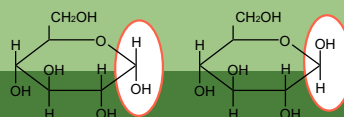
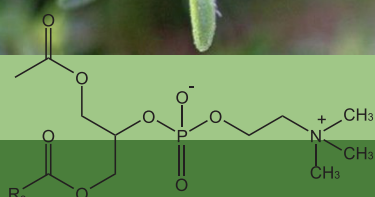
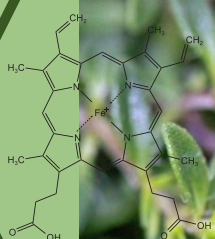
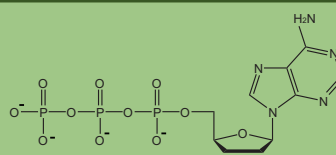
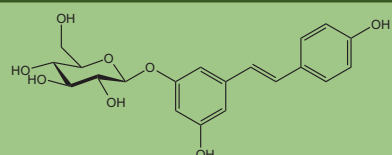


Светлана Кулеванова
Гоше Стефков, Марија Карапанцова
Ивана Цветковиќ Каранфилова

ПРИРОДНИ ПРОИЗВОДИ И НИВНА АНАЛИЗА



Светлана Кулеванова
Ѓоше Стефков, Марија Карапанцова
Ивана Цветковиќ Каранфилова

Природни производи и нивна анализа



Скопје, 2026

Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

Издавач:

Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје
Бул. „Гоце Делчев“ бр. 9, 1000 Скопје
www.ukim.edu.mk

Уредник за издавачка дејност на УКИМ:

проф. д-р Биљана Ангелова, ректор

Уредник на изданието

проф. д-р Светлана Кулеванова
УКИМ, Фармацевтски факултет - Скопје

Рецензенти

1. проф. д-р Катерина Брезовска, УКИМ, Фармацевтски факултет - Скопје
2. проф. д-р Ана Поцева-Пановска, УКИМ, Фармацевтски факултет - Скопје

Техничка обработка:

проф. д-р Светлана Кулеванова, доц. д-р Ивана Цветковиќ Каранфилова, УКИМ,
Фармацевтски факултет - Скопје

Компјутерска подготовка:

Киро Мавроски, Дизајн и принт солушн Студио „Мавроски“, Скопје

Лектура на македонски јазик:

Дијана Ристова

CIP - Каталогизација во публикација
Национална и универзитетска библиотека „Св. Климент Охридски“, Скопје

615.32.07(075.8)

ПРИРОДНИ производи и нивна анализа [Електронски извор] / Светлана Кулеванова ... [и др.]. - Скопје :
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, 2026

Начин на пристапување (URL): <https://ukim.edu.mk/e-book/00156>. - Текст во PDF формат, содржи 374, [10] стр., илустр.
- Наслов преземен од екранот. - Опис на изворот на ден 11.02.2026. - Други автори: Ѓоше Стефков, Марија Карапанцова,
Ивана Цветковиќ Каранфилова. - Библиографија: стр. [357]-368

ISBN 978-9989-43-550-8

1. Кулеванова, Светлана [автор] 2. Стефков, Ѓоше [автор] 3. Карапанцова, Марија [автор] 4. Цветковиќ Каранфилова,
Ивана [автор]

а) Фармацевтски производи -- Природни извори -- Анализа -- Високошколски учебници

COBISS.MK-ID 68118021

ПРЕДГОВОР

Учебникој Природни производи и нивна анализа е наменет за студентите од прв циклус на студии по Лабораториско биоинженерство, како и за студентите од студиската програма Магистер по фармација од прв и втор интегриран циклус на студии при УКИМ – Фармацевтски факултет во Скопје. Овој учебник ги офаќа наставните содржини од предметите од областа на природните производи (Природни производи и нивна анализа, Екстракција и изолација на природни производи и Фитохемија), со цел да го олесни совладувањето на теоретската и на практичната настава поврзана со овие дисциплини.

Природни производи и нивна анализа претставува современа фармацевтска дисциплина што ги проучува биолошки активните соединенија добиени од природни извори, нивната изолација, идентификација, структурна карактеризација и процена на нивното дејство врз човечкиот организам. Најчесто, овие соединенија потекнуваат од растителни или од животински сировини, но современите истражувања офаќаат и морски организми, габии и симбиотски микроорганизми.

Иако употребата на природни производи во лекувањето има длабоки историски корени, нивното систематско научно проучување доживува значителен подем во XIX и XX век, паралелно со развојот на органската хемија, аналитичките методи и молекуларната биологија. Денес, дисциплината е насочена кон истражување на хемискиот состав на природните соединенија, механизмите на нивното дејство, односот помеѓу структурата и активносста, како и кон стандардизација и контрола на квалитетот во согласност со Европската фармакопеја и со други меѓународни стандарди.

Предметот Природни производи и нивна анализа е задолжителен во студиската програма по Лабораториско биоинженерство, додека студентите на програмата Магистер по фармација го изучуваат како Фитохемија. Овој предмет претставува продолжение на знаењата стекнати по органска хемија, аналитичка хемија, биохемија и фармацевтска биологија. Наставната програма е осмислена така што на студентите им овозможува совладување на принципите на класификација, биосинтеза, екстракција и изолација на природни соединенија, нивната биолошко-фармаколошка активност и современите аналитички техники за нивно истражување, со посебен акцент на хроматографските, спектроскопските и масено-спектрометриските методи.

Книгата Природни производи и нивна анализа е подготвена како основен учебник за студентите на Фармацевтскиот факултет при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје и е целосно усогласена со програмската содржина на предметите на кои се темели. Таа е структурирана така што ги следи наставните целини: основни принципи и класификација на природните соединенија, методи на изолација и пречистување, како и рутинските и современите аналитички методи за идентификација и квалитативно и квантитативно определување на содржина на активните принципи. Во ова издание се вклучени и најновите научни сознанија, како и примери на современи лабораториски методи што се применуваат во фармацевтската анализа. Во ова издание се вклучени и најновите научни сознанија, како и примери на современи лабораториски методи што се применуваат во фармацевтската анализа.

Се надеваме дека ова издание ќе им овозможи на студентите од двете студиски програми при Фармацевтскиот факултет во Скопје, како и на идните истражувачи, да стекнат цврста теоретска основа и практични насоки за работа со природни производи, подготвувајќи ги за нивната професионална улога во фармацевтската индустрија, регулаторните тела и научните истражувања.

Рецензиите, проф. д-р Катерина Брезовска и проф. д-р Ана Поцева-Пановска од Фармацевтскиот факултет во Скопје, вложија значителен труд во рецензирањето на ова издание. Со своите стручни забелешки, коментари и предлози, тие придонесоа кон подобрување на содржината и јасноста на материјалот, за што им изразуваме искрена благодарност.

Скопје, септември 2025

Авторите

СОДРЖИНА

ПРЕДГОВОР	3
1. ВОВЕД	11
1.1. Примарни и секундарни метаболити.....	13
1.1.1. Основни метаболитски патишта	13
1.1.1.1. Ензими.....	14
1.1.1.2. Фошосинтеза.....	18
1.1.1.3. Клеточно дишење.....	20
1.1.1.4. Создавање на аминокиселини	21
1.1.1.5. Разградба на масните киселини и создавање на ацетил CoA	22
1.2. Основни метаболитски патишта за создавање на секундарни метаболити	23
1.2.1. Биосинтетски патишта за создавање на фенолни соединенија	23
1.2.1.1. Патишта на шикими киселините	24
1.2.1.2. Патишта на поликетидите	25
1.2.1.3. Комбинирана биосинтеза на фенолни соединенија	25
1.2.2. Биосинтеза на терпени (патот на мевалонска киселина)	27
1.2.3. Биосинтеза на алкалоиди.....	29
1.2.4. Биосинтеза на гликозиди (хетерозиди)	29
1.2.5. Биолошка активност и значење на секундарните метаболити	31
1.2.5.1. Биолошка улога на секундарните метаболити во растенијата	31
1.2.5.2. Биолошко-фармаколошка активност на секундарните метаболити и нивната практична употреба	31
2. МЕТОДИ НА ЕКСТРАКЦИЈА И ИСПИТУВАЊЕ НА ПРИРОДНИ ПРОИЗВОДИ	35
2.1. Екстракција на природни производи	36
2.2. Изолација и прочистување на природни производи.....	40
2.3. Структурна анализа на природни производи	42
2.4. Методи за квалитативна и квантитативна анализа на природни производи	43
3. ЈАГЛЕХИДРАТИ	51

3.1. Моносахариди	52
3.1.1. Производи на моносахариди	54
3.2. Олигосахариди	54
3.3. Полисахариди	55
3.3.1. Хомополисахариди	57
3.3.2. Хетерополисахариди	60
3.3.3. Гуми и слузи	61
3.3.4. Полисахариди на морски алги	63
3.3.5. Протеоглигани (мукополисахариди)	63
3.3.6. Дејство и употреба на полисахаридите	63
3.4. Екстракција и испитување на јаглехидратите	64
3.4.1. Екстракција, прочистување и сепарирање	64
3.4.2. Идентификација и квантификација	66
4. РАСТИТЕЛНИ ЛИПИДИ	71
4.1. Едноставни липиди	73
4.1.1. Триглицериди	73
4.1.2. Восоци - <i>Cera</i>	76
4.2. Сложени липиди	77
4.2.1. Фосфолипиди	77
4.2.2. Сфинголипиди и други сложени липиди	78
4.3. Испитување на липиди	80
4.3.1. Екстракција, изолирање и прочистување на липиди	80
4.3.2. Идентификација и анализа на липиди	81
4.4. Растителни алкини	83
4.4.1. Растителни ацетилени и полиацетилени	83
5. АМИНОКИСЕЛИНИ, ПЕПТИДИ, ПРОТЕИНИ И АМИНИ	89
5.1. Аминокиселини	89
5.2. Пептиди и протеини	91
5.3. Испитување на протеини, пептиди и аминокиселини	95
5.4. Сложени протеини - протеиди	98
5.4.1. Гликопротеини - лектини	98
5.4.2. Хромопротеиди	98
5.5. Биогени амини	101
6. ЦИЈАНОГЕНИ ХЕТЕРОЗИДИ, ГЛУКОЗИНОЛАТИ И СУЛФИДИ	105
6.1. Цијаногени хетерозиди	105
6.2. Глукозинолати	109

6.3. Сулфиди и други соединенија со сулфур	113
6.4. Екстракција и испитување на цијаногени гликозиди, глукозинолати и сулфиди	115
7. РАСТИТЕЛНИ ОРГАНСКИ КИСЕЛИНИ	117
7.1. Монокарбоксилни киселини	118
7.2. Дикарбоксилни киселини	120
7.3. Алфа-хидрокси киселини	121
7.4. Шеќерни киселини	122
7.5. Циклични органски киселини	123
7.6. Екстракција и испитување на растителни органски киселини.....	125
7.6.1. Екстракција и прочистување.....	125
7.6.2. Идентификација и квантификација.....	127
8. ФЕНОЛНИ И ПОЛИФЕНОЛНИ СОЕДИНЕНИЈА.....	129
8.1. Едноставни феноли и фенолни хетерозиди	133
8.1.1. Едноставни феноли	133
8.1.2. Фенолни гликозиди.....	135
8.1.3. Екстракција и испитување на едноставни феноли	136
8.1.3.1. Екстракција и прочистување	136
8.1.3.2. Идентификација и квантификација на едноставните феноли	137
8.2. Фенолни киселини и фенилетаноиди	138
8.2.1. Фенолни киселини	138
8.2.2. Фенилетаноиди	141
8.2.3. Екстракција и испитување на фенолни киселини и на фенилетаноиди	143
8.2.3.1. Екстракција и прочистување	143
8.2.3.2. Идентификација и квантификација	144
8.3. Кумарини	145
8.3.1. Растителни кумарини.....	145
8.3.2. Екстракција и испитување на кумарини	151
8.3.2.1. Екстракција и прочистување	151
8.3.2.2. Идентификација и квантификација на кумарини	152
8.4. Лигнани, неолигнани и слични производи.....	153
8.4.1. Растителни лигнани	153
8.4.2. Екстракција и испитување на лигнани	156
8.5. Гингероли и куркуминоиди	157
8.5.1. Гингероли	157
8.5.2. Куркуминоиди	158
8.5.3. Екстракција и испитување на гингероли и куркуминоиди	159
8.6. Фенилпропаноиди со продолжена странична низа.....	161
8.6.1. Стилбеноиди	161
8.6.2. Стирилпирони	164
8.6.3. Ксантони	166

