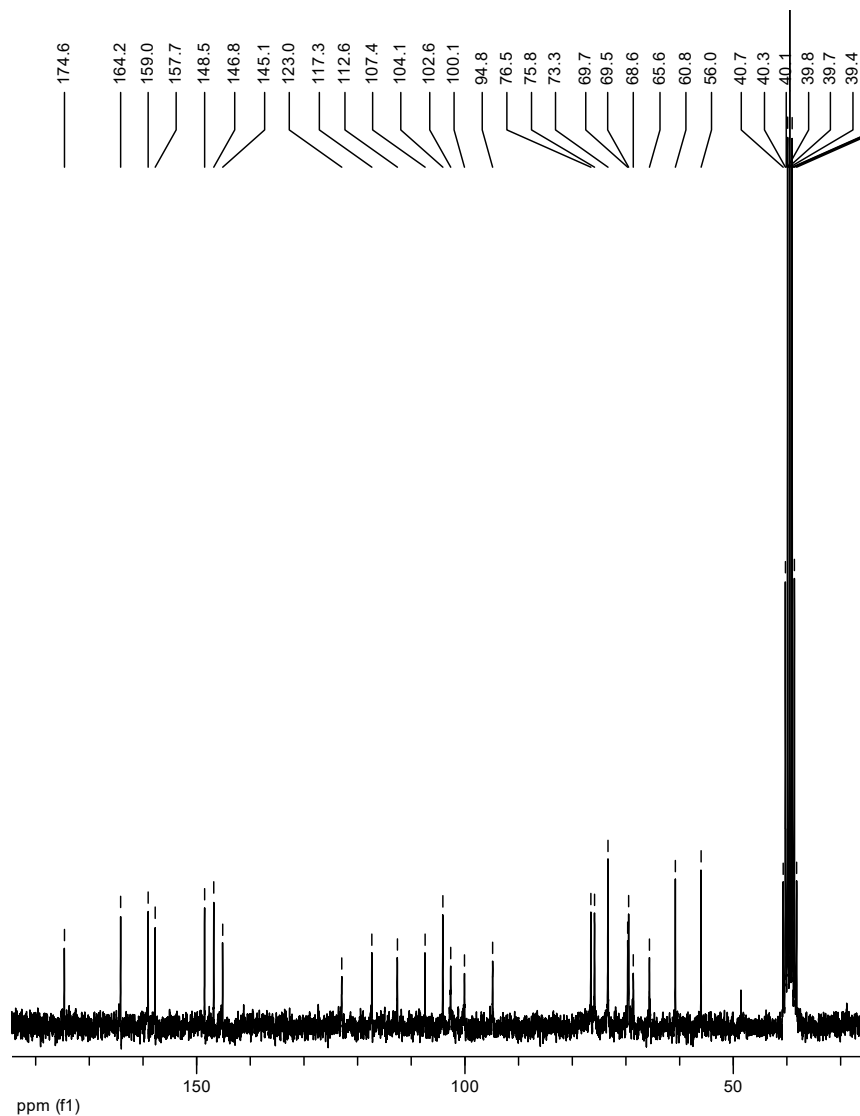
na 3,79 i 3,88 ppm. Prošireni singlet na δ 9,43 potiče iz OH-7. Protoni H-5 i H-6 daju dublete na 7,14 i 7,29 ppm ($^3J_{5,6} = 9,2$ i $8,8$ Hz). Druga dva dubleta su na δ 6,71 i 6,76 sa daljinskim konstantama sprezanja $^4J_{2,4} = 2,2$ Hz (H-2 odnosno H-4).



Slika 70: ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$) spektar genciakaulein-1-*O*-primverozida

Signali za ugljenike metoksi grupa u ^{13}C NMR spektru (Slika 71, Tabela 24) se uočavaju na 56,0 i 60,8 ppm. U delu spektra od 64-80 ppm nalaze se signali ugljenika šećera. Anomerni ugljenici su na 102,6 ppm za glukozu i 104,1 ppm za ksilozu. Signal karbonilnog ugljenika je na 174,9 ppm.

Dobijeni rezultati su u skladu sa podacima iz literature^{27, 131}

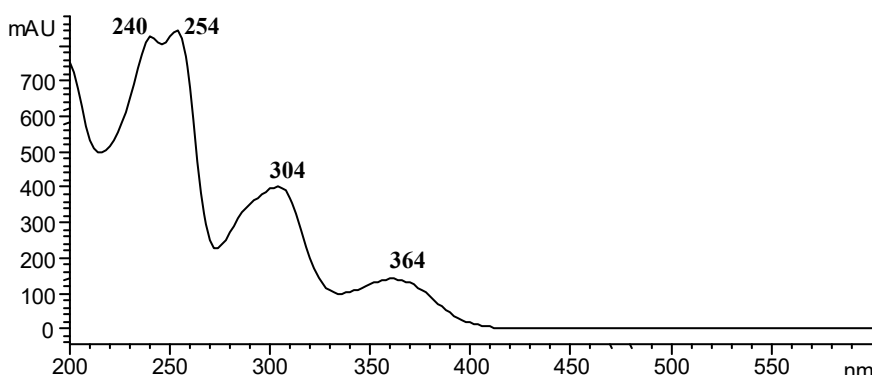


Slika 71: ^{13}C NMR (DMSO- d_6) spektar genciakaulein-1-*O*-primverozida

Pored vrste *G. kochiana*, ovaj ksanton, genciabavarozyd ili 7-hidroksi-3,8-dimetoksi-1-*O*-primverozid, izolovan je i iz *G. bavarica*, *G. nivalis* i *G. verna*¹⁶.

2.3.1.4. GENCIAKAULEIN-1-*O*-GLUKOZID (13)

Rehromatografijom frakcije 5 na koloni poliamida dobijeno je i jedinjenje (13) (poglavlje 3.3.2.). Struktura je određena spektroskopskim metodama.



Slika 72: UV spekter genciakaulein-1-*O*-glukozida u MeOH ($\lambda = 260$ nm, $R_t = 34.2$ min)

Tabela 25: UV spektri genciakaulein-1-*O*-glukozida posle dodatka reagenasa

	λ_{\max} (nm)
MeOH	241, 251, 303, 361
+ AlCl ₃	240, 251, 304, 359
+ HCl	240, 253, 305, 359
+ NaOAc	240, 251, 303, 361
+ NaOMe	250, 272, 408

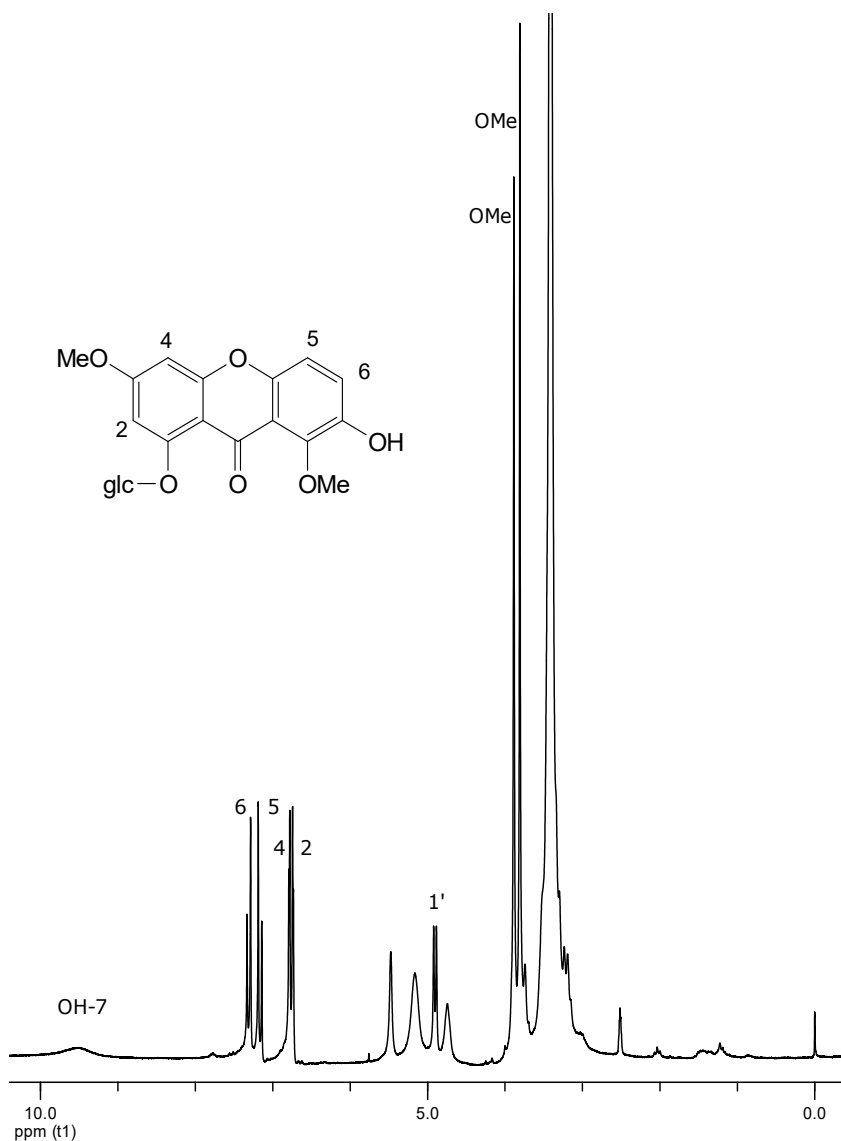
Izolovano jedinjenje je po obliku UV spektra i vrednostima za apsorpcione maksimume identično predhodno izolovanom genciakaulein-1-*O*-primverozidu. Takođe i promene u spektrima nakon dodavanja odgovarajućih reagenasa su iste. Međutim, razlikuju se retencionna vremena u hromatogramu na kojima se

pojavljuju njihovi pikovi, što nedvosmisleno govori da je u pitanju ksanton sa drugačijom strukturom.

Tabela 26: (200 MHz) i ^{13}C (50 MHz) NMR genciakaulein-1-O-glukozida u DMSO- d_6

H/C	δ_{H} , mult., J (Hz)	δ_{C}
1	-	159,4
2	6,74 d (2,6)	100,8
3	-	164,4
4	6,78 d (2,6)	95,1
4a	-	158,0
5	7,16 d (8,8)	117,6
6	7,30 d (9,2)	123,3
7	-	145,4
8	-	147,1
8a	-	112,9
9	-	175,0
9a	-	107,8
10a	-	148,8
OH-7	9,44 s	-
OMe	3,79 s	61,1
OMe	3,87 s	56,2
Glc		
1'	4,89 d (7,0)	103,4
2'	*	73,8
3'	*	76,2
4'	*	70,1
5'	*	77,8
6'	*	*

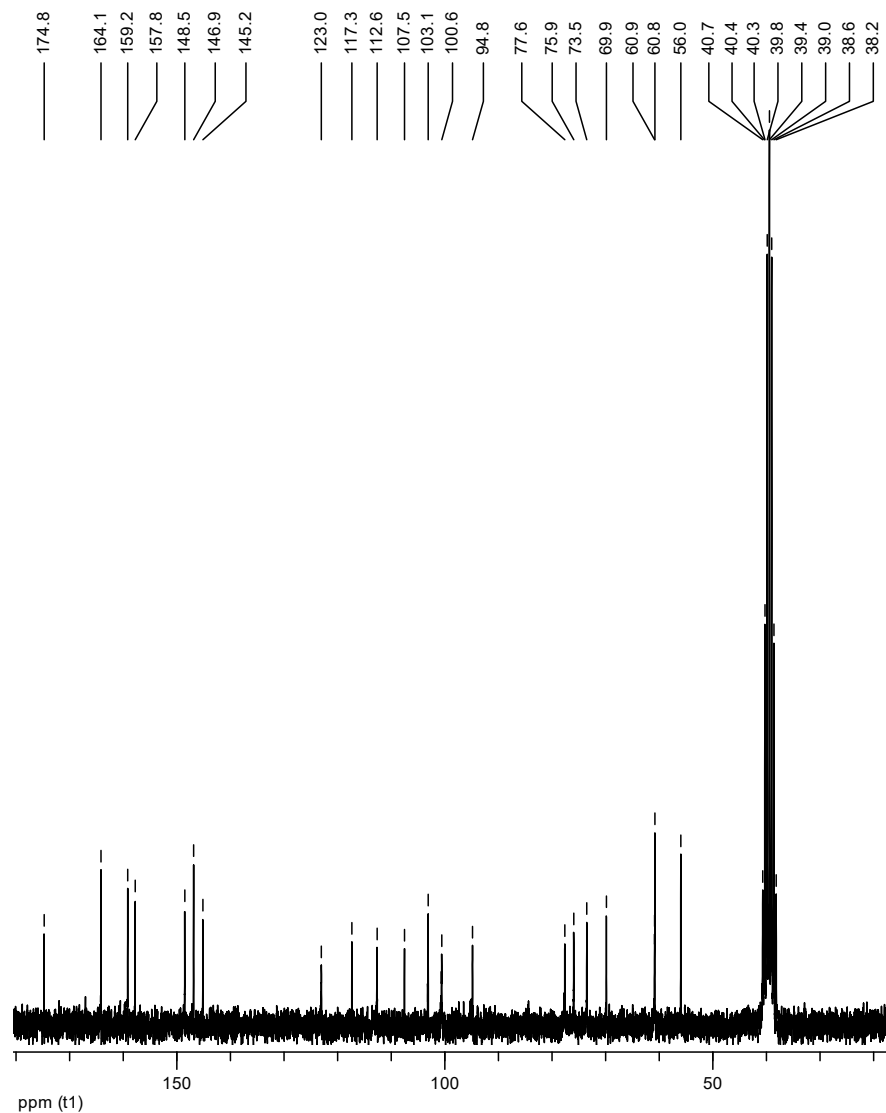
Po podacima iz ^1H NMR spektra (Slika 73, Tabela 26) ovo jedinjenje ima signale samo za protone glukoze, po čemu se razlikuje od genciakaulein-1-O-primverozida čija je šećerna jedinica primverozna. Ostali spektralni podaci su vrlo slični: dva dubleta sa *meta* konstantama sprežanja $^4J_{2,4} = 2,6$ Hz za H-2 i H-4 i dva dubleta sa *orto* konstantama sprežanja $^3J_{5,6} = 8,8$ i $9,2$ Hz za protone H-5 i H-6. Signali dve metoksi grupe su na 3,79 i 3,87 ppm. Dublet anomernog protona glukoze je na 4,89 ppm.



Slika 73: ^1H NMR (DMSO-d_6) spektar genciakaulein-1-*O*-glukozida

U ^{13}C NMR spektru (Slika 74, Tabela 26) hemijska pomeranja ugljenika su gotovo ista kao u spektru genciakaulein-1-*O*-primverozida, s tom razlikom što nema signala za ugljenike ksiloze.

Spektralni podaci su upoređivani sa podacima za prethodno izolovan 7-hidroksi-3,8-dimetoksi-1-*O*-primverozid, obzirom da je razlika samo u šećernoj jedinici.



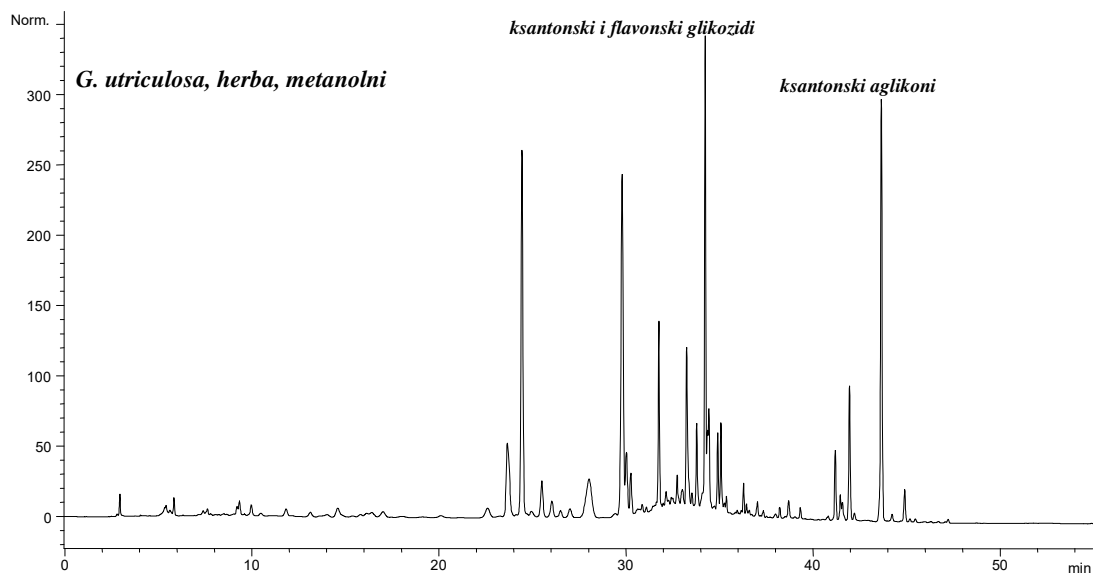
Slika 74: ^{13}C NMR (DMSO- d_6) spektar genciakaulein-1-*O*-glukozida

Ovo jedinjenje, 7-hidroksi-3,8-dimetoksi-1-*O*-glukozil ksanton, je ranije izolovan iz vrste *G. bavarica*¹⁶

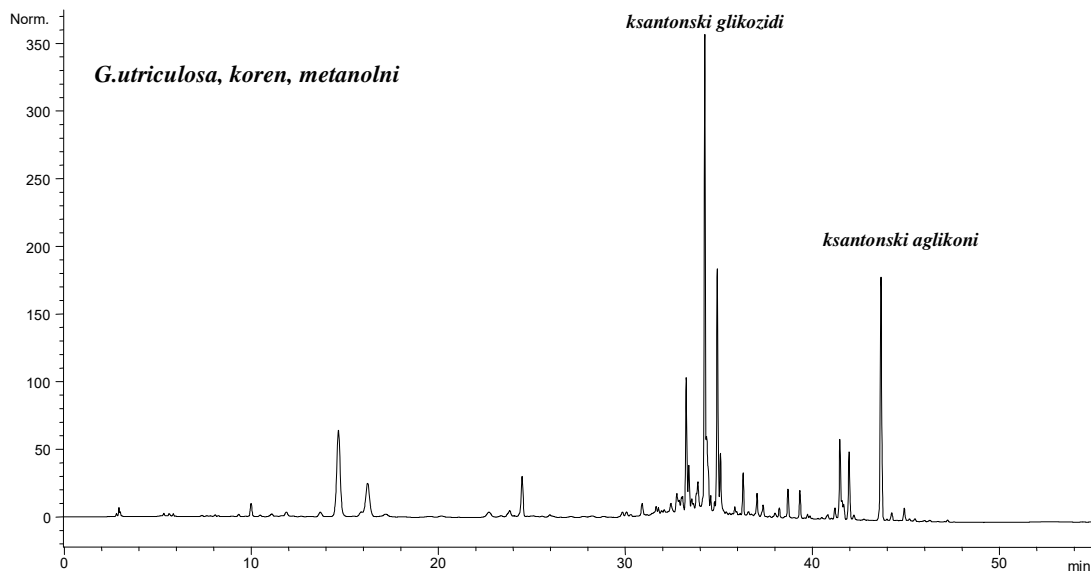
2.4. Analiza hemijskog sastava vrste *G. utriculosa*

2.4.1. Hemijska analiza nadzemnog dela

Ova biljna vrsta je sakupljena u fazi cvetanja na planini Tari u julu 2002. godine, kao i na Valjevskim planinama, iste godine (poglavlje 3.4.). Urađena je preliminarna HPLC analiza metanolnih ekstrakata korena i nadzemnog dela što je prikazano na slikama (Slika 75, Slika 76). Hromatogram nadzemnog dela je bogatiji aktivnim komponentama od korena. U hromatogramu korena uočava se odsustvo pikova na retencionim vremenima od 25-33 min koja su karakteristična za pojavljivanje flavonskih glikozida.

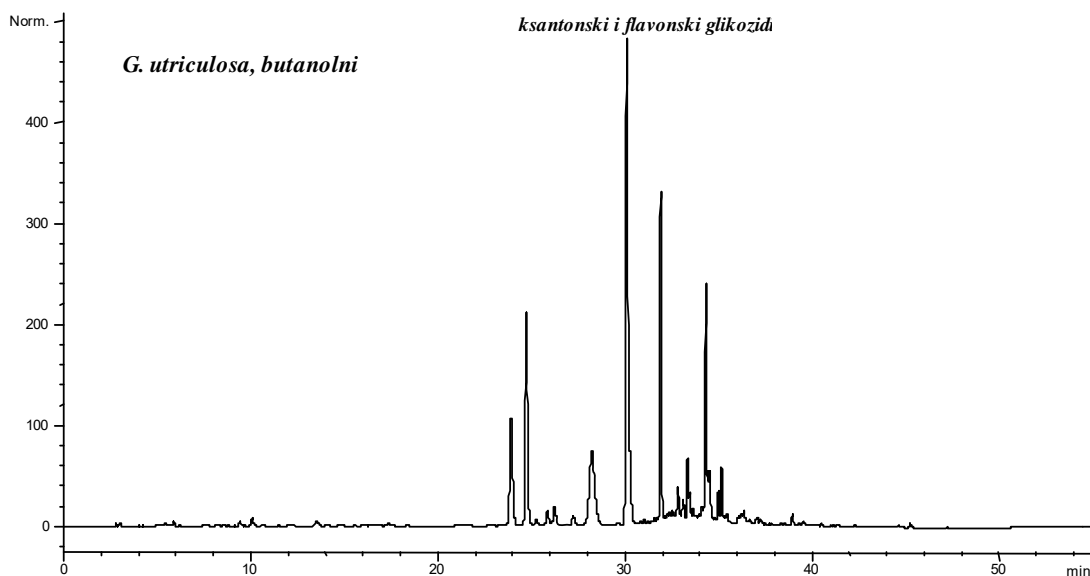


Slika 75: Hromatogram metanolnog ekstrakta nadzemnog dela vrste *G. utriculosa*



Slika 76: Hromatogram metanolnog ekstrakta korena vrste *G. utriculosa*

Sirovi metanolni ekstrakt nadzemnog dela biljke je rastvoren u vodi i uzastopno reekstrahovan etrom, etil-acetatom i n-butanolom. HPLC analizom je utvrđeno da se u butanolnom ekstraktu uglavnom nalaze ksantonski i flavonski glikozidi. Obzirom da ne postoje literaturni podaci o ksantonskim glikozidima iz ove vrste, glavni cilj je bio njihova izolacija i identifikacija. Na slici (Slika 77) je prikazan hromatogram butanolnog ekstrakta.

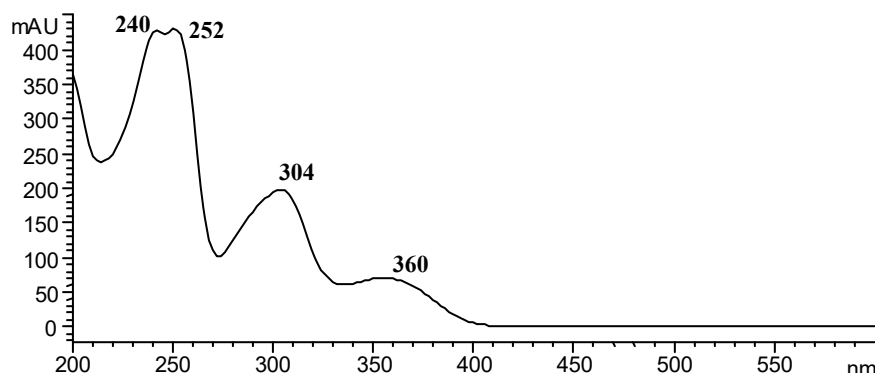


Slika 77: Hromatogram butanolnog ekstrakta nadzemnog dela vrste *G. utriculosa*

Butanolni ekstrakt je razdvojen na koloni poliamida SC₆ u više frakcija iz kojih su dalje različitim hromatografskim tehnikama izolovane pojedine komponente (poglavlje 3.4.1.).

2.4.1.1. DEKUZATIN-1-O-PRIMVEROZID (14)

Iz frakcije 5 koja je rehromatografisana na poliamidnoj koloni, a potom dalje prečišćavana na preparativnoj ploči silika-gela (poglavlje 3.4.1), izolovano je jedinjenje (14) čija je struktura određena spektroskopskim metodama.



Slika 78: UV spekter dekuzin-1-O-primverozida u MeOH
($\lambda = 260$ nm, $R_t = 34.3$ min)

Tabela 27: UV spektri dekuzin-1-O-primverozida posle dodatka reagenasa

	λ_{max} (nm)
MeOH	241, 252, 304, 355
+ AlCl ₃	241, 247, 302, 355
+ HCl	241, 252, 304, 357
+ NaOAc	240, 252, 302, 356
+ NaOMe	240, 252, 302, 358

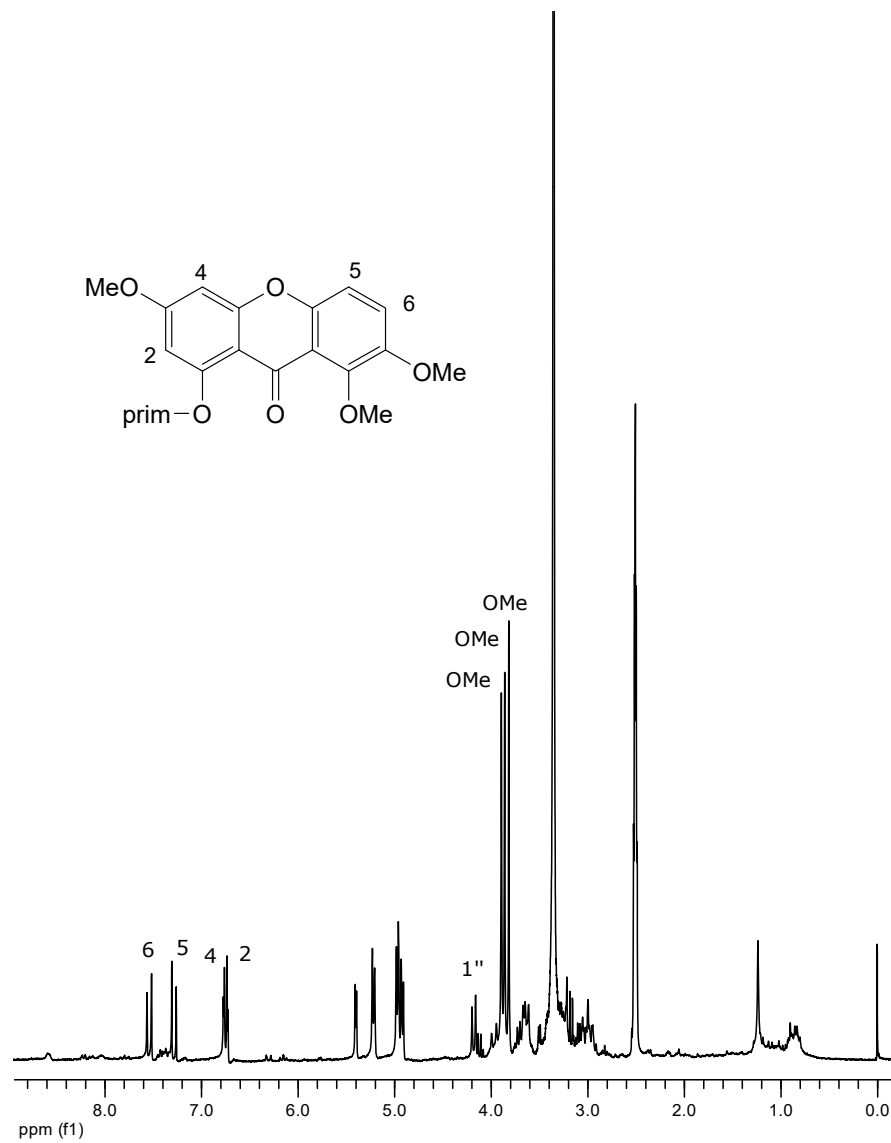
Oblik osnovnog spektra ukazuje na strukturu ksantona. Dodatak AlCl₃, kao ni HCl, NaOAc, niti NaOMe nisu pomerili apsorpcione maksimume u spektru, što znači da ovaj ksanton nema slobodne hidroksilne grupe.

Tabela 28: ^1H (200 MHz) i ^{13}C (50 MHz) NMR dekuzatin-1-O-primverozida u DMSO- d_6

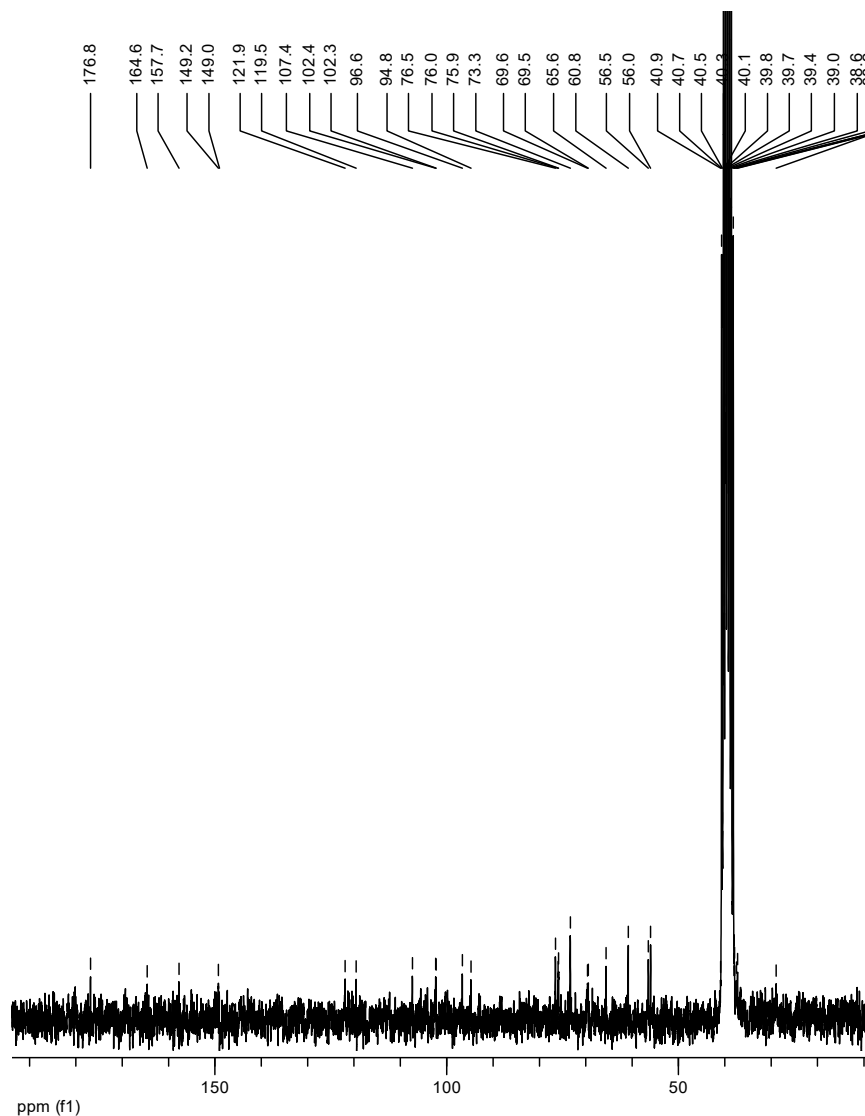
H/C	δ_{H} , mult., J (Hz)	δ_{C}
1	-	159,3
2	6,72 d (2,2)	100,0
3	-	164,6
4	6,76 d (2,2)	**
4a	-	158,0
5	7,28 d (9,0)	117,8
6	7,54 d (9,6)	119,7
7	-	**
8	-	149,3
8a	-	112,6
9	-	176,8
9a	-	107,6
10a	-	149,3
OMe	3,89 s	61,1
OMe	3,86 s	56,8
OMe	3,81 s	56,3
Glc		
1'	*	102,4
2'	*	73,6
3'	*	76,8
4'	*	69,7
5'	*	76,8
6'	*	**
Xyl		
1''	4,17 d (7,4)	104,4
2''	*	73,6
3''	*	76,2
4''	*	69,7
5''	*	68,8

*Signali su preklapljeni **Signali se ne vide zbog male koncentracije uzorka

U ^1H NMR spektru (Slika 79, Tabela 28) na δ 3,89, 3,86 i 3,81 nalaze se singleti od tri protona OMe grupa. Dubleti *meta* protona H-2 i H-4 su na δ 6,72 i 6,76 ppm, dok su dubleti *orto* protona H-5 i H-6 na δ 7,28 i 7,54. Dublet anomernog protona ksiloze je na δ 4,17. Signal anomernog protona glukoze je preklapljen sa signalima ostalih OH grupa šećera u oblasti 4,8-5 ppm.