8.6.4.	Екстракција и испитување на стилбени, стирилпирони и ксантони	168
8.7.	Флавоноиди	171
8.7.1.	Вистински (правилни) флавоноиди (2-фенил-бензо- γ -пирони).....	174
8.7.1.1.	Флаволи и флавоноли	175
8.7.1.2.	Флаванони и дихидрофлавоноли	177
8.7.1.3.	Екстракција и испитување на вистински флавоноиди.....	181
8.7.2.	Флавоноиди од групата на 2-фенил-бензо- γ -пирани	187
8.7.2.1.	Кетехини и леукоантхоцијанидини	187
8.7.2.2.	Антхоцијанидини/антхоцијани	188
8.7.3.	Флавоноиди со отворен пропански низ или со фурански прстен	194
8.7.3.1.	Халкони и дихидрохалкони	194
8.7.3.2.	Аурони	195
8.7.4.	Флавоноиди од групата на 3-фенил-бензо- γ -пирони.....	197
8.7.4.1.	Изофлаволи	198
8.8.	Танини	202
8.8.1.	Хидролизирачки танини	203
8.8.2.	Кондензирани танини	206
8.8.3.	Екстракција и испитување на танините	212
8.9.	Хинони.....	215
8.9.1.	Растителни бензохинони	215
8.9.2.	Растителни нафтохинони.....	217
8.9.3.	Растителни антрони, антраноли и антрахинони	220
8.10.	Флороглуциноли и канабиноиди	227
8.10.1.	Флороглуциноли.....	227
8.10.2.	(Фито)канабиноиди	231
9.	ТЕРПЕНИ И ТЕРПЕНОИДИ	239
9.1.	Етерични масла (EO).....	247
9.1.1.	Монотерпени.....	250
9.1.2.	Сесквитерпени.....	252
9.1.3.	Ароматични соединенија	253
9.1.4.	Други компоненти	253
9.1.5.	Екстрактивни техники за добивање и испитување на етерични масла	254
9.2.	Иридоиди	260
9.2.1.	Вистински / правилни иридоиди.....	262
9.2.2.	Валепотријати.....	263
9.2.3.	Секоиридоиди	263
9.3.	Сесквитерпенски лактони (STL).....	266
9.3.1.	Класификација на STL согласно со карбоцикличниот скелет	267
9.3.2.	Екстракција и испитување на сесквитерпенски лактони	269
9.4.	Дитерпени и дитерпеноиди.....	270
9.4.1.	Ациклични дитерпени.....	271
9.4.2.	Циклични дитерпени	272
9.4.3.	Екстракција и испитување на дитерпени	277

9.5. Сестерпеноиди	278
9.5.1. Екстракција и испитување на сестерпени.....	278
9.6. Тритерпени и стероиди.....	279
9.6.1. Сапонини.....	281
9.6.1.1. Стероидни сапонини	282
9.6.1.2. Тритерпенски сапонини.....	286
9.6.2. Растителни стероли (фитостероли и нивни естри).....	289
9.6.3. Кардиотонични хетерозиди	291
9.7. Тетратерпени - каротеноиди	297

10.АЛКАЛОИДИ 303

10.1.Алкалоиди што се производи на орнитин и лизин	308
10.1.1. Тропански алкалоиди	309
10.1.2. Пиролизидински алкалоиди	312
10.1.3. Пиперидински алкалоиди	314
10.1.4. Пиридински алкалоиди	316
10.2.Алкалоиди што се производи на фенилаланин и на тирозин.....	317
10.2.1. Фенилетиламински алкалоиди.....	317
10.2.2. Изохинолински алкалоиди.....	318
10.2.2.1. Прости и етрахидроизохинолински алкалоиди.....	318
10.2.2.2. Бензилетрахидроизохинолински алкалоиди	319
10.2.2.3. Бензилизохинолински алкалоиди	320
10.2.2.4. Бисбензилетрахидроизохинолински алкалоиди.....	320
10.2.2.5. Ајорфински алкалоиди	322
10.2.2.6. Проіоберберински алкалоиди	324
10.2.2.7. Морфински алкалоиди.....	326
10.2.2.8. Фенилетилизохинолински алкалоиди - ітроіолонски алкалоиди.....	328
10.2.2.9. Алкалоиди на фамилијата Amaryllidaceae.....	330
10.2.2.10.Моітеріенско-изохинолински алкалоиди	331
10.3.Алкалоиди што се производи на триптофан.....	333
10.3.1. Триптамини и β-карболински алкалоиди - природни халуциногени супстанции -	334
10.3.2. Езерински алкалоиди	336
10.3.3. Ергот алкалоиди.....	337
10.3.4. Монотерпенско-индолни алкалоиди	339
10.3.4.1. Коринаніиани и асігосіремани.....	340
10.3.4.2. Бинарни моітеріенско-индолни алкалоиди.....	342
10.3.4.3. Хинолински (хинуклидински) алкалоиди	343
10.4.Алкалоиди што се производи на хистидин	344
10.5.Терпенски алкалоиди.....	345
10.5.1. Моно и сесквитерпенски алкалоиди	345
10.5.2. Стероидни алкалоиди	346
10.6.Пурински алкалоиди	348
10.7.Екстракција и испитување на алкалоиди.....	350

10.7.1. Екстракција, прочистување и изолација	350
10.7.2. Идентификација и квантификација на алкалоиди	355

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА	357

КРАТЕНКИ	369

СПИСОК НА ТАБЕЛИ	375

СПИСОК НА ИЛУСТРАЦИИ	377

ВОВЕД

Природен производ е соединение произведено од жив организам што е присутен во природата. Во најширока смисла на зборот, природните производи ја вклучуваат секоја супстанција што е произведена од живиот свет. Во областа на органската хемија, дефиницијата за природни производи главно е ограничена на органски соединенија изолирани од природни извори коишто се произведуваат по патиштата на секундарниот метаболизам. Во областа на медицинската хемија, дефиницијата исто така е ограничена на секундарните метаболити. Секундарните метаболити не се од суштинско значење за опстанокот, но сепак на организмите кои ги создаваат им обезбедуваат еволутивна предност. Секундарните метаболити во најголем број случаи се уникатни за определените видови, по што се разликуваат од примарните метаболити кои се универзално дистрибуирани во сите биолошки системи. Проширената дефиниција за природни производи ги вклучува и биотичките материјали (дрво, свила), биобазираниите материјали (биопластика, пченкарен скроб), телесните течности (млеко, растителни ексудати) и другите природни материјали (почва, јаглен). Природните производи се разликуваат според нивната биолошка функција, биосинтетичкиот пат и изворот за добивање. Бројот на познати молекули на природен производ се движи помеѓу 300.000 и 400.000 ентитети.

Природните производи се создаваат главно од еукариотските организми: протисти, габи, растенија и животни (Protista, Fungi, Plantae и Animalia). Протист е секој еукариотски организам кој не е животно, растение или габа. Според новите пристапи овие организми денес се сметаат за подгрупи или т.н. сродни организми на габи, растенија и животни. Истите се малку проучени и имаат голем потенцијал за откривање на нови и интересни природни производи. Сепак, главни извори на природни производи се останатите три царства на еукариоти. Габите се хетеротрофни, еукариотски организми коишто првенствено се разградувачи во околината. Тие вклучуваат едноклеточни организми како што се квасец и мувла, и повеќеклеточни организми коишто имаат плодни тела, како што се печурките. Габите произведуваат огромен број секундарни природни производи. Некои од нив се многу токсични, додека други наоѓаат голема употреба во медицината. На пример, неколку антимицробни лекови се добиени од габи, вклучувајќи ги пеницилините и цефалоспорините (антибактериски лекови добиени од *Penicillium chrysogenum* и *Cephalosporium acremonium*, соодветно) и грисеофулвин (антифунгален лек добиен од *Penicillium griseofulvum*). Друг медицински корисен метаболит е ловастатин којшто го произведува габата *Aspergillus terreus* и претставува базична компонента за добивање на цела серија лекови за третман на хиперлипидемии и хиперхолестеринемии, означени како статини. Габата 'ржена гламна (*Claviceps spp.*) создава ергот алкалоиди, меѓу кои и ергометрин, којшто дејствува како вазоконстриктор и се користи за спречување на крвавење по породувањето. Денес, голем интерес е свртен кон состојката цикло-

спорин, уште еден производ на габите, со важна медицинска апликативност. Во хемиски поглед циклоспоринот е алкалоидна структура, составена од градежни блокови на аминокиселини што формираат циклична пептидна структура. Главната биолошка активност на циклоспоринот е потиснување на имунолошкиот одговор. Се користи при трансплантација на органите, за супресија на имунолошкиот систем, со цел спречување отфрлање на органите. Циклоспоринот се наоѓа на списокот на есенцијални лекови на Светската здравствена организација, а се произведува од асексуланиот животен стадиум на габата *Cordyceps subsessilis*.

Растенијата се повеќеклеточни еукариотски организми коишто се автотрофни или способни да произведуваат сопствена храна. Процесот преку којшто ја создаваат сопствената храна е фотосинтезата, при што ја користат светлосната енергија од сонцето за да ги претворат јаглерод диоксидот и водата во едноставни органски соединенија, шеќери. Како нуспроизвод на оваа реакција се создава кислород, кој се ослободува во атмосферата, од каде што растенијата се главен извор на кислород на планетата. Освен што произведуваат кислород и се користат како извор на храна, растенијата исто така се главен извор на разновидни секундарни метаболити. Иако бројот на растенија коишто се опширно проучувани е релативно мал во однос на вкупниот број на растенијата, многу фармаколошки активни природни производи се идентификувани како такви и во моментот се користат како лекови. Во клиничката пракса се важни на пр., цитостатиците паклитаксел и винбластин (изолирани од *Taxus brevifolia* и *Catharanthus roseus*, соодветно), антималяричниот агенс артемисинин (од *Artemisia annua*), аналгетскиот лек морфин (од *Papaver somniferum*), галантамин што се користи за лекување на Алцхајмерова болест (од *Galanthus sp.*) и многу други.

Животните се повеќеклеточни, еукариотски хетеротрофни организми коишто се карактеризираат по тоа што се подвижни во одреден момент од нивниот живот. Животните може да се поделат на ‘рбетници и безрбетници. ‘Рбетниците имаат ‘рбет (‘рбетниот столб) и претставуваат помалку од пет проценти од сите познати животински видови, а вклучуваат риби, водоземци, влекачи, птици и цицачи. Останатите животни се безрбетниците, а вклучуваат мекотели, членконоги, сунѓери и редица други групи. Животните се голем извор на природни производи, особено отровните животни (змии, пајаци, скорпии, гасеници, пчели, оси, стоногалки, мравки и жаби) коишто денес привлекуваат големо внимание. Испитувањата покажале дека состојките на отровите се пептиди, ензими, нуклеотиди, липиди, биогени амини и други видови соединенија, коишто често имаат многу специфична интеракција со целните молекули во телото на човекот и животните. Хлоротоксинот од отровот на скорпијата, по структура е пептид составен од 36 аминокиселини. Овој отров ги блокира хлоридните канали од клетките на пленот, што ѝ овозможува на скорпијата да го имобилизира. Кај човекот хлоротоксинот селективно се врзува за клетките на глиом, еден вид тумор на мозокот. Глиомот често станува малиген, со лоша прогноза и склоност да се шири во различни делови од телото. Хлоротоксинот се врзува само со клетките на туморот, а не со нормалното мозочно ткиво, што овозможува развој на нови методи за лекување, дијагностицирање и отстранување на различни видови тумор. Покрај копнените животни, многу морски животни се испитувани во однос на содржината на фармаколошки активни природни производи (различни корали, сунѓери, туникати, морски полжави и др.), кои покажуваат интересни аналгетски, анти-вирусни и антиканцерогени активности. Две соединенија се особено интересни како лекови што се внесени во клиничка употреба, ω -конотоксин (од морскиот полжав *Conus magus*) и ектенасцидин 743 (од туникатот *Ecteinascidia turbinata*). Првиот, ω -конотоксин, се користи за ублажување на силна и хронична болка, додека вториот, ектенасцидин 743 се користи за лекување на рак.

1.1. ПРИМАРНИ И СЕКУНДАРНИ МЕТАБОЛИТИ

Врз база на нивното значење и улогата во животните процеси, органските соединенија во растенијата се делат на две групи:

- примарни метаболити или примарни биомолекули, и
- секундарни метаболити или секундарни биомолекули.

Примарните метаболити (биомолекули) се соединенија неопходни за раст и развој, функционирање и репродукција на растителните организми. Тие настануваат како производи на примарниот метаболизам, што го опфаќа процесот на фотосинтезата и трансформациите на настанатата гликоза до полисахариди, т.е. нејзината гликолиза и формирање аминокиселини, пептиди и масни киселини, односно липиди.

Фундаменталните метаболички процеси на примарниот метаболизам се одвиваат според исти механизми во сите растителни организми. Со овие процеси настануваат, се трансформираат и се разградуваат основните градбени функционални и енергетски соединенија, неопходни за растот, развојот, функционирањето и репродукцијата на живите организми (јаглехидрати, липиди и протеини).

Секундарните метаболити/биомолекули (етерични масла, алкалоиди, феноли, фитоалексини и др.) се соединенија што растенијата многу често ги создаваат, но чијашто улога сè уште не е доволно разјаснета. Секундарниот метаболизам е специфичен за некои растителни клетки, односно за определен растителен вид и претставува директно продолжение на примарните метаболички процеси, односно трансформација на шеќерите, аминокиселините и масните киселини до разновидни органски соединенија, секундарни биомолекули. Токму секундарните молекули се носители на голем број биолошки и фармаколошки дејства на растителните сировини и нивните производи.

1.1.1. Основни метаболички патишта

Базичните метаболички патишта се слични во сите биолошки системи, а производите на примарниот метаболизам се неопходни за одвивање на животните процеси. За растенијата е карактеристичен и т.н. секундарен метаболизам, односно создавање разновидни хемиски соединенија со метаболички промени на производите на примарниот метаболизам. Создавањето на секундарните метаболити се базира на фундаменталните метаболички циклуси во живите клетки. Процесите на секундарниот метаболизам може да се генерализираат во растенијата само донекаде и само до некои почетни фази се одвиваат со исти механизми. Сродните хемиски структури, исто така, само до некаде (до создавањето на одредени интермедиери) се синтетизираат по исти биосинтетски патишта. Понатаму, секој растителен вид внесува специфичности во секундарните метаболички процеси, што е, пак, врзано за биолошките (генетските) карактеристики на видовите. Најчесто специфичноста се однесува на присуство на точно определени ензими во определено ткиво, што овозможуваат промени во основните биосинтези, го условуваат разгранувањето на биосинтетските патишта и создавањето на многу разновидни структури на секундарните биомолекули.

Растителните клетки поседуваат високоорганизирана внатрешна структура со голем број органели што поседуваат различни биохемиски карактеристики. Органелите овозможуваат различни

хемиски средини во една иста клетка, а од друга страна и низа реакции што се одвиваат на површината и низ мембраните, што е многу значајно за биолошките системи. Присуството и активността на ензимите и на ензимските системи е основа за започнување на метаболички процеси во клетката. Точно определени гени се одговорни за синтеза на протеините, а со тоа и на ензимите. Ензимите се носители и двигатели на секундарниот метаболизам. Биосинтетските патишта, по кои настануваат фармаколошки активни соединенија, во најголем дел се недоволно ензимолошки проучени. Се претпоставува дека со дефинирање на времето и на причините кога и како започнуваат процесите на секундарниот метаболизам во растенијата, како и со дефинирање на механизмите (ензимите) што се одговорни за нивно одвивање, ќе се разјасни и ќе биде можна контрола на синтезата на фармаколошки активни природни производи во растителните ткива (*in vitro* и *in vivo*).

1.1.1.1. Ензими

Голем број реакции во клетката се зависни од ензимите. Тие вообичаено дејствуваат врз точно определена супстанција или врз група на соединенија и се специфични за одредена функционална група или за одредена врска. Специфичноста на ензимите варира, па така липазите не се строго специфични, додека фумаразата дејствува само на L-малат и фумарат, а D-малат е веќе компетитивен инхибитор на фумаразата. Количеството на материјалот врз којшто ензимот дејствува и го менува е вообичаено многу поголемо од количеството на ензимот. Како и други катализатори, ензимите не учествуваат директно во реакцијата туку само влијаат врз обемот и брзината на реакцијата. Имаат протеинска природа, а молекуларните маси им се големи, од 9 000 до 100 000 Da. Во голем број случаи нивниот аминокиселински состав веќе е познат. Во зависност од хемиската градба, ензимите се класификувани во три основни групи:

- прости протеински ензими,
- метало-протеински ензими и
- сложени протеински ензими.

Прости протеински ензими се чисти протеини. Може да имаат мономерна и олигомерна структура, односно мономерните се изградени од еден прост полипептиден ланец што не дисоцира (хидролази и протеинази), додека олигомерните се изградени од два или од повеќе полипептидни ланци (ензими вклучени во процесите на гликолизата). Метало-протеинските ензими во структурата покрај протеинот имаат и метален јон, што ја олеснува и ја потпомага активноста (каталаза - $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$; тирозиназа и цитохром оксидаза - Cu^{2+} ; алкохол дехидрогеназа - Zn^{2+} ; фосфохидролаза - Mg^{2+} , глутатион пероксидаза - Se^{2+} и др.). Сложените протеински ензими во својот состав покрај протеинот содржат и коензим или простетична група. Протеинскиот дел се нарекува апоензим, а целосниот сложен ензим холоензим. Во оваа група спаѓа, на пр. пируват декарбоксилазата што содржи молекула на витамин B_1 како коензим.

Според усвоената номенклатура, во зависност од функцијата што ја имаат, растителните ензими се делат во шест главни групи:

1. Оксидо-редуктази (катализираат пренесување електрони од еден на друг молекул);
2. Трансферази (пренесуваат функционални групи, како C_1 единици или метил групи, аминокиселини и др.);
3. Хидролази (ги разложуваат другите молекули во присуство на вода);
4. Лијази (катализираат реакции на отстранување групи од супстратот, но не со хидролиза);
5. Изомерази (катализираат реакции на изомеризација – структурни, геометриски и стереоизомерни промени);

6. Лигази (синтетази) (катализираат синтези односно поврзување на две молекули во присуство на АТР, слика 1).

Растенијата содржат поголем број ензими од човекот и од животните што им овозможува да синтетизираат повеќе илјади соединенија, како примарни, така и секундарни метаболити. Најголем број ензими се сместени во клеточните органели, но има и такви што се слободни во цитоплазмата. Најмногу ензими содржат митохондриите. Активноста на ензимите зависи од низа фактори, како што се: концентрацијата на супстратот, концентрацијата на ензимот, температурата, рН на средината, коензимите, присуството на активатори или на инхибитори, присуството на алостерични ефектори и интерконверзија и др. Активноста дополнително зависи од видот и од староста на растението, начинот на исхраната, водениот режим, хемискиот состав на земјиштето, како и од еколошките (активиращки или инхибиращки) фактори.

Од особено значење за растенијата е саморегулацијата на ензимската активност, како последица на промени во надворешната средина, којашто се случува со: регулирање на активноста или со регулирање на синтезата на ензимот. Регулацијата на активноста на ензимот е зависна од: количеството на супстрат, присуството на активатори или на инхибитори, количеството на метаболитот, врзувањето на ензимот за различни клеточни структури и сл. Регулацијата на активноста може да се изврши и со т.н. ковалентно модифицирање, односно ковалентно врзување на разни радикали на ензимот (фосфатен, метилен, ацетилен и др.). Регулацијата на синтезата на ензимите е една од најзначајните карактеристики на растителната ензимологија. Биосинтезата на ензимите е под генетска контрола, а брзината на биосинтезата е условена од низа фактори, како што се: видот на ткивото, фазата на растот и развојот на растението, хемискиот состав на почвата и др.

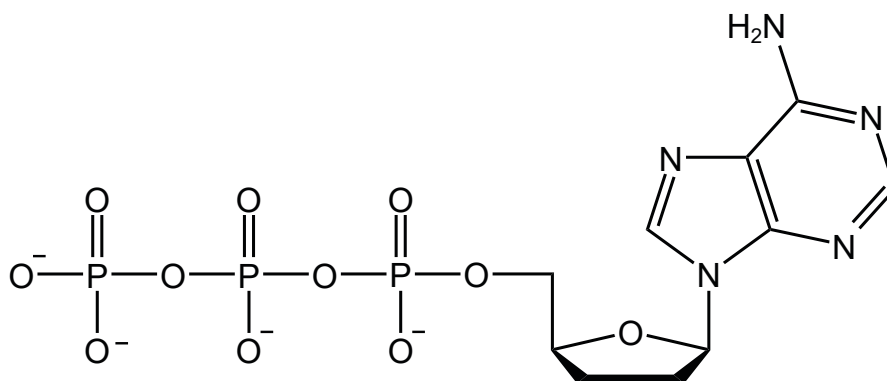
Коензими. Поголем број ензими својата каталитичка функција ја извршуваат со помош на други соединенија, кофактори што се нарекуваат *коензими* и *простетички групи*. Коензимите вообичаено лесно се одвојуваат од ензимот, со дијализа, додека простетичните групи многу потешко. Денес простетичните групи се дефинираат како групи што хемиски се менуваат, додека, коензимите се групи што не се менуваат во текот на ензимската реакција. Коензимите се нискомолекуларни органски соединенија што му овозможуваат на протеинскиот дел од ензимот да ја изврши својата каталитичка функција. Тие можат да бидат активни центри на ензимот или нивен дел, што помага ензимот да се врзе за супстратот, при што во текот на реакцијата супстратот се менува, а коензимот останува непроменет. Најзначајните коензими се претставени во табела 1.

Според видот на ензимот, коензимите се делат во три групи:

- коензими на оксидоредуктази,
- коензими на трансферази и
- коензими на лијази, на лигази и на изомеразии.

Ензимите од групата на хидролазите ги катализираат биохемиските реакции без коензими и како активатори главно користат метални јони.

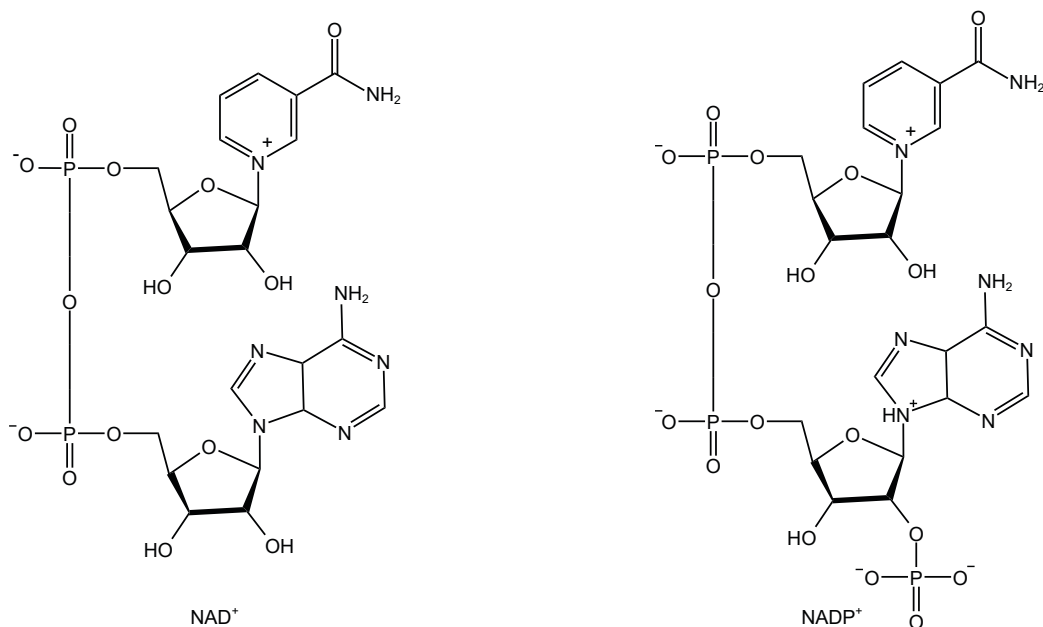
За извршување на биосинтетските процеси во растенијата особено значење имаат аденозин и уридин фосфатите, што содржат по една базна единица и се нарекуваат мононуклеотиди. Базните единици (аденин и уридин) се поврзани со рибоза во аденозин, којшто понатаму се естерифицира со фосфорна киселина. Овие молекули овозможуваат транспорт на енергија во форма на високоенергетски фосфорни врски, при што енергијата се ослободува при раскинување на врската што ја гради фосфорната киселина.



ATP

Слика 1. Структура на моноклеотидот аденозин трифосфат - ATP

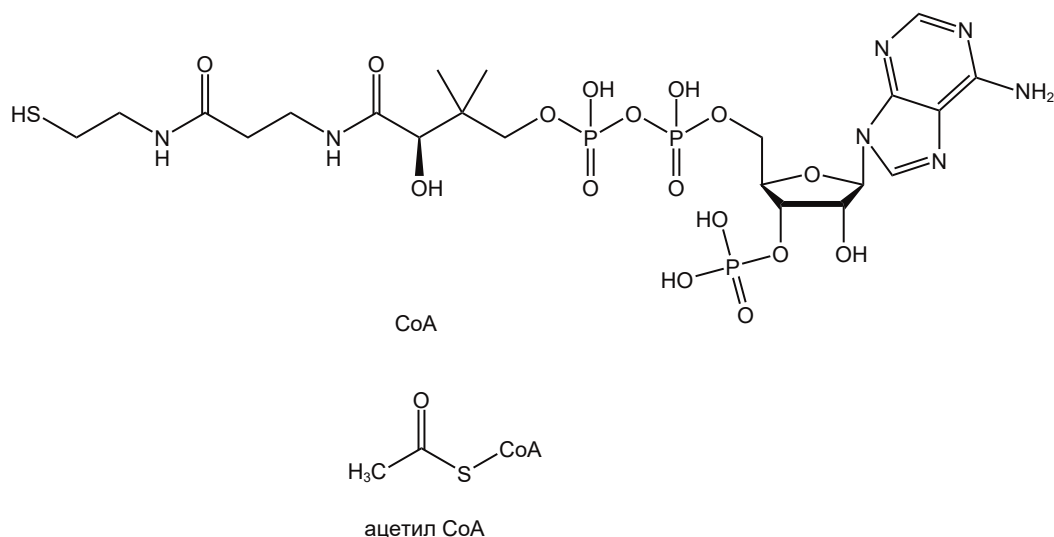
Никотинамид-аденин-динуклеотидот (NAD) и неговиот фосфат (NADP) содржат по две базни единици (никотинамид и аденин) и се нарекуваат динуклеотиди. Двете бази врзуваат по молекул рибоза којашто понатаму естерски се поврзува со фосфорната киселина. Имаат функција во оксидо-редуктивните системи. Оксидираните форми се обележуваат како NAD^+ и NADP^+ (слика 2), а редуцираните како NADH и NADPH_2 .