Slika 79: ^1H NMR (DMSO-d_6) spektar dekuzatin-1-*O*-primverozida



Slika 80: ^{13}C NMR (DMSO- d_6) spektar dekuzatin-1-*O*-primverozida

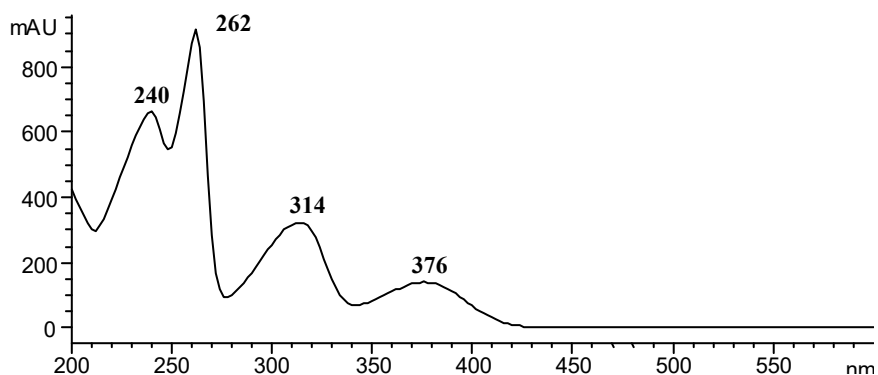
Signali ugljenika metoksi grupa u ^{13}C NMR spektru (Slika 80, Tabela 28) se uočavaju na 56,3, 56,8 i 61,1 ppm. Anomerni ugljenik ksiloze je na 104,4 ppm. Signal ugljenika C-9 je na 176,4 a anomernog ugljenika glukoze na 102,4 ppm.

Dobijeni rezultati su u skladu sa podacima iz literature^{31, 131}

Dekuzatin-1-*O*-primverozid (3,7,8-trimetoksi-1-*O*-primverozil ksanton) je ranije izolovan iz vrsta *Gentiana verna* i *G. Bavarica*¹⁴.

2.4.1.2. LANCERIN (15)

Posle rehromatografisanja frakcije 12-43 na koloni poliamida (poglavlje 3.4.1.) i prečišćavanja na koloni sefadeksa LH-20, iz spojenih frakcija 3-6 izolovano je jedinjenje (15). Struktura je određena spektroskopskim metodama.



Slika 81: UV spekter lancerina u MeOH ($\lambda = 260$ nm, $R_t = 30.1$ min)

	λ_{\max} (nm)
MeOH	239, 262, 312, 371
+ AlCl ₃	234, 274, 321, 419
+ HCl	232, 274, 329, 415
+ NaOAc	236, 260, 321, 355
+ NaOMe	245, 275, 345, 405

Slika 82: UV spektri lancerina posle dodatka reagenasa

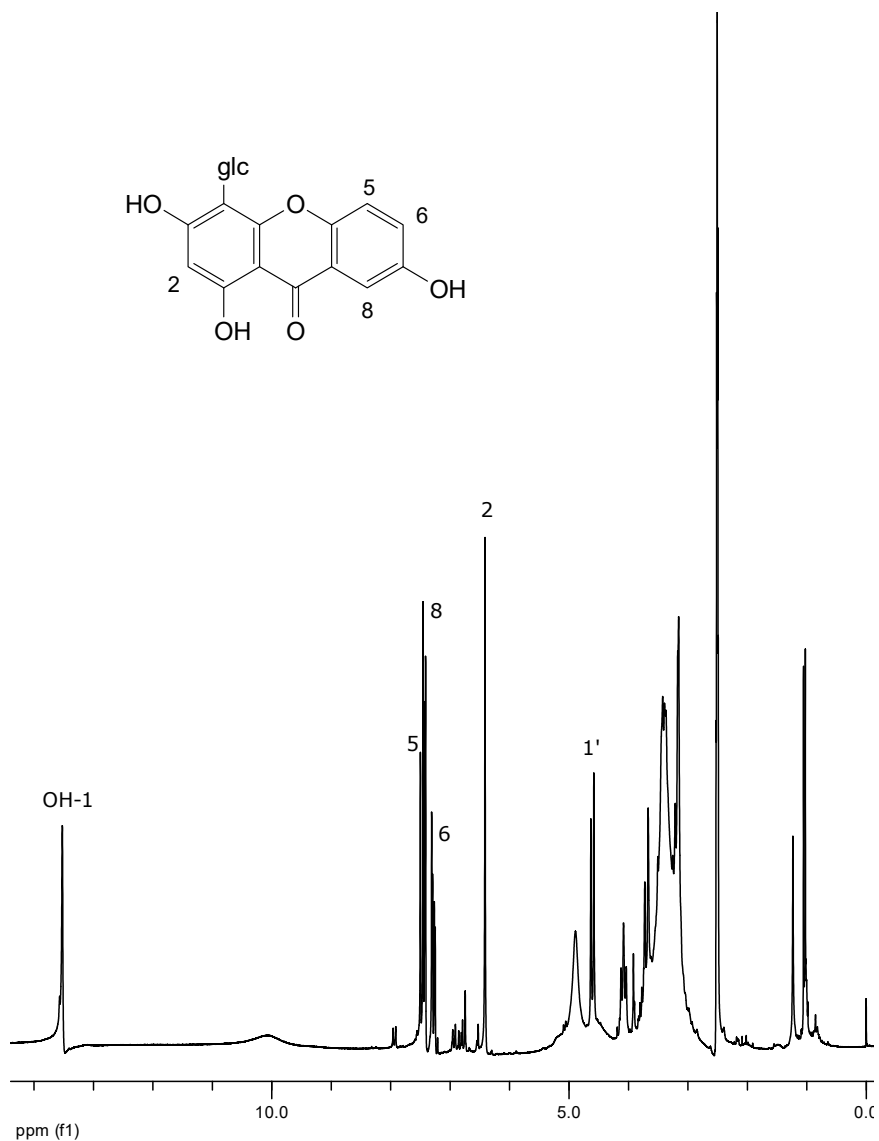
I ovo jedinjenje prema izgledu osnovnog spektra ima strukturu koja odgovara ksantonu. Dodatak AlCl₃ dovodi do batohromnog pomeranja maksimuma u oblasti I, II i III trake. Pod uticajem HCl spekter se ne menja, što pokazuje da postoje slobodne OH grupe u položaju 1 ili 8. Posle dodavanja NaOAc uočava se batohromno pomeranje maksimuma u oblasti II trake sa 312 na 321nm, čime se potvrđuje prisustvo slobodne OH grupe u položaju 3.

Tabela 29: ^1H (200 MHz) i ^{13}C (50 MHz) NMR lincerina u DMSO-d_6

H/C	δ_{H} , mult., J (Hz)	δ_{C}
1	-	162,2
2	6,41 s	93,76
3	-	165,6
4	-	124,6
4a	-	156,7
5	7,47 d (9,0)	108,12
6	7,28 dd (3,0; 9,0)	120,6
7	-	149,1
8	7,42 d (2,8)	108,3
8a	-	119,2
9	-	179,8
9a	-	101,7
10a	-	154,2
OH-1	13,52 s	-
Glc		
1'	4,61 d (9,8)	81,6
2'	*	70,9
3'	*	73,2
4'	*	70,4
5'	*	79,2
6'	*	61,7

* Signali su preklapljeni na $\delta = 3-4$ ppm

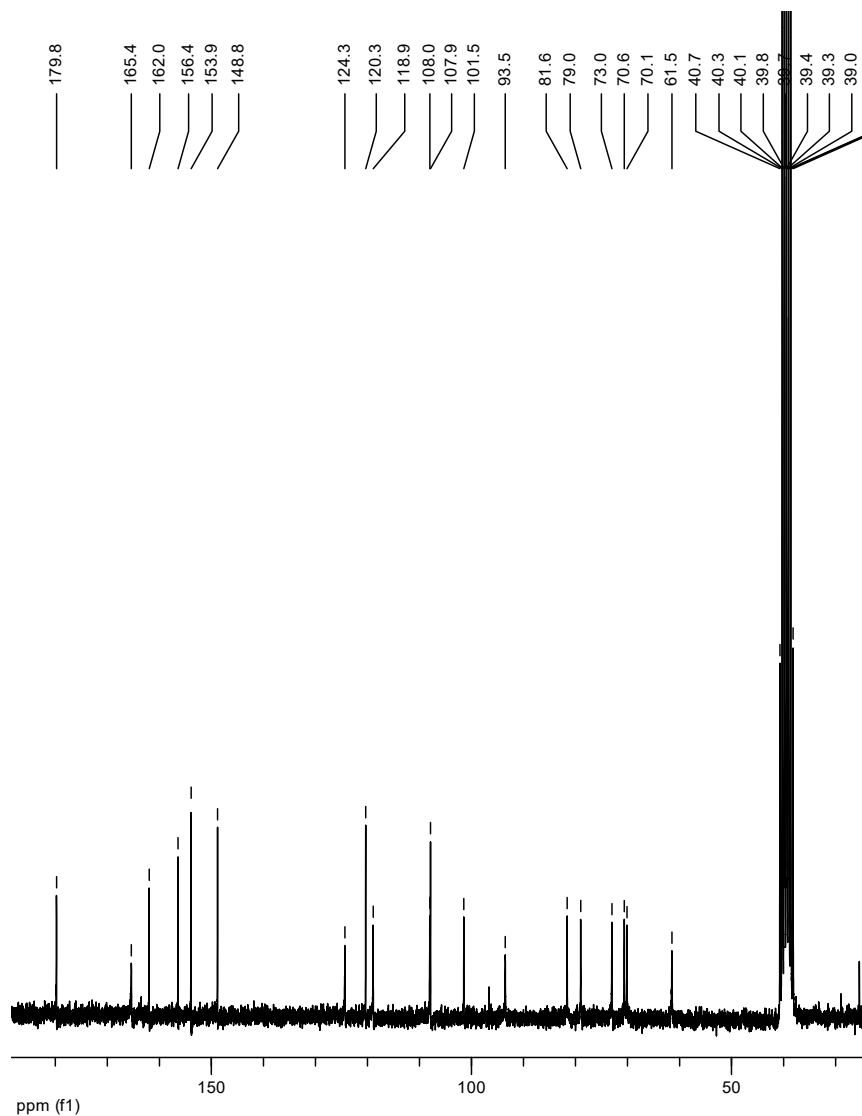
Pored signala za aromatične protone, u ^1H NMR spektru (Slika 83, Tabela 29) uočavaju se i signali protona šećera. Dublet na δ 4,61 potiče od protona koji se nalazi na anomernom ugljeniku. Obzirom da je konstanta spreznjanja $J_{1',2'} = 9,8$ Hz znači da je glukoza vezana za aglikon C-glikozidnom vezom. Singlet na 13,52 ppm daje proton OH-1 grupe. Na δ 7,42 nalazi se dublet protona H-8 ($^4J_{6,8} = 2,8$ Hz), dok je na δ 7,47 dublet protona H-5 ($^3J_{5,6} = 9,0$ Hz).

Slika 83: ^1H NMR (DMSO- d_6) spektar lancherina

Proton H-6 daje dvostruki dublet na 7,28 ppm zbog sprežanja sa H-8 ($^4J_{6,8} = 3,0$ Hz) i H-5 ($^3J_{5,6} = 9,0$ Hz). Na δ 6,41 je singlet protona H-2.

U ^{13}C NMR spektru (Slika 84, Tabela 29) na hemijskom pomeranju 179,8 ppm uočava se signal karakterističan za karbonilni ugljenik. Anomerni ugljenik glukoze daje signal na 81,6 ppm, dok se signali za ostale C-atome šećera nalaze na 60-80 ppm.

CI maseni spektar pokazuje molekulski jon (M+1) na m/z 407. Glukoza daje jon na m/z 163.



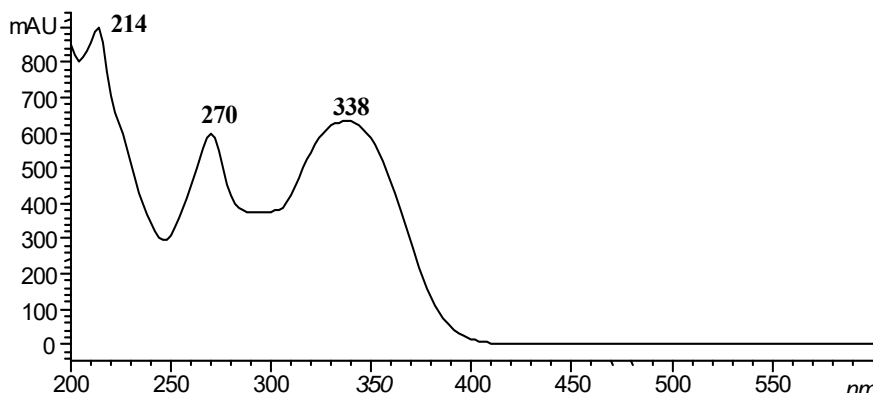
Slika 84: ^{13}C NMR (DMSO- d_6) spektar lancerina

Dobijeni rezultati su u skladu sa podacima iz literature za lancerin^{136, 137}.

Ovo je prvi podatak da je lancerin (1,3,7-trihidroksi-4-*C*-glukozil ksanton), pronađen u nekoj vrsti roda *Gentiana*. Ranije je izolovan iz vrste *Triptospermum taiwanense* i *T. lanceolatum*^{136, 137}

2.4.1.3. IZOVITEKSIN (16)

Frakcija 44-56 je rehromatografisana na poliamidnoj koloni (poglavlje 3.4.1.) i iz frakcije 31-37 dobijeno je jedinjenje (16), čija je struktura određena spektroskopskim metodama.



Slika 85: UV spektrar izoviteksina u MeOH ($\lambda = 260$ nm, $R_t = 31.8$ min)

Tabela 30: UV spektri izoviteksina posle dodatka reagenasa

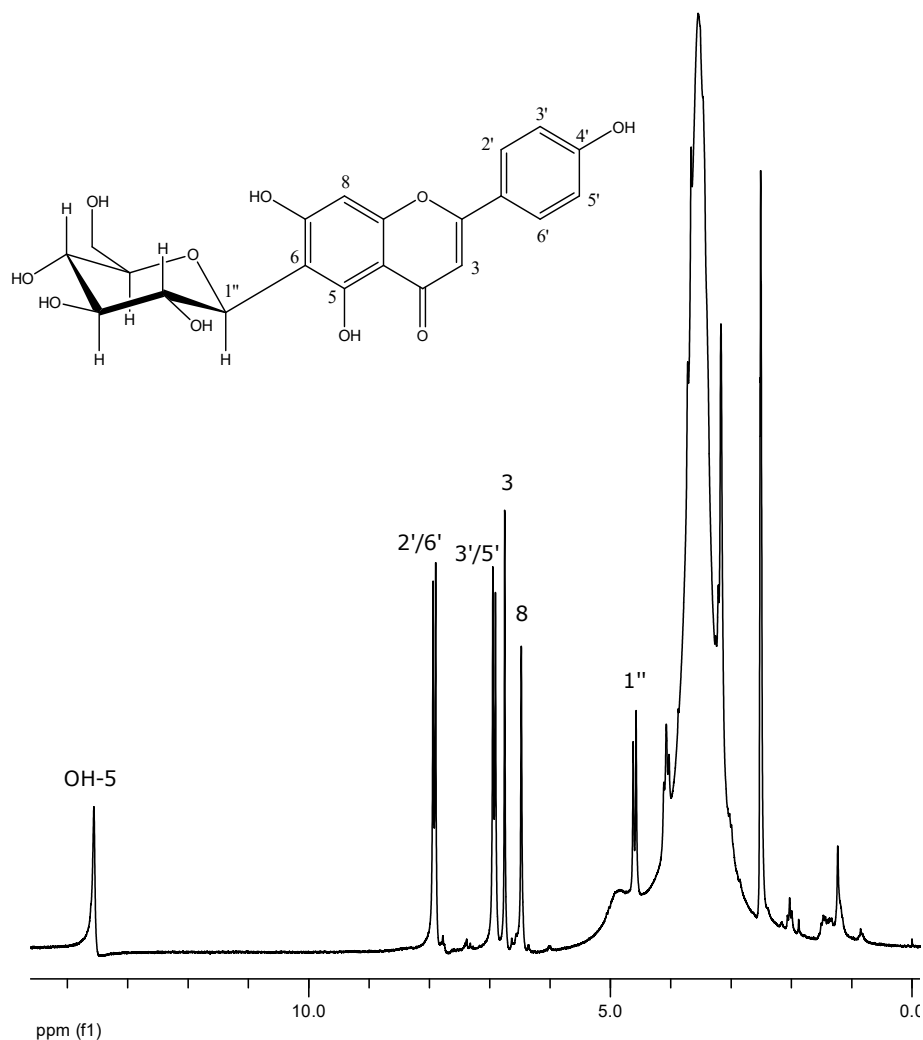
	λ_{\max} (nm)
MeOH	214, 270, 338
+ AlCl ₃	278, 305, 349, 388
+ HCl	280, 302, 347, 383
+ NaOAc	275, 303, 361
+NaOMe	221, 279, 332, 398

Oblik spektra kao i apsorpcioni maksimumi na 270 i 338 nm, odgovaraju strukturi flavona. Promene u spektrima po dodatku AlCl₃ i HCl, ukazuju da u molekulu nema *orto*-OH grupa, ali da je prisutna OH grupa u položaju 5. Batohromno pomeranje trake II u prisustvu NaOAc potvrđuje prisustvo OH grupa u položajima 7 i 4'.

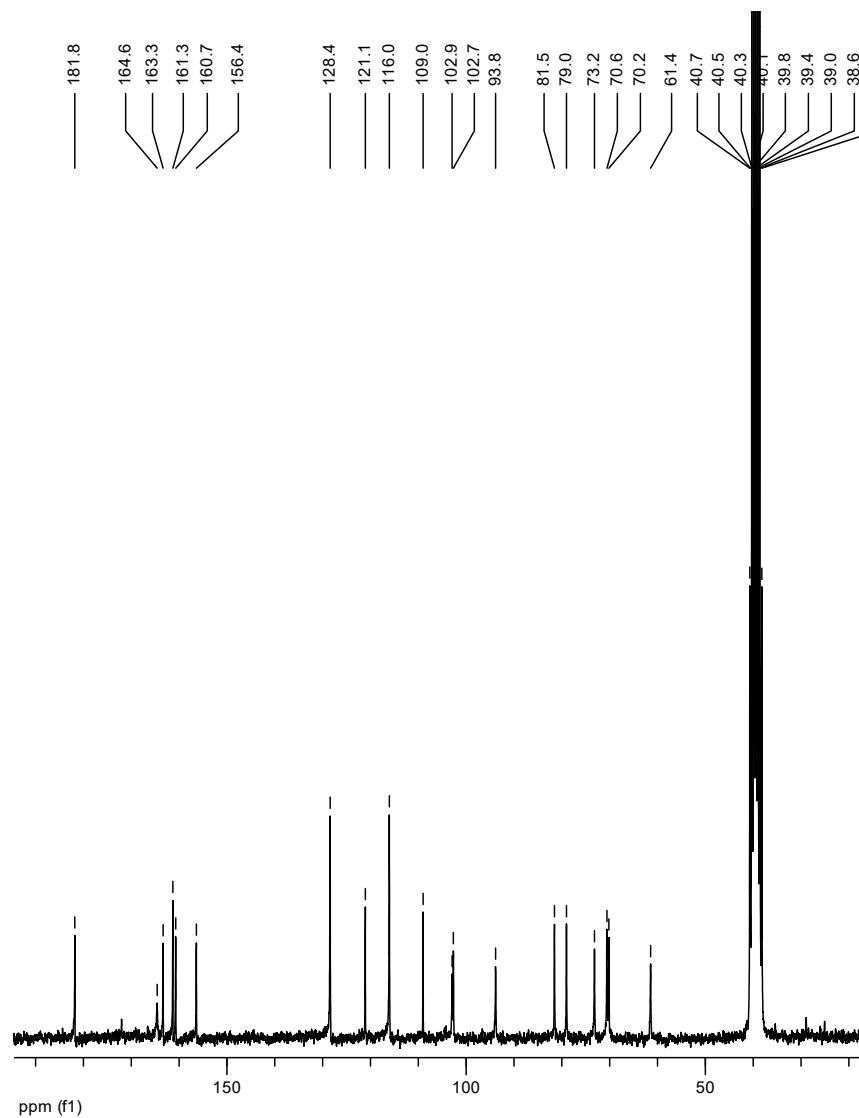
Tabela 31: ^1H (200 MHz) i ^{13}C (50 MHz) NMR izviteksina u DMSO-d_6

H/C	δ_{H} , mult., J (Hz)	δ_{C}
2	-	163,6
3	6,75 s	103,2
4	-	182,1
5	-	161,6
6	-	109,3
7	-	164,8
8	6,47 s	94,1
9	-	160,9
10	-	102,9
1'	-	121,3
2'	7,92 d (8,8)	128,7
3'	6,92 d (8,6)	116,3
4'	-	156,6
5'	6,92 d (8,6)	116,3
6'	7,92 d (8,8)	128,7
OH-5	13,5 s	-
Glc		
1''	4,59 d (9,8)	81,8
2''	*	70,8
3''	*	73,4
4''	*	70,4
5''	*	79,3
6''	*	61,7

* Signali su preklapljeni na $\delta = 3-4$ ppm

Slika 86: ^1H NMR (DMSO- d_6) spektar izoviteksina

Pored dva singleta aromatičnih protona H-3 i H-8, u ^1H NMR spektru (Slika 86, Tabela 31) uočavaju se i dva dubleta na δ 7,92 i 6,92, koja potiču od 4 protona *p*-disupstituisanog aromatičnog prstena B. U ovom slučaju u pitanju su hemijski ekvivalentni i magnetno neekvivalentni protoni (H-2',6',3' i 5') koji daju AA'BB' tip spektra, predstavljen sa dva dubleta. Hemijsko pomeranje anomernog protona glukoze, kao i konstanta sprezanja od 9,8 Hz, ukazuju na C-glikozidnu vezu sa aglikonom. Spektralni podaci su u skladu sa podacima iz literature ¹³⁴.



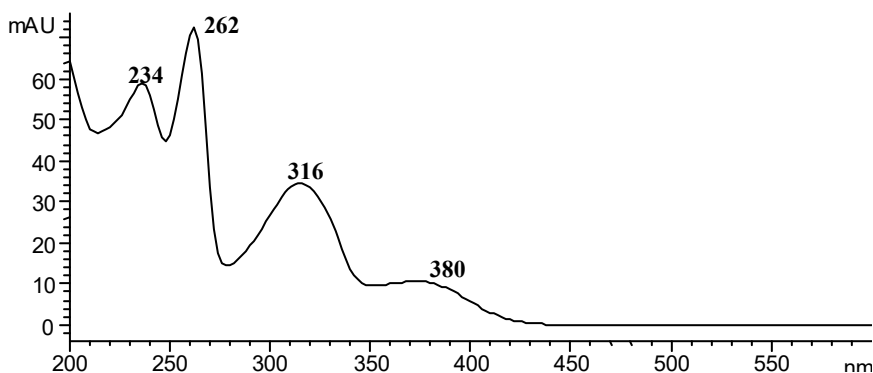
Slika 87: ^{13}C NMR (DMSO- d_6) spektar izoviteksina

Signali ugljenika u ^{13}C NMR spektru (Slika 87, Tabela 31) odgovaraju literaturnim podacima^{15, 138}

Izoviteksin, apigenin-6-*C*-glukozid, je ranije izolovan iz vrsta *G. lutea*¹²⁶ i *G. asclepiadea*¹³⁴

2.4.1.4. 1,8-DIHIDROKSI-3-METOKSI-7-O-PRIMVEROZID (17)

Frakcija 61-82 je rehromatografisana na koloni poliamida (poglavlje 3.4.1.). Preparativnom hromatografijom iz frakcije 18, izolovano je jedinjenje (17) čija je struktura određena spektroskopskim metodama.



Slika 88: UV spektar 1,8-dihidroksi-3-metoksi-7-*O*-primverozida u MeOH ($\lambda = 260$ nm, $R_t = 35.07$ min)

Tabela 32: UV spektri 1,8-dihidroksi-3-metoksi-7-*O*-primverozida posle dodatka reagenasa

	λ_{\max} (nm)
MeOH	235, 262, 317, 376
+ AlCl ₃	232, 274, 330, 420
+ HCl	235, 274, 321, 360
+ NaOAc	263, 312, 383
+ NaOMe	245, 275, 315, 405

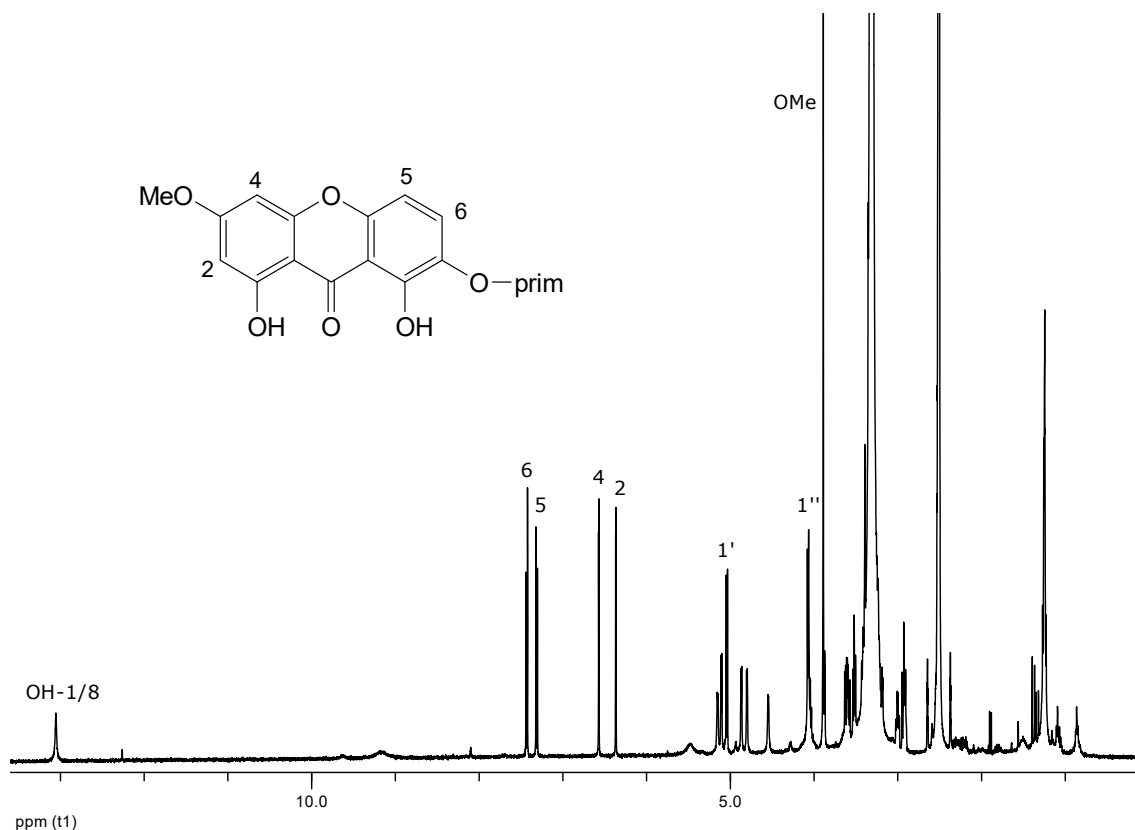
Osnovni spektar snimljen u MeOH ukazuje na strukturu ksantona. Batohromna pomeranja u spektru posle dodatka AlCl₃ sugerišu na postojanje slobodnih OH grupa u položaju 1 i/ili 8. HCl ne dovodi do promene spektra, što znači da nema slobodnih *ortho* OH grupa. Dodavanje NaOMe dokazuje prisustvo slobodnih OH grupa u molekulu.