Слика 2. Структура на динуклеотидот никотинамид-аденин-динуклеотидот – NAD и фосфорилираниот облик – NADP

Коензим	Ознака	Група што ја пренесува	Дериват на витамин
1. Коензими на оксидоредуктази			
Никотинамид аденин динуклеотид	NAD ⁺	водород	амид на никотинска киселина
Никотинамид аденин динуклеотид фосфат	NADP ⁺	водород	амид на никотинска киселина
Флавинаденин моноклеотид	FMN	водород	рибофлавин
Флавинадениндинуклеотид	FAD	водород	рибофлавин
Убихинон	Q	електрони и H ⁺	
Клеточни хемини	/	електрони	
Липонска киселина	Lip(S ₂)	водород и ацилни групи	
2. Коензими на трансферази			
Аденозин трифосфат	ATP	фосфатна група	-
Уридин дифосфат	UDP	шеќери и уронати	-
S-аденозил метионин	SAM	метил групи	-
Тетрахидрофолна киселина	H ₄ -фосфат	формил група	фолна киселина
Биотин	-	карбоксилна група	биотин
Коензим А	CoA	ацетилни и ацил групи	пантотенска киселина
Тиамин пирофосфат	TPP	C ₂ -алдехидни групи	тиамин
Пиридоксал фосфат	PLP	аминогрупи	пиридоксал
Сульфатофосфо-аденилин киселини	PAPS	сулфат	-
3. Коензими на изомерази, на лигази и на лијази			
Аденозин трифосфат	ATP	фосфатна	-
Уридин дифосфат	UDP	фосфатна	-
Цитидин дифосфат	CDP	фосфатна	-

Од другите коензими особено значење има коензимот А (CoA) којшто партиципира во трансферот на ацетил и ацил групите, поради што има централно место во растителниот и во животинскиот метаболизам.



Слика 3. Структура на коензим А (CoA) и на тиестерот ацетил CoA

Коензим А (CoA) се состои од фосфоаденозин поврзан со два остатоци од фосфорна киселина коишто понатаму се поврзани со пантоинска киселина, β -аланин и β -цистамин (слика 3). Последната киселина има слободна тиакохолна група (SH) која со масни киселини гради тиестери. Ацетил CoA е тиестер на оцетната киселина со коензим А.

1.1.1.2. Фотосинтеза

Основниот процес од кој зависи животот на планетата Земја е фотосинтезата, процес преку кој во зелените делови од растенијата неорганските соединенија јаглерод диоксид и вода се преведуваат во органски соединенија (шеќер), а светлосната енергија се претвора во хемиска.

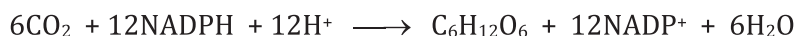
Фотосинтезата се одвива во хлоропластите, органели со специјална ултраструктурна градба, што содржат пигменти неопходни за одвивање на процесот (хлорофил). Од биохемиски аспект фотосинтезата може да се дефинира како верижен процес од оксидоредукциски реакции. Според некои автори (денес има и други толкувања) фотосинтезата многу поедноставено може да се сведе на два основни процеси што се дефинираат како светла и темна фаза на фотосинтезата (слика 4).

За **светлата фаза** (фотохемиска фаза) која се одвива во тилакоидните мембрани на хлоропластите, неопходна е сончевата светлина, под чие дејство се создаваат редукциони (NADPH_2) и енергетски соединенија (АТР), неопходни за одвивање на *темната фаза*. Основен процес во светлата фаза е трансформација на светлосната енергија во хемиска, со учество на хлорофилни молекули што имаат каталитичка улога во реакцијата. Во светлата фаза со примената (усвоената) сончева енергија доаѓа до разложување (*фотолиза*) на водата, се создава водород потребен за *редукција* на NADP до NADPH и OH^- јони од кои се добива вода и молекуларен кислород. Со процесот на *фотосинтетскиот фосфорилирање*, светлосната енергија се претвора во хемиска во процесот на создавање на високоенергетското соединение АТР.

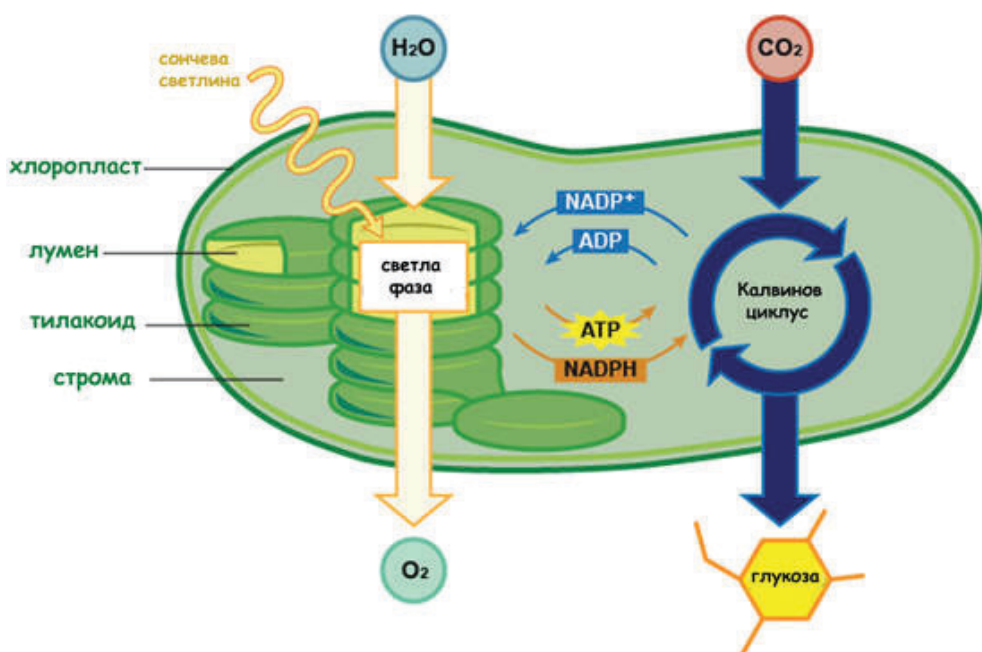
Сумирано, процесите од оваа фаза може да се прикажат со равенката:



Реакциите од **темната фаза** (термохемиска фаза) се биохемиски процеси на фиксирање и редуцирање на CO_2 , кои се одвиваат во стромата на хлоропластот и за кои не е потребна директна сончева светлина. Но, овие процеси, иако се нарекуваат темна фаза, сепак протекуваат во присуство на светлината. Всушност, дејството на светлината се гледа во активирање на некои ензими што учествуваат во биохемиските реакции на фиксирање на CO_2 . Темната фаза трае подолго и вклучува голем број реакции во циклус што е познат како Калвинов циклус, во чест на Мелвин Калвин и соработниците кои го разјасниле редоследот на реакциите во темната фаза, за што во 1961 година ја добиле Нобеловата награда за хемија. Сложените процеси што се одвиваат во циклусот имаат за цел фиксација на CO_2 , редукција на органските соединенија и формирање на крајни продукти, триози (C_3). За сите наведени процеси се троши енергија од АТФ и NADPH_2 , акумулирана во светлата фаза. По фиксација на CO_2 се создава глицеролска киселина, првото стабилно соединение, кое во понатамошниот тек се редуцира до фосфоглицеролски алдехид, од кој под дејство на одредени ензими се создаваат прво триози (C_3), од кои потоа настануваат хексози (C_6). Сумирано, темната фаза може да се претстави со равенката:



Вкупната реакција на процесот на фотосинтезата го има следниот облик:



Слика 4. Светлата и темната фаза на фотосинтезата (преземено од <https://andrianadimitrov.weebly.com/10921086109010861089108010851090107710791072.html>)

Врз база на примарните производи на фотосинтезата, растенијата се делат во три групи:

- C_3 растенија кои го асимилираат CO_2 во фосфоглицеринска киселина, со C_3 атоми;
- C_4 растенија, кои CO_2 го инкорпорираат директно во дикарбонските киселини (јабољкова и аспартамска) преку создавање на C_4 - соединение, оксалацетат. Овој вид растенија се карактеристични за тропски и за суптропски подрачја, имаат карактеристичен изглед на листовите, а ги опфаќаат различните видови треви.
- САМ (Crassulacean acid metabolism) растенија, кои CO_2 го фиксираат ноќе, кога ги отвораат стомите (карактеристични претставници се сукулентните растенија, Crassulaceae). Овие растенија можат да создаваат и фосфоглицеринска киселина (C_3) и оксалацетат (C_4).

Помеѓу растенијата од трите групи постојат значајни биохемиски, физиолошки и еколошки разлики. Најголема група растенија се C_3 растенијата, што создаваат триози. Триозите може да се искористат за регенерација на супстратот за врзување на CO_2 или да се транспортираат од хлоропластите и понатаму да се искористат за синтеза на хексози. Од хексозите се создаваат посложени јаглехидрати, скроб (резервни материи) или сахароза (транспортна форма на шеќерите создадени во процесот на фотосинтезата). Значајно е да се напомене дека во напредните фази од Калвиновиот циклус, структурите на хексозите можат да се раскинуваат на различни начини и со меѓусебно соединување на посебните делови да се синтетизираат шеќери со четири С-атоми (тетрози), со пет (пентози), со шест (хексози) и со седум С-атоми (хептози). Во сложени и контролирани биохемиски реакции, овие соединенија можат понатаму да се трансформираат во други природни производи.

1.1.1.3. Клеточно дишење

Равенката на фотосинтезата напишана во обратна насока е равенка на клеточно дишење или клеточна респирација, обратен процес, каде што се врши оксидација на хексози до CO_2 , а како спореден продукт се добива вода. Оваа равенка претставува збирна равенка, додека процесот на дишење се одвива во клетките преку три одвоени, но заемно поврзани процеси:

- гликолиза,
- циклус на лимонска киселина (Кребсов циклус) и
- транспорт на електрони.

Во процесот на гликолизата кој се одвива во цитоплазмата, доаѓа до разложување на гликозата до пирогроздова киселина (пируват), создавање АТР и редукција на NAD. Понатамошното разградување на пируватот ќе зависи од тоа дали се врши во присуство или во отсуство на кислород. Под нормални, аеробни услови (во присуство на кислород), пируватот се транспортира во митохондриите и оксидира до CO_2 и вода, пренесувајќи ги своите електрони на кислородот. Аеробното дишење се нарекува уште и циклус на трикарбонски киселини или т.н. *Кребсов циклус*. Најзначајна придобивка во овој процес е синтезата на големо количество АТР, поради што од енергетски аспект Кребсовиот циклус претставува многу ефикасен процес. Во текот на овој циклус се создаваат покрај лимонската, и други киселини како што се α -кетоглутарна, килибарна, фумарна, малонска и оксалоцетна киселина, кои се многу важни како интермедиери во процесите на примарниот, но и на секундарниот метаболизам. Доколку разградувањето на органските материи се изведува без присуство на кислород, при анаеробното дишење, производите на ваквата реакција се CO_2 и поедноставни органски материи, што се богати со енергија. Овие соединенија понатаму, до крајните продукти (CO_2 и вода) се разложуваат повторно во аеробни услови.

Во растенијата се случува и директната оксидација на јаглехидратите по т.н. спореден пат за разложување на гликозата, при што се создаваат шеќери со помал број С-атоми (тетрози и пентози),

а се образува поголемо количество NADPH_2 . Голем број растенија го имаат токму овој алтернативен пат на разложување на гликозата. Создадениот NADPH_2 се користи како донор на H_2 , за редукција на кислород (O_2) и за создавање на АТФ. Создадените шеќери (тетрози, пентози и др.) се најчесто прекурсори во синтеза на други метаболити, како на пр., ароматични аминокиселини, лигнани или флавоноиди.

1.1.1.4. Создавање на аминокиселини

Аминокиселините се производи што содржат една или повеќе аминокиселини и најмалку една карбоксилна група. Во природата најчесто се јавуваат α -аминокиселини, со еден асиметричен C-атом и со општа формула $\text{R-CH(NH}_2\text{)COOH}$. Оние што се јавуваат како градбени единици на протеини се секогаш L-аминокиселини. Освен основните елементи (C, O, H и N), некои аминокиселини содржат сулфур (S) (цистеин), а некои јод (I) (тироксин). Можат да бидат алифатични, моноамино, диамино или моно- и дикарбоксилни киселини, да содржат ароматично јадро (фенилаланин, тирозин) или да вклучуваат хетероциклус (триптофан, хистидин). 20 аминокиселини влегуваат во градбата на протеините. Многу поголем број (неколку стотини) се непротеински аминокиселини. Иако голем број од нив се токсични за човекот, непротеинските аминокиселини денес се разгледуваат како фитохемиски интересни компоненти со физиолошко или со еколошко значење.

Аминокиселините се создаваат на различни нивоа од гликолизата и од Кребсовиот циклус. Азотот од NH_3 се вклучува во аминација на три α -кетокиселини: пирогроздова, оксалоцетна и α -кетоглутарна, од кои понатаму се создава аланин, аспартамска и глутаминска киселина, соодветно. Овие киселини служат како α -аминодонори, а со реакции на трансаминација со други соодветни α -кетокиселини се создаваат останатите аминокиселини. Глутаминската киселина е особено значајно соединение во биосинтезата на аминокиселините. Во нејзината дезаминација е вклучен NAD и овој процес е реверзибилен. Така, оваа киселина се однесува како донор на аминокиселината и од состојба на глутаминска киселина (кога содржи аминокиселина), со губење на истата, преминува во α -кетоглутарна киселина и обратно (слика 5).



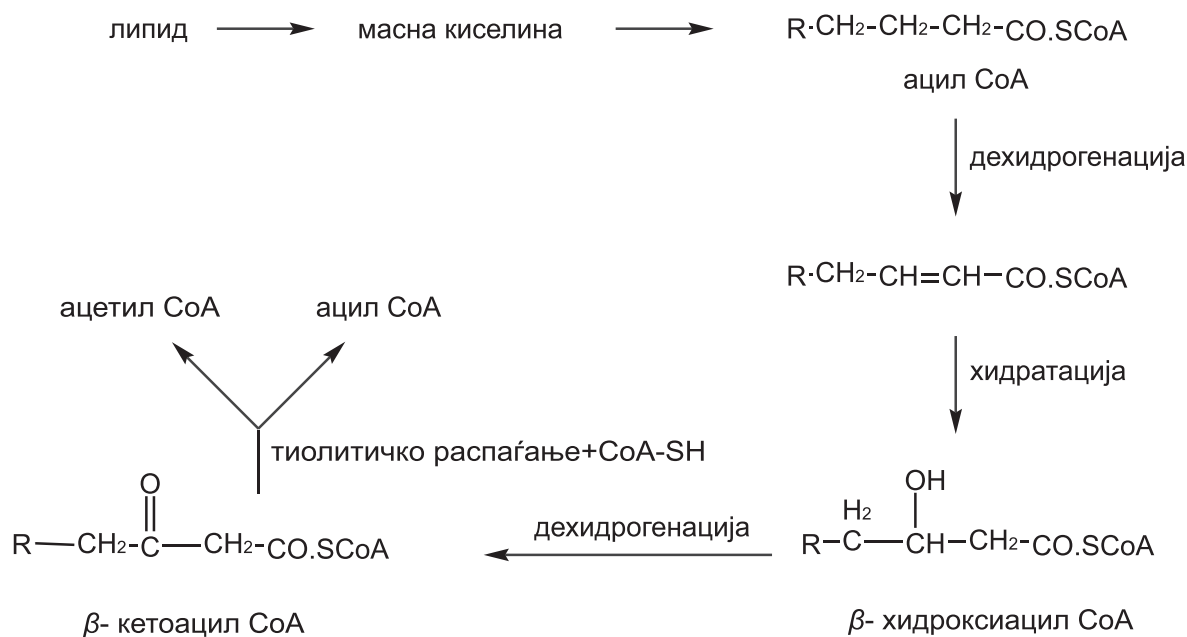
Слика 5. Трансформација на α -кетоглутарна киселина во глутаминска киселина и обратно

Аминокиселините меѓусебно се поврзуваат со пептидни врски и градат пептиди, олигопептиди, полипептиди, протеини, хормони, ензими и други примарни метаболити. Во секундарниот метаболизам се вклучуваат во создавањето на голем број различни структури како што се цијаногениите хетерозиди, глюкозинолати, сулфиди и дисулфиди, лектини, алкалоиди и др.

1.1.1.5. Разградба на масните киселини и создавање на ацетил CoA

Вистинските (правилните) масти се тројни естри на глицерол со виши масни киселини, означени како триглицериди. Вишите масни киселини имаат парен број на C-атоми и може да бидат заситени и незаситени. Со карбоксилната група стапуваат во процес на естерификација со алкохолните групи на глицеролот и градат глицериди. Покрај правилните масти кои се означуваат како прости, растенијата создаваат и сложени масти од различен карактер. Од сложените масти особено се значајни фосфолипидите кои се градбени единици на клеточните структури.

Мастите (липидите) се создаваат како резерви на храна и енергија и во поголеми количества растенијата ги депонираат во ендоспермот на семето, а животните во масното ткиво. Со катаболизмот на мастите се ослободува големо количество енергија потребно за извршување на биохемиските процеси на ниво на клетка. Катаболизмот (разградувањето) на мастите вклучува процес на деестерификација и ослободување на масни киселини, нивно активирање во ацил CoA, а потоа нивна разградба преку процесот на бета-оксидација на масни киселини. Една бета-оксидација вклучува две дехидрогенации, една хидратација и едно тиолитичко ослободување на C_2 -единица, ацетил коензим А (ацетил CoA) (слика 6). Остатокот од киселината е нов ацил CoA, намален за 2 C-атоми во низата, кој се вклучува во следен циклус на бета-оксидација. Создадениот ацетил CoA е активен облик на оцетната киселина кој е многу реактивен и се вклучува во различни биосинтези во секундарниот метаболизам.



Слика 6. Бета-оксидација на масни киселини и продукција на ацетил CoA

1.2. ОСНОВНИ МЕТАБОЛИЧКИ ПАТИШТА ЗА СОЗДАВАЊЕ НА СЕКУНДАРНИ МЕТАБОЛИТИ

Од примарните производи на фотосинтеза во многу краток период можат да се синтетизираат голем број различни органски соединенија, како што се: органски киселини, липиди, нуклеински киселини и др. Освен производите на примарниот метаболизам, примарните производи на фотосинтезата се значајни и за создавање на прекурсорите на секундарниот метаболизам. Според досегашните сознанија, секундарните метаболити се делат во три основни групи или класи соединенија:

- фенолни соединенија
- терпенски соединенија и
- алкалоиди.

Секоја од наведените групи се карактеризира со специфични патишта на секундарниот метаболизам. Покрај наведените главни групи (феноли, терпени и алкалоиди), како секундарни метаболити се јавуваат и различни едноставни метаболити на аминокиселини како што се цијаногените глукозиди, глукозинолати, сулфиди, алкил амиди и др. производи што се создаваат од масните киселини какви што се различните јаглеводороди и особено ацетилени и полиацетилени, како и сложени производи што настануваат со поврзување на шеќери и протеини (гликопротеини) и друго.

1.2.1. Биосинтетски патишта за создавање на фенолни соединенија

Во растенијата фенолните соединенија се синтетизираат од едноставни, примарни метаболити со ниска молекуларна тежина (на пример, едноставни шеќери, едноставни органски киселини и аминокиселини). Се добиваат со вклучување на следните биосинтетски патишта:

- патот на шикими киселината,
- патот на поликетидите, и
- комбинираната (мешаната) биосинтеза, со вклучување на двата биосинтетски патишта.

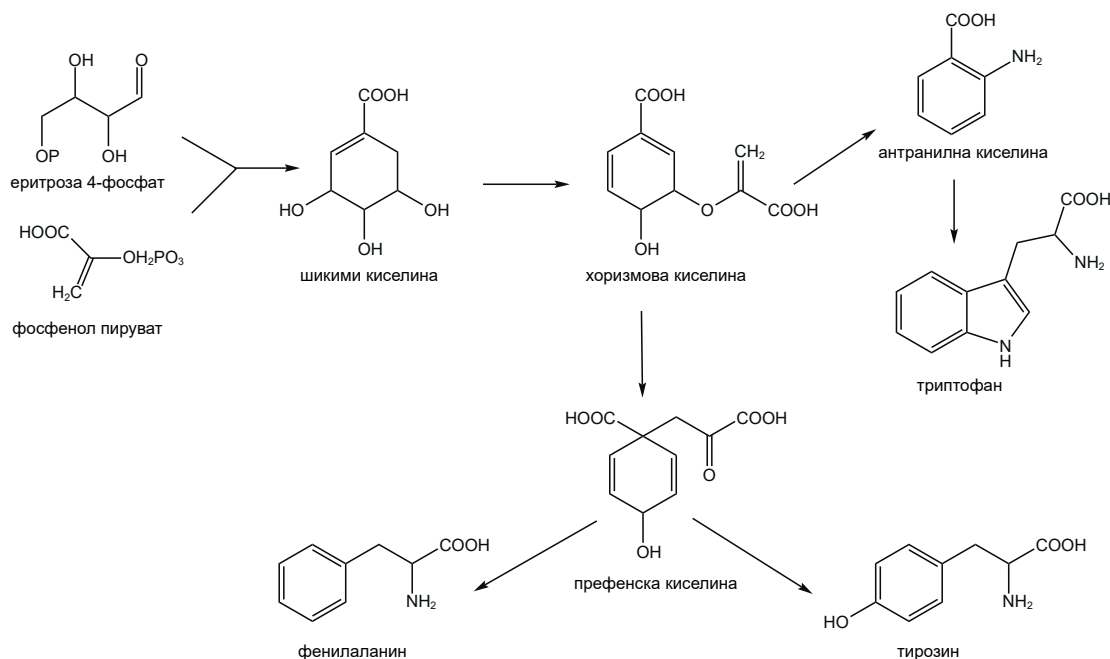
Патот на шикими киселината започнува од јаглехидратите и произведува фенолни соединенија со хидроксилни супституенти на бензоловото јадро на позициите 3 и 4 (тип на катехол) или на 3, 4 и 5 (тип на пирогалол).

Поликетидниот пат произлегува од ацетил CoA и малонил CoA и создава феноли со хидроксилни супституенти на бензол на позициите 1 и 3 (тип на резорцинол) или на 1, 3 и 5 (тип на флороглуцинол). Оттука, преку хидроксилацијата во ароматичниот прстен на фенолното соединение, може да се одреди биосинтетичкиот пат по кој е создаден.

Фенолните соединенија со повеќе од едно фенолно јадро (на пр. флавоноиди) се резултат од мешаниот биосинтетички пат и содржат ароматични прстени што се добиени по патот на шикими киселината и по патот на поликетидите.

1.2.1.1. Патоот на шикими киселината

Патот на шикими киселината во основа е биосинтетскиот пат со кој се создаваат ароматичните соединенија од групата фенилпропаноиди со основна градба C_6-C_3 . Во растенијата, фенилпропаноидите се многу значајни соединенија, што се создаваат како крајни производи или уште повеќе, како интермедиери и прекурсори во биосинтезата на другите соединенија. Особено значајни производи на шикими киселината се аминокиселините фенилаланин и тирозин. Создавањето на овие две аминокиселини е претставено на слика 7. Експериментално се утврдени и ензимите што се вклучени во оваа биосинтеза. Имено, биосинтезата започнува со поврзување на фосфоенол-пирогроздова киселина (C_3 соединение) и еритроза-4-фосфат (C_4 соединение) кои се создаваат во процесот на гликолизата. Со поврзување на двете соединенија се создава 2-кето-деокси-7-фосфо-D-глюкохептанонска киселина (C_7 соединение) која спонтано циклизира во 3-дехидрохина киселина и се редуцира до 3-дехидрошикими киселина, односно до шикими киселина која е главниот интермедиер, по која се нарекува овој биосинтетски пат. Од шикими киселината се создаваат интермедиерите хоризмова киселина, од која се создава префенска киселина, од една страна и антранилна киселина, од друга страна. Од префенската киселина се создаваат фенилпирогроздова киселина, а од неа фенилаланин, и хидроксифенилпирогроздова киселина, а од неа тирозин. Од антранилната киселина се создава аминокиселината триптофан. Со деаминација, од фенилаланинот се создава циметна киселина, а од тирозинот 4-хидроксикумарна киселина, типични фенолни фенилпропаноидни соединенија (слика 7).



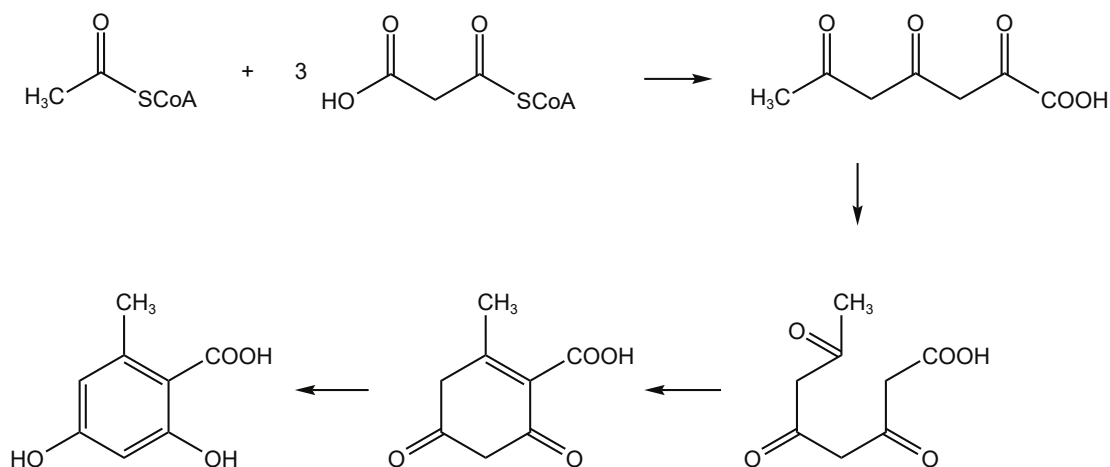
Слика 7. Биосинтетскиот пат на шикими киселина (создавање фенилпропаноиди)

Патот на шикими киселината е битен за градењето на ароматичните соединенија што влегуваат во составот на лигнани, танини и фенилпропаноидни соединенија. Значаен е за создавањето на флавоноидите, кумарините, ксантоните, стилбените и на др. соединенија.

1.2.1.2. Патот на поликетидите

Формирањето на фенолни соединенија по поликетидниот пат започнува од кондензацијата на ацетил и малонил коензим А (слика 8). Малонил CoA се формира со карбоксилација на ацетил CoA. Групата $-\text{CH}_2$ во малонил CoA се активира поради присуството на карбонилни групи од двете страни. Лесно се подложува на Клајсенова кондензација (Claisen) со ацетил CoA за да се добие ацетоацетил CoA. Понатамошната кондензација со малонилни единици дава поликетидни ланци (поли β -кетоестери) со различни должини. Биосинтезата во која учествуваат повеќе молекули активирани оцетна киселина и во која настануваат соединенија во кои групата $[-\text{CH}_2-\text{CO}-]$ се повторува неколку пати едноподруго, се вика поликетидна биосинтеза, а настанатите соединенија поликетиди (слика 8). Во литературата овие соединенија се означуваат и како полацетати, а биосинтетскиот пат се нарекува полиацетатен пат.