Tabela 33: ^1H (500 MHz) NMR 1,8-dihidroksi-3-metoksi-7-O-primverozida u DMSO- d_6

H	δ_{H} , mult., J (Hz)
2	6,35 d (2,5)
4	6,56 d (2,5)
5	7,30 d (9,0)
6	7,42 d (9,5)
OH-1/OH-8	13,04 s
OMe	3,87 s
Glc	
1'	5,03 d (8,0)
2'	*
3'	*
4'	*
5'	*
6'	*
Xyl	
1''	4,06 d (7,5)
2''	*
3''	*
4''	*
5''	*

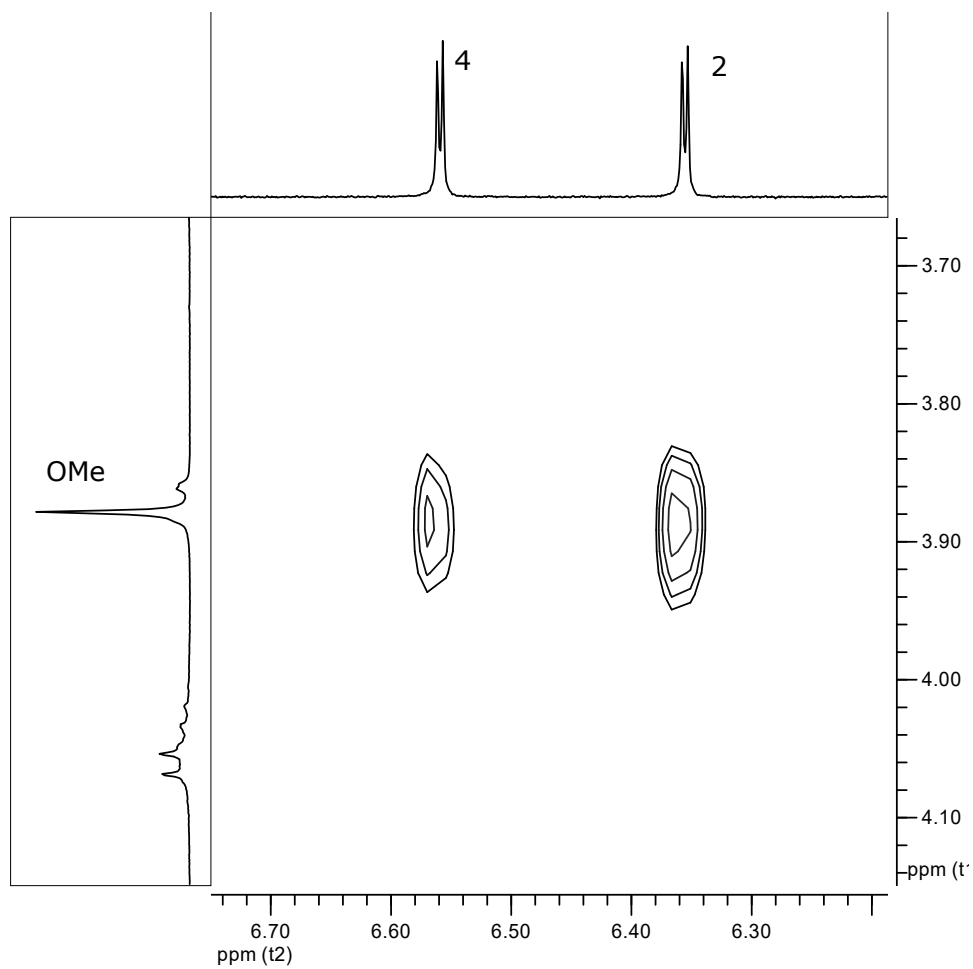
* Signali su preklopljeni

U ^1H NMR spektru (Slika 89, Tabela 33) se uočavaju dubleti koje daju aromatični protoni, dubleti koje daju anomerni protoni primveroze i singleti protona metoksi i OH grupe. Na δ 6,35 i 6,56 su dubleti protona H-2 i H-4 ($^4J = 2,5$ Hz). Protoni H-5 i H-6 daju dublete na 7,30 i 7,42 ppm sa konstantama sprežanja karakterističnim za *orto* protone. Signal na δ 3,87 je od protona metoksi grupe. Dublet anomernog protona glukoze je na 5,03 ppm, a ksiloze na 4,06.



Slika 89: ^1H NMR (DMSO- d_6) spektar 1,8-dihidroksi-3-metoksi-7-O-primverozida

Položaj metoksi grupe i primveroze je određen iz NOESY spektra (Slika 90). U NOESY spektrima korelacioni signali povezuju signale protona između kojih postoji dipolarna interakcija, odnosno, protona koji su prostorno bliski. U prikazanom spektru se vidi da su signali protona H-2 i H-4 u korelaciji sa metoksi grupom, što znači da je metoksi grupa vezana za ksantonsko jezgro u položaju 3. Zbog male količine uzorka, signali korelacije između anomernih protona i ostalih protona šećera su nedovoljno jasno vidljivi pa zato nisu prikazani.

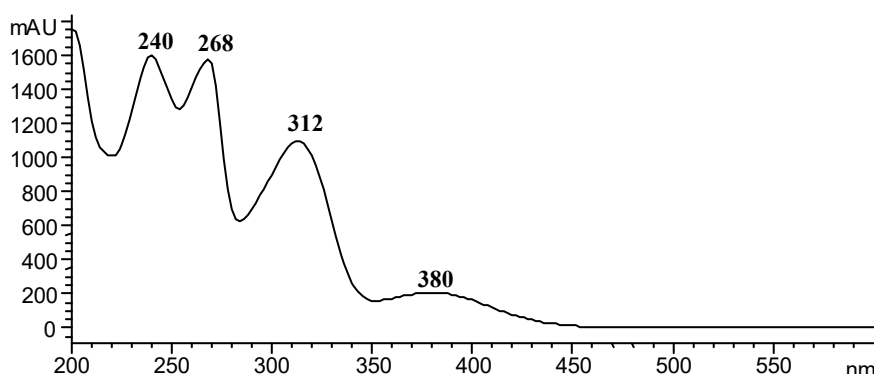


Slika 90: Detalj NOESY spektra 1,8-dihidroksi-3-metoksi-7-*O*-primverozida

Ovaj ksantonski heterozid je ranije izolovan iz vrste *Gentianella ciliata*¹⁶

2.4.1.5. GENCIAKOHIANIN-1-O-PRIMVEROZID (18)

Posle rehromatografije frakcije 44 na koloni poliamida (poglavlje 3.4.1.) i preparativne tankoslojne hromatografije, frakcija 14-29 je preparativnom hromatografijom razdvojena u tri trake. Iz gornje trake je dobijeno jedinjenje (18), čija je struktura određena spektroskopskim metodama.



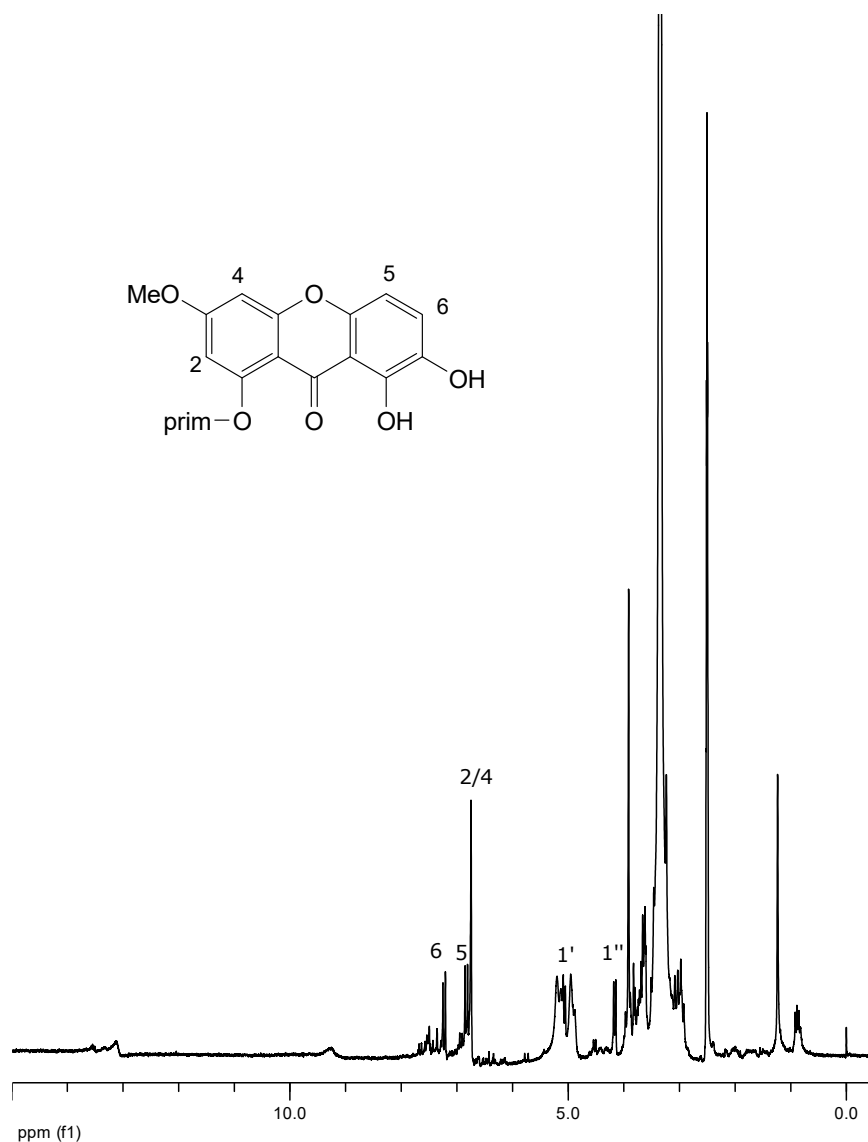
Slika 91: UV spektar genciakohianin-1-*O*-primverozida u MeOH
($\lambda = 260$ nm, $R_t = 33.3$ min)

Tabela 34: UV spektri genciakohianin-1-*O*-primverozida posle dodatka reagenasa

	λ_{\max} (nm)
MeOH	239, 269, 310, 380
+ AlCl ₃	241, 278, 338, 400
+ HCl	241, 278, 334, 400
+ NaOAc	240, 269, 310, 370
+ NaOMe	241, 276, 310, 371

I ovo jedinjenje prema izgledu UV spektra ima strukturu tetrasupstituisanog ksantona. Dodatak NaOMe dovodi do batohromnog pomaka traka u oblasti kratkotalnog maksimuma čime se dokazuje prisustvo slobodnih OH grupa vezanih za ksantonsko jezgro. Dodatkom AlCl₃ apsorpcioni maksimumi traka II i III su se batohromno pomerili. Nagrađeni kompleks je stabilizovan dodatkom HCl što znači da je u položajima 1 ili 8 vezana OH grupa. Po dodatku NaOAc nije

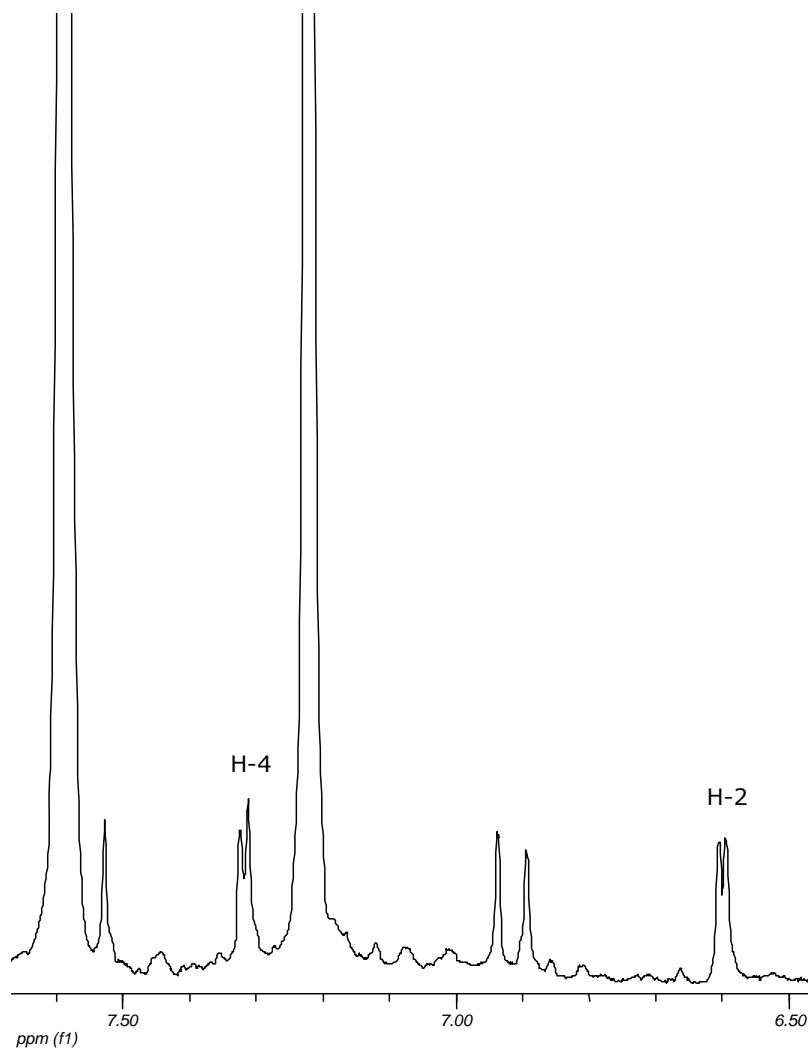
došlo do promena u UV spektru - u položajima 3 i 6 su blokirane OH grupe (metoksi grupa ili šećerna jedinica).



Slika 92: ^1H NMR (DMSO- d_6) spektar genciakohianin-1-*O*-primverozida

U ^1H NMR spektru snimanom u DMSO- d_6 (Slika 92, Tabela 35) pored dva dubleta *orto* protona H-5 i H-6 nalazi se i singlet u kome su preklopljeni signali za *meta* protoni H-2 i H-4. Da bi se ovi signali razdvojili ksanton je sniman i u piridinu (Slika 93). Njihova hemijska pomeranja u piridinu su prikazana u Tabeli 35. Za

ostale protone prikazana hemijska pomeranja su u DMSO-d₆. Anomerni protoni glukoze i ksiloze su na δ 5,07 i 4,16.



Slika 93: Detalj ¹H NMR (C₅D₅N) spektra genciakohianin-1-*O*-primverozida

Tabela 35: ^1H (200 MHz) NMR genciakohianin-1-*O*-primverozida u DMSO-d_6

H/C	δ_{H} , mult., J (Hz)
1	-
2	6,60 d (2,0) u $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$
3	-
4	7,32 d (2,2) u $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$
4a	-
5	6,83 d (9,0)
6	7,22 d (9,0)
7	-
8	-
8a	-
9	-
9a	-
10a	-
OH-8	13,1 s
OMe	3,91 s
Glc	
1'	5,07 d (7,4)
2'	*
3'	*
4'	*
5'	*
6'	*
Xyl	
1"	4,16 d (7,4)
2"	*
3"	*
4"	*
5"	*

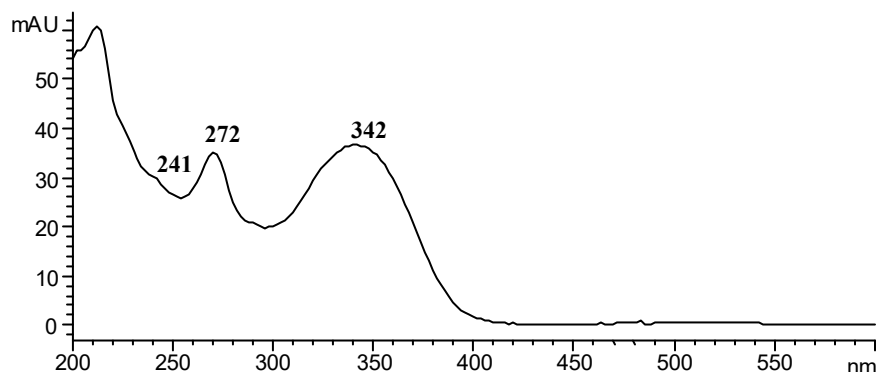
* Signali su preklopljeni

Podaci su u skladu sa podacima iz literature¹³¹

Genciakohianin-1-*O*-primverozid (izogenciakohianozid), ili 7,8-dihidroksi-3-metoksi-1-*O*-primverozil ksanton, je izolovan i iz vrsta *Gentiana bavarica*¹³¹, *G. verna* i *G. nivalis*¹⁶.

2.4.1.6. IZOORIJENTIN-3'-O-GLUKOZID (19)

Kao i u predhodnom slučaju i ovo jedinjenje (19) je izolovano preparativnom tankoslojnom hromatografijom iz frakcije 14-29, ali iz donje trake (poglavlje 3.4.1.). Struktura je određena spektroskopskim metodama.

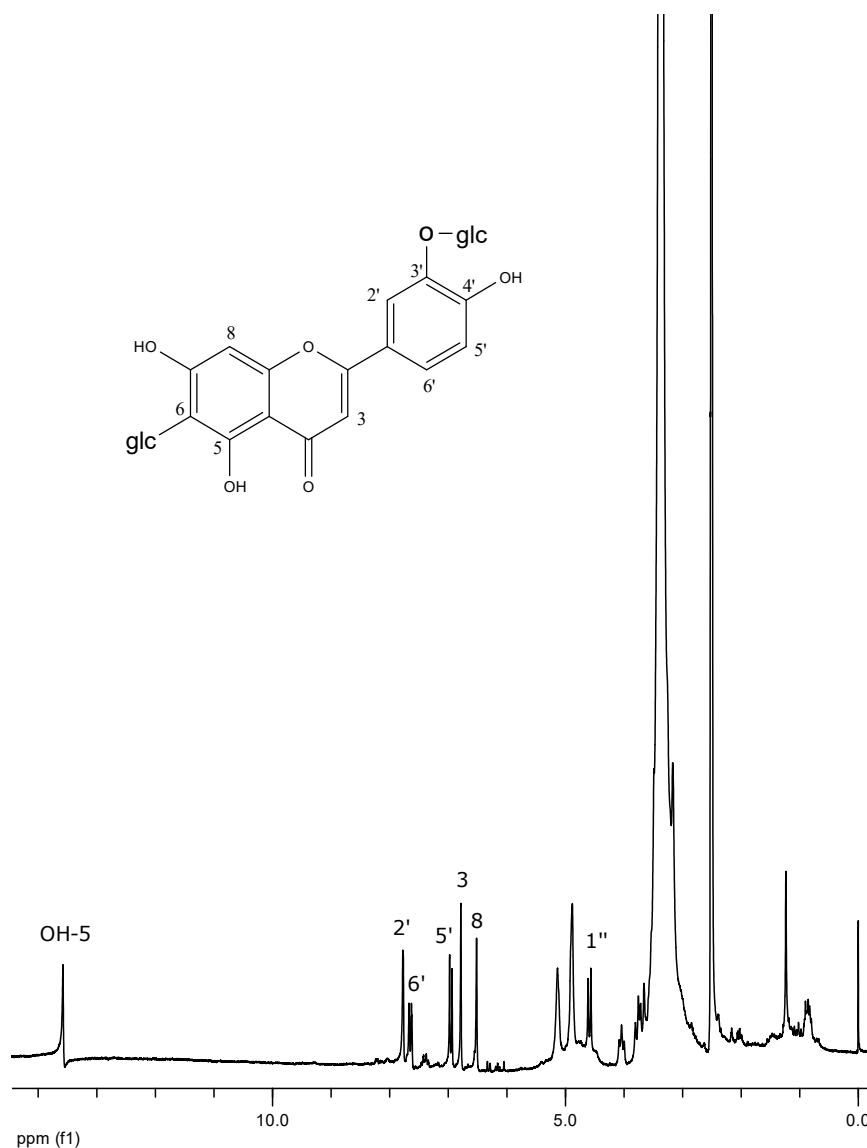


Slika 94: UV spektar izoorijentin-3'-O-glukozida u MeOH ($\lambda = 260$ nm, $R_t = 25.5$ min)

Tabela 36: UV spektri izoorijentin-3'-O-glukozida posle dodatka reagenasa

	λ_{max} (nm)
MeOH	241, 272, 342
+ AlCl ₃	259, 279, 301, 356, 390
+ HCl	259, 279, 301, 354, 390
+ NaOAc	271, 395
+ NaOMe	279, 335, 403

Dva karakteristična maksimuma u UV spektru (272 i 342 nm) ukazuju da izolovano jedinjenje ima flavonsku strukturu. U prisustvu AlCl₃ dolazi do pomeranja maksimuma jer se stvara kompleks sa OH grupom. U kiselj sredini spektar se ne menja što znači da se OH grupa nalazi u položaju 5. Dodatak NaOAc dovodi do batohromnog pomaka II trake, što ukazuje na prisustvo slobodnih hidroksilnih grupa u položaju 4' i 7. UV spektri su upoređivani sa spektrima luteolin-3'-O-glukozida¹³⁹.



Slika 95: ^1H NMR (DMSO-d_6) spektar izoorientin-3'-*O*-glukozida

Na slici 95 je prikazan ^1H NMR spektar izoorientin-3'-*O*-glukozida. Protoni H-3 i H-8 daju singlete na δ 6,78 odnosno 6,51. Proton H-5' koji se spreže sa protonom H-6' daje dublet na 6,96 ppm. Dublet na δ 7,77 sa daljinskom *meta* konstantom sprežanja $^4J_{2',6'} = 1,6$ Hz potiče od protona H-2'. Signali za proton H-6' su preklopljeni tako da se umesto dvostrukog dubleta vidi samo jedan dublet sa proširenim signalima na 7,72 ppm. Takođe je preklopljen i signal za anomerni proton glukoze koja je *O*-glikozidno vezana za aromatično jezgro. Singlet na

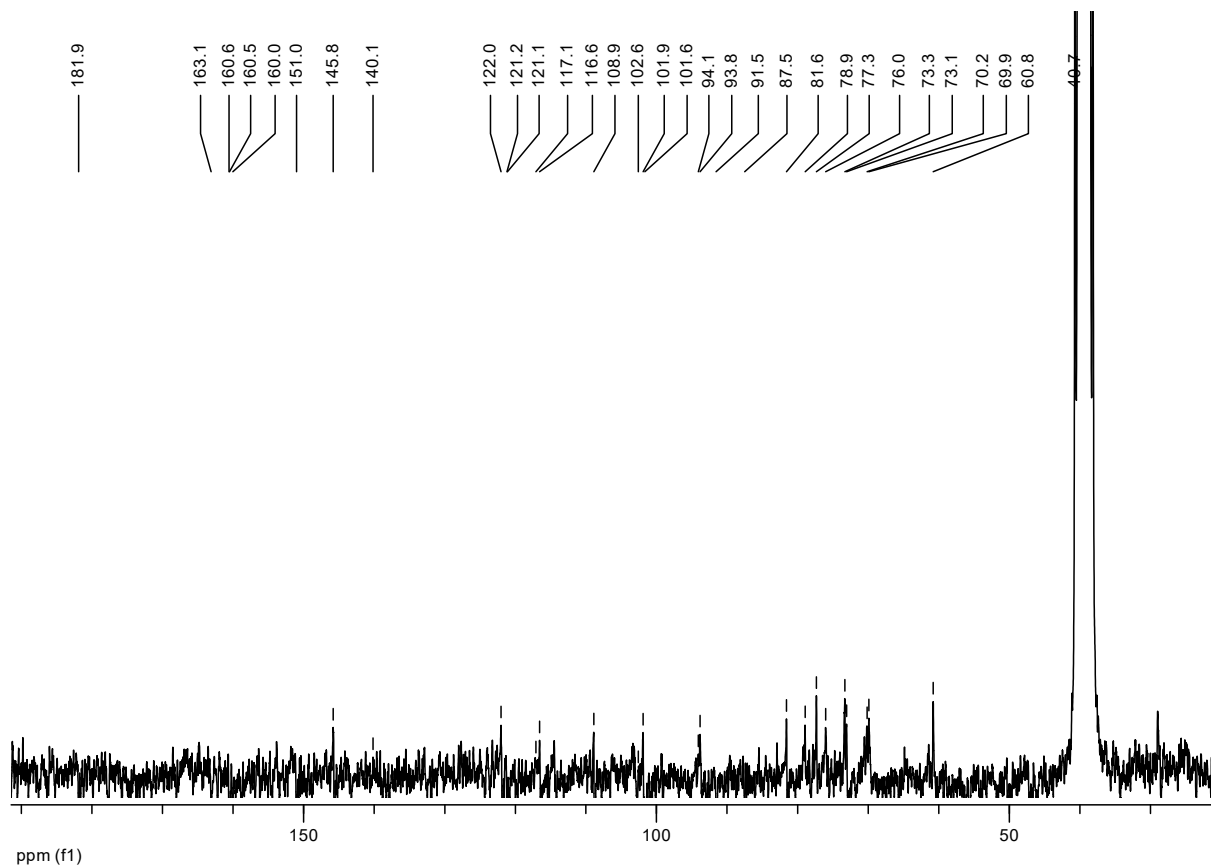
13,57 ppm je od OH-5 koja je blizu karbonila. Spektralni podaci su prikazani u Tabeli 37, a upoređivani su sa podacima za luteolin-3'-*O*-glukozid¹⁴⁰.

Tabela 37: ¹H (200 MHz) i ¹³C (50 MHz) NMR izoorjentin-3'-*O*-glukozida u DMSO-d₆

H/C	δ_H , mult., J (Hz)	δ_C
2	-	163,1
3	6,78 s	102,6
4	-	181,9
5	-	160,6
6	-	108,9
7	-	163,1
8	6,51 s	94,1
9	-	160,5
10	-	101,9
1'	-	122,2
2'	7,77 d (1,6)	116,6
3'	-	145,8
4'	-	151,0
5'	6,96 d (8,4)	117,1
6'	7,72 dd (8,2)	121,1
OH-5	13,57 s	-
Glc		
1"	4,59 d (10,0)	81,6
2"	*	70,2
3"	*	73,1
4"	*	69,9
5"	*	78,9
6"	*	60,8
Glc		
1'''	*	101,5
2'''	*	73,3
3'''	*	76,0
4'''	*	70,2
5'''	*	77,3
6'''	*	60,8

* Signali su preklopljeni na $\delta_H = 3 - 5$ ppm

Slika 96 prikazuje ¹³C NMR spektar u kome se signali ugljenika glukoze uočavaju u oblasti 60-80 ppm. Anomerni ugljenik *C*-glikozidno vezane glukoze je na 81,6 ppm, dok je anomerni ugljenik *O*-glikozidno vezane glukoze na 101,5 ppm. Signali aromatičnih ugljenika za koje su vezani kiseonici imaju hemijsko pomeranje između 140-180 ppm. I ovi spektralni podaci su poređeni sa podacima za luteolin-3'-*O*-glukozid¹⁴¹.



Slika 96: ^{13}C NMR (DMSO- d_6) spektar izoorientin-3'- O -glukozida

CI maseni spektar pokazuje molekularni jon ($M+1$) na m/z 611 što odgovara molekularnoj formuli $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$

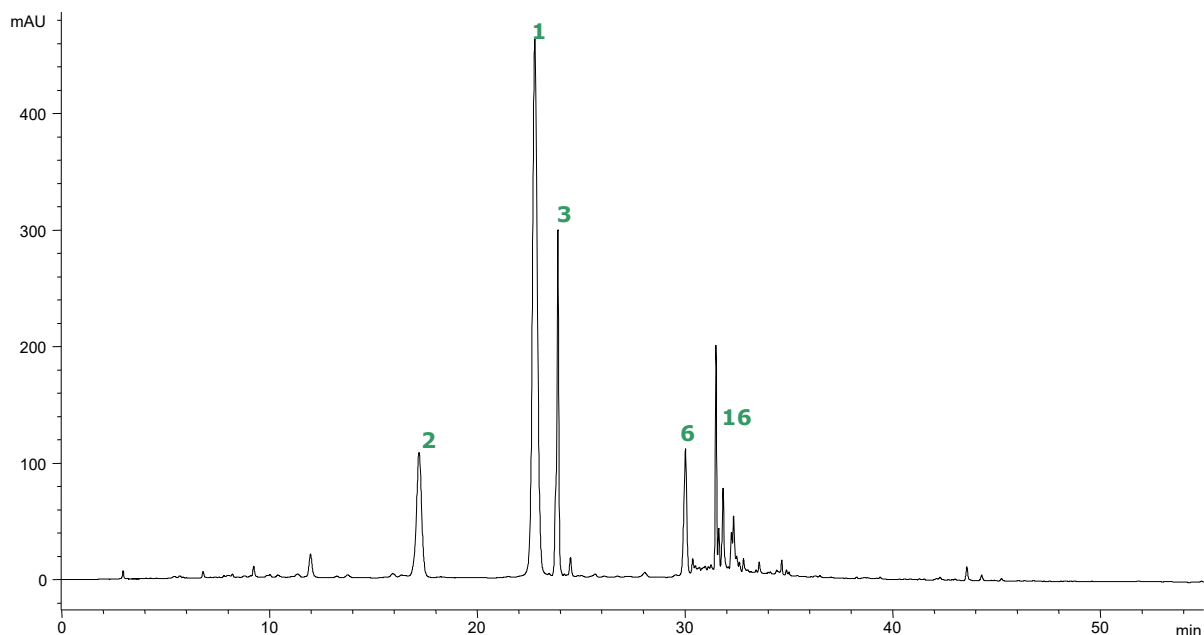
Ovaj flavon, izoorientin-3'- O -glukozid, je ranije izolovan iz vrste *Gentiana pedicellata*¹⁴² i *G. nivalis*¹⁴³

2.5. Uporedni prikaz hemijskog sastava vrsta roda *Gentiana*

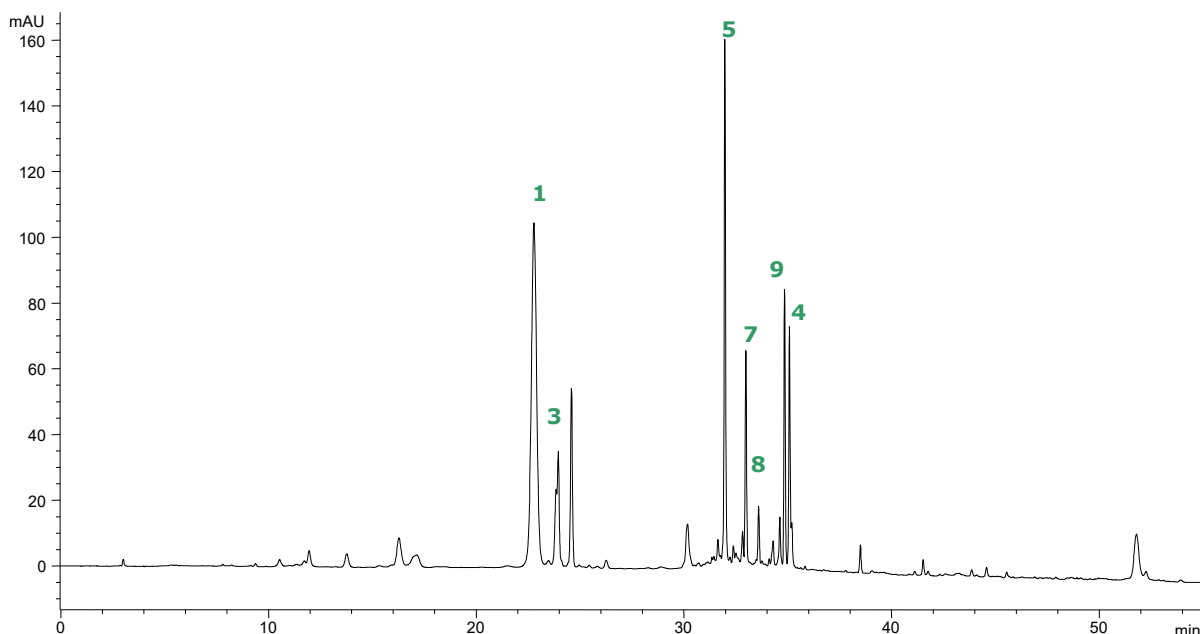
Identifikacija jedinjenja u hromatogramima je urađena koinjektiranjem sa prethodno izolovanim standardima čije su strukture određene spektroskopskim metodama (poglavlja 2.2., 2.3. i 2.4.). Mangiferin, gentizin i dekuzatin su identifikovani na osnovu karakterističnih UV spektara i retencionih vremena u datim uslovima hromatografisanja.