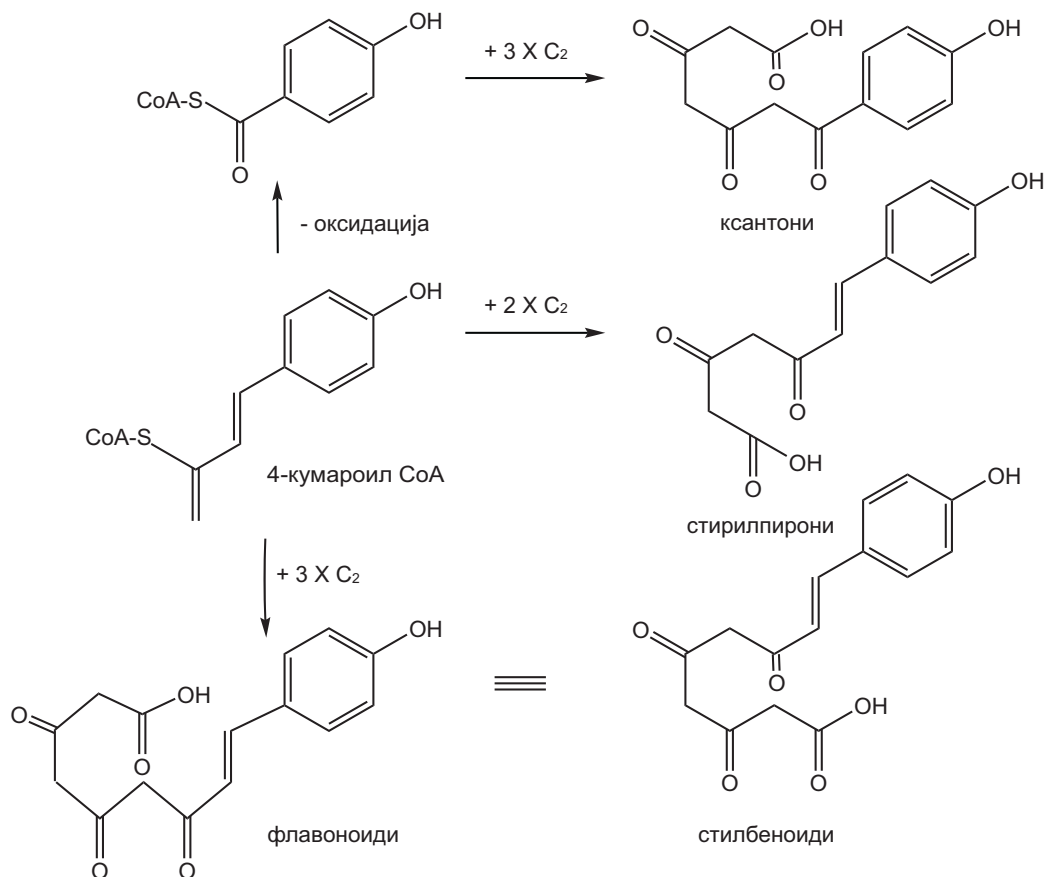
Поликетидниот ланец може да се свитка и да претрпи циклизација (интрамолекуларна алдолска кондензација) за да произведе ароматично јадро со метаориентирани хидроксилни групи (флороглуцинол). Циклизацијата на поликетидниот ланец може да се одвива на неколку начини, а за време на циклизацијата се случуваат и многу други реакции како што се оксигенација, деоксигенација, хидратација, дехидрација, декарбоксилација, О-метилација итн. Овие реакции овозможуваат создавање на антрони и на други групи поликетиди.



Слика 8. Поликетидна биосинтеза и создавање на ароматичен прстен

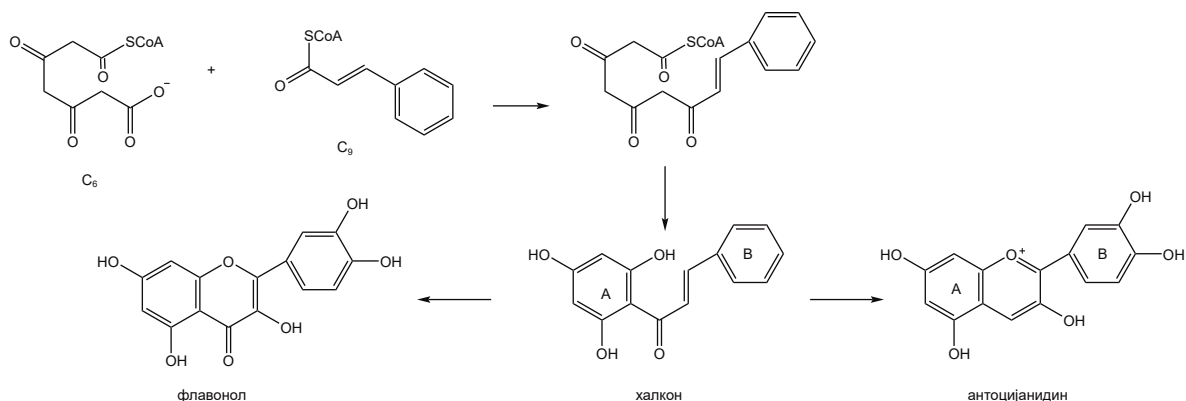
1.2.1.3. Комбинирана биосинтеза на фенолни соединенија

Фенилпропаноидните структури во растенијата се често изложени на промени во правецот на продолжување на страничната низа, со „лепење“ (надодавање) на C_2 -фрагменти, на начин како што е прикажано во случајот на циметна киселина или кај 4-кумароил CoA (слика 9). Врзувањето на C_2 -фрагменти на молекул на 4-кумароил CoA всушност значи спојување на молекул кој настанал по патот на шикими киселина со молекул кој се создал по патот на ацетатите (поликетидите). Така доаѓа до продолжување на страничната низа на фенилпропаноидот, со што се создаваат различни соединенија, од типот на: ксантони, флавоноиди, стирилпирони и стилбеноиди, кои се биолошки и фармаколошки активни.



Слика 9. Продолжување на странична низа на фенилпропаноид (4-кумароил CoA)

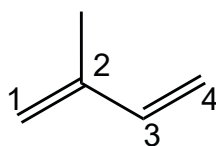
Флавоноидите се C_6 - C_3 - C_6 фенолни соединенија, каде што двата бензенски прстени се добиени по два различни биосинтетички патишта. 1,3- или 1,3,5-хидроксилиран прстен (тип на флороглуцинол) се создава по патот на поликетидите. Во структурата на флавоноидите тоа е прстенот А или C_6 фрагментот. Со вклучување на патот на шикими киселината се создава 4-, 3,4 - или 3,4,5-хидроксилиран прстен кој е фенилпропаноидниот дел со прстен В или C_9 фрагмент. Со спојување на овие два фрагменти (C_6 и C_9 фрагментите), се создава халкон, од кој понатаму се создаваат различните групи на флавоноиди (флавоноли, антоцијанидини и др.) (слика 10).



Слика 10. Спојување на C_9 и C_6 фрагменти и формирање на халкон и на флавоноидните деривати

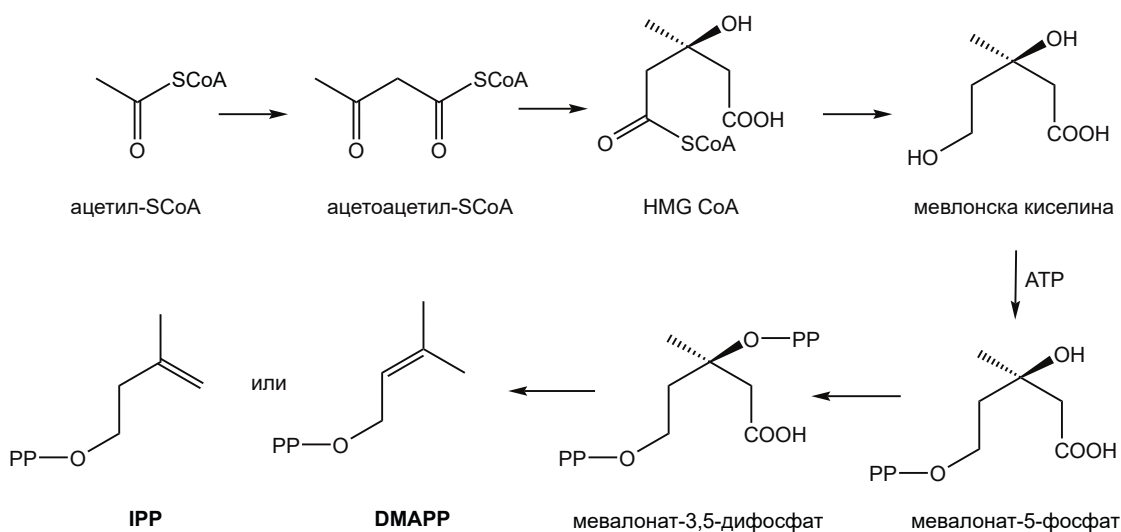
1.2.2. Биосинтеза на терпени (патот на мевалонска киселина)

Терпенските соединенија се создаваат од соединението изопрен, кој хемиски претставува 2-метил-1,3-бутадиен (слика 11). Изопренот во растенијата се јавува само во активирана форма како изопентенилпирофосфат и како таков е многу реактивен и веднаш стапува во реакција во која се поврзуваат две молекули на активиран изопрен при што се создава монотерпен. Монотерпенот може да се поврзе со дополнителни активирани молекули на изопрен со што може да се создадат други класи терпенски соединенија. Соединенијата кои се создаваат со поврзувањето на изопренот се означуваат како терпени, но може да се означуваат и како изопреноиди, поради нивното изопренско потекло.



Слика 11. Структура на изопрен

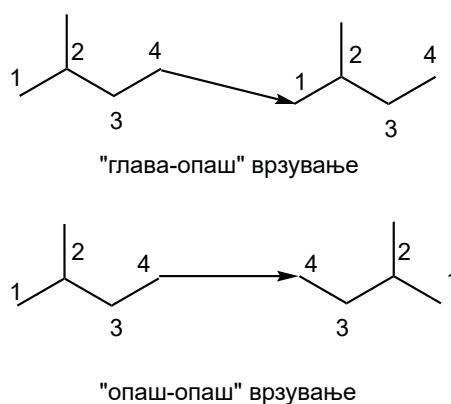
Изопренот настанува преку биосинтетскиот пат на мевалонска киселина, со поврзување на ацетил CoA со ацетоацетил CoA, при што настанува хидроксиметил глутарил CoA (HMG CoA). Од него настанува мевалонска киселина што се фосфорилира до 5-фосфомевалонат, а со дополнителна фосфорилација настанува 5-пирофосфомевалонат. Со декарбоксилација, се добива изопентенил пирофосфат (IPP) што се изомеризира во диметилалил пирофосфат (DMAPP) (слика 12).



Слика 12. Биосинтеза на изопрен (патот на мевалонска киселина)

Освен преку патот на мевалонската киселина, денес е познато дека изопренот може да се создаде и преку друг биосинтетски пат. Имено, сознанијата за постоењето на уште еден метаболен пат по кој се создаваат терпените датира од 1993 година, кога е утврдено дека IPP може да настане и од 1-деокси-D-ксилоулоза-5-фосфат. Овој дериват на ксилоулоза се формира од гликоза преку кондензација на пирогроздовата киселина и глицералдехид-3-фосфат. Наредните фази вклучуваат реорганизирање на структурата и формирање на изопентенилпирофосфат. Денес е познато дека токму овој биосинтетски пат е значаен за формирање на повеќе монотерпени што влегуваат во составот на етеричните масла на поголем број ароматични видови (нане, мајчина душица), на дитерпени (гинко, тиса) и на каротеноидите (морков). Денес дури е поставена и хипотеза дека патот на мевалонската киселина (MVA) егзистира во цитоплазматските реакции, а деоксиксилоулоза патот (DOX) е повеќе карактеристичен за пластидите.

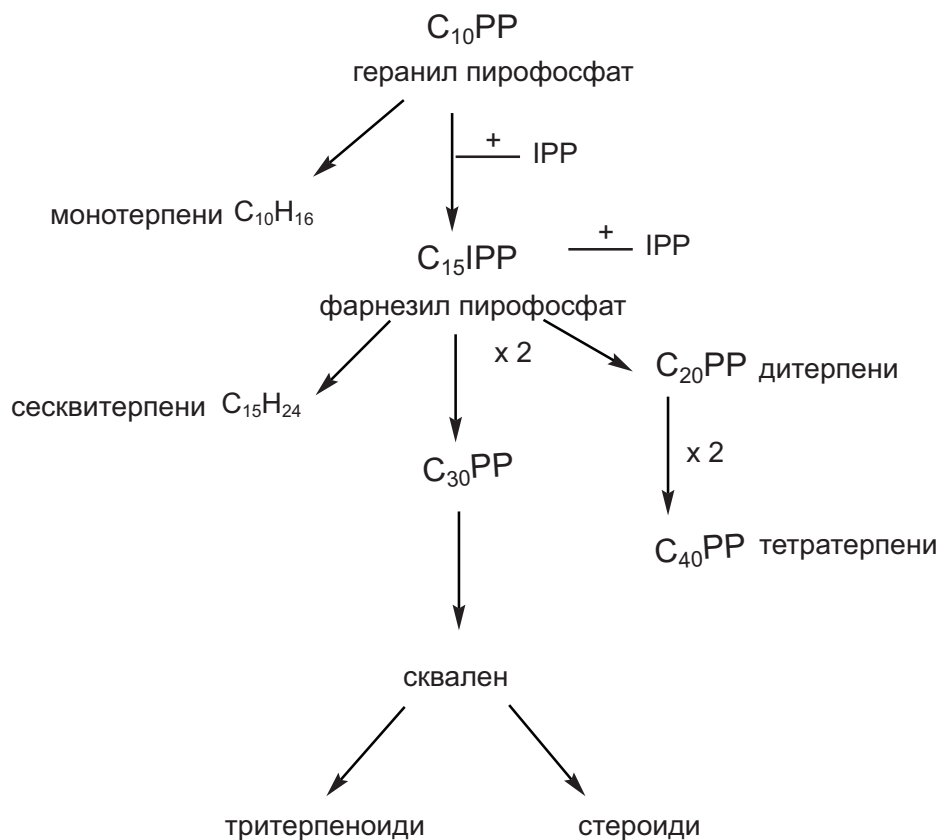
Активираниот изопрен IPP и неговит таутомер DMAPP се поврзуваат според биогенетското правило поставено од Ружичка, со „глава-опаш“ врзување и градат геранил пирофосфат (GPP), монотерпен и прекурсор на другите монотерпени (слика 13). Со вклучување на уште една молекула IPP, со ист начин на врзување, се создава фарнезилпирофосфат (FPP), основното сесквитерпенско соединение, прекурсор на другите сесквитерпени. Од FPP со уште еден IPP се создава дитерпенот геранилгеранил пирофосфат (GGPP), а од него останатите дитерпени. Од овие структури (FPP и GGPP), со „опаш-опаш“ поврзување, може да се добијат и другите терпени, три- и тетратерпени (слика 14).



Слика 13. Создавање на терпени според биогенетското изопренско правило

Во зависност од бројот на изопренски остатоци, терпенските соединенија се класификуваат во следните групи:

- Монотерпени ($C_{10}H_{16}$), два изопрена,
- Сесквитерпени ($C_{15}H_{24}$), три изопрена,
- Дитерпени ($C_{20}H_{32}$), четири изопрена,
- Тритерпени ($C_{30}H_{48}$), шест изопрена,
- Тетратерпени ($C_{40}H_{64}$), осум изопрена,
- Политерпени ($C_{10}H_{16}$)_n, 2n изопрена.



Слика 14. Создавање на различни групи терпени

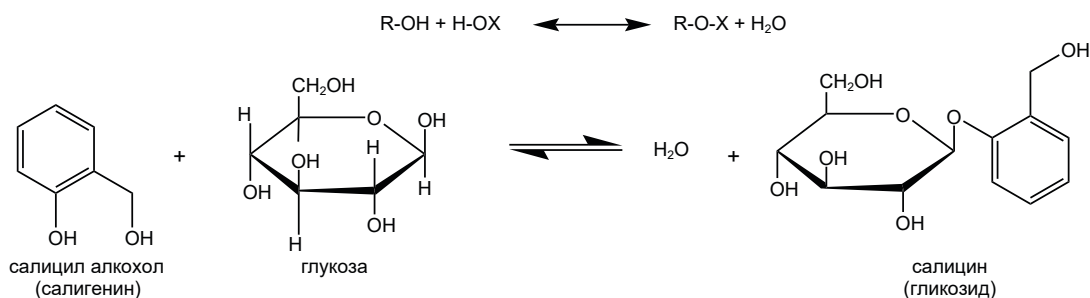
1.2.3. Биосинтеза на алкалоиди

Алкалоиди се соединенија кои во својата структура задолжително содржат азот. Тие имаат утврдени физичко-хемиски својства кои ги двојат од другите соединенија што содржат азот (различни амини, амински бази, нуклеиди и многу други соединенија, меѓу кои и аминокиселини и нивни производи). Покажуваат базни својства и со киселините градат соли растворливи во вода. За биосинтезата на алкалоидите од особено значење е создавањето на алифатични аминокиселини орнитин и лизин, на фенилпропаноидните киселини фенилаланин и тирозин, на индолната киселина триптофан, ароматичната антранилна киселина и хетероцикличната имидазолска киселина хистидин. Од овие киселини, со вклучување на голем број ензими и други прекурсори и врз база на генетските, внатрешни фактори, растенијата ги создаваат најголем дел од досега познатите алкалоиди.

1.2.4. Биосинтеза на гликозиди (хетерозиди)

Гликозиди се секундарни метаболити за чие создавање се неопходни шеќерни компоненти. Терминот гликозиди, всушност, се користи за означување многу голема и разновидна група природни соединенија, што денес се именуваат и како хетерозиди, бидејќи освен гликозата во гликон-

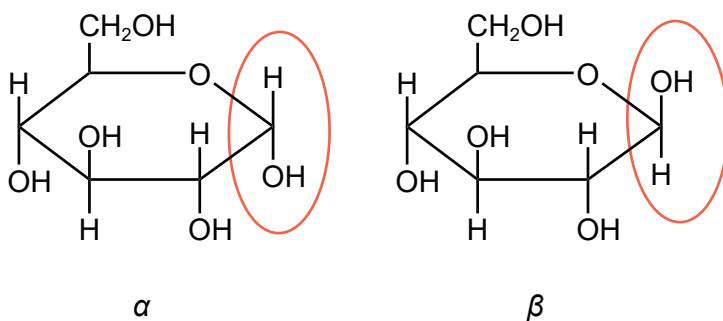
скиот дел можат да се најдат и многу други едноставни шеќери или уронски киселини. Класификацијата на овие соединенија е направена според хемиската природа на агликонскиот дел.



Слика 15. Создавање на гликозидна врска помеѓу агликонот и шеќерот (гликонот) и пример на О-гликозид (салицин)

Гликозидите (хетерозидите) се соединенија што настануваат со поврзување на полуацеталната ОН-група од шеќерот (гликон) со алкохолна или со фенолна ОН-група на друга компонента агликон. Вака настанати гликозиди се означуваат како кислородни или О-гликозиди и се најраспространети во растителниот свет. Други видови гликозиди имаат врзување преку сулфур (S-гликозиди), преку азот (N-гликозиди) или директно преку јаглеродот (C-гликозиди). Освен C-гликозидите, другите групи гликозиди се нестабилни соединенија и под дејство на ензими хидролази лесно хидролизираат до појдовните компоненти, гликон и агликон. Создавањето гликозиди е под контрола на ензими градители, а хидролизата е под влијание на специфични ензими, разградители (различни хидролази). Синтезата и хидролизата на О-гликозидите може да се претстави со равенката на слика 15. Пример на гликозидно соединение е гликозидот салицин (слика 15) што се создава со поврзување на шеќерот глюкоза со алкохолната група на салицилниот алкохол и создавање на О-гликозидна врска.

Во природата, шеќерите се јавуваат во две изомерни форми, полуацеталите α - и β - (слика 16). Сите природни гликозиди се од типот β -гликозиди/хетерозиди, а само во некои структури се јавуваат и α -поврзувања.



Слика 16. Структура на полуацеталите на гликоза (α - и β -)

1.2.5. Биолошка активност и значење на секундарните метаболити

1.2.5.1. Биолошка улога на секундарните метаболити во растенијата

Улогата на секундарните метаболити во растенијата сè уште не е доволно разјаснета. Долго време се сметаше дека тоа се споредни продукти и дека немаат никаква биолошка функција. Денес улогата на некои од нив е донекаде позната. Некои секундарни метаболити се значајни делови на ензимски системи (коензими), неопходни за клеточното дишење. За други метаболити е утврдено дека поседуваат хормонска активност и дека го регулираат растот и развитокот на растенијата. За определени секундарни метаболити се смета дека играат значајна улога во адаптивните механизми на растенијата и приспособувањето за живот во различни еколошки услови. Во оваа смисла се проучувани повеќе односи во еколошките системи, од каде што е дојдено до сознанија дека секундарните метаболити имаат заштитна улога (од инфекции од бактерии, од габи и од вируси, т.н. фитоалексинска функција), при што дејствуваат како: антибиотици, антифунгални и антивирусни агенси. Слично на тоа, секундарните метаболити можат да имаат и други значајни биолошки својства, како што се инсектицидни и ларвицидни својства и својство да ги одбиваат паразитите и животните да се хранат со растенијата, со што обезбедуваат заштита од предаторство, паразитизам, инвазија и конкуренција. Секундарните метаболити имаат значајна улога и во алелопатските односи (односите на растението со другите растенија), како и во односите на растението со другите елементи на биоценозите (земјиштето, животинските организми и човекот). Постојат секундарни метаболити што го заштитуваат растението од прекумерното ултравиолетово зрачење, прекумерната транспирација и од други неповолни еколошки фактори.

1.2.5.2. Биолошко-фармаколошка активност на секундарните метаболити и нивната практична употреба

Секундарните метаболити може да влијаат врз сите ткива, органи и органски системи во човековиот организам и да предизвикуваат различни биолошки и фармаколошки дејства. Различни растенија имаат различно значење за човекот. Некои се користат во исхраната, некои во медицински, некои во козметички цели, но голем број растенија имаат и друга комерцијална употреба во разни полиња: во прехранбената индустрија, производството на сокови, во производство на вина и други пијалаци, тутунска индустрија, кожарство, текстилна индустрија и др. Внесени преку храна, поради карактеристиките на другите состојки во храната и фактот дека се внесуваат секојдневно во многу мали количества, секундарните метаболити покажуваат определена биорасположливост од која зависат придобивките од нивното присуство во храната врз зачувување и унапредување на човековото здравје.

Најголемото значење на растителните секундарни метаболити за човекот е во доменот на фармацевтски производи. Растенијата се извонредно голем извор за добивање на секундарни метаболити чиј потенцијал за лекување на заболувања е познат од најраните цивилизации. Секундарните метаболити што се присутни во медицинските и во ароматичните растителни сировини дејствуваат биолошко-фармаколошки и се исползуваат во производство на хербални лекови наменети за постигнување на терапевтски цели. Доколку активните принципи се изолираат во чист облик и се вградат/инкорпорираат во фармацевтска дозирана форма, таквите фармацевтски производи

претставуваат лекови и се користат во терапевтски цели за третман на заболувања. Со напредокот на аналитичката хемија и биологијата, потрагата на човекот за откривање на чисти биоактивни молекули, одговорни за фармаколошките својства, а застапени во хербалните препарати што се користат во народната медицина, доведе до развој на многу нови фармацевтски производи. Со брзиот развој на фармацевтската индустрија, некои од нив станаа дури и т.н. блокбастер лекови. Некои активни компоненти се успешно синтетизирани, со што за некои од нив се решија проблемите поврзани со собирањето на растенијата, екстракцијата и изолацијата и нивното обезбедување за потребите на фармацевтската индустрија. Испитувањата на природните производи во однос на врската структура-активност обезбедија многу важни информации за активните делови од молекулите, што е понатаму искористено во насока на дериватизирање и производство на голем број синтетски аналози. Во некои случаи, некои од овие полусинтетски деривати покажаа подобра биолошко-фармаколошка активност и растворливост, поради што се избрани како подобри лекови. Студиите за биоактивност на природни производи овозможуваат откривање на одредени фармакофори (молекулски особини што се неопходни за молекулско препознавање на лигандите од страната на биолошките макромолекули) кои можат да комуницираат со некои супстрати и да обезбедат терапевтски ефект. Во полусинтетското или синтетското производство на лекови, ваквите фармакофори често се инкорпорираат во нови молекули, со цел дизајн и развој на нови лекови. Оттука, фармацевтските препарати базирани на природни производи или од природно потекло може да се категоризираат во 4 групи:

1. Фармацевтски производи развиени со изолирање на чистиот природен производ од неговиот матичен екстракт,
2. Синтетски производ идентичен на природниот производ,
3. Полусинтетски дериват на чист природен производ за подобрување на ефикасноста и испораката на лекот,
4. Производи на целосна синтеза, со фармакофор што бил присутен во природниот производ или послужил за дизајн на нов.

Растенијата сè уште се значајни како богат извор за откривање на фармацевтски интересни природни производи. Во моментот стотици лекови од растително потекло се предмет на клинички испитувања. Напредокот на биотехнологијата и на аналитичката хемија, овозможи користење на огромен број силни алатки. Брзите методи на скрининг со висока моќност, потпомогнати од роботиката, го олеснија скринингот на голем број растителни екстракти за пократко време. Напредните методи за дерепликација овозможуваат поефикасно идентификување на активните метаболити. И покрај сето наведено, се проценува дека само околу 6 % видови на вишите растенија се подложени на систематско истражување, што остава голем простор за понатамошни испитувања на растителниот свет и потрага за нови природни производи.

Покрај фармацевтската индустрија и производството на хербални и на конвенционални лекови со природно потекло, во последно време голем развој доживува и индустријата за додатоци во исхраната, која користи стандардизирани растителни екстракти со секундарни метаболити, како активни компоненти во овие производи. Интересот на производителите за овој тип на производи се должи пред сè на поедноставната регулаторна рамка и можноста за полесно пласирање на производите до потрошувачите. Денес значително е присутна и постојано растечка побарувачката за додатоци во исхраната кои се однесуваат на широк спектар на здравствени тврдења. Регулаторните тела во САД (FDA - Федерална агенција за храна и лекови), во Европската Унија (ЕМА - Агенција за лекови и EFSA - Европска агенција за безбедност на храна) и националните агенции на ниво на држави, ги утврдуваат административните аспекти за регистрација на производи-

те што како активни принципи содржат растителни екстракти со активни секундарни метаболити. Додатоците на исхраната вообичаено содржат растителни екстракти во дози што се пониски од терапевтските, не се наменети за терапија и лекување, туку за подобрување на физиолошките функции во организмот, за зајакнување и тонизирање или се користат генерално како извор на некои секундарни метаболити.