2.5.1. Hemijski sastav vrste *G.dinarica*

Biljni materijal je sakupljen u fazi cvetanja na planini Tari u leto 2001. godine. Posle sušenja na vazduhu, nadzemni deo je odvojen od korena. Samleveni nadzemni deo i koren su posebno ekstrahovani metanolom i analizirani HPLC metodom. Na slikama 97 i 98 su prikazani hromatogrami.



Slika 97: Hromatogram metanolnog ekstrakta nadzemnog dela vrste *G.dinarica*



Slika 98: Hromatogram metanolnog ekstrakta korena vrste *G. dinarica*

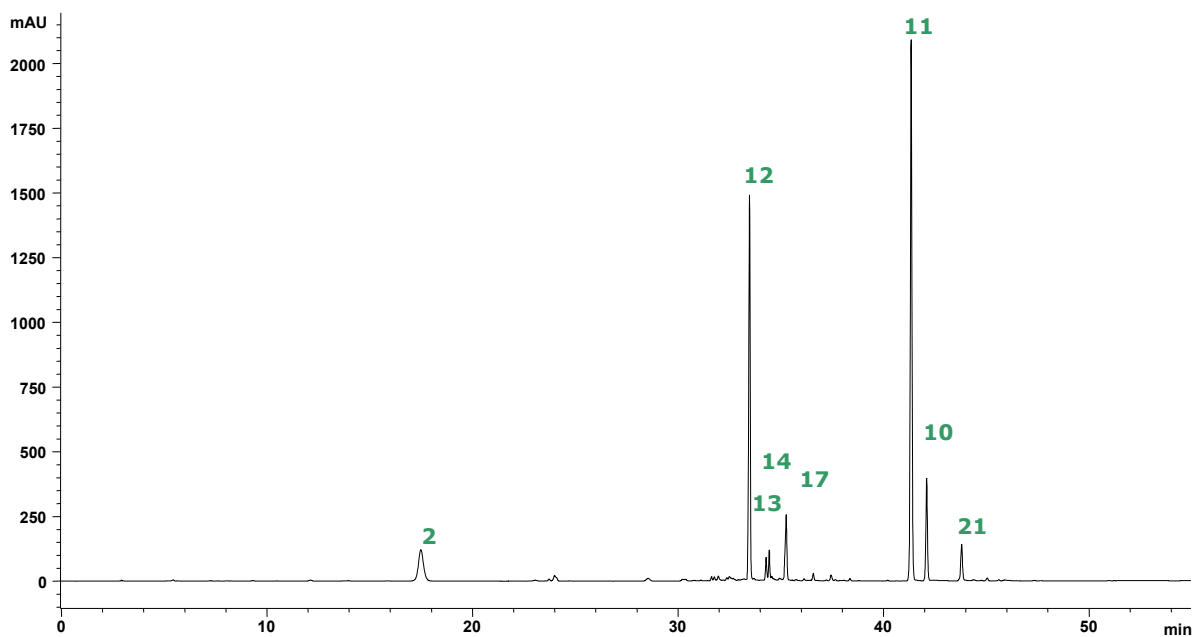
U totalnom metanolnom ekstraktu nadzemnog dela identifikovana su sekoiridoidna jedinjenja genciopikrin (1) i sverciamarin (2) i flavonski C-glukozidi: izoorijentin-4'-*O*-glukozid (3), izoorijentin (6) i izoviteksin (16). Interesantno je da u nadzemnom delu nema ksantonskih glukozida koji su glavne komponente korena. U hromatogramu korena uočava se dominantan pik norsvercianin-1-*O*-primverozida (5), zatim norsvercianin-8-*O*-primverozida (7) i -1-*O*-glukozida (8) i genciozida (9). Pored genciopikrina i tragova sverciamarina, za koren ove vrste je karakteristično prisustvo bifenilnog sekoiridoida amarogencina (4).

2.5.2. Hemijski sastav vrste *G. kochiana*

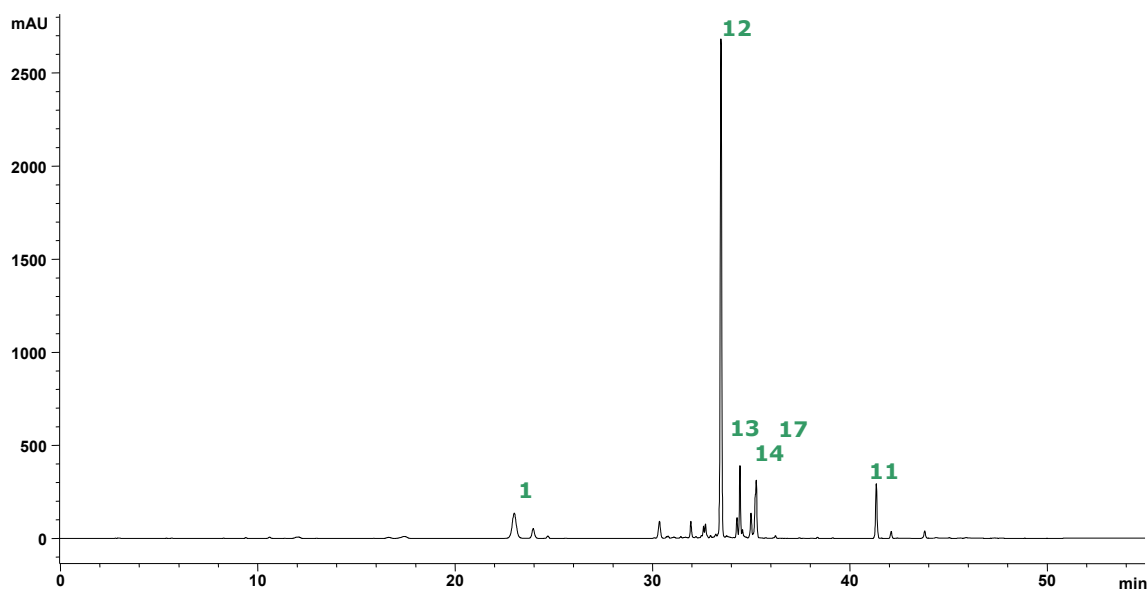
Biljni materijal je sakupljen u fazi cvetanja jula 2002. godine na planini Komovi (2000m nadmorske visine). Biljka je osušena na vazduhu, razdvojeni su nadzemni delovi od korena i posebno ekstrahovani metanolom. Urađena je HPLC analiza totalnih metanolnih ekstrakata korena i herbe, a dobijeni hromatogrami su prikazani na slikama 99 i 100.

Kada se uporede prikazani hromatogrami, uočava se da je nadzemni deo u odnosu na koren, bogatiji sadržajem ksantonskih aglikona: genciakaulein (11),

genciakohanin (10) i dekuzatin (21). Pik genciakaulein-1-*O*-primverozida (12) dominira i u korenu i u nadzemnom delu. Od ksantonskih *O*-heterozida identifikovani su genciakaulein-1-*O*-glukozid (13), dekuzatin-1-*O*-primverozid (14) i 1,8-dihidroksi-3-metoksi-7-*O*-primverozid (17). Sekoiridoidi (1 i 2) su pronađeni u tragovima.



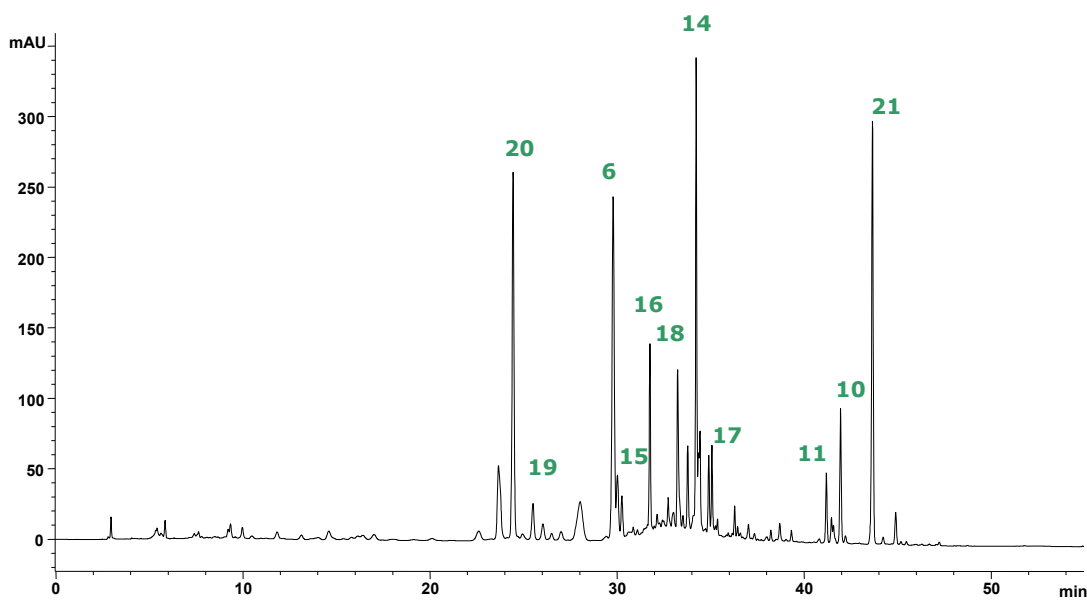
Slika 99: Hromatogram metanolnog ekstrakta nadzemnog dela vrste *G.kochiana*



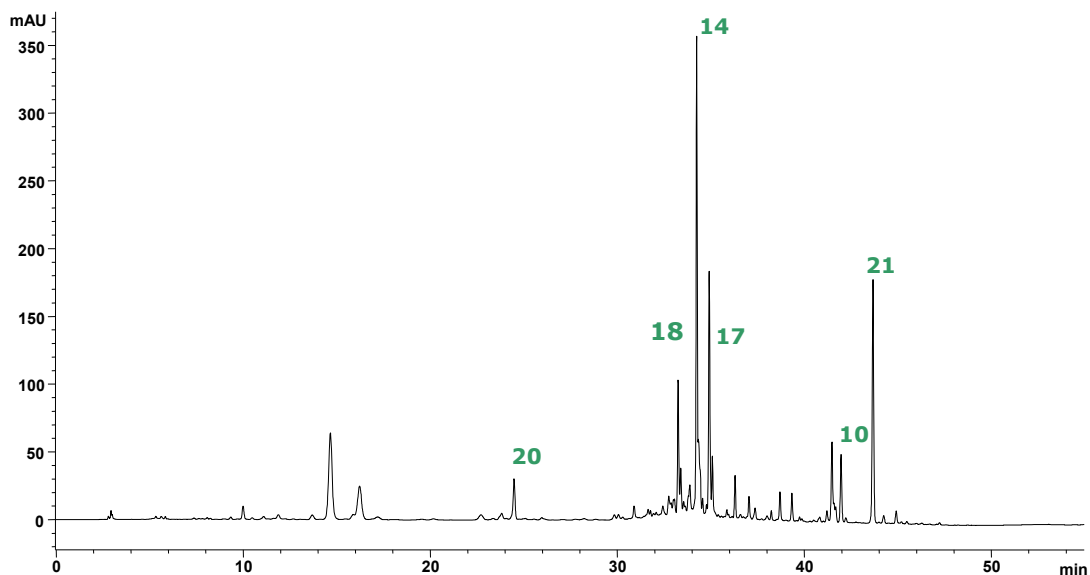
Slika 100: Hromatogram metanolnog ekstrakta korena vrste *G. kochiana*

2.5.3. Hemijski sastav vrste *G. utriculosa*

G. utriculosa je sakupljena u fazi cvjetanja na planini Tari u julu 2002.godine. Kao i kod prethodnih biljnih vrsta, na isti način su pripremljeni uzorci za HPLC analizu. Dobijeni hromatogrami su prikazani na slikama.



Slika 101: Hromatogram metanolnog ekstrakta nadzemnog dela vrste *G. utriculosa*



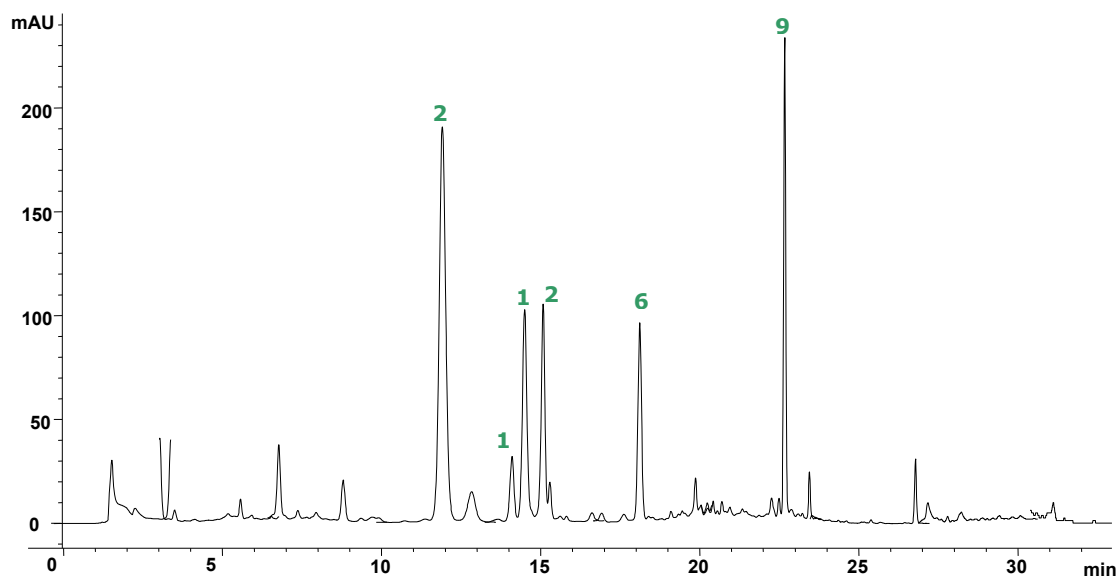
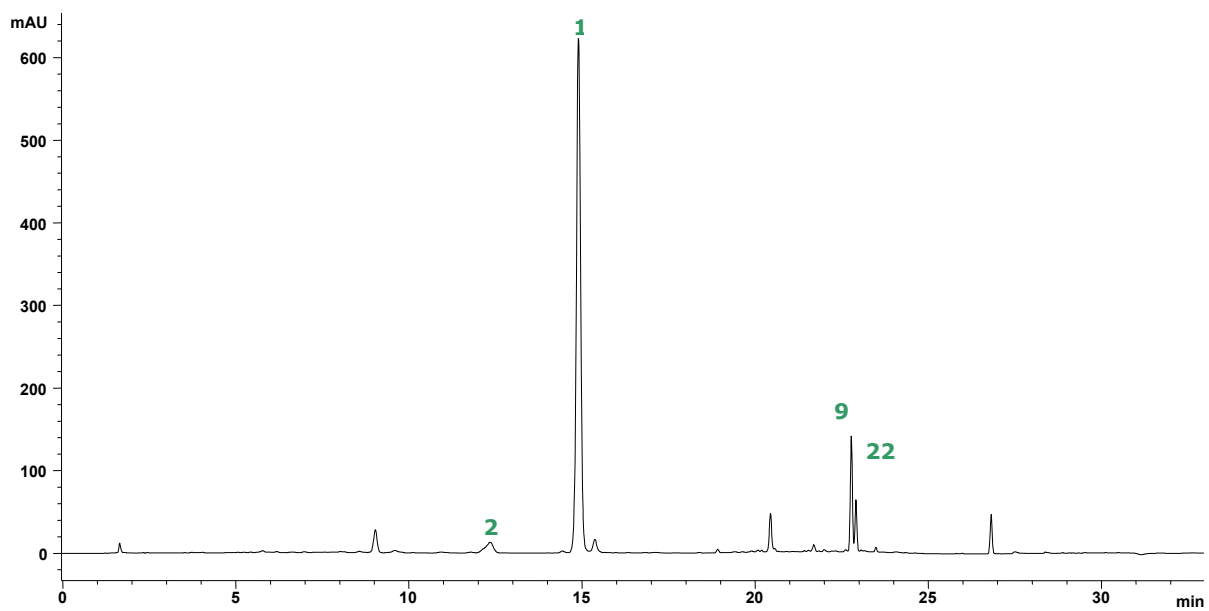
Slika 102: Hromatogram metanolnog ekstrakta korena vrste *G. utriculosa*

Ova biljna vrsta obiluje sadržajem flavonskih i ksantonskih heterozida. U hromatogramu nadzemnog dela kao i korena, dominiraju pikovi dekuzatina (21) i dekuzatin- 1-*O*-primverozida (14). Od aglikona, prisutni su i genciakohianin (10) i genciakaulein (11). Pored izoorijentina i izoviteksina, identifikovan je i izoorijentin-3'-*O*-glukozid (19) kao i ksantonski *C*-glukozid lancerin (15).

2.5.4. Hemijski sastav vrste *G. lutea*

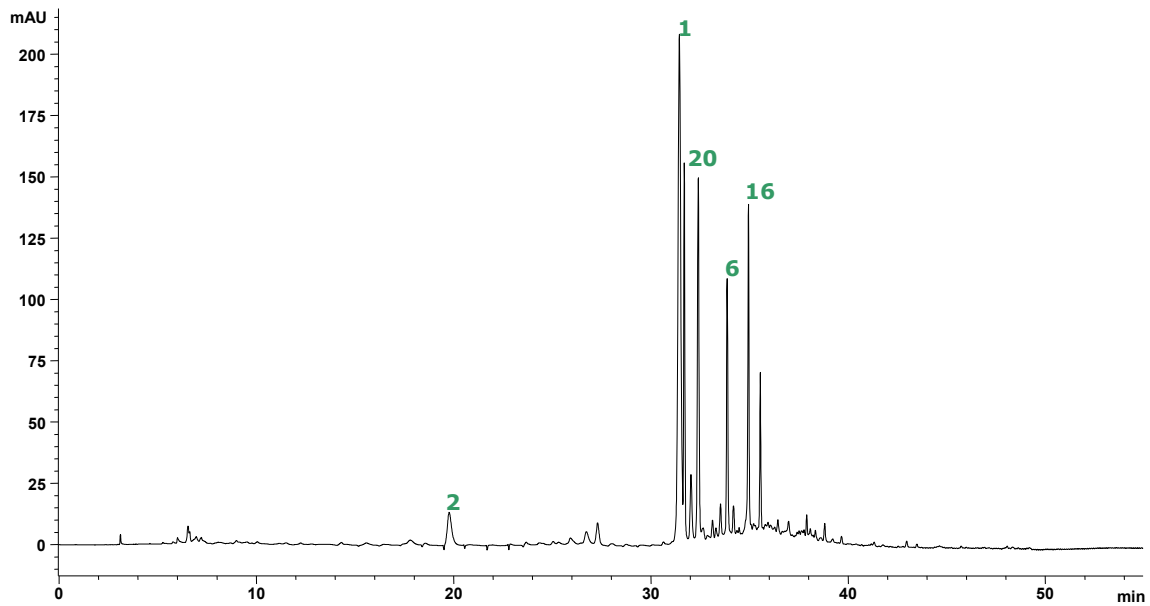
Biljni materijal je sakupljen u fazi cvetanja u julu 2001. godine na planini Suvobor, na 800m nadmorske visine. Posle sušenja na vazduhu, nadzemni deo je odvojen od korena. Samleveni listovi i koren su posebno ekstrahovani metanolom i analizirani HPLC metodom. Na slikama 103 i 104 su prikazani hromatogrami

Kao što se vidi iz prikazanih hromatograma, nadzemni deo *G. lutea* ima složeniji hemijski sastav nego koren u kome dominira sekoiridoid genciopikrin (1). U nadzemnom delu, pored sekoiridoidnih komponenti (1 i 2) detektovani su flavonski *C*-glukozidi izoorijentin i izoviteksin (6 i 16), kao i ksantonski *C*-glukozid mangiferin (20) i ksantonski *O*-primverozid genciozid (9).

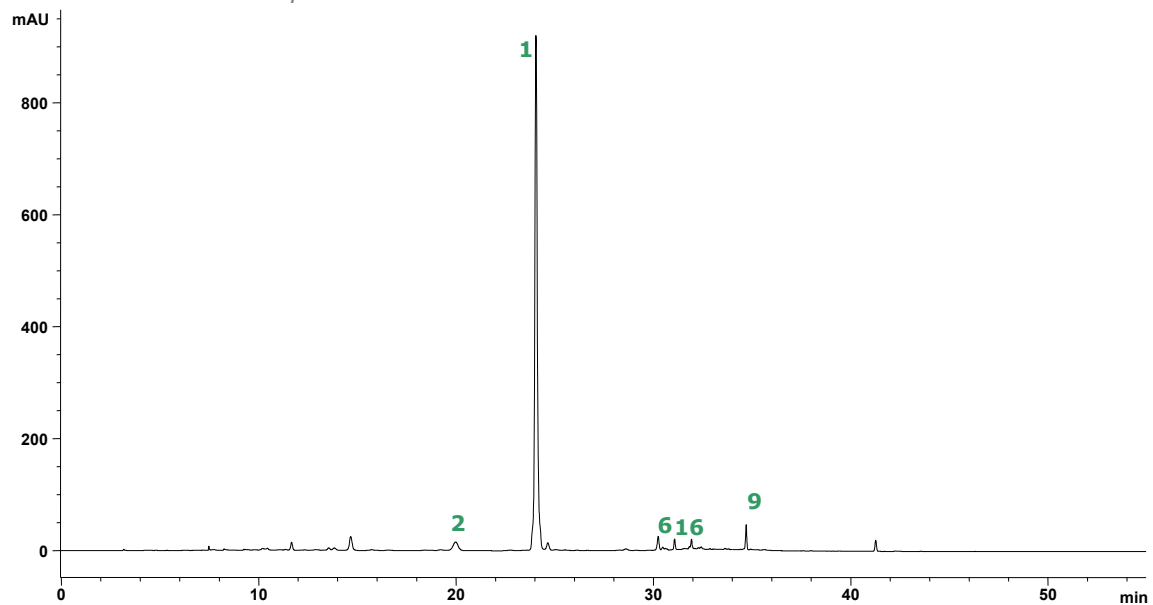
Slika 103: Hromatogram metanolnog ekstrakta nadzemnog dela vrste *G. lutea*Slika 104: Hromatogram metanolnog ekstrakta korena vrste *G. lutea*

2.5.5. Hemijski sastav vrste *G. asclepiadea*

Biljni materijal je sakupljen na planini Tari, u fazi cvjetanja, u leto 2001. godine. Biljka je osušena na vazduhu, razdvojeni su nadzemni delovi od korena i posebno ekstrahovani metanolom. Urađena je HPLC analiza totalnih metanolnih ekstrakata a dobijeni hromatogrami su prikazani na slikama 105 i 106.



Slika 105: Hromatogram metanolnog ekstrakta nadzemnog dela vrste *G. asclepiadea*

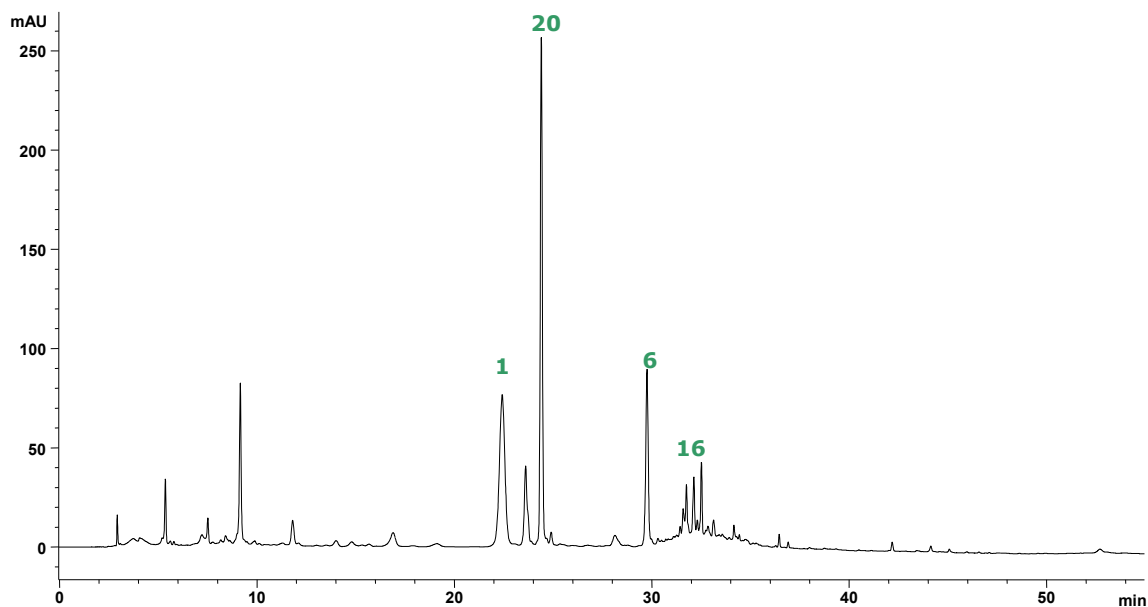


Slika 106: Hromatogram metanolnog ekstrakta korena vrste *G. asclepiadea*

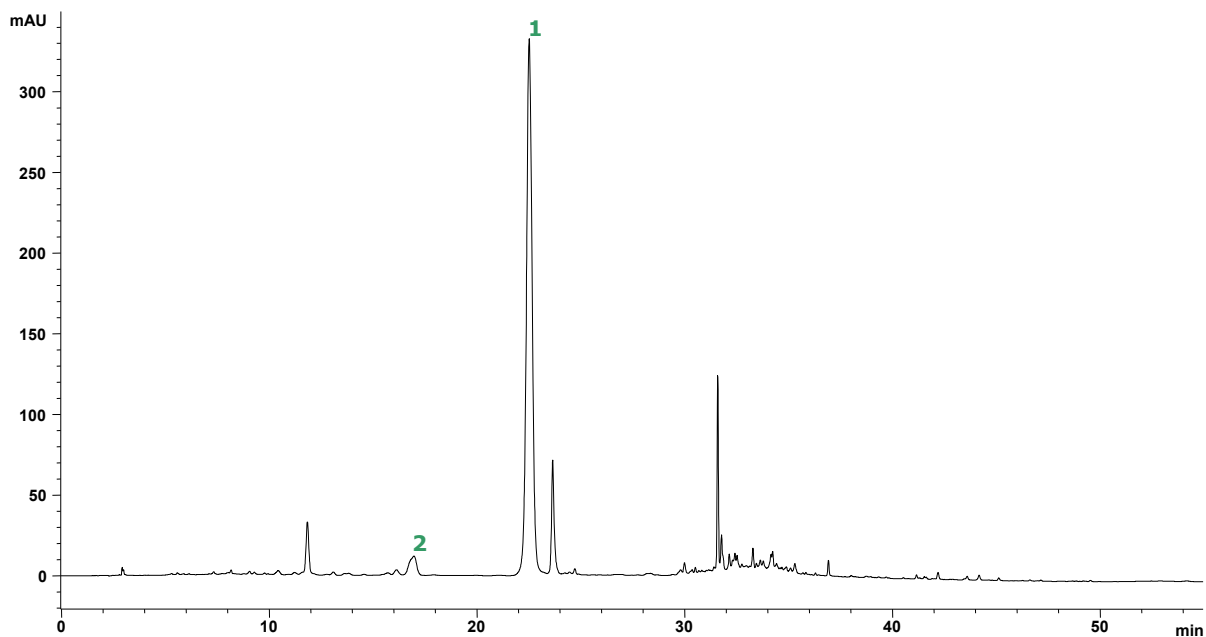
Kao i kod prethodne vrste uočava se da je nadzemni deo bogatiji po hemijskom sastavu u odnosu na koren. Genciopikrin (**1**) je dominantna komponenta i u nadzemnom delu i u korenu. Pored sekoiridoida u nadzemnom delu su identifikovani i flavonski (**6** i **16**) i ksantonski (**20**) C-glukozidi.

2.5.6. Hemijski sastav vrste *G. pneumonanthe*

Biljka je sakupljena u fazi cvetanja na planini Tari u leto 2001. godine. Posle sušenja na vazduhu pripremljeni su totalni metanolni ekstrakti herbe i korena i istom HPLC metodom analizirani. Hromatogrami su prikazani na slikama 107 i 108.



Slika 107: Hromatogram metanolnog ekstrakta nadzemnog dela vrste *G.pneumonanthe*

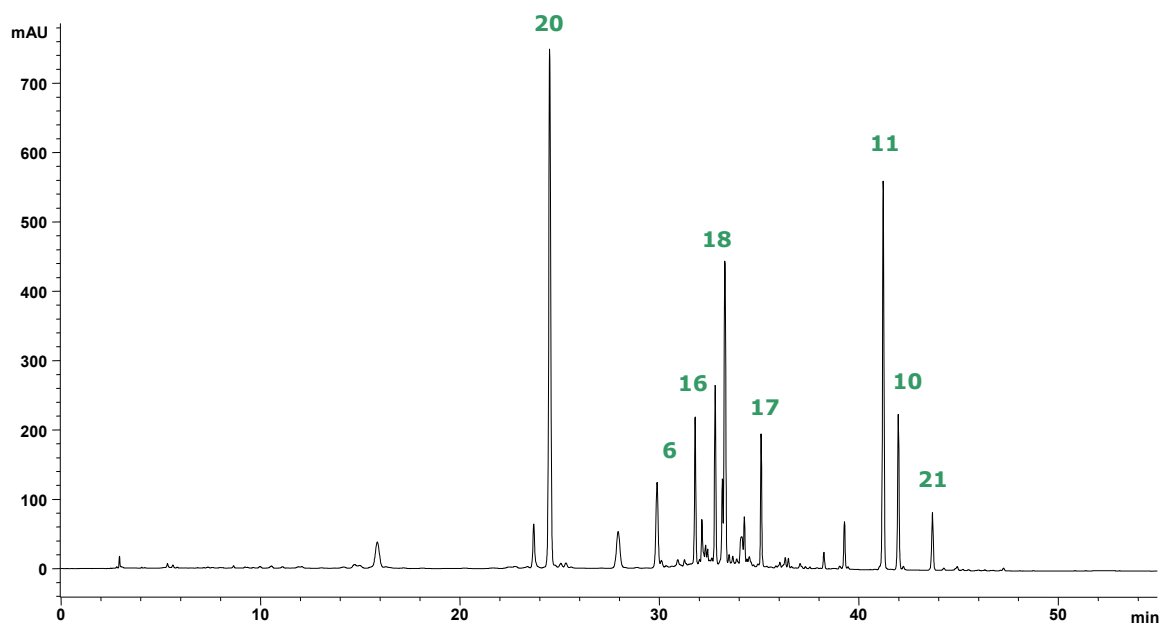
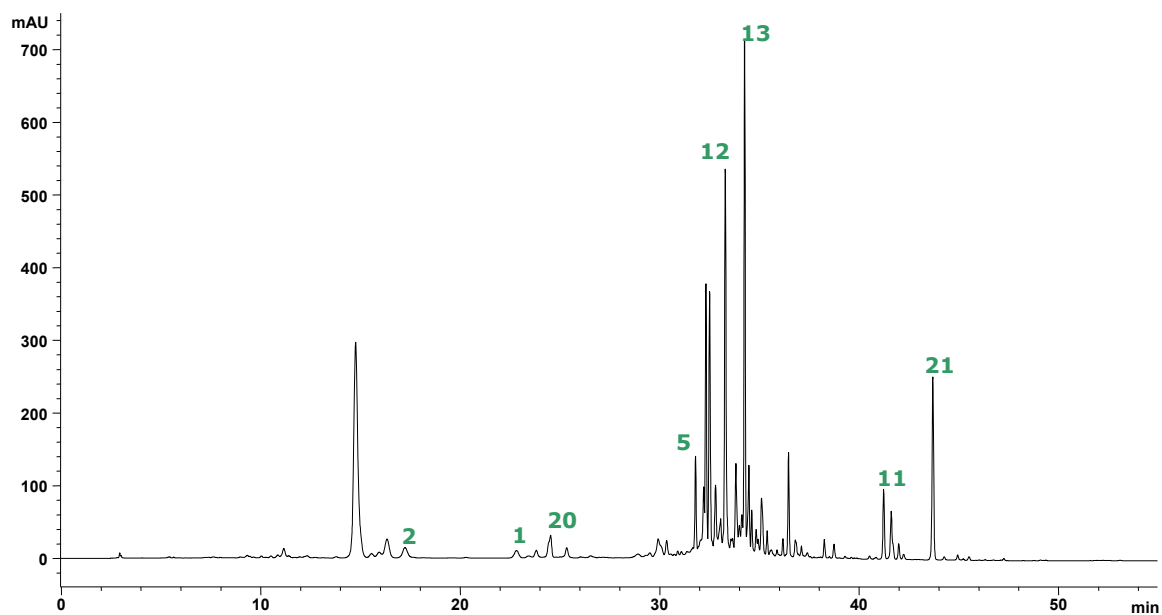


Slika 108: Hromatogram metanolnog ekstrakta korena vrste *G.pneumonanthe*

Pored mangiferina koji je glavna komponenta u nadzemnog delu biljke, identifikovani su i flavonski C-glukozidi (6 i 16), kao i genciopikrin čiji je pik dominantan u korenu. Neidentifikovani pik na Rt= 23 min ima UV spektar koji odgovara flavonskoj strukturi.

2.5.7. Hemijski sastav vrste *G. verna*

Ova biljna vrsta je sakupljena u leto 2001.godine u Crnoj Gori, na planini Bjelasici. Kao i kod prethodnih biljnih vrsta, na isti način su pripremljeni uzorci za HPLC analizu. Dobijeni hromatogrami su prikazani na slikama 109 i 110.

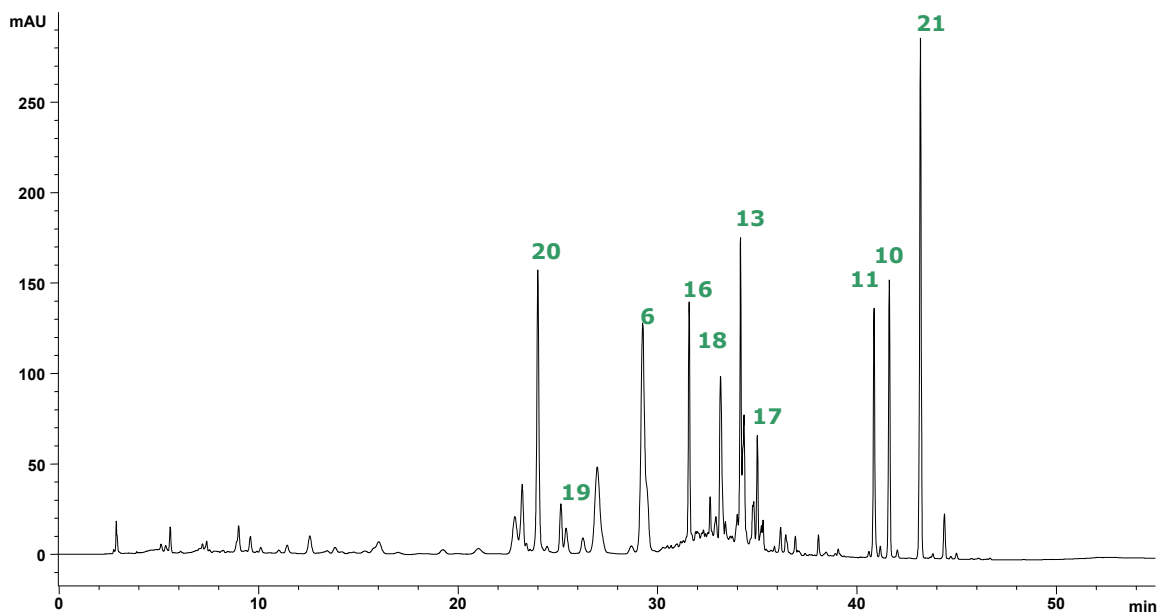
Slika 109: Hromatogram metanolnog ekstrakta nadzemnog dela vrste *G. verna*Slika 110: Hromatogram metanolnog ekstrakta korena vrste *G. verna*

Kao što se vidi iz hromatograma postoje značajne razlike u hemijskom profilu korena i nadzemnog dela. Dok je mangiferin (20) dominirajuća komponenta u nadzemnom delu, u korenu je detektovan u tragovima zajedno sa sekoiridoidima. Izoorijentin i izoviteksin (6 i 16) nisu pronađeni u korenu. Interesantno je da je u korenu identifikovan norsvercianin-1-*O*-primverozid (5) i genciakaulein (11) sa svojim 1-*O*-primverozidom (12) i 1-*O*-glukozidom (13). Nadzemni deo se karakteriše prisustvom genciakohianina (10) i njegovog primverozida (18). Identifikovan je i ksantonski 7-*O*-primverozid (17). I u korenu i u nadzemnom delu, pik sa najvećim retencionim vremenom je detektovan kao ksantonski aglikon dekuzatin (21).

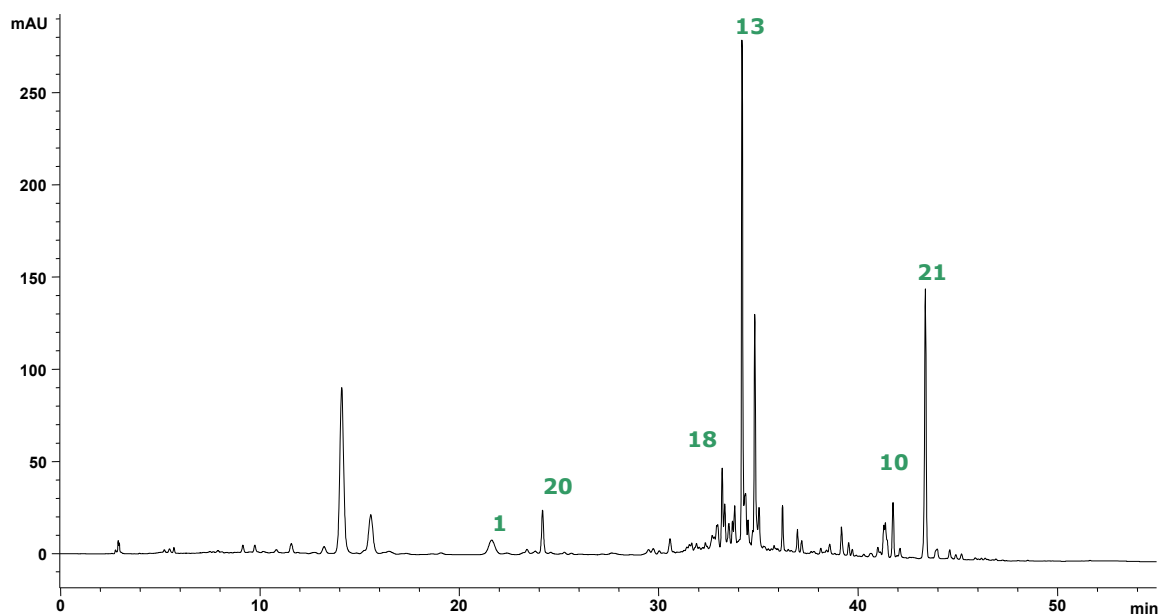
2.5.8. Hemijski sastav vrste *G. tergestina*

Biljni materijal je sakupljen u fazi cvetanja u leto 2001. godine na planini Prokletije.

Totalni metanolni ekstrakti nadzemnog dela i korena su ispitivani HPLC metodom. Hromatogrami su prikazani na slikama 111 i 112.



Slika 111: Hromatogram metanolnog ekstrakta nadzemnog dela vrste *G. tergestina*



Slika 112: Hromatogram metanolnog ekstrakta korena vrste *G. tergestina*

U hromatogramu nadzemnog dela kao dominantan pik ističe se aglikon dekuzatin (21), koji je prisutan i u korenu. Od aglikona detektovani su još i genciakohianin (10) i genciakaulein (11). Pored izoorijentina (6) i izoviteksina (16), pronađen je i izoorijentin-3'-*O*-glukozid (19). U hromatogramu korena dominira pik genciakaulein-1-*O*-glukozida (13), a identifikovani su i genciakohianin i njegov 1-*O*-primverozid (18).

2.6. Hemotaksonomski značaj izolovanih jedinjenja

Rezultati HPLC analize totalnih metanolnih ekstrakata, koji predstavljaju hemijske profile ispitivanih vrsta roda *Gentiana* su u ovom poglavlju, zbog bolje preglednosti, prikazani tabelarno.

Tabela 38: Distribucija izolovanih sekoiridoida i flavonskih-C-glukozida u ispitivanim vrstama

		1	2	4	3	6	16	19
<i>G. dinarica</i>	h	+	+		+	+	+	
	k	+		+	+			
<i>G. kochiana</i>	h		+					
	k	+		+				
<i>G. lutea</i>	h	+	+			+	+	
	k	+	+					
<i>G. pneumonanthe</i>	h	+				+	+	
	k	+	+					
<i>G. asclepiadea</i>	h	+	+			+	+	
	k	+	+			+	+	
<i>G. utriculosa</i>	h					+	+	+
	k							
<i>G. verna</i>	h					+	+	
	k	+	+					
<i>G. tergestina</i>	h					+	+	+
	k	+						

h- herba, k- koren

U tabeli 38 je prikazana distribucija izolovanih sekoiridoida genciopikrina (1), sverciamarina (2) i amarogencina (4) u ispitivanim vrstama roda *Gentiana*. Uočava se da je amarogencin prisutan samo u korenu vrste *G. dinarica* i *G. kochiana*, dok u korenu vrste *G. utriculosa* izolovani sekoiridoidi i flavonski-C-glukozidi nisu pronađeni. Takođe, sekoiridoidi nisu pronađeni ni u nadzemnim delovima nijedne od sledeće tri vrste *G. utriculosa*, *G. verna* i *G. tergestina*.

Što se tiče flavonskih heterozida, izoorijentin-3'-O-glukozid (19) je detektovan samo u nadzemnim delovima vrsta *G. utriculosa* i *G. tergestina*, dok je izoorijentin-4'-O-glukozid (3) prisutan samo u vrsti *G. dinarica*. Izoorijentin (6) i izoviteksin (16) su prisutni u svim ispitivanim vrstama osim u *G. kochiana* kod koje nije detektovan nijedan od izolovanih flavonskih heterozida. I po literaturnim podacima u rodu *Gentiana* najprisutniji su izoorijentin i izoviteksin, za razliku od roda *Gentianella* gde je izoviteksin zamenjen svertizinom¹¹⁵

Tabela 39: Distribucija izolovanih ksantona u ispitivanim vrstama

		5	7	8	9	10	11	12	13	14	15	17	18	20	21	22
<i>G. dinarica</i>	h															
	k	+	+	+	+											
<i>G. kochiana</i>	h					+	+	+	+	+		+				+
	k						+	+	+			+				
<i>G. lutea</i>	h				+									+		
	k				+											+
<i>G. pneumonanthe</i>	h													+		
	k															
<i>G. asclepiadea</i>	h													+		
	k				+											
<i>G. utriculosa</i>	h						+	+		+	+	+	+	+	+	+
	k					+				+		+	+	+	+	+
<i>G. verna</i>	h					+	+					+	+	+	+	+
	k	+					+	+	+						+	+
<i>G. tergestina</i>	h					+	+		+			+	+	+	+	+
	k					+			+				+	+	+	+

h- herba, k- koren

Tabela 39 prikazuje raspodelu ksantonskih heterozida i aglikona u ispitivanim vrstama roda *Gentiana*. Može se primetiti da su neke vrste međusobno veoma slične po sadržaju ksantonskih jedinjenja, što ih hemotaksonomski svrstava u određenu sekciju. Vrste koje su ispitivane u ovom radu prema Flori Evrope⁸ pripadaju sledećim sekcijama:

Gentiana – *G. lutea*

Pneumonanthe – *G. asclepiadea*, *G. pneumonanthe*

Megalanthe – *G. dinarica*, *G. kochiana*

Calanthianae – *G. utriculosa*, *G. verna*, *G. tergestina*

Za sekciju *Gentiana* su karakteristični tri-supstituisani ksantoni. *G. lutea* kao jedini ispitivani predstavnik ove sekcije, prema našim rezultatima sadrži genciozid (9) i gentizin (22) 1,7-dihidroksi-3-metoksi ksanton, što je u skladu sa ranijim hemotaksonomskim istraživanjima.

Sekciju *Pneumonanthe* odlikuje prisustvo ksantonskog-C-glukozida mangiferina (20), koga smo detektovali u ispitivanim vrstama ove sekcije.

Izolovano je nekoliko ksantonskih heterozida sa 1,3,7,8- poretkom supstitucije koji je karakterističan za vrste sekcija *Calanthianae* i *Megalanthe*. Ksantonski 1-

O-primverozidi (12, 14, 18) koji su tipični za sekciju *Calathianae*, preovlađuju u vrstama *G. utriculosa*, *G. verna* i *G. tergestina*.

Treba napomenuti da do sada u vrsti *G. utriculosa* nisu ispitivani ksantonski *O*-heterozidi. Lancerin (15) i 1,8-dihidroksi-3-metoksi-7-*O*-primeverozid (17) su po prvi put izolovani iz ove vrste. Takođe, važno je istaći da lancerin, ksantonski-*C*-glukozid, do sada nije pronađen ni u jednoj ispitivanoj vrsti roda *Gentiana*. Ranije je izolovan iz vrsta roda *Triptospermum*¹³⁶.

Sekcija *Megalanthe* je u ovom radu predstavljena sa dve vrste: *G. kochiana* i *G. dinarica*. O hemijskom sastavu vrste *G. dinarica* ne postoje podaci u literaturi i ona je u ovom radu po prvi put fitohemijski ispitivana. Zbog morfološke sličnosti i pogrešne determinacije *G. dinarica* je često zamenjivana sa vrstom *G. kochiana* koja je dobro poznata. Rezultati dobijeni u ovom radu, pokazuju koliko se ove dve vrste međusobno razlikuju. Već upoređivanjem flavonskih komponenti uočava se velika razlika: u vrsti *G. kochiana* nije detektovan nijedan od izolovanih flavonski heterozida koji su pronađeni u vrsti *G. dinarica*. Kada su u pitanju ksantonski *O*-heterozidi, takođe se uočava velika razlika: nije pronađen nijedan ksanton koji je prisutan u obe vrste. Jedina sličnost u hemijskom sastavu je u prisustvu genciopikrina i bifenilnog sekoiridoida amarogencina u korenovima ovih vrsta.

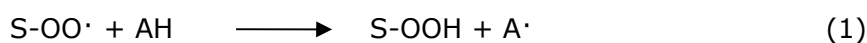
Hemijski profil vrste *G. dinarica* je veoma interesantan. Nadzemni deo biljke se odlikuje prisustvom sekoiridoida i flavonskih-*C*-glukozida, dok se u korenu nalaze ksantonski *O*-heterozidi. Za ovu vrstu je karakteristično prisustvo norsvercianin-1-*O*- i -8-*O*-primverozida (5,7), kao i norsvercianin-1-*O*-glukozida (8). Najvažnije je istaći da ksanton norsvercianin-8-*O*-primverozid (7) do sada nije pronađen ni u jednoj drugoj biljnoj vrsti i da je u ovom radu prvi put predstavljeno jedinjenje sa ovakvom strukturom.

2.7. Biološki efekti izolovanih jedinjenja

2.7.1. Ispitivanje antiradikalske aktivnosti izolovanih jedinjenja DPPH metodom

Danas je opšte prihvaćeno da su slobodni radikali faktori koji u velikoj meri doprinose patogenezi brojnih degenerativnih oboljenja tako što izazivaju oksidativne promene vitalnih ćelijskih komponenti¹⁴⁴. Funkcija antioksidanata, koji učestvuju u odbrani od oksidativnih oštećenja, je sprečavanje nastanka i razvoja bolesti. Zbog toga je u poslednje vreme, veliko interesovanje usmereno ka pronalaženju bezbednih, efikasnih i netoksičnih antioksidanata.

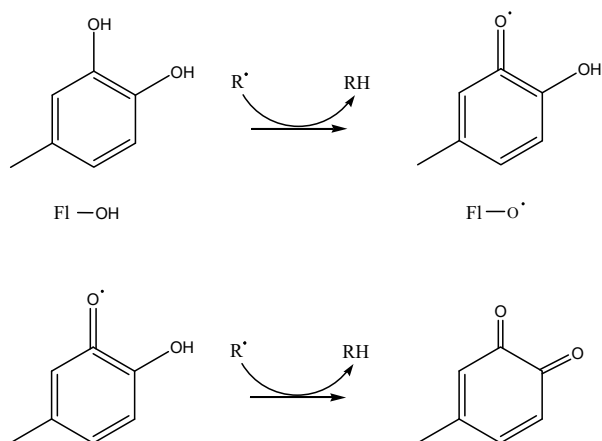
Tradicionalna medicina ima jedinstvenu terapijsku ulogu u prevenciji i lečenju mnogih bolesti. Postoje brojni dokazi da su polifenoli izolovani iz lekovitih biljaka potencijalni terapijski činioci. Njihovo blagotvorno dejstvo je većinom zasnovano na antioksidativnim i antiradikalnim aktivnostima, a za mnoga od ovih jedinjenja je to i eksperimentalno i klinički dokazano. Shodno tome, nova terapijska dostignuća se svode na istraživanje aktivnih komponenti koje biljke akumuliraju a koje deluju antiradikalno. Te aktivne biljne komponente su: flavonoidi, antocijanini, karotenoidi, vitamini i endogeni metaboliti^{145, 146}. Sva ova jedinjenja svoju antiradikalnu aktivnost baziraju na sledećim hemijskim jednačinama:



gde je S oksidacioni supstrat, AH je antioksidant, a A \cdot - antioksidant-radikal.

Kao što se vidi iz hemijske jednačine, antioksidant se prevodi u drugo jedinjenje, neradikalno, sa hemijskom strukturom koja je drugačija od početnog AH¹⁴⁶.

Tipičan primer je reakcija flavonoida sa slobodnim radikalima (Slika 113).

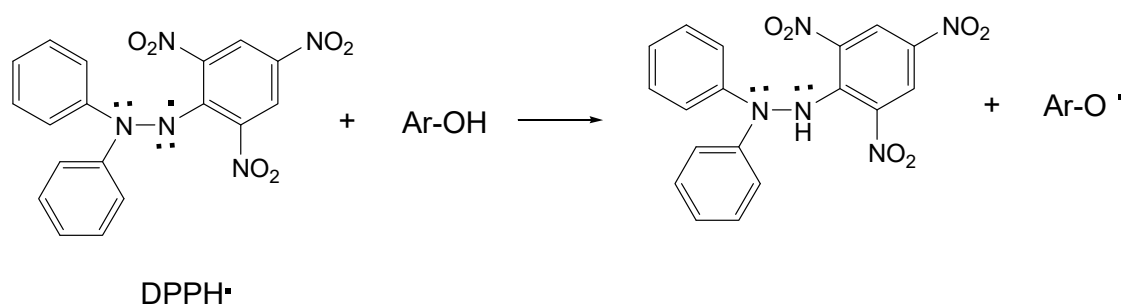


Slika 113: Antiradikalska reakcija flavonoida

R• predstavlja superoksid anjon, peroksil, alkoksil ili hidroksil radikal. Aroksil radikal može da reaguje sa drugim slobodnim radikalom pri čemu nastaje stabilna hinonska struktura⁸⁷.

Za određivanje antiradikaliskog kapaciteta postoji nekoliko metoda i sve uključuju spektrofotometrijsko merenje nestanka stabilnih slobodnih radikala kao što su ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)), DPPH• (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) ili nekih drugih obojenih radikala. Metode su vrlo pogodne i korisne za preliminarno određivanje antioksidativnosti, jer se za kratko vreme može analizirati veliki broj uzoraka, a dovoljno su osetljive da mogu da detektuju antioksidante u malim koncentracijama.

U ovom radu je korišćena brza i jednostavna metoda u kojoj DPPH kao stabilna slobodno-radikalna forma, direktno reaguje sa ispitivanim biljnim ekstraktima ili jedinjenjima. Zbog delokalizovanog slobodnog elektrona, metanolni rastvor DPPH je ljubičaste boje sa apsorpcionim maksimumom na 517 nm. Kada se ovom rastvoru doda jedinjenje koje može da bude donor protona, odnosno da redukuje DPPH, gubi se ljubičasta boja i smanjuje apsorpcija na 517 nm (Slika 114)¹⁴⁷.



Slika 114: Reakcija DPPH sa antioksidantom

Metoda i eksperimentalni detalji opisani su u poglavlju **3.5.1**. Ispitivana je antiradikalska aktivnost (kapacitet) početnih ekstrakata vrsta *G. dinarica*, *G. kochiana* i *G. utriculosa* (Tabela 40), a potom i aktivnost jedinjenja koja su iz njih izolovana (Tabela 41).

Tabela 40: Antiradikalska aktivnost biljnih ekstrakata

biljni ekstrakti	Inhibicija (%)		
	<i>G. dinarica</i>	<i>G. kochiana</i>	<i>G. utriculosa</i>
MeOH ekstrakt	44,24	24,54	14,07
Etarski ekstrakt	12,71	39,12	1,22
Etilacetatni ekstrakt	29,91	4,83	8,62
Butanolni ekstrakt	26,41	1,31	10,30

Iz Tabele 40 se može videti da najveću antiradikalnu aktivnost pokazuju ekstrakti vrste *G. dinarica*. Jedino etarski ekstrakt vrste *G. kochiana* ima veći inhibitorni kapacitet od etarskog ekstrakta *G. dinarica*. Kod vrsta *G. utriculosa* i *G. dinarica* metanolni ekstrakti ispoljavaju najveću aktivnost u odnosu na druge ispitivane ekstrakte u okviru iste vrste.

Tabela 41: Antiradikalska aktivnost izolovanih jedinjenja

izolovana jedinjenja	Inhibicija (%)			
	20 μ M	40 μ M	60 μ M	80 μ M
izoorijentin	15,10	32,70	55,84	68,30
izoorijentin-4'- <i>O</i> -glukozid	-	-	-	0,63
izoorijentin-3'- <i>O</i> -glukozid	-	-	-	0,16
izoviteksin	-	-	-	1,71
genciakohianin	31,83	51,88	63,61	84,34
genciakaulein	-	-	-	3,37
norsvercianin	23,14	40,29	79,34	89,9
norsvercianin-1- <i>O</i> -primverozid	16,07	45,72	57,9	70,97
norsvercianin-8- <i>O</i> -primverozid	3,33	3,64	4,74	7,72
norsvercianin-1- <i>O</i> -glukozid	8,45	20,70	35,31	48,10
genciakaulein-1- <i>O</i> - primverozid	-	-	-	2,32
genciakaulein-1- <i>O</i> -glukozid	-	-	-	4,38
genciakohianin-1- <i>O</i> - primverozid	-	-	-	12,06
Troloks*	18,32	48,71	59,68	78,34
askorbinska kiselina*	15,28	94,97	98,89	100

* pozitivna kontrola

Ksantonski aglikoni norsvercianin (89,9%) i genciakohianin (84,34%) pokazuju najveću aktivnost u odnosu na druga izolovana jedinjenja, pri koncentraciji od 80 μ M. Ovi ksantoni pokazuju veći inhibitorski potencijal od troloksa koji predstavlja pozitivnu kontrolu. Nešto manju aktivnost ima norsvercianin-1-*O*-primverozid (70,97%). Dokazano je da antiradikalska aktivnost ksantona, kao polifenolnih jedinjenja, raste sa povećanjem broja OH grupa u molekulu. Prisustvo kateholnih grupa dodatno pojačava antiradikalnu sposobnost, kao i prisustvo OH grupa u položajima 1 i 8⁵⁸. Time se može objasniti jako mala aktivnost genciakauleina u odnosu na genciakohianin, čije se strukture razlikuju samo u položaju 8 (kod genciakauleina u položaju 8 je metoksi grupa, a kod genciakohianina OH grupa). Slično je i sa ksantonskim 1-*O*- i 8-*O*-primverozidima: nedostatak kateholne grupe (7,8-dihidroksi grupe) u molekulu norsvercianin-8-*O*-primverozida drastično smanjuje njegovu antiradikalnu sposobnost (7,72%) u odnosu na 1-*O*-primverozid.

Od izolovanih flavonskih *C*-glukozida jedino izoorijentin (80 μ M) ima značajnu aktivnost (68,3%) što se moglo i očekivati ukoliko se uzme u obzir njihova struktura. Kao što je već navedeno u poglavlju (1.2.3.2) sklonosti flavonoida da ispoljavaju antioksidativne efekte su pripisane prvenstveno njihovoj hemijskoj strukturi i sposobnosti da budu donatori elektrona. Za antiradikalnu aktivnost je esencijalno prisustvo *orto* dihidroksi strukture u prstenu B i C-2 – C-3 dvostruke

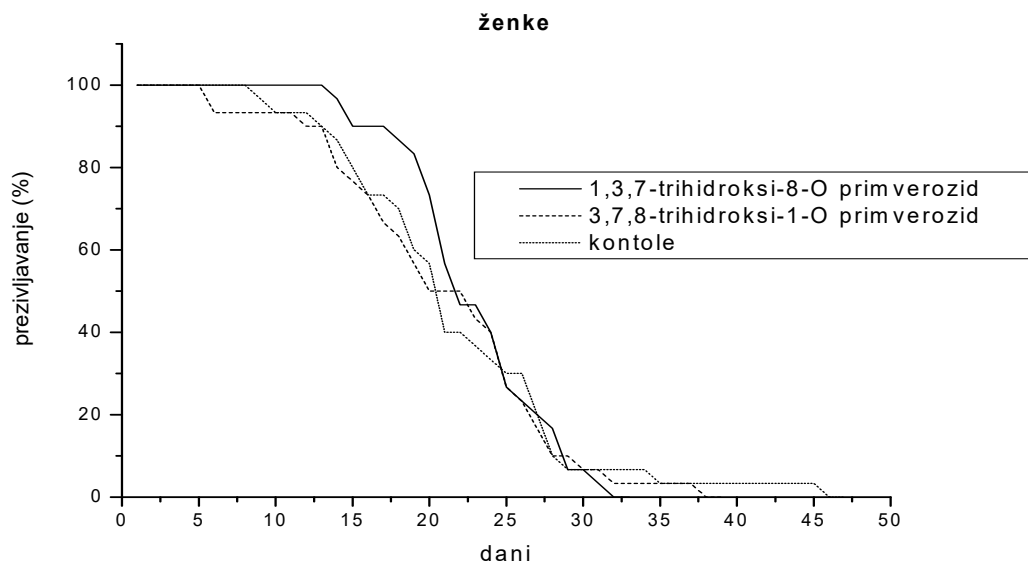
veze konjugovane sa karbonilnom grupom na C-4 atomu u prstenu C. Obzirom da 3' i 4'-*O*-glukozidi izoorijentina nemaju slobodne OH grupe u *orto* položaju, to se odražava na njihovu aktivnost pa im je inhibitorski kapacitet manji od 1%.

2.7.2. Ispitivanje antiradikalske aktivnosti na modelu pasuljevog žiška

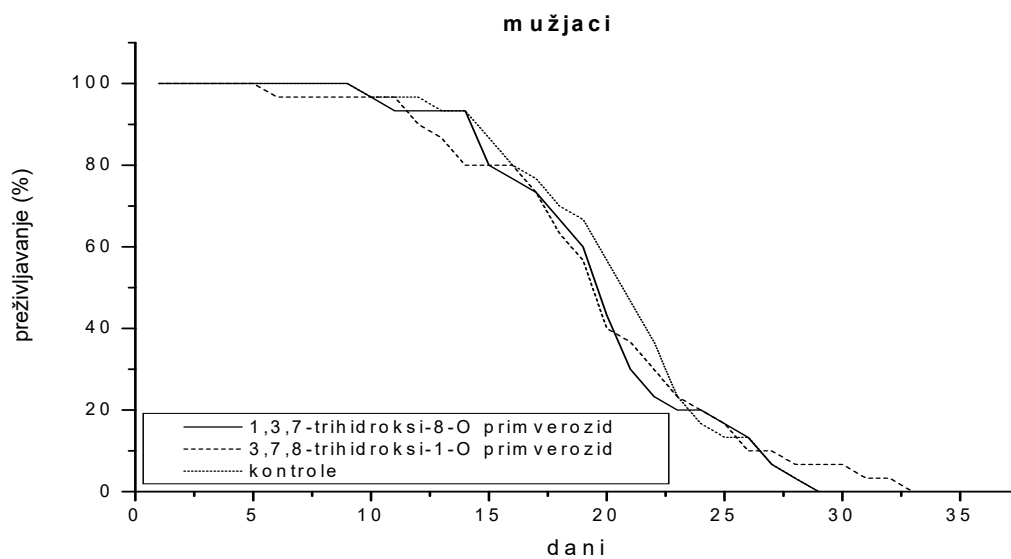
Za ovaj rad, odabrana su jedinjenja koja su prethodno testirana DPPH metodom, koja su pokazala antiradikalnu aktivnost *in vitro* i koja su rastvorljiva u vodi. Norsvercianin-1-*O*-primverozid i norsvercianin-8-*O*-primverozid su testirani kao nutritivni antioksidansi na pasuljevom žišku.