МЕТОДИ НА ЕКСТРАКЦИЈА И ИСПИТУВАЊЕ НА ПРИРОДНИ ПРОИЗВОДИ

Природните производи што се добиваат од медицински растенија имаат најголемо практично значење за човекот. Се користат за производство на хербални и на конвенционални лекови коишто во медицината се употребуваат за третман на заболувања на речиси сите органи и органски системи во човековиот организам. Се користат најчесто во форма на екстракти за производство на хербални лекови или како изолирани, хемиски чисти ентитети на секундарни метаболити, во форма на конвенционални лекови. Без разлика на тоа за каков лек станува збор, фармацевтскиот квалитет на лекот мора да биде обезбеден. Оттука, се наметнува потребата од испитување и контрола на квалитетот на екстрактите/природните производи со цел задоволувања на законските барања и гарантирање на квалитетни и безбедни производи за пациентите. Огромен број секундарни метаболити денес се испитуваат како потенцијални активни супстанции во дизајнот и развојот на нови лекови. Од друга страна, храната од растително потекло (зеленчук, овошје, житарици) е извонредно голем извор на биолошки активни секундарни метаболити што имаат потенцијал за поттикнување, модулирање и потпомагање на физиолошките процеси во организмот. Некои секундарни метаболити изолирани од зеленчуци и од некои овошја се наоѓаат во фаза на претклинички и клинички испитувања и претставуваат ветувачки супстанции што би можеле да се искористат во производство на лекови. Таков е случајот со сулфорафанот од брокулата, ресвератролот од црвеното грозје, мангостинот од мангостана овошјето и др. Природните производи се користат и во производство на додатоци на исхраната, имаат голема примена во козметичката индустрија како активни компоненти, во прехранбената индустрија како различни адитиви, во кожарската индустрија како материјали за штавење на кожата, во текстилната индустрија за производство на импрегнирани материјали итн. Од сето горенаведено, се наметнува потребата од развој на техники и методи за испитување и анализа на природните производи со цел испитување и контрола на нивниот квалитет. Овие методи вклучуваат екстракција од растителни материјали, изолатија и прочистување, структурна идентификација, како и квалитативна и квантитативна анализа. Она што секако мора да се има предвид е големата хемиска сложеност на природните производи, што го прави процесот на испитување и контрола на квалитетот на истите многу сложен. Денес се наметнува потребата за определување на хемискиот профил на производите од растително

потекло со цел обезбедување нивна подобра научна и клиничка прифатливост. Понатаму, активните компоненти на растенијата може да варираат во големи размери во зависност од времето на собирање, од нивното потекло и од другите процеси низ кои поминува собраниот растителен материјал (обработка, чистење, сушење, стерилизација, стабилизација и др.). Оттука, испитувањето и анализата на растителните производи сè повеќе се свртува кон определување на хемискиот отпечаток на прст (chemical fingerprinting), со цел поврзување на овие податоци со биолошките анализи, во насока на обезбедување гаранција за ефикасноста и конзистентноста.

Класичните фитохемиски истражувања се занимаваат со брзата идентификација и квантификација на биолошки активните природни производи во суровите растителни екстракти. Денес, развиен е широк спектар на аналитички методи за примена во фитохемиските истражувања, во фармаколошките студии или во контролата на квалитетот. Во оваа насока, аналитичките пристапи може да се класификуваат како:

- анализа на поединечни, целни соединенија, т.е. конкретно едно соединение, или
- анализа на група соединенија, т.е. анализа на одреден број (по можност сите) соединенија што припаѓаат на таа одредена група и профилирање на метаболитите насочени кон голем број примарни и секундарни метаболити од екстрактот, вклучувајќи ги и јаглехидратите, липидите, аминокиселините и др. Сè повеќе станува актуелен поимот метаболомија, којшто дефинира анализа на целиот метаболом како збир на сите соединенија што се детектираат, наместо поединечни (целни) метаболити.

2.1. ЕКСТРАКЦИЈА НА ПРИРОДНИ ПРОИЗВОДИ

Екстракцијата на природни производи од растителен материјал е процес на извлекување и изолирање на одредени корисни соединенија односно фитокомпоненти со различна биолошка активност од растителен материјал (листови, херба, корени, ризоми, семиња или плодови), при третман со течен растворувач (екстрактивно средство), а чија намена е користење во фармацевтската, козметичката, прехранбената или во други индустрии. Постојат класични и еколошки прифатливи методи на екстракција (слика 17) чија главна разлика е во влијанието што го имаат врз животната средина и здравјето.

Конвенционални методи

- **Мацерацијата** претставува едноставен, дисконтинуиран метод на екстракција, при што фитокомпонентите од интерес се извлекуваат со потопување на растителниот материјал во соодветен растворувач на собна температура. Процесот е едноставен и економичен, но има недостатоци како долготрајност на постапката (7–14 дена) поради зависноста од молекуларната дифузија, како и потребата од големо количество растворувач. Процедурата се одвива во неколку чекори: подготвување (дробење) на растителниот материјал, потопување во растворувач одредено време, филтрирање и концентрирање на добиениот екстракт како и негова анализа. Најчесто се користат растворувачи како вода, смеса од метанол и вода или други органски растворувачи. Постојат неколку видови на мацерација и тоа:
 - едноставна мацерација – се одвива во 1 фаза, се става целата количина на растворувач и мацерацијата е едноставна, но помалку ефикасна (пр. добивање на тинктура од портокал, лимон),
 - двојна мацерација - се одвива во 2 фази, количината на растворувач е поделена на 2 еднакви дела со што се добива подобрена екстракција (за добивање на концентрирана инфузија на портокал),

- тројна мацерација - се одвива во 3 фази, количината на растворувач е поделена на 3 еднакви дела со што се овозможува најефикасно извлекување на фитокомпонентите,
- како и мацерација што се врши со помош на загревање или мешање.



Слика 17. Видови на екстрактивни постапки

- **Перколација**, позната и како исцрпна екстракција, претставува процес во којшто растворувачот континуирано тече низ слој од ситно иситнет растителен материјал сместен во вертикална стаклена цевка или инка наречена перколатор, на температура од 25 °C до 60 °C. Растворувачот, додека минува низ материјалот, постепено ги апсорбира растворливите компоненти од растението. Процесот на перколација се одвива во неколку чекори (пулверизирање на материјалот, натопување односно квасење, пакување во перколаторот, мацерација, перколација, цедење, добивање на вкупен екстракт и негово концентрирање). Се применува во фармацијата за добивање на тинктури, екстракти и други лековити препарати, а се користи и во козметичката индустрија.
- **Соксклет екстракција** е постапка на континуирано извлекување на компонентата од интерес од цврста смеса, во специјална апаратура, што се состои од грејно тело за загревање, стаклен балон со растворувачот, којшто се загрева до вриење, соксклет екстрактор каде е сместен растителниот материјал (уситнет) во порозна капсула или чаура и повратно ладило каде пареите од растворувачот кондензираат и капат во резервоарот со растителен материјал за да вршат екстракција на компонентите од интерес. Процесот трае од 6 до 48 часа и овозможува речиси 100 % принос на екстракцијата. Можно е користење на растворувачи со различна поларност, што овозможува добивање различни фракции од фитокомпоненти со различна по-

ларност. Овој метод не е погоден за термолабилни соединенија (ензими, некои алкалоиди, естри, антрахинони).

- **Дестилација со водена пареа** најчесто се изведува во специјално изработена стаклена апаратура по Клевендер (поретко по Унгер или Ликенс-Никерсон) и се користи за екстракција на испарливи компоненти, пред сè за екстракција на етерични масла. Се изведува во затворена стаклена апаратура што се состои од стаклен балон, каде што се наоѓа растителниот материјал и определено количество на вода како растворувач. Грејното тело го загрева балонот и неговата содржина до вриење, настанува екстракција на испарливите компоненти со водена пареа и истите потоа кондензираат и кумулативно се собираат во собирната цевка, а водата континуирано се враќа назад во балонот, односно кружи во системот преоѓајќи од течна во гасовита состојба и обратно.

Освен класичните методи на екстракција на природни производи од растителен материјал, денес во голема мера е присутен трендот на т.н. зелена екстракција или еколошки прифатлива екстракција, којашто се карактеризира со значително редуцирање на количината на растворувачите за екстракција, скратување на потребното време, обезбедување висок принос на активни компоненти, како и голем број други придобивки. Во оваа група на техники на екстракција спаѓаат: екстракција со суперкритични флуиди, екстракција во микробранова печка, ултрасонична екстракција, ензимски асистирани екстракција и др.

Најчесто користени методи на екстракција на природни производи се:

- **Екстракција со растворувач (Solvent extraction, SE)**, е една од најкористените постапки за екстракција и добивање на природни производи. Кај оваа постапка изборот на растворувач е според поларитетот на соединенијата со цел да се добие екстракт со максимална можна количина на активни супстанции. Растителниот материјал по собирање се суши, по што е подложен и на преттретман со неполарни растворувачи (за негово обезмастување), по што следува екстракцијата на активните компоненти најчесто со примена на Сокслет апарат или мацерација (со 95 % алкохол или вода).
- **Екстракција на цврста фаза / цврсто-фазна екстракција (Solid-phase extraction, SPE)**, се заснова на задржување на растворените материи на цврст медиум (сорбент), со механизам сличен на задржувањето на молекулите во стационарната фаза во хроматографијата (адсорпција, нормална/реверзна фаза или јонска размена). Стационарната фаза (сорбентот) ја задржува компонентата од интерес, којашто потоа се елуира со соодветна мобилна фаза. Сорбентите коишто се користат се во форма на перли или се смоли и се достапни во различни пакувања (мали колонии или т.н. патрони и дискови).
- **Екстракција со суперкритична течност / суперкритична течна екстракција (Supercritical fluid extraction, SFE)** е напредна технологија којашто се користи за екстракција со примена на суперкритична течност (на температура и притисок над критичната точка) на биоактивни соединенија со висока ефикасност и селективност. Како растворувач, најчесто се користи CO_2 , поради неговите уникатни карактеристики што подразбира критична температура од 31 °C и притисок од 74 bar. Суперкритичниот CO_2 има мала поларност поради што е идеален за липиди и неполарни компоненти. Оваа карактеристика е ограничувачка за повеќето фармацевтски производи, но може да се надмине со примена на хемиски модификатори. Најважните варијабли што влијаат врз ефикасноста на оваа екстракција се: температурата, големината на честичките, притисокот, влагата, времето на екстракција, како и брзината на проток на CO_2 . Екстракцијата на биоактивните соединенија со помош на суперкритични флуиди нуди неколку предности како што се:
 - Коефициентот на дифузија на суперкритичната течност е повисок додека неговиот површински напон и вискозност се помали од оние на растворувачот што се користи како екстракција.

трактивно средство, што резултира со поголема пенетрација на растовурвачот во примерокот и поголем пренос на маса на целното соединение или група. Во споредба со конвенционалните методи, времето на екстракција со SFE може значително да се намали.

- SFE е идеална техника за екстракција на термолабилни соединенија бидејќи се изведува на собна температура.
 - Моќта на растворање може да се промени со промена на температурата или на притисокот, што ја прави суперкритичната течност селективна во споредба со течниот растворувач.
 - SFE обезбедува завршување на процесот на екстракција со повторен рефлукс на суперкритична течност во примерокот.
 - Со SFE може да се екстрахира многу мала количина на примерок, што не е случај со SE-методите.
 - Суперкритичната течност може да се рециклира и повторно да се користи со што се намалува создавањето на отпад.
 - SFE е еколошка техника бидејќи бара помала количина на органски растворувач.
 - Обемот на SFE може се движи од неколку mg (лабораториска скала) до неколку тони (t) примерок (во индустриски цели).
 - SFE не може да се користи за екстракција на силно поларни соединенија без употреба на корастворувач (како етанол или вода), и претставува скапа инвестиција што може да најде намена за широк спектар на апликации.
- **Екстракција со помош на микробранови (Microwave assisted extraction, MAE)**, е иновативна технологија за екстракција на биоактивни соединенија, особено секундарни метаболити, и се базира на примена на микробранова енергија во фреквенциски опсег од 300 MHz до 300 GHz. Механизмот на екстракција вклучува три чекори: одвојување на растворените материји од матриксот на примерокот со зголемување на температурата и притисокот, ослободување на супстанциијата од интерес во растворувачот и дифузија на растворувачот низ матриксот на примерокот. MAE како екстрактивна техника нуди многу предности: побрзо загревање и извлекување на биоактивните компоненти од матриксот, опрема со помали димензии, намалени термички градиенти и зголемување на приносот на добиениот екстракт. Времето за екстракција на биоактивни соединенија во случај на MAE е помало од конвенционалните методи на екстракција. Покрај тоа, тоа е метод од прв избор за екстракција на органски и органометални материји. Бидејќи MAE вклучува помала употреба на органски растворувач, таа исто така се смета за зелена екстрактивна техника.
- **Екстракција со помош на ултразвук (Ultrasound assisted extraction, UAE)**, е едноставен метод на екстракција бидејќи вклучува употреба на едноставна лабораториска апаратура, како што е ултразвучната бања. Со овој метод, механички здробениот примерок, по мешањето со растворувач, се третира во ултразвучната бања, при што времето и температурата на екстракција се контролираат, во зависност од карактеристиките на примерокот. UAE се применува во технологијата за преработка на храна и за екстракција на фитокомпоненти од медицински растенија и од други матрикси. Ултразвукот (повеќе од 20 kHz) предизвикува нарушување на клеточните сидови, подобрувајќи ја способноста на растворувачот да навлезе во клетките, а како резултат на тоа, се постигнува повисок