Pasuljev žižak (*Acanthoscelides obtectus* Say; *Coleoptera*; *Bruchidae*) se izleže iz semena pasulja kao adult. Tokom života se ne hrani, samo pije vodu, jer po izleganju ima nutritivne rezerve za kompletan adultni period. I kod mužjaka i kod ženki dužina života je određena potrošnjom energetske rezerve, koje zavise od reproduktivne aktivnosti (kod mužjaka) i broja položenih jaja – fekunditeta (kod ženki). Merenje dužine života žižaka omogućuje procenu antioksidativnog ili prooksidativnog delovanja supstanci, a merenje broja položenih jaja mogućnost procene potencijalnih fizioloških efekata primenjenih antioksidanata. Dosadašnji rezultati su pokazali da egzogeni antioksidanti izazivaju promene u dužini života i broju položenih jaja. Pokazano je da biljni ekstrakti i izolovane čiste supstance sa antioksidativnim dejstvom, imaju promenljive efekte i da dobar antioksidans *in vitro* ne mora da deluje apsolutno protektivno *in vivo*. Primenom antioksidanata se može smanjiti brzina starenja i dosadašnji rezultati, na modelu insekta - pasuljevog žiška, su pokazali da egzogeni antioksidanti imaju potencijal antioksidativnog *in vivo* delovanja¹⁴⁸.

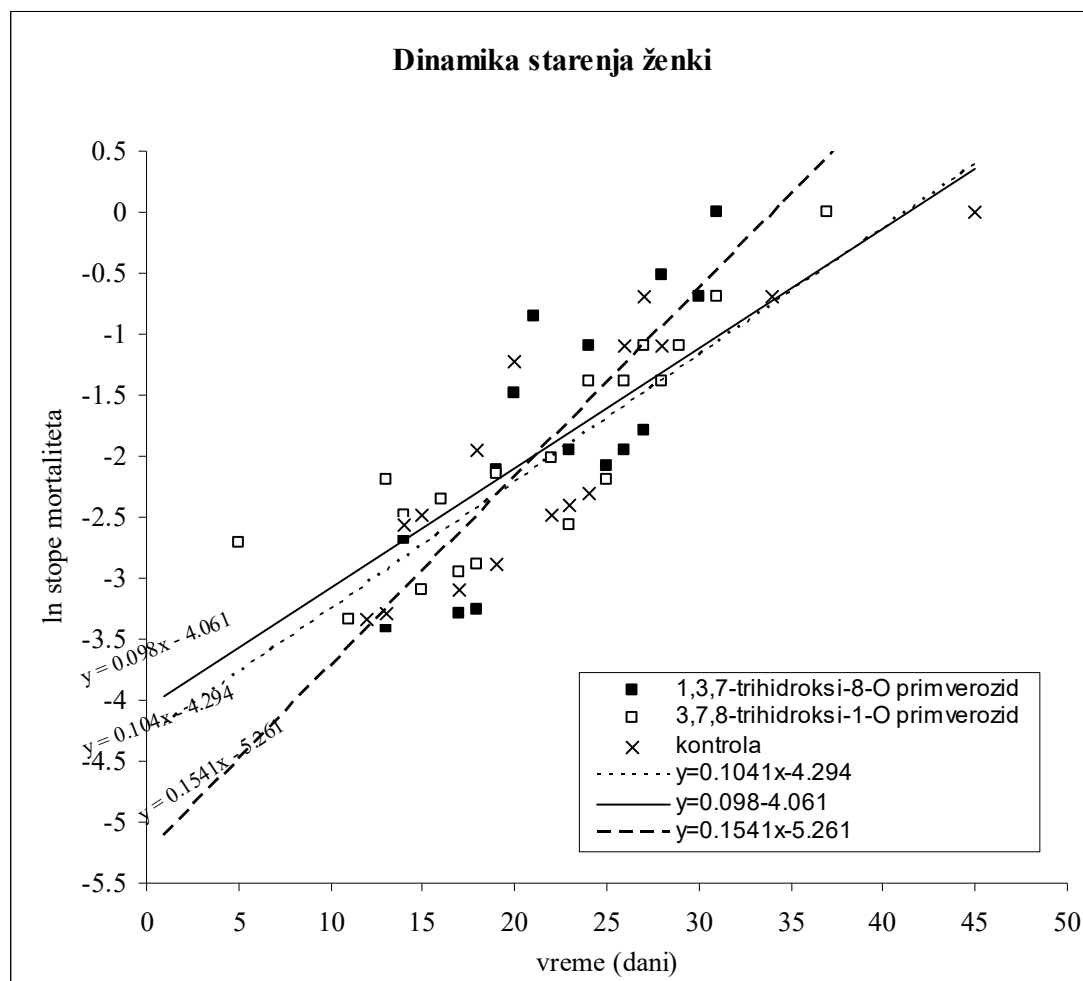
Mušjacima i ženkama pasuljevog žiška, koji su po izleganju stavljeni u Petri-šolje, ovi antioksidanti su davani tako što su filter papirići (1x1cm) natapani njihovim vodenim rastvorom (15µM), *ad libitum*. Brojnost jedinki je kontrolisana dnevno sve do uginuća poslednjeg žiška. Praćeni su efekti na dužinu života, dinamiku starenja, kao i na aktivnost endogenih antioksidativnih enzima (poglavljja 3.5.2.1. i 3.5.2.2.). Rezultati su prikazani u grafikonima (slike 115-118).



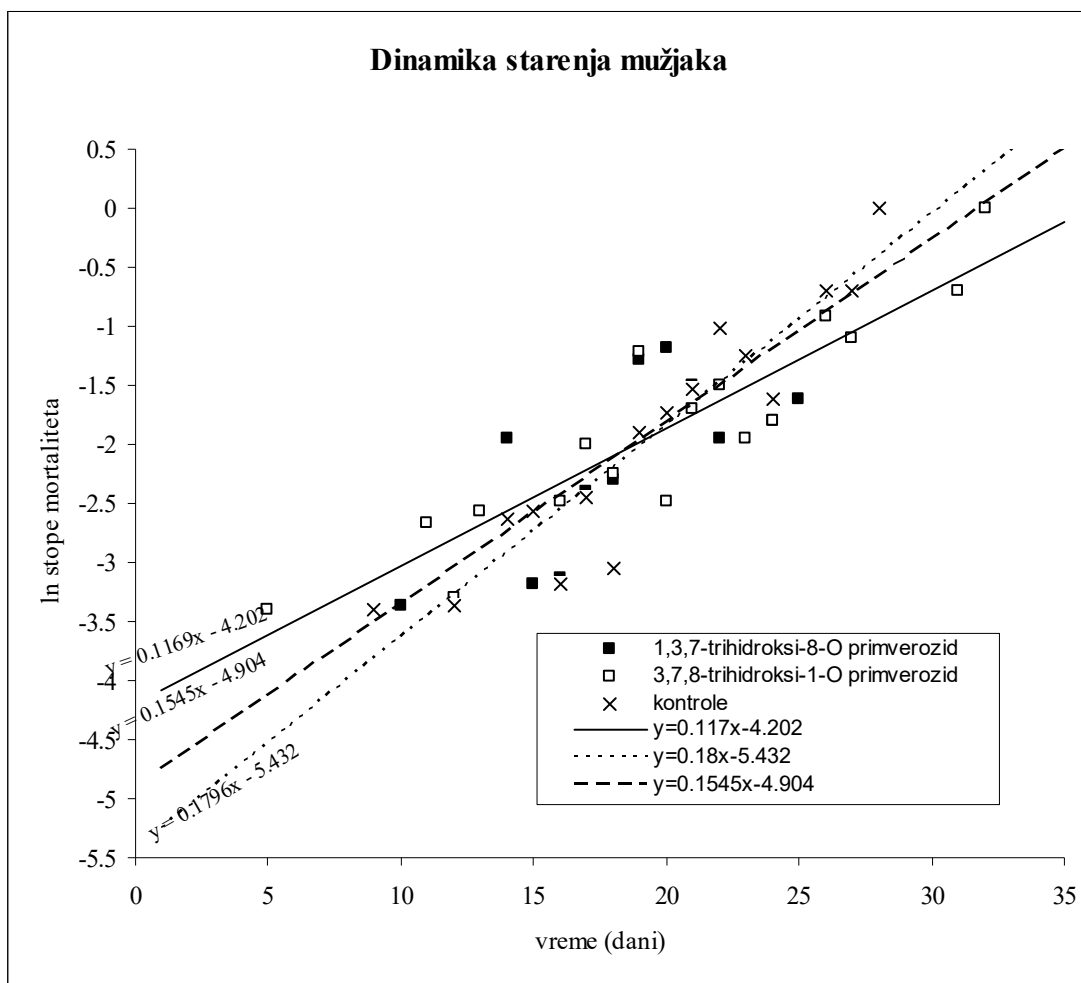
Slika 115: Kriva preživljavanja ženki pasuljevog žiška tretiranih ksantonskim primverozidima



Slika 116: Kriva preživljavanja mužjaka pasuljevog žiška tretiranih ksantonskim primverozidima



Slika 117: Dinamika starenja ženki pasuljevog žiška tretiranih ksantonskim primverozidima



Slika 118: Dinamika starenja mužjaka pasuljevog žiška tretiranih ksantonskim primverozidima

Rezultati su pokazali da kod ženki norsvercianin-1-*O*-primverozid malo usporava starenje, dok norsvercianin-8-*O*-primverozid smanjuje smrtnost nezavisnu od starosnih promena, tj. pokazuje pozitivan efekat u ranom uzrastu, ali značajno ubrzava starenje u kasnoj dobi, što je prikazano na slikama 115 i 117. Kod mužjaka, naprotiv, oba ksantona usporavaju starenje, ali je -1-*O*-primverozid efikasniji nego -8-*O*-primverozid 116 i 118.

U Tabeli 42 su prikazani efekti ksantonskih primverozida na enzime antioksidativne zaštite: CuZnSOD, MnSOD i CAT i glutation-S-transferazu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška.

Tabela 42. Aktivnost antioksidativnih enzima ženki pasuljevog žiška tretiranih norsvercianin-1-*O*-primverozidom i norsvercianin-8-*O*-primverozidom.

	ženke			ANOVA
	kontrola	-8- <i>O</i> -primverozid	-1- <i>O</i> -primverozid	
CuZnSOD	8.7 \pm 0.4	8.3 \pm 0.3	9.2 \pm 1.5	N.S.
MnSOD	0.88 \pm 0.07	0.987 \pm 0.003	1.18 \pm 0.07	P<0.05
CAT	18.7 \pm 3.7	22.1 \pm 2.7	19.2 \pm 6.7	N.S.
GST	145 \pm 7	123 \pm 11	164 \pm 30	N.S.

Kontrola = netretirani žišci N.S.= nije značajno

Tabela 43. Aktivnost antioksidativnih enzima mužjaka pasuljevog žiška tretiranih norsvercianin-1-*O*-primverozidom i norsvercianin-8-*O*-primverozidom.

	mužjaci			ANOVA
	kontrola	-8- <i>O</i> -primverozid	-1- <i>O</i> -primverozid	
CuZnSOD	7.5 \pm 1.2	6 \pm 1.1	7 \pm 0.8	N.S.
MnSOD	0.9 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	N.S.
CAT	7.2 \pm 0.3	8.2 \pm 1.6	5.5 \pm 0.5	N.S.
GST	81 \pm 8	71 \pm 18	93 \pm 24	N.S.

Kontrola = netretirani žišci N.S.= nije značajno

U prikazanim tabelama može se uočiti da je kod ženki tretiranih sa norsvercianin-1-*O*-primverozidom, vrednost MnSOD je veća u poređenju sa kontrolnim žiškima.

Rezultati ispitivanja efekata na modelu pasuljevog žiška su pokazali da *in vitro* antioksidant norsvercianin-1-*O*-primverozid ima antioksidativni potencijal i *in vivo*, ali samo kod mužjaka. Efekat se odražava na usporavanje starenja, pri čemu se ne menja endogena antioksidativna ravnoteža uspostavljena delovanjem antioksidativnog zaštitnog sistema (nema promene aktivnosti antioksidativnih enzima).

Kod ženki je pokazano da norsvercianin-1-*O*-primverozid deluje na slobodno radikalsku ravnotežu, menja aktivnost MnSOD, ali to povećanje nije protektivno delovalo na dužinu života ženki, što ne isključuje mogućnost da može imati pozitivne efekte na drugim model sistemima. Norsvercianin-8-*O*-primverozid, naprotiv ubrzava starenje kod ženki u kasnoj životnoj dobi, ali pri tom ne izaziva aktivaciju niti antioksidativnih niti detoksifikacionih mehanizama (nema promena aktivnosti ispitivanih antioksidativnih enzima i GST), što ukazuje na postojanje sekundarnih interakcija sa drugim fiziološkim sistemima koji su uključeni u održavanje bazične homeostaze. Svi navedeni rezultati jasno ukazuju i na razlike u efektima koji potiču od strukture samog molekula, tako da se mera efekata antioksidanata mora razmatrati u širem kontekstu slobodno radikalskih procesa *in vivo*.

2.7.3. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

2.7.3.1. Detekcija antimikrobne aktivnosti bioautografskom TLC metodom

Za preliminarno ispitivanje antimikrobne aktivnosti biljnih ekstrakata i izolovanih jedinjenja korišćena je bioautografska TLC metoda (poglavlje 3.5.3.1.). Ispitivana je aktivnost ekstrakata i izolovanih ksantona i flavonoida iz vrste *G. dinarica*, kao i aktivnosti genciakohianina i genciakauleina iz vrste *G. kochiana*. Kao test mikroorganizmi korišćeni su bakterijski sojevi: *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* i gljivica *Candida albicans*. Rezultati su prikazani u tabeli.

Tabela 44: Ispitivanje antimikrobne aktivnosti bioautografskom TLC metodom

	µg/ml	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. typhimur.</i>	<i>S. aureus</i>
1	2,5	-	-	+	-	+
	5	-	+	++	-	++
	10	-	++	+++	+	+++
2	2,5	-	-	-	-	-
	5	-	+	+	-	+
	10	-	++	++	+	++
3	2,5	-	-	-	-	-
	5	+	+	+	+	+
	10	++	++	++	++	++
4	2,5	-	-	+	-	-
	5	+	-	++	+	+
	10	++	+	+++	++	++
5	2,5	-	+	+	-	+
	5	-	++	++	+	++
	10	-	+++	+++	++	+++
6	2,5	-	-	+	+	+
	5	-	+	++	++	++
	10	-	++	+++	+++	+++
7	25	-	-	-	-	-
	50	-	-	+	+	+
	100	-	+	++	++	++
8	25	-	-	+	+	+
	50	-	+	++	++	++
	100	-	++	+++	+++	+++

- +++ jako dobro dejstvo, zone inhibicije se vide golim okom
 ++ dobro dejstvo, zone inhibicije se vide pod UV svetlom
 + ima dejstva, zone inhibicije se slabo vide pod UV svetlom
 - nema dejstva, ništa se ne uočava

(**1**)norsvercianin-1-*O*-primverozid, (**2**)norsvercianin-8-*O*-primverozid,
 (**3**)izoorijentin, (**4**)izoorijentin-4'-*O*-glukozid, (**5**)genciakohianin,
 (**6**)genciakaulein, (**7**)BuOH ekstrakt, nadzemni deo, *G. dinarica*, (**8**)BuOH
 ekstrakt, koren, *G. dinarica*

Kao što se može videti u Tabeli 44, od ispitivanih komponenti samo izoorijentin i njegov *O*-glukozid imaju dejstvo na gljivicu *C. albicans*. Genciakohianin i genciakaulein pokazuju najbolju inhibitornu aktivnost na ispitivane bakterije u odnosu na ostala testirana jedinjenja. Interesantno je primetiti da butanolni ekstrakt korena vrste *G. dinarica* inhibitorno deluje na sve ispitivane bakterije u svim testiranim koncentracijama, dok ksantoni koji su izolovani iz ovog ekstrakta imaju slabiju aktivnost, što ukazuje na mogućnost sinergističkog dejstva ovih jedinjenja.

2.7.3.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti mikrodilucionom metodom

Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) ispitivanih ekstrakata i izolovanih jedinjenja su određivane mikrodilucionom metodom (poglavlje 3.5.3.2.). Rezultati su prikazani u Tabeli 45.

Tabela 45: Minimalne inhibitorne koncentracije ispitivanih jedinjenja i ekstrakata

	<i>B.cereus</i> MIC (µg/ml)	<i>E. coli</i> MIC (µg/ml)	<i>S.typhimur.</i> MIC (µg/ml)	<i>S. aureus</i> MIC (µg/ml)	<i>C. albicans</i> MIC (µg/ml)
1	12,5	25	50	12,5	-
2	25	25	50	12,5	-
3	25	25	25	25	25
4	12,5	50	25	25	25
5	12,5	25	25	12,5	-
6	12,5	25	25	12,5	-
7	25	50	25	25	-
8	12,5	25	12,5	12,5	-
Kontr.	12,5	25	50	12,5	12,5

(**1**)norsvercianin-1-*O*-primverozid, (**2**)norsvercianin-8-*O*-primverozid, (**3**)izoorijentin, (**4**)izoorijentin-4'-*O*-glukozid, (**5**)genciakohianin, (**6**)genciakaulein, (**7**)BuOH ekstrakt, nadzemni deo, *G. dinarica*, (**8**)BuOH ekstrakt, koren, *G. Dinarica*, (**kontr.**) ampicilin

I ovom metodom je pokazano da od ispitivanih komponenti jedino izoorijentin i izoorijentin-4'-*O*-glukozid pokazuju antifungalnu aktivnost sa minimalnom inhibitornom koncentracijom od 25 µg/ml. Najbolje antimikrobno dejstvo pokazuje BuOH ekstrakt korena *G. dinarica* čije su minimalne inhibitorne koncentracije za *B. cereus*, *E. Coli* i *S. aureus* iste kao i kod kontrolnog antibiotika ampicilina, a na bakteriju *S. typhimurium* ekstrakt pokazuje jače dejstvo od antibiotika. Takođe bolje inhibitorno dejstvo na ovu bakteriju u odnosu na antibiotik imaju i ostala testirana jedinjenja izuzev ksantonskih *O*-primverozida.

**EKSPERIMENTALNI
DEO**

3.1. Rastvarači i aparati

U metodama izolovanja i prečišćavanja farmakološki aktivnih jedinjenja, korišćeni su sledeći rastvarači: metanol, etil-acetat, n-butanol, toluen, metilen-hlorid, dejonizovana voda. Svi rastvarači su dobijeni destilacijom i bili su analitičke čistoće.

Od hromatografskih metoda najčešće su korišćene:

- **hromatografija na stubu**
 - silika gela (0,063-0.2 mm)
 - poliamida SC₆ (50-160 μm)
 - sefadeksa LH-20
- **"dry-column" flash hromatografija** na silika gelu (veličina čestica <0,063 mm),
- **preparativna tankoslojna hromatografija** na gotovim pločama Kieselgel 60 F₂₅₄, debljine 0,25 mm, ili na pravljenim pločama Kieselgel 60 GF₂₅₄ debljine 0,75 mm i
- **visokoefikasna tečna hromatografija** (HPLC) koja je rađena na aparatu Hewlett-Packard 1100, na koloni Zorbax SB-C18 5 μm, 250x4,6 mm, sa DAD detektorom. Kao mobilna faza korišćena je voda sa 2% 0,1N H₃PO₄ (A) i MeCN (B). Protok 1ml/min. Injekciona zapremina uzorka je 5 μl, a eluiranje je gradijentno po sledećoj šemi: 98-90% A, 0-5 min, 90% A, 5-18 min, 90-85% A, 18-20 min, 85% A, 20-25 min, 85-70% A, 25-30 min, 70-30% A, 30-40 min, 30-0% A, 40-50 min. UV apsorbancija je merena na 260 i 320 nm.

¹H i ¹³C NMR spektri su snimani na spektrometru Varian Gemini 2000 na 200 MHz i 50 MHz. 2D NMR spektri su snimani na spektrometru Bruker AMX 500 na 500 MHz.

Maseni spektri su snimani na masenom spektrometru Finnigan Mat 8230, a za jonizaciju su korišćene tehnike elektronskog udara (EI 70 eV) i hemijske jonizacije (CI 150 eV) uz izobutan kao jonizujućii gas.

UV spektri su snimani na spektrofotometrima Hewlett-Packard HP 8543 i Cintra 40.

3.2. Analiza hemijskog sastava vrste *Gentiana dinarica*

Biljna vrsta *G. dinarica* je sakupljena u fazi cvetanja, u toku leta 2000. i 2001. godine, na planini Tari, lokaliteti Zvezda (1230 m) i Veliki Kraj (1330 m). Posle sušenja na vazduhu, nadzemni delovi biljaka (400g) su odvojeni od korena (158g), samleveni i ekstrahovani metanolom na sobnoj temperaturi, u mraku, tokom 48 sati. Ekstrakti su upareni na vakuum uparivaču. HPLC metodom je urađena preliminarna analiza hemijskog sastava ovih ekstrakata.

3.2.1. *G. dinarica*, analiza nadzemnog dela

Sirovi metanolni ekstrakt (100g) nadzemnog dela vrste *G. dinarica* rastvoren je u vodi, a potom reekstrahovan rastvaračima rastuće polarnosti: etrom, etil-acetatom i n-butanolom. Dobijeni ekstrakti su upareni, pri čemu je dobijeno 9,5g etarskog, 1,5g etil-acetatnog i 31,6g butanolnog ekstrakta.

3.2.1.1. Butanolni ekstrakt

Za "dry - column flash" hromatografiju na silika gelu, uzeto je 10g ovog ekstrakta. Ekstrakt je rastvoren u maloj količini smeše rastvarača CH₂Cl₂ : MeOH, 80:20, u koji je potom dodat SiO₂. Tako pripremljena suspenzija je uparena i ostavljena na vazduhu da otpari sav rastvarač. Za eluiranje je korišćena smeša CH₂Cl₂ : MeOH u različitim odnosima. Tok hromatografije je prikazan u Tabeli 1

Tab. 1

eluens	procentni sadržaj	broj frakcije
CH ₂ Cl ₂ : MeOH	85 : 15	1
CH ₂ Cl ₂ : MeOH	80 : 20	2
CH ₂ Cl ₂ : MeOH	70 : 30	3
CH ₂ Cl ₂ : MeOH	60 : 40	4
CH ₂ Cl ₂ : MeOH	40 : 60	5
CH ₂ Cl ₂ : MeOH	20 : 80	6
CH ₂ Cl ₂ : MeOH	0 : 100	7

Frakcije su uparene i analizirane tankoslojnom hromatografijom. Kao razvijač je korišćen sistem rastvarača CH₂Cl₂ : MeOH, 85 : 15. Po završenom razvijanju i sušenju, pločice su posmatrane pod UV lampom na talasnim dužinama 254 nm i 366 nm, a zatim isprskane 50% sumpornom kiselinom da bi se vizuelno locirale fino razdvojene mrlje. Najbolje razdvajanje sekoiridoida i flavonoida je postignuto u frakcijama 3 i 4.

3.2.1.1.1. Izolovanje sekoiridoida

Frakcija 3 (2,61g, Tabela1) je rehromatografisana na koloni SiO₂ koja je formirana u CH₂Cl₂. Eluiranje je započeto čistim CH₂Cl₂. Polarnost eluensa je postepeno povećavana dodavanjem MeOH. Način eluiranja je prikazan u Tabeli 2

Tab.2

eluens	procentni sadržaj	broj frakcije
CH ₂ Cl ₂ : MeOH	100 : 0	1 - 2
CH ₂ Cl ₂ : MeOH	95 : 5	3 - 5
CH ₂ Cl ₂ : MeOH	90 : 10	6 - 8
CH ₂ Cl ₂ : MeOH	85 : 15	9 - 16
CH ₂ Cl ₂ : MeOH	80 : 20	17 - 30

Frakcije su analizirane tankoslojnom hromatografijom u sistemu rastvarača CH₂Cl₂ : MeOH, 85 : 15 i na osnovu R_f vrednosti spajane.

Frakcije 15-16 (0.68g, Tabela 2) su na TLC pločici davale samo jednu mrlju za koju je kasnije HPLC metodom utvrđeno da je smeša genciopikrina i sverozida. Hromatografijom na koloni silika-gela, kao ni hromatografijom na stubu poliamida SC₆ nije bilo moguće frakcionisati ovu smešu.

Preparativnom tankoslojnom hromatografijom u sistemu razvijaača EtOAc-MeOH-H₂O, 21:4:3, nakon tri razvijanja, izdvojile su se dve trake vidljive pod UV lampom (254 nm), koje su sastrugane sa ploče i desorbovane metanolom nekoliko puta. Posle uparavanja rastvarača, svaka od supstanci je prečišćena na koloni sefadeska LH-20 uz eluiranje metanolom. Dobijen je čist genciopikrin i smeša sverozida i genciopikrina.

Frakcija 17-30 (1,28g, Tabela 2) je rehromatografisana na koloni silika-gela (0,063-0,2 mm) koja je formirana u CH₂Cl₂. Eluiranje je započeto sa CH₂Cl₂ a potom je povećavana polarnost eluensa dodatkom metanola. Sakupljene su frakcije od 0-58 na način prikazan u Tabeli 3.

Tab.3

eluens	procentni sadržaj	broj frakcije
CH ₂ Cl ₂ : MeOH	100 : 0	0
CH ₂ Cl ₂ : MeOH	95 : 5	1-17
CH ₂ Cl ₂ : MeOH	93 : 7	18-26
CH ₂ Cl ₂ : MeOH	90 : 10	27-49
CH ₂ Cl ₂ : MeOH	88 : 12	50
CH ₂ Cl ₂ : MeOH	85 : 15	51-58

Frakcije su analizirane tankoslojnom hromatografijom u sistemu rastvarača CH_2Cl_2 : MeOH, 80 : 20 i frakcije sa istim R_f vrednostima su spajane.

Iz uparenih i spojenih frakcija 39-41 (Tabela 3) dobijen je **genciopikrin (1)** (380mg). H^1 NMR i MS spektri su prikazani u poglavlju (2.2.1.1.)

Iz **frakcija 44-48** (Tabela 3) izolovan je **sverciamarin (2)** (95mg). Snimljeni su H^1 NMR i MS spektri (poglavlje 2.2.1.2.) koji su ukazivali na strukturu svercijamarina, ali zbog nedostatka literaturnih podataka o H^1 NMR spektru izvršena je njegova derivatizacija acetilovanjem.

U sverciamarin (10mg) dodat je piridin (1ml) i anhidrid sirćetne kiseline (0,5ml). Smeša je ostavljena u mraku 48 časova. Višak anhidrida je razoren dodatkom metanola (1ml) i nekoliko kapi vode. Rastvor je zatim uparen, a ostaci piridina i sirćetne kiseline uklonjeni uparavanjem na vakuumu uz dodatak toluena i na kraju uz dodatak heptana.

Frakcije 6 i 7 su spojene (1g, Tabela 1) i rehromatografisane na stubu polamida SC_6 ; eluens: voda i metanol. Tok eluiranja je prikazan u Tabeli 4.

Tab.4

eluens	procentni sadržaj	broj frakcije
H_2O : MeOH	100 : 0	0 – 5
H_2O : MeOH	95 : 5	6 – 11
H_2O : MeOH	90 : 10	12 – 16
H_2O : MeOH	85 : 15	17 – 18
H_2O : MeOH	80 : 20	19 – 20
H_2O : MeOH	70 : 30	21
H_2O : MeOH	40 : 60	22 – 23
H_2O : MeOH	50 : 50	24 – 26
H_2O : MeOH	40 : 60	27 – 28
H_2O : MeOH	30 : 70	29

Nakon hromatografije na tankom sloju, u sistemu razvijača EtOAc:MeOH: H_2O , 21:4:3, na osnovu istih R_f vrednosti, spojene su **frakcije 9-14** iz kojih je izolovan **izoorijentin-4'-O-glukozid (3)** (50mg). Snimljeni su H^1 , ^{13}C NMR i UV spektri. Podaci su dati u poglavlju 2.2.1.3.

3.2.2. *G. dinarica*, analiza korena

Sirovi metanolni ekstrakt korena (22g) je uparen, rastvoren u vodi i sukcesivno reekstrahovan rastvaračima rastuće polarnosti: dietil-etrom, etil-acetatom i n-butanolom.

Butanolni ekstrakt

Butanolni ekstrakt (5g) je rastvoren u malo vode i nanešen na kolonu poliamida SC₆ koja je formirana u vodi. Za eluiranje su korišćeni voda i metanol. Tok hromatografije je prikazan u tabeli Tab.5.

Tab.5

eluens	procentni sadržaj	broj frakcije
H ₂ O : MeOH	100 : 0	1 - 7
H ₂ O : MeOH	90 : 10	8 - 20
H ₂ O : MeOH	80 : 20	21 - 26
H ₂ O : MeOH	70 : 30	27 - 38
H ₂ O : MeOH	60 : 40	39 - 45
H ₂ O : MeOH	50 : 50	45 - 50
H ₂ O : MeOH	40 : 60	51 - 53
H ₂ O : MeOH	30 : 70	54 - 57
H ₂ O : MeOH	20 : 80	57 - 59
H ₂ O : MeOH	10 : 90	60 - 62

Frakcije su analizirane tankoslojnom hromatografijom u sistemu rastvarača EtOAc:MeOH:H₂O, 21:4:3. Spajane su na osnovu R_f vrednosti.

Iz **frakcije 31-33**, (pod UV lampom svetli intenzivno plavom bojom) izolovan je **amarogencin (4)** (50mg). Snimljeni su H¹ i ¹³C NMR i UV spektri. Podaci su dati u poglavlju 2.1.2.1.

Nakon uparavanja rastvarača iz **frakcija 39-43** dobijen je ksanton **norsvercianin-1-O-primverozid (5)** (73,1mg). Snimljeni su H¹ i ¹³C NMR i UV spektri. Podaci su dati u poglavlju 2.2.2.2.

Frakcije 48 do 51 su spojene, uparen je rastvarač, i posle provere tankoslojnom hromatografijom izolovan je flavon **izoorjentin (6)** (11,9mg). H¹ i ¹³C NMR i UV spektri su prikazani u poglavlju 2.2.2.3.

Iz **frakcije 52** izolovan je **norsvercianin-8-O-primverozid (7)** (21mg). Snimljeni su H¹ i ¹³C NMR i UV spektri. Podaci su dati u poglavlju 2.2.2.4.

Frakcija 53-57 (105mg, Tabela 5) je rehromatografisana na koloni poliamida SC₆ koja je formirana u vodi. Eluiranje je započeto smešom voda-metanol, 80 : 20. Način eluiranja je prikazan u Tabeli 6.

Tab.6

eluens	procentni sadržaj	broj frakcije
H ₂ O : MeOH	80 : 20	1 – 5
H ₂ O : MeOH	70 : 30	6 – 8
H ₂ O : MeOH	60 : 40	9 – 14
H ₂ O : MeOH	55 : 45	15 – 52
H ₂ O : MeOH	50 : 50	53 – 60
H ₂ O : MeOH	40 : 60	61

Posle analize tankoslojnom hromatografijom, frakcije su spojene prema R_f vrednostima. Dobijena **frakcija 28-30** (13mg) je rehromatografisana preparativnom tankoslojnom hromatografijom u sistemu razvijača EtOAc-MeOH-H₂O, 21:4:3 (debljina ploče 0.7mm). Jasno su se izdvojile dve trake vidljive pod UV lampom (254 nm) koje su potom sastrugane sa ploče, desorbovane metanolom i proceđene kroz sinter levak. Metanol je uparen, a supstance su prečišćene na koloni sefadeksa LH-20. Iz gornje trake dobijen je **norsvercianin-1-O-glukozid (8)** (2,8 mg). H¹ i ¹³C NMR i UV spektri su prikazani u poglavlju 2.2.2.5.

Ostatak butanolnog ekstrakta korena *G. dinarica* (4,5g) je rastvoren u vodi i prečišćavan na koloni poliamida. Eluiranje je započeto vodom a potom je postepeno povećavan udeo metanola kao što je prikazano u Tabeli 7.

Tab.7

eluens	procentni sadržaj	broj frakcije
H ₂ O	100	1 – 22
H ₂ O : MeOH	90 : 10	23 – 51
H ₂ O : MeOH	80 : 20	52 – 67
H ₂ O : MeOH	70 : 30	68 – 82
H ₂ O : MeOH	60 : 40	83 – 99
H ₂ O : MeOH	50 : 50	100 – 114
H ₂ O : MeOH	40 : 60	115 – 122
H ₂ O : MeOH	30 : 70	123 – 131
H ₂ O : MeOH	20 : 80	132 – 139
H ₂ O : MeOH	10 : 90	140 – 143
MeOH	100	144

Frakcije su analizirane tankoslojnom hromatografijom u sistemu rastvarača EtOAc:MeOH:H₂O, 21:4:3 i spajane na osnovu R_f vrednosti.

Frakcija 37-42 (50mg, Tabela 7) je rehromatografisana na poliamidnoj koloni koja je formirana u vodi. Tok eluiranja je prikazan u Tabeli 8.

Tab.8

eluens	procentni sadržaj	broj frakcije
H ₂ O	100	
H ₂ O : MeOH	80 : 20	1 - 9
H ₂ O : MeOH	70 : 30	10 - 22
H ₂ O : MeOH	60 : 40	23 - 34
H ₂ O : MeOH	50 : 50	35 - 43
H ₂ O : MeOH	30 : 70	44 - 46
H ₂ O : MeOH	10 : 90	47 - 48

Posle uklanjanja rastvarača i provere tankoslojnom hromatografijom, frakcije su spajane. Iz **frakcije 7-9** dobijen je trisupstituisani ksanton **genciozid (9)** (4,9mg). H¹, ¹³C NMR i UV spektri su prikazani u poglavlju **2.2.2.6**.

3.3. Ispitivanje hemijskog sastava vrste *Gentiana kochiana*

Biljni materijal je sakupljen u fazi cvetanja jula 2002. godine na planini Komovi (2000m nadmorske visine). Posle sušenja na vazduhu nadzemni delovi (330g) su odvojeni od korena, samleveni i ekstrahovani metanolom 48 sati na sobnoj temperaturi. Ekstrakt je uparen do suva na vakuum uparivaču i dobijeno je 79g sirovog metanolnog ekstrakta. Ovaj ekstrakt je rastvoren u vodi i dalje reekstrahovan sukcesivno etrom, etil-acetatom i n-butanolom. Tako dobijeni ekstrakti su upareni, analizirani HPLC metodom i dalje prečišćavani hromatografskim tehnikama.

3.3.1. Etarski ekstrakt

Od ukupno 17g etarskog ekstrakta, odvojeno je 12g, rastvoreno u etil-acetatu, izmešano sa silika-gelom i ostavljeno preko noći da sav rastvarač otpari. Smesa je frakcionisana "dry-column flash" hromatografijom na SiO₂ koristeći toluen, etil-acetat i metanol kao eluense. U Tabeli 9 je prikazan način eluiranja.

Tab. 9

eluens	procentni sadržaj	broj frakcije
EtOAc - Toluen	10 : 90	0 – 1
EtOAc - Toluen	15 : 85	2 – 3
EtOAc - Toluen	20 : 80	4 – 11
EtOAc - Toluen	25 : 75	12 – 15
EtOAc - Toluen	30 : 70	16 – 19
EtOAc - Toluen	40 : 60	20 – 21
EtOAc - Toluen	50 : 50	22 – 23
EtOAc - Toluen	60 : 40	24 – 25
EtOAc - Toluen	80 : 20	26 – 27
EtOAc - Toluen	100	28 – 29
EtOAc - MeOH	90 : 10	30

Frakcije su analizirane tankoslojnom hromatografijom u smeši razvijaa Toluen : EtOAc, 75:25 i na osnovu Rf vrednosti su spojene sledeće frakcije: 5-6, 7-10, 11-12, 13, 14-19, 20-23

Iz **frakcije 5-6** pastiranjem i prekrizacijom je dobijen **genciakohianin (10)** (128mg). U poglavlju **2.3.1.1.** su prikazani H¹ i ¹³C NMR i UV spektri.

Iz **frakcije 11-12** posle delimičnog uparavanja metanola pojavio se žuti talog. Pastiranjem iz smeše CH₂Cl₂ – MeOH dobijeni su žuti kristali – **genciakaulein (11)** (96mg). U poglavlju **2.3.1.2.** su prikazani H¹ i ¹³C NMR i UV spektri.

3.3.2. Butanolni ekstrakt

Butanolni ekstrakt (5g) je rastvoren u 5ml vode i nanešen na stub poliamida SC₆ koji je formiran u vodi. Eluiranje započeto čistom vodom, a potom je povećavan udeo metanola kao što je prikazano u Tabeli 10.

Tab. 10

eluens	procentni sadržaj	broj frakcije
H ₂ O	100	0 – 13
H ₂ O : MeOH	90 : 10	14 – 27
H ₂ O : MeOH	80 : 20	28 – 34
H ₂ O : MeOH	70 : 30	35 – 36
H ₂ O : MeOH	60 : 40	36 – 37
H ₂ O : MeOH	40 : 60	38 – 39

Frakcije su analizirane tankoslojnom hromatografijom na SiO₂ u sistemu EtOAc:MeOH:H₂O, 21:4:3 i na osnovu R_f vrednosti spajane.

Frakcija 5 (206mg) je rechromatografisana na koloni poliamida SC₆ koristeći vodu i metanol kao eluense. Tok eluiranja je prikazan u Tabeli 11.

Tab. 11

eluens	procentni sadržaj	broj frakcije
H ₂ O	100	0 – 5
H ₂ O : MeOH	90 : 10	6 – 8
H ₂ O : MeOH	80 : 20	9 – 20
H ₂ O : MeOH	70 : 30	21 – 26
H ₂ O : MeOH	60 : 40	27 – 28
H ₂ O : MeOH	50 : 50	28 – 29
H ₂ O : MeOH	30 : 70	30
H ₂ O : MeOH	10 : 90	31

Posle uklanjanja rastvarača i provere tankoslojnom hromatografijom, frakcije su spajane. Iz **frakcije 1** dobijen je **genciakaulein-1-O-primverozid (12)** (17mg), čiji su H¹, ¹³C NMR i UV spektri prikazani u poglavlju 2.3.1.3.

Iz **frakcije 12** dobijen je **genciakaulein-1-O-glukozid (13)** (5mg). Njegovi spektralni podaci su prikazani u poglavlju 2.3.1.4.

3.4. Ispitivanje hemijskog sastava vrste *Gentiana utriculosa*

Ova biljna vrsta je sakupljena u fazi cvetanja na planini Tari u julu 2002.godine, kao i na Valjevskim planinama, iste godine. Nadzemni deo (122g) je samleven i ekstrahovan metanolom. Dobijeno je 30g sirovog metanolnog ekstrakta koji je potom rastvoren u vodi i uzastopno reekstrahovan etrom, etil-acetatom i *n*-butanolom. Dobijeni ekstrakti su upareni i dalje frakcionisani hromatografskim metodama. Preliminarnom HPLC analizom ovih ekstrakata utvrđeno je da se u butanolnom ekstraktu uglavnom nalaze ksantoni i flavonoidi.

3.4.1. Butanolni ekstrakt

Butanolni ekstrakt (7,6g) je rastvoren u vodi i frakcionisan na koloni poliamida SC₆. Eluiranje je započeto vodom a potom je postepeno povećavan udeo metanola na način prikazan u Tabeli 12.

Tab.12

eluens	procentni sadržaj	broj frakcije
H ₂ O	100	0 – 17
H ₂ O : MeOH	90 : 10	18 – 34
H ₂ O : MeOH	80 : 20	35 – 52
H ₂ O : MeOH	70 : 30	53 – 65
H ₂ O : MeOH	60 : 40	66 – 77
H ₂ O : MeOH	50 : 50	78 – 85
H ₂ O : MeOH	40 : 60	86 – 109
H ₂ O : MeOH	20 : 80	110 – 102
MeOH	100	103

Frakcija 5 (116mg) je rastvorena u smeši metanol-voda i rehromatografisana na koloni poliamida SC₆. Kao eluens je korišćena voda i metanol. Tok eluiranja je prikazan u Tabeli 13.

Tab.13

eluens	procentni sadržaj	broj frakcije
H ₂ O	100	1 – 12
H ₂ O : MeOH	90 : 10	13 – 21
H ₂ O : MeOH	80 : 20	22 – 28
H ₂ O : MeOH	60 : 40	29

Spojene su frakcije 0-1 i 9-12 (36mg, Tabela 13) i rehromatografisane na poliamidnoj koloni formiranoj u vodi. Eluiranje je započeto vodom (50ml), zatim 20% MeOH (50ml), 40% MeOH (50ml) i 60% MeOH (50ml). Dobijene frakcije su uparene, analizirane tankoslojnom hromatografijom i spojene po R_f vrednostima. **Frakcija 4-7** je prečišćena na tankoj preparativnoj ploči, posle čega je dobijeni ksanton identifikovan kao **dekuzatin-1-O-primverozid (14)** (2,5mg). U poglavlju 2.4.1.1. su prikazani H¹ i ¹³C NMR i UV spektri.

Frakcija 47-49 (616mg, Tabela 12) je rehromatografisana na koloni poliamida koja je formirana u vodi. Eluiranje je početo 10% metanolom, a dalji tok hromatografije je prikazan u Tabeli 14.

Tab. 14

eluens	procentni sadržaj	broj frakcije
H ₂ O : MeOH	90 : 10	1 – 6
H ₂ O : MeOH	80 : 20	7 – 37
H ₂ O : MeOH	70 : 30	38 – 63
H ₂ O : MeOH	60 : 40	64 – 82
H ₂ O : MeOH	50 : 50	83 – 96
H ₂ O : MeOH	30 : 70	97 – 107
H ₂ O : MeOH	10 : 90	107 – 111

Rehromatografisane su frakcije: **12-43** , **44-56** i **61-82**

Koristeći vodu i metanol za eluiranje, **frakcija 12-43** (122mg, Tabela 14) je dalje prečišćavana na koloni poliamida. Tok eluiranja je prikazan u Tabeli 15.

Tab. 15

eluens	procentni sadržaj	broj frakcije
H ₂ O	100	1 – 7
H ₂ O : MeOH	90 : 10	8 – 19
H ₂ O : MeOH	80 : 20	20 – 37
H ₂ O : MeOH	70 : 30	38 – 56
H ₂ O : MeOH	60 : 40	57 – 75
H ₂ O : MeOH	40 : 60	76 – 80
H ₂ O : MeOH	10 : 90	81 – 84

Frakcija 22-33 (Tabela 15) je pračišćena na koloni sefadena LH-20 i dobijen je ksantonski C-glukozid **lancerin (15)** (10mg). U poglavlju **2.4.1.2.** su prikazani H¹, ¹³C NMR i UV spektri.

Frakcija 44-56 (190mg, Tabela 14) je rehromatografisana na poliamidnoj koloni formiranoj u vodi. Tok eluiranja je prikazan u Tabeli 16.

Tab. 16

eluens	procentni sadržaj	broj frakcije
H ₂ O	100	1 – 20
H ₂ O : MeOH	90 : 10	21 – 32
H ₂ O : MeOH	80 : 20	33 – 51
H ₂ O : MeOH	70 : 30	52 – 76
H ₂ O : MeOH	60 : 40	77 – 85
H ₂ O : MeOH	40 : 60	86 – 98
H ₂ O : MeOH	10 : 90	99 – 124

Dobijene frakcije su analizirane tankoslojnom hromatografijom i spojene su na osnovu R_f vrednosti. **Frakcija 24-42** (138mg, Tabela 16) je rehromatografisana na koloni poliamida a tok je prikazan u tabeli Tab.17.

Tab. 17

eluens	procentni sadržaj	broj frakcije
H ₂ O	100	0 – 14
H ₂ O : MeOH	90 : 10	15 – 21
H ₂ O : MeOH	80 : 20	22 – 35
H ₂ O : MeOH	70 : 30	36 – 57
H ₂ O : MeOH	60 : 40	58 – 64
H ₂ O : MeOH	50 : 50	65 – 71
H ₂ O : MeOH	30 : 70	72 – 75
H ₂ O : MeOH	10 : 90	76 – 78

Posle uparavanja rastvarača i analize dobijenih frakcija tankoslojnom hromatografijom, iz **frakcije 31-37** izolovan je flavon **izovitekisin (16)** (9mg). U poglavlju **2.4.1.3.** su prikazani H¹, ¹³C NMR i UV spektri.

Frakcija 61-82 (128mg, Tabela 14) je rastvorena u smeši metanol-voda i rehromatografisana na koloni poliamida. U Tabeli 18 je prikazan tok eluiranja smešom voda:metanol.

Tab. 18

eluens	procentni sadržaj	broj frakcije
H ₂ O : MeOH	90 : 10	0 – 3
H ₂ O : MeOH	80 : 20	4 – 14
H ₂ O : MeOH	70 : 30	15 – 44
H ₂ O : MeOH	50 : 50	45 – 50
H ₂ O : MeOH	30 : 70	51 – 53

Iz **frakcije 18** preparativnom tankoslojnom hromatografijom u sistemu razvijaa EtOAc:MeOH:H₂O, 21:4:3, izolovan je ksanton **1,8-dihidroksi-3metoksi-7-O-primverozid (17)** (2,1mg). U poglavlju **2.4.1.4.** su prikazani H¹, ¹³C NMR i UV spektri.

Frakcija 44 (300mg, Tabela 12) je rastvorena u smeši MeOH : H₂O. Rastvarač je uparen a uzorak je frakcionisan na koloni poliamida. Eluiranje je započeto 10% MeOH u vodi, a dalji tok hromatografije je prikazan u Tabeli19.

Tab. 19

eluens	procentni sadržaj	broj frakcije
H ₂ O : MeOH	90 : 10	0 – 3
H ₂ O : MeOH	80 : 20	4 – 29
H ₂ O : MeOH	70 : 30	30 – 40
H ₂ O : MeOH	60 : 40	41 – 42
H ₂ O : MeOH	40 : 60	43 – 44
H ₂ O : MeOH	20 : 80	45 – 46

Na osnovu Rf vrednosti spojene su frakcije: 3-4, 5-8, 9-13, 14-29, 30-35, 36-39, 40-42.

Frakcija 14-29 (32mg, Tabela 19) je preparativnom tankoslojnom hromatografijom razdvojena na tri trake u sistemu rastvarača EtOAc:MeOH:H₂O, 21:4:3. Trake su sastrugane sa ploče, desorbovane metanolom, proceđene kroz sinter levak, metanol uparen a supstance prečišćene na koloni sefadeks LH-20. Iz gornje trake je dobijen ksanton **genciakohianin-1-O-primverozid (18)** (6mg). U poglavlju **2.4.1.5.** su prikazani H¹, ¹³C NMR i UV spektri.

Iz donje frakcije je dobijen flavon **izoorientin-3'-O-glukozid (19)** (7mg). U poglavlju **2.4.1.6.** su prikazani H¹, ¹³C NMR i UV spektri.

3.5. Biološki efekti izolovanih jedinjenja

3.5.1. Ispitivanje antiradikalske aktivnosti

Relativna antiradikalska aktivnost biljnih ekstrakata i izolovanih jedinjenja je ispitivana pomoću stabilnog slobodnog radikala DPPH. Od rastvora su korišćeni 500 μ M DPPH u metanolu i 100mM Tris-HCl pufer (Tris-[hidroksimetil]aminometan), pH 7,4. Uzorci metanolnih, etarskih, etilacetatnih i butanolnih ekstrakata vrsta *G. dinarica*, *G. kochiana* i *G. utriculosa* su ispitivani u koncentracijama od 1mg/ml (finalna koncentracija 0,1mg/ml), dok su izolovana jedinjenja pripremana u koncentracijama od 200, 400, 600 i 800 μ M (finalna koncentracija- 20, 40, 60 i 80 μ M). Reakciona smeša od 100 μ l testiranog jedinjenja, 400 μ l pufera i 500 μ l metanolnog rastvora DPPH (finalna koncentracija 250 μ M), ostavljena je da stoji u mraku na sobnoj temperaturi 20 minuta. Nakon toga je spektrofotometrijski merena apsorbancija DPPH na 517 nm. Kao kontrola korišćen je metanol, a kao pozitivna kontrola Troloks (analog α -tokoferola rastvoran u vodi) i askorbinska kiselina. Svako merenje je urađeno u tri ponavljanja. Antiradikalska aktivnost je prikazana kao % inhibicije DPPH radikala prema formuli:

$$\% \text{inhibicije} = [(A_{\text{blank}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{blank}}] \times 100, \text{ gde je:}$$

A_{blank} - apsorbancija DPPH bez testiranog jedinjenja

A_{test} - apsorbancija DPPH sa testiranim uzorkom

3.5.2. Ispitivanje antiradikalske aktivnosti na modelu pasuljevog žiška

3.5.2.1. Žrtvovanje životinja i priprema uzoraka

Celi žišci (20 jedinki) stari 10 dana su homogenizovani Janke-Kunkel Ka-Werk Ultra-Turrax homogenizerom na 0-4 $^{\circ}$ C u 1.2 mL 0.25 M saharoznom, 0.05 M Tris, i 0.1 mM EDTA rastvoru, pH 7,4. Homogenati su sonifikovani po metodi Takade i sar. i centrifugirani 90 minuta, 105000g, na 4 $^{\circ}$ C¹⁴⁹. U supernatantu je određivana količina proteina i aktivnost SOD, CAT i GST.

3.5.2.2. Određivanje aktivnost endogenih antioksidativnih enzima

Ukupna aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) je određivana modifikovanom adrenalinskom metodom¹⁵⁰. Metoda se zasniva na sprečavanju autooksidacije adrenalina u adrenohrom u prisustvu SOD, u baznoj sredini. Brzina reakcije prati se na 480 nm i stepen inhibicije je (u linearnom delu reakcije) proporcionalan prisutnoj količini enzima. Jedinica SOD je definisana kao ona količina proteina koja prouzrokuje 50% inhibicije brzine autooksidacije adrenalina u linearnom delu absorbance, a izražava se kao jed./mg proteina. Za određivanje aktivnosti MnSOD, uzorci su 30 minuta pre eseja inkubirani sa 8 mM KCN.

Metoda za određivanje katalaze (CAT) se bazira na principu praćenja opadanja apsorpcije standardne koncentracije vodonik-peroksida na 230 nm, koji se razgrađuje katalazom koja je prisutna u ispitivanom uzorku¹⁵¹. Jedinica aktivnosti je definisana kao $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ redukovanih u minuti, a vrednosti izražavaju po mg ćelijskih proteina.

Aktivnost GST je određivana po metodi Habig-a i sar.¹⁵². Metoda se zasniva na sposobnosti enzima da katalizuje reakciju 1-hloro-2-4-dinitrobenzena (CDNB) sa SH grupom glutationa. U reakciji nastaje kompleks CDNB-S-glutation, preko koga se promenom absorbance na 340 nm određuje aktivnost enzima i izražava u nM GSH/min/mg proteina.

3.5.2.3. Statistička obrada rezultata

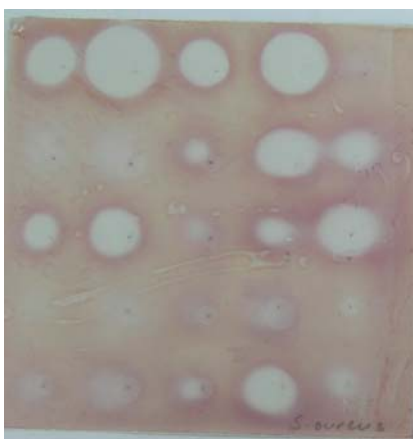
Svi statistički testovi su urađeni uz pomoć profesionalnog statističkog paketa SAS verzija 9.1.3.¹⁵³

3.5.3. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

3.5.3.1. Bioautografska TLC metoda za detekciju antimikrobne aktivnosti

Za preliminarno ispitivanje antimikrobne aktivnosti korišćena je bioautografska TLC metoda¹⁵⁴. Definisane količine ispitivanih jedinjenja (2,5 μg , 5 μg i 10 μg) i ekstrakata (25 μg , 50 μg i 100 μg) su pipetom nanošene na TLC ploče (Kieselgel 60 F254, Merck). Posle sušenja ploče su isprskane suspenzijom bakterija i inkubirane u termostatu na 37°C tokom 18h. Nakon toga, ploče se ponovo prskaju rastvorom p-jodonitrotetrazolijum violet (I 8377-Sigma)-3mg/1ml H₂O i stavljaju u termostat još 3h. Da bi se zaustavio rast bakterija, ploče se na kraju

prskaju 70% EtOH. Rezultati se posmatraju pod UV lampom na 365nm pri čemu se uočavaju bele zone različitih veličina na ružičastoj podlozi (Slika 119)



Slika 119: Bioautografska TLC metoda

3.5.3.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti mikrodilucionom metodom

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti in vitro korišćena je mikrodiluciona metoda na mikrotitar pločama, 96-sistem¹⁵⁵. Testirani mikroorganizmi su prikazani u tabeli Tab.20.

Tab.20: Spisak testiranih mikroorganizama

Mikroorganizmi	poreklo
<i>Bacillus cereus</i>	izolat iz hrane
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311 (275)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Candida albicans</i>	izolat sa pacijenta

3.5.3.3. Mikrodiluciona metoda

Inokulum je pripremljen zasejavanjem bakterija i *C.albicans* na tečnu TSB podlogu (Tryptic Soy Broth, Biolife, Italija). Tako pripremljen inokulum čuvan je na sobnoj temperaturi 24h. Suspenzija spora sadrži ~ 10⁹ ćelija/ml. Zbog provere validnosti inokuluma kao i odsustva kontaminacije, vršena je inokulacija na čvrstu podlogu.

Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) s određivane serijskim razređivanjem ispitivanih komponenti rastvorenih u DMSO. Tako pripremljena jedinjenja i ekstrakti su dodavani u tečni medijum (TSB) sa inokulumom. Mikroploče su inkubirane na 37°C u trajanju od 24h. Da bi se uočio rast bakterija u svaki bunarčić se dodaje po 40 μ l *p*-jodonitrotetrazolijum violet (INT) (0,2mg/ml H₂O), i ponovo se mikrotitar ploče ostave u termostat još 1h. Na mestima gde je testirano jedinjenje inhibiralo rast mikroorganizama vidi se žućkasta (bela) boja bunarčića, a tamo gde nije došlo do dejstva testiranih komponenti na mikroorganizme, INT boji bunarčiće ljubičastom bojom. Najmanja koncentracija na kojoj nije bilo rasta mikromiceta predstavlja MIC.

3.5.3.4. Hranljive podloge

Podloga za gajenje bakterija

Bakterije su gajene na podlozi Lutria Broth (LB). U 1000ml hladne destilovane vode se dodaju goveđi ekstrakt (3g), pepton (5g) i agar (15g) i zagreva do ključanja. Sipa se u sterilne erlenmajere ili epruvete i sterilise na temperaturi od 121°C, 25 minuta. pH= 6,8 \pm 0,2 se podešava pomoću 1N NaOH.

Podloga za gajenje C.albicans

Gljive su gajene na podlozi Sabouraud-Dekstroza-agar (SDA). U 1000ml hladne destilovane vode se dodaju glukoza (40g), pepton (10g) i agar (18g). Kuva se do potpunog rastvaranja i sterilise na temperaturi od 121°C, 25 minuta. pH= 5,6 se podešava pomoću 1N NaOH.

Tečna podloga

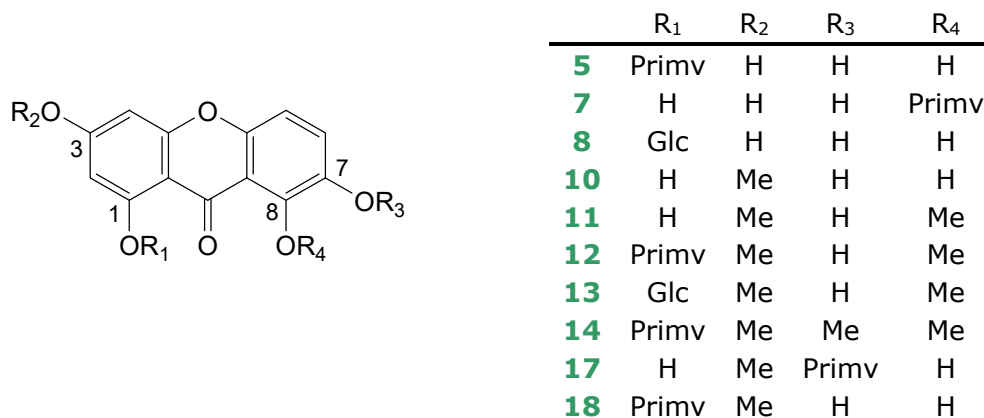
Bakterije i gljive su zasejavane na podlogu Tryptic Soy Broth (TSB). Gotova TSB podloga (30g) se sipa u hladnu destilovanu vodu (1000 ml) i kuva do potpunog rastvaranja. Sterilise se na temperaturi od 121°C, 25 minuta.

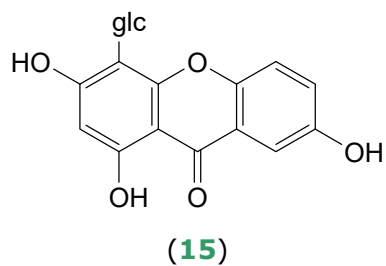
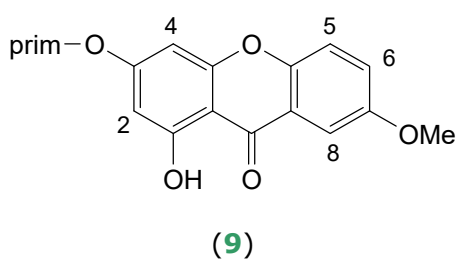
IZVOD

Rod *Gentiana* (Gentianaceae) obuhvata preko 400 biljnih vrsta koje su rasprostranjene u planinskim oblastima Evrope, Južne Amerike i Centralne Azije. U Srbiji raste 11 vrsta ovog roda koje su fitohemijski nedovoljno istražene. U ovom radu su ispitivane sledeće vrste: *G.dinarica* (Beck), *G.kochiana* (Perr.et Song.), *G. utriculosa* L., *G. lutea* L., *G.asclepiadea* L., *G. pneumonanthe* L., *G.verna* L. i *G.tergestina* (Beck). Posebna pažnja je posvećena ispitivanju reliktno-endemične vrste *G. dinarica* čija su staništa po prvi put pronađena u Srbiji. Po literaturnim podacima ova vrsta nije fitohemijski proučavana i sa tog aspekta je nepoznata.

Osnovni predmet ovog istraživanja su sekoiridoidi, flavonoidi i ksantoni kao dominantni sekundarni metaboliti koje produkuju vrste roda *Gentiana*. Kombinacijom metoda ekstrakcije i hromatografije, iz biljnog materijala koji je sakupljen na prirodnim staništima, izolovano je 18 poznatih i jedno, do sada, nepoznato jedinjenje. Strukture ovih jedinjenja su određivane savremenim spektroskopskim tehnikama kao što su: UV, 1D NMR, 2D NMR i MS. Identifikovano je 12 ksantona, među kojima je i norsvercianin-8-*O*-primverozid (**7**) kao novo jedinjenje. Takođe, izolovana su i 4 flavonska heterozida, kao i 3 jedinjenja sa sekoiridoidnom strukturom.

- U ispitivanim vrstama preovlađuju ksantonski heterozidi sa 1,3,7,8-tipom supstitucije što je karakteristično za rod *Gentiana* posebno za sekcije *Calathianae* i *Megalanthe*. Od ksantonskih aglikona izolovani su genciakohianin (**10**) i genciakaulein (**11**) iz vrste *G. kochiana*, dok je tri-supstituisani ksantonski primverozid genciozid (**9**) izolovan iz *G. dinarica*.





- Na osnovu distribucija izolovanih ksantonskih heterozida i aglikona, ispitivane vrste su hemotaksonomski svrstane u sledeće sekcije:

Gentiana – *G. lutea*

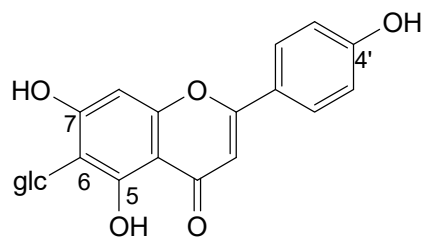
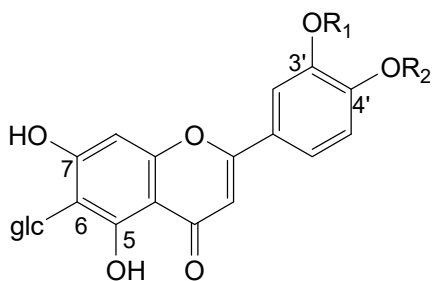
Pneumonanthe – *G. asclepiadea*, *G. pneumonanthe*

Megalanthe – *G. dinarica*, *G. kochiana*

Calanthianae – *G. utriculosa*, *G. verna*, *G. tergestina*,

što je u skladu sa ranijim hemotaksonomskim istraživanjima.

- Pored flavonskih C-glukozida izoorijentina (**6**) i izoviteksina (**16**) koji su tipični za rod *Gentiana*, prisutni su i izoorijentin-3'-O-glukozid (**19**) koji je pronađen u vrstama *G. utriculosa* i *G. tergestina*, i izoorijentin-4'-O-glukozid (**3**) koji je karakterističan samo za vrstu *G. dinarica*.



(16)

	R ₁	R ₂
3	H	glc
6	H	H
19	glc	H

- Od sekoiridoidnih jedinjenja ispitivane vrste sadrže sekoiridoide sverozidnog tipa- genciopikrin (**1**) i sverciamarin (**2**) i bifenilni sekoiridoid amarogencin (**4**).
- Posebno treba napomenuti da u vrsti *G. utriculosa* do sada nisu ispitivani ksantonski *O*-heterozidi. Lancerin, ksantonski *C*-glukozid (**15**) i 1,8-dihidroksi-3-metoksi-7-*O*-primeverozid (**17**) su po prvi put izolovani iz ove vrste.
- Obzirom da je biljna vrsta *G. dinarica* potpuno neistražena, posebna pažnja u ovom radu je posvećena fitohemijskom ispitivanju njenog nadzemnog dela i korena. Nadzemni deo biljke se odlikuje prisustvom sekoiridoide i flavonskih-*C*-glukozida, dok se u korenu nalaze ksantonski *O*-heterozidi. Važno je istaći da ksanton norsvercianin-8-*O*-primverozid (**7**) do sada nije pronađen ni u jednoj drugoj biljnoj vrsti i da je u ovom radu prvi put predstavljeno jedinjenje sa ovakvom strukturom.

Pored analize sekundarnih metabolita, istraživanja u ovom radu su usmerena i na ispitivanje potencijalnih bioloških efekata biljnih ekstrakata i izolovanih jedinjenja kao što su antiradikalska i antimikrobna aktivnost.

Antiradikalska aktivnost je ispitivana *in vitro* DPPH metodom, i *in vivo* na modelu insekta- pasuljevog žiška.

- Pokazano je da antiradikalska aktivnost ksantona raste sa povećanjem broja OH grupa u molekulu.
- Prisustvo kateholnih grupa dodatno pojačava antiradikalnu sposobnost, kao i prisustvo OH grupa u položajima 1 i 8.
- Ksantoni genciakohianin i norsvercianin-1-*O*-primverozid pokazuju najveću antiradikalnu aktivnost u odnosu na druga izolovana jedinjenja, pri koncentraciji od 80µM.
- Biljni ekstrakti i izolovana jedinjenja sa antioksidativnim dejstvom, imaju promenjive efekte. Dobar antioksidans *in vitro* ne mora da deluje protektivno *in vivo*. Naši rezultati dobijeni na modelu insekta - pasuljevog žiška, su pokazali da norsvercianin-1-*O*-primverozid kao egzogeni antioksidant ima antioksidativni potencijal i *in vivo* ali samo kod mužjaka.

Antimikrobna aktivnost biljnih ekstrakata i izolovanih jedinjenja je ispitivana bioautografskom i mikrodilucionom metodom.

- Jedino izoorijentin i izoorijentin-4'-*O*-glukozid pokazuju antifungalno dejstvo na gljivicu *C.albicans* sa minimalnom inhibitornom koncentracijom od 25 µg/ml.
- Najbolje antimikrobno dejstvo na bakterije *B.cereus*, *E.Coli*, *S.aureus* i *S.typhimurium* pokazuje butanolni ekstrakt korena vrste *G. dinarica*.

ABSTRACT

The genus *Gentiana* (Gentianaceae) comprises more than 400 species that are mostly distributed in the mountain regions of Europe, South America and Central Asia. There are 11 species of this genus growing in Serbia. Our study was focused on investigation of chemical constituents of *G.dinarica* (Beck), *G.kochiana* (Perr.et Song.), *G. utriculosa* L., *G. lutea* L., *G.asclepiadea* L., *G.pneumonanthe* L., *G.verna* L. and *G.tergestina* (Beck). Special attention has been paid to the research of *G. dinarica*, an endemic plant species. According to the literature data, it has not been phytochemically studied till now.

Some of the main subjects of this research are active pharmacological components of *Gentiana* species, such as secoiridoids, flavonoids and xanthonenes. One new and eighteen known compounds were isolated from plant material collected at natural localities using combination of extraction and chromatography methods. The isolated compounds were identified by means of spectroscopic techniques (UV, 1D NMR, 2D NMR and MS). They comprised 12 xanthonenes, where norswertianin-8-O-primeveroside appeared to be new compound, 4 C-glucoflavones and 3 secoiridoids.

- Xanthone glycosides with 1,3,7,8 -substitution pattern are prevalent components in investigated species. The oxygenation 1,3,7,8 -pattern of xanthone is characteristic for the genus *Gentiana*, particularly for the sections *Calathianae* and *Megalanthe*. Xanthone aglycones gentiakochianin (10) and gentiacaulein (11) were isolated from *G. kochiana* species, while xanthone primeveroside with 1,3,7 -substitution pattern was isolated from *G. dinarica*.
- According to distribution of isolated xanthone glycosides and aglycones, investigated species are divided into following sections:

Gentiana – *G. lutea*

Pneumonanthe – *G. asclepiadea*, *G. pneumonanthe*

Megalanthe – *G. dinarica*, *G. kochiana*

Calanthianae – *G. utriculosa*, *G. verna*, *G.tergestina*,

These results are in accordance with the previous hemotaxonomical research of *Gentiana* species.

- Beside *C*-glucoflavones isoorientin (6) and isovitexin (16) typical for Gentians, the presence of isoorientin-3'-*O*-glucoside was found in *G. utriculosa* and *G. tergestina*, and isoorientin-4'-*O*-glucoside (3) was found only in *G. dinarica*.
- As far as secoiridoid components are concerned, investigated species contain swerosid-type secoiridoids glucosides such as gentiopicrin and swertiamarin, and biphenyl secoiridoid amarogentin.
- Isolation of xanthone *O*-glycosides from the aerial parts of *G. utriculosa* has not been reported previously. Xanthone-*C*-glucoside lancerin (15) and 1,8-(OH)₂-3-(OMe)-7-*O*-primveroside (17) are have been detected in this species for the first time.
- Our study was focused on research of chemical constituents of *G. dinarica*, an endemic plant species. Aerial parts were characterised by presence of secoiridoids and *C*-glucoflavones, while roots contain xanthone *O*-glycosides. It is important to point out that norswertianin-8-*O*-primeveroside has not been found in any plant species so far, and this is the first time that the compound of this structure has been detected.

In addition, we have examined potent antioxidant and antimicrobial activity of some plant extracts and isolated xanthone glycoside.

- It was shown that antiradical activity of xanthone compounds increased with the increasing number of OH groups.
- Presence of catechol groups and free OH groups at position 1 and 8 in the xanthone molecules strongly enhance antiradical ability.
- Gentiakochianin (10) and norswertianin-1-*O*-primveroside (5) showed the best antiradical activity in comparison to other tested xanthenes in 80 μM concentration.
- According to our results obtained on experimental model system such as bean weevil, norswertianin-1-*O*-primveroside has potent antioxidant activity only in adult males.

Antimicrobial activity of some plant extract and isolated xanthenes were determined by bioautographic TLC metho and microdilution method.

- Only isoorientin (6) and isoorientin-4'-O-glucoside (3) showed antifungal activity against *Candida albicans* with minimal inhibitory concentration 25 µg/ml
- Butanolic root extract of *G. dinarica* showed the best antimicrobial activity against bacteria *B. cereus*, *E. Coli*, *S. aureus* and *S. typhimurium*

LITERATURA

-
- ¹ R. Jovanović-Dunjić, u: *Flora SR Srbije*, M. Josifović, SANU, Beograd, **1997**, tom V, 413-425
 - ² L. Struwe, J. W. Kadereit, J. Klackenberg, S. Nilsson, M. Thiv, K. B. Von Hagen, V. A. Albert, u *Gentianaceae: Systematics and Natural History*, L. Struwe, V. Albert (Eds.), Cambridge University Press, **2002**, pp. 21-309
 - ³ V. A. Albert, L. Struwe, u *Gentianaceae: Systematics and Natural History*, L. Struwe, V. Albert (Eds.), Cambridge University Press, 2002, pp.1-20
 - ⁴ A. Takhtajan, Online of the classification of flowering plants (*Magnoliophyta*), *Bot. Rev.*, 46, **1980**, 225-359
 - ⁵ F. Kohlein, u: *Gentians*, J. Jermyn (Edt.), Timber Press, Portland, Oregon, **1991**, pp.5-8
 - ⁶ Y-M. Yuan, P. Kupfer, J. J. Doyle, *American Journal of Botany*, 83 (5), **1996**, 641
 - ⁷ L. Gielly, P. Taberlet, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 120, **1996**, 55
 - ⁸ T. G. Tutin, u: *Flora Europea*, Cambridge University Press, **1972**, pp.60-63
 - ⁹ V. Peres, T. J. Nagem, F. Faustino de Oliveira, *Phytochemistry*, 55, 2000, 683
 - ¹⁰ S. Mandal, P. C. Das, P. C. Joshi, *J. Ind. Chem. Soc.*, 69, **1992**, 611
 - ¹¹ K. Hostettmann, M. Hostettmann, u *Methods in Plant Biochemistry 1*, Academic Press Ltd. **1989**, pp 493-508
 - ¹² M. U. S. Sultanbawa, *Tetrahedron*, 36, **1980**, 1465
 - ¹³ Y. Asahina, J. Asano, Y. Uyeno, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 17, **1942**, 104
 - ¹⁴ K. Šavikin-Fodulović, T. Janković, D. Krstić, N. Menković, u: *Series recent progress in Medicinal Plants*, Vol. 8, *Phytochemistry and Pharmacology II*, D. K. Majumdar, J.N. Govil and V.K. Singh (Eds.), SCI TECH Pub., **2000**, pp 379-409.
 - ¹⁵ K. Hostettmann, A. Jacot-Guillarmod, *Helv. Chim. Acta*, 59, **1976**, 1584
 - ¹⁶ K. Hostettmann, H. Wagner, *Phytochemistry*, 16, **1977**, 821
 - ¹⁷ P. Rivaille, J. Massicot, M. Guyot, V. Plouvier, *Phytochemistry*, 8, **1969**, 1533

- ¹⁸ J. Carbonnier, M. Massias, D. Molho, *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat.*, 13, **1977**, 23-40
- ¹⁹ M. Guyot, J. Massicot, P. Rivaille, *C.R. Acad. Sci., Paris*, 267, **1968**, 423
- ²⁰ K. Hostettmann, M. Hostettmann-Kaldas, O. Sticher, *Helv. Chim. Acta*, 62, **1979**, 2079
- ²¹ G. G. Nikolaeva, V. I. Glizin, D. A. Fassenko, A. V. Patudin, *Him. Prir. Soed.* 2, **1980**, 252
- ²² G. G. Nikolaeva, V. I. Glizin, M. S. Mladencova., et.al., *Him. Prir. Soed.* 1, **1983**, 107
- ²³ H. Renyan, F. Shuji, N. Ruilin, *Yun Nan Zhi Wu Yan Jiu*, 4, **1981**, 68
- ²⁴ K. Hostettmann, I. Miura, *Helv. Chim. Acta*, 60, **1977**, 262
- ²⁵ K. Hostettmann, R. Tabacchi, A. Jacot-Guillarmod, *Helv. Chim. Acta*, 57, **1974**, 294
- ²⁶ D. Krstić, T. Janković, I. Aljančić, K. Šavikin-Fodulović, N. Menković, S. Milosavljević, *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, **2004**, 937
- ²⁷ K. Hostettmann, A. Jacot-Guillarmod, *Helv. Chim. Acta*, 57, **1974**, 1155
- ²⁸ W.G. De Oliveira, O.R. Gottlieb, A.A.L. Mesquita, *Phytochemistry*, 11, **1972**, 3323
- ²⁹ N. E. Byars, R. W. Ferrarese, *Agents Action*, 10, **1980**, 252
- ³⁰ N. M. Neshta, G.G. Nikolaeva, V.I. Sheichenko, D.A. Patudin, *Him. Prir. Soed.* 2, 1982, 258
- ³¹ J. Carbonnier, M. Massias, D. Molho, *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat.*, 13, **1977**, 41
- ³² P. M. Richardson, *Biochem. Syst. Ecol.*, 11, **1983**, 371
- ³³ M. Goets, P. Maniliho, A. Jacot-Guillarmod, *Helv. Chim. Acta*, 61, **1978**, 1549
- ³⁴ J.E. Atkinson, P. Gupta, J.R. Lewis, *Tetrahedron*, 24, **1969**, 1507
- ³⁵ P. Lebreton, M. P. Dangy-Caye, *Planta Med. Phytotherap.*, 7, **1973**, 87

-
- ³⁶ T. A. Geismann, u: *The chemistry of flavonoid compounds*, New York, Perg.Press, **1962**, 666
- ³⁷ S. Peters, W. Schmidt, L. Beerhues, *Planta*, 204, **1998**, 64
- ³⁸ W. Schmidt, L. Beerhues, *FEBS Letters*, 420, **1997**, 143
- ³⁹ A. M. A. Abd el Mawla, W. Schmidt, L. Beerhues, *Planta*, 212, **2001**, 288
- ⁴⁰ W. Schmidt, S. Peters, L. Beerhues, *Phytochemistry*, 53, **2000**, 427
- ⁴¹ C-Z. Wang, U. H. Maier, M. Keil, M. H. Zenk, A. Bacher, F. Rondich, W. Eisenreich, *Eur. J. Biochem.*, 270, **2003**, 2950
- ⁴² M. M. M. Pinto, M. E. Sousa, M. S. J. Nascimento, *Current Medicinal Chemistry*, 12, **2005**, 2517
- ⁴³ Y. Jiang, P-F. Tu, *Phytochemistry*, 60, **2002**, 813
- ⁴⁴ O. Suzuki, Y. Katsumata, M. Oya, V. M. Chari, R. Klapfenberger, H. Wagner, K. Hostettmann, *Planta Medica*, 39, **1980**, 19
- ⁴⁵ O. Suzuki, Y. Katsumata, M. Oya, V. M. Chari, B. Vermes, H. Wagner, K. Hostettmann, *Planta Medica*, 42, **1981**, 17
- ⁴⁶ M. B. Nunez, F. P. Maguna, N. B. Okulik, E. A. Castro, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14, **2004**, 5611
- ⁴⁷ W. Weyler, J. I. Salach, *J. Biol. Chem.*, 260, **1985**, 13199
- ⁴⁸ W. Weyler, Y. P. Hsu, X.O. Breakefield, *Pharmacol. Therapeut.*, 47, **1990**, 391
- ⁴⁹ C. J. Fowler, K. F. Tipton, *J. Pharm. Pharmacol.*, 36, **1984**, 111
- ⁵⁰ S. Ghosal, P. V. Sharma, R. K. Chaudhuri, S. K. Bhattacharya, *J. Pharm Sci.*, 64, **1975**, 80
- ⁵¹ D. Schaufelberger, K. Hostettmann, *Planta Medica*, 54, **1988**, 219
- ⁵² M. Tomić, G. Tovilović, B. Butorović, D. Krstić, T. Janković, I. Aljančić, N. Menković, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 81, **2005**, 535
-

- ⁵³ N. Ohishi, T. Suzuki, T. Ogasawara, K. Yagi, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 10, **2000**, 291
- ⁵⁴ C. Gnerre, U. Thull, P. Gaillard, P-A. Carrupt, B. Testa, E. Fernandes, F. Silva, M. Pinto, J-L. Wolfander, K. Hostettmann, G. Cruciani, *Helv. Chim. Acta*, 84, **2001**, 552
- ⁵⁵ F. Moureau, J. Wouters, D. P. Vercauteren, S. Colin, G. Edrward, F. Durant, F. Ducrey, J. Koenig, F.X. Jarreau, *Eur. J. Med. Chem*, 29, **1994**, 269
- ⁵⁶ A. Urbain, A. Marston, E. F. Queiroz, K. Ndjoko, K. Hostettmann, *Planta Medica*, 70, **2004**, 1011
- ⁵⁷ C. Bruhlmann, A. Marston, K. Hostettmann, P. A. Carrupt, B. Testa, *Chem. Biodeversity*, 1, **2004**, 819
- ⁵⁸ A. S. Pannala, T.S. Chan, P. J. O'Brien, C.A. Rice-Evans, *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 282, 2001, 1161
- ⁵⁹ B. W. Lee, J. H. Lee, S-T. Lee, H. S. Lee, W. S. Lee, T-S. Jeong, K.H. Park, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15, **2005**, 5584
- ⁶⁰ K.H. Park, Y-D. Park, J.M. Han, K-R. Im, B. W. Lee, I. Y. Jeong, T-S. Jeong, W. S. Lee, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16, **2006**, 5580
- ⁶¹ M. Pedro, F. Cerqueira, M. E. Sousa, M.S.J. Nascimento, M. Pinto, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10, **2002**, 3725
- ⁶² D.C.G. Pinto, N. Fuzzati, X. C. Pazmino, K. Hostettmann, *Phytochemistry*, 37, **1994**, 875
- ⁶³ V. Rukachaisirikul, M. Kamkaew, D. Sukavisit, S. Phongpaichit, P. Sawangchote, W.C. Taylor, *J. Nat. Prod.*, 66, **2003**, 1531
- ⁶⁴ A. Groweiss, J.H. Cardellina, M. R. Boyd, *J. Nat. Prod*, 63, **2000**, 1537
- ⁶⁵ J-N. Wang, C-Y. Hou, Y-L. Liu, *J. Nat. Prod*, 57, **1994**, 211
- ⁶⁶ R. Reyes-Chilpa, C. H. Baggio, D. Alavez-Solano, E. Estrada-Muniz, F. C. Kauffman, R. I. Sanchez, S. Mesia-Vela, *Journal of Ethno-Pharmacology*, 105, **2006**, 167

-
- ⁶⁷ M. V. Ignatushchenko, R. W. Winter, M. Riscoe, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62 (1), **2000**, 77
- ⁶⁸ L-W. Wang, J-J. Kang, I-J. Chen, C-M. Teng, C-N.Lin, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10, **2002**, 567
- ⁶⁹ D-J. Jiang, G-S. Tan, Z-H. Zhou, K-P. Xu, F. Ye, Y-j. Li, *Planta Medica*, 68, **2002**, 710
- ⁷⁰ S. Chericoni, L. Tesai, V. Calderone, G. Flamini, P. Nieri, I. Morelli, E. Martinotti, *Planta Medica*, 69, **2003**, 770
- ⁷¹ O. Schimmer, H. Mauthner, *Planta Medica*, **62**, 1996, 561
- ⁷² N. Pant, D. C. Jain, R.S. Bhakuni, *Indian Journal of Chemistry*, 39B, **2000**, 565
- ⁷³ S. Ghosal, K. Biswas, R.K. Chaudhuri, *J. Pharm. Sci.*, 67, **1978**, 721
- ⁷⁴ S.- R. Jensen, J. Schripsema, Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae, u: *Gentianaceae: Systematics and Natural History*, L. Struwe, V. Albert (Eds.), Cambridge University Press, **2002**, pp 573
- ⁷⁵ P. Junior, *Planta Medica*, 56, **1990**, 1
- ⁷⁶ B. Grujić-Injac, S. Lajšić, *Hemija prirodnih proizvoda*, Univerzitet u Nišu, Niš, **1983**, p.328
- ⁷⁷ W. G. van der Sluis, R. P. Labadie, *Planta Medica*, 41, **1981**, 150
- ⁷⁸ M.C. Recio, R. M. Giner, S. Mez, J. L. Rios, *Planta Medica*, 60, **1994**, 232
- ⁷⁹ R. Kekuda, T. Iijima, Y. Yaoita, K. Machida, M. Kikuchi, *J. Nat. Prod.*, 64, **2001**, 1574
- ⁸⁰ Y. Takino, M. Koshioka, M. Kawaguchi, T. Miyahara, H. Tanizawa, Y. Ishii, M. Higashino, T. Hayashi, *Planta Medica*, 38, **1980**, 344
- ⁸¹ R. X. Tan, J-L. Wolfender, L.X. Zhang, W. G. Ma, N.Fuzzati, A. Marston, K. Hostettmann, *Phytochemistry*, 42, **1996**, 1305
- ⁸² R. X. Tan, J-L. Wolfender, W. G. Ma, L.X. Zhang, K. Hostettmann, *Phytochemistry*, 41, **1996**, 111
-

- ⁸³ Y. Kumarasamy, L. Nahar, P.J. Cox, M. Jaspars, S.D. Sarker, *Phytomedicine*, 10, **2003**, 344
- ⁸⁴ W. G. Van der Sluis, J. M. Van der Nat, R. P. Labadie, *Journal of Chromatography*, 259, **1983**, 522
- ⁸⁵ A. Rojas, M. Bah, J. I. Rojas, D. M. Gutierrez, *Planta Medica*, 66, **2000**, 765
- ⁸⁶ E. G. W. M. Schijlen, C.H. Ric de Vos, A. J. Van Tunen, A. G. Bovy, *Phytochemistry*, 65, **2004**, 2931
- ⁸⁷ P-G. Pietta, *J. Nat. Prod.*, 63, **2000**, 1035
- ⁸⁸ T. Nakatsuka, M. Nishihara, K. Mishiba, S. Yamamura, *Plant Science*, 168, **2005**, 1309
- ⁸⁹ K. Hosokawa, E. Fukushi, J. Kawabata, C. Fujii, T. Ito, S. Yamamura, *Phytochemistry*, 45, **1997**, 167
- ⁹⁰ S. Martens, G. Forkmann, *The Plant Journal*, 20 (5), **1999**, 611
- ⁹¹ C-A. Calliste, P. Trouillas, D-P. Allais, A. Simon, J-L. Duroux, *J. Agric. Food Chem*, 49, **2001**, 3321
- ⁹² H.S. Chung, L.C. Chang, S.K. Lee, L.A. Shamon, R.B.van Breemen, R.G. Mehta, N.R. Farnsworth, J.M. Pezzuto, A.D.Kinghorn, *J. Agric. Food Chem.*, 47, **1999**, 36
- ⁹³ G. Di Carlo, N. Mascolo, A.A. Izzo, F. Capasso, *Life Sciences*, 65, **1999**, 337
- ⁹⁴ Q. Cai, R.O. Rahn, R. Zhang, *Cancer Letters*, 119, **1997**, 99
- ⁹⁵ S. Burda, W. Oleszek, *J. Agric. Food Chem.*, 49, **2001**, 2774
- ⁹⁶ C. Rice-Evans, N. Miller, P.G. Bolwell, P. M. Bramley, J. B. Pridham, *Free Radical Research*, 22, **1995**, 375
- ⁹⁷ C. Rice-Evans, N. Miller, G. Paganga, *Free Radical Biology & Medicine*, 20, **1996**, 933
- ⁹⁸ N. Cotelle, J-L. Bernier, J-P. Catteau, J. Pommery, J-C. Wallet, E.M. Gaydou, *Free Radical Biology & Medicine*, 20, **1996**, 35

-
- ⁹⁹ F. Ursini, M. Maiorino, P. Morazzoni, A. Roveri, G. Pifferi, *Free Radical Biology & Medicine*, 16, **1994**, 547
- ¹⁰⁰ L. B. Harborne, C. A. Williams, *Phytochemistry*, 55, **2000**, 481
- ¹⁰¹ A. C. Santos, S. A. Uyemura, J.L.C. Lopes, J.N. Bazon, F.E. Mingatto, C.Curti, *Free Radical Biology & Medicine*, 24, **1998**, 1455
- ¹⁰² K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, D. J. Bobilya, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, **2002**, 572
- ¹⁰³ M. Vessal, M. Hemmati, M. Vasei, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 135, **2003**, 357
- ¹⁰⁴ B. Pawlikowska-Pawlega, W. I. Gruszecki, L. Misiak, R. Paduch, T. Piersiak, B. Zarzyka, J. Pawelec, A. Gawron, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768, **2007**, 2195
- ¹⁰⁵ A. E. Rotelli, T. Guardia, A. O. Juarez, N. E. De la Rocha, L. E. Pelzer, *Pharmacological Research*, 48, **2003**, 601
- ¹⁰⁶ J. M. McCord, L. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, 244, 1969, 6049
- ¹⁰⁷ L. A. Cotgreave, P. Moldeus, S. Orrenius, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 28, 1988, 188
- ¹⁰⁸ J. Gromazdinska, M. Sklodowska, W. Wasowich, *Biomed. Biochem. Acta.*, 47, 1988, 19
- ¹⁰⁹ C. Walling u: *Proceedings of the Third International Symposium on Oxidases and Related Redox Systems*, T. E. King, H. S. Mason, M. Morrison Eds., Academic Press., 1981, p.85
- ¹¹⁰ B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge u: *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford, 1989b, p.71
- ¹¹¹ D. Harman, *J. Gerontol.*, 2, 1956, 298
- ¹¹² D. Harman u: *Free Radical and Aging*, I. Emerit, B. Chance Eds., Birkhauser Verlag Basel, Switzerland, 1992, p.1-10
- ¹¹³ D. Harman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, 5360
- ¹¹⁴ S. Meszaros, *Biochem. Syst. Ecol.*, 22, 1994, 85
-

- ¹¹⁵ M. Massias, J. Carbonnier, D. Molho, *Biochemical Systematics and Ecology*, 10, **1982**, 319
- ¹¹⁶ S.Međedović, S. Šiljak-Yakovlev, Lj. Mišić, *Godišnjak Biol. Inst. Sarajevo*, 37, **1984**, 79
- ¹¹⁷ E. M. Mpondo, A. J. Chulia, *Planta Medica*, 54, **1988**, 185
- ¹¹⁸ R. Kakuda, T. Iijima, Y. Yaoita, K. Machida, M. Kikuchi, *J. Nat. Prod.*, 64, **2001**, 1574
- ¹¹⁹ W. G. van der Sluis, J. M. van der Nat, A. L. Spek, Y. Ikeshiro, R. P. Labadie, *Planta Medica*, 49, **1983**, 211
- ¹²⁰ W. Changzeng, Y. Dequan, *Phytochemistry*, 45, **1997**, 1483
- ¹²¹ A. Cornelis, J. P. Chapelle, *Pharm. Acta Helv.*, 6, **1976**, 177
- ¹²² E. M. Mpondo, J. Garcia, G. Cartier, G. Pellet, *Planta Medica*, 56, **1990**, 334
- ¹²³ T. J. Mabry, K. R. Markham, M. B. Thomas, u *The Systematic Identifikacion of Flavonoids*, Springer-Verlag, New York, **1970**, pp 35-164
- ¹²⁴ K. Hostettmann, B. Domon, D. Schaufelberger, M. Hostettmann, *Journal of Chromatography*, 283, **1984**, 137
- ¹²⁵ K. Hostettmann, G. Bellmann, R. Tabacchi, A. Jacot-Guillarmod, *Helvetica Chimica Acta*, 56, **1973**, 3050
- ¹²⁶ G. Bellmann, A. Jacot-Guillarmod, *Helvetica Chimica Acta*, 56, **1973**, 284
- ¹²⁷ K. Hostettmann, G. Bellmann, *Helvetica Chimica Acta*, 59, **1976**, 1584
- ¹²⁸ M. . Hostettmann-Kaldas, K. Hostettmann, O. Sticher, *Phytochemistry*, 20, **1981**, 443
- ¹²⁹ C-Z. Wang, U. H. Maier, W. Eisenreich, P. Adam, I. Obersteiner, M. Keil, A. Bacher, M. H. Zenk, *Eur. J. Org. Chem.*, **2001**, 1459
- ¹³⁰ H. Inouye, Y. Nakamura, *Tetrahedron*, 27, **1971**, 1951

-
- ¹³¹ K. Hostettmann, R. Tabacchi, A. Jacot-Guillarmod, *Helvetica Chimica Acta*, 57, **1974**, 294
- ¹³² B. Q. Ya, L. C. Nian, X. P. Gen, *Pharm. Pharmacol. Commun.*, 4, **1998**, 597
- ¹³³ J-L. Wolfender, M. Hamburger, J. D. Msonthi, K. Hostettmann, *Phytochemistry*, 30, **1991**, 3625
- ¹³⁴ G. M. Kitanov, D.T.Van, I. Asenov, *Him. Prir. Soed.*, 3, **1991**, 425
- ¹³⁵ T. Hayashi, T. Yamagishi, *Phytochemistry*, 27, **1988**, 3696
- ¹³⁶ D. Adinarayana, K. Varaprasad, P. Ramachandraiah, *Indian J.Nat. Prod.*, 5, **1989**, 3
- ¹³⁷ C-N. Lin, C-H. Chang, M. Arisawa, M. Shimizu, N. Morita, *Phytochemistry*, 21, **1982**, 205
- ¹³⁸ M. S.C. Pedras et al. , *Phytochemistry*, 64, **2003**, 949
- ¹³⁹ R. J. Grayer, R. P. J. de Kok, *Biochemical Systematics and Ecology*, 26, **1998**, 729
- ¹⁴⁰ M. Yoshizaki, H. Fujino, M. Masuyama, M. Arisawa, N. Morita, *Phytochemistry*, 26, **1987**, 2557
- ¹⁴¹ K. R. Markham, B. Ternai, R. Stanley, H. Geiger, T. J. Mabry, *Tetrahedron*, 34, **1978**, 1389
- ¹⁴² A. J. Chulia, K. Hostettmann, M.-L. Bouillant, A.-M. Mariotte, *Planta Medica*, 34, **1978**, 442
- ¹⁴³ K. Hostettmann, A. Jacot-Guillarmod, *Helvetica Chimica Acta*, 57, **1974**, 204
- ¹⁴⁴ E. J. Cho, T. Yokozawa, D. Y. Rhyu, S. C. Kim, N. Shibahara, J. C. Park, *Phytomedicine*, 10, **2003**, 544
- ¹⁴⁵ C. W. Choi, S. C. Kim, S. S. Hwang, B. K. Choi, H. J. Ahn, M.Y. Lee, S. H. Park, S. K. Kim, *Plant Science*, 163, **2002**, 1161
- ¹⁴⁶ T. Masuda, Y. Inaba, T. Maekawa, Y. Takeda, H. Yamaguchi, K. Nakamoto, H. Kuninaga, S. Nishizato, A. Nonaka, *J. Agric. Food Chem.*, 51, **2003**, 1831
-

-
- ¹⁴⁷ P. Molyneux, *Songklanakarín J. Sci. Technol.*, 26, **2004**, 211
- ¹⁴⁸ D. Blagojević, D. Šešlija, R. Radojičić, R. Jankov, M. B. Spasić, u: *XI Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International*, C. Pasquier Ed., Paris, France, **2002**, p.529
- ¹⁴⁹ Y. Takada, T. Noguchi, M. Kayiyama, *Cancer Res.*, 42, **1982**, 4233
- ¹⁵⁰ H. P. Misra, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, 247, **1972**, 3170
- ¹⁵¹ E. Beutler, Catalase, u: *Red Cell Metabolism, A Manual of Biochemical Methods*, E. Beutler Ed., Grune and Stratton, Inc., New York, **1982**, p. 105-106,
- ¹⁵² W. H. Habig, M. J. Pabst, W. B. Jakoby, *J. Biol. Chem.*, 249, **1974**, 7130
- ¹⁵³ SAS Institute Inc., *SAS/STAT User's Guide*, **2004**, Version 6, Fourth Edition, Volume 1, Cary, NC.
- ¹⁵⁴ T. Pacher, M. Bacher, O. Hofer, H. Greger, *Phytochemistry*, 58, **2001**, 129
- ¹⁵⁵ K. Hosokawa, Y. Oikawa, S. Yamamura, *Plant Cell Reports*, 17, **1998**, 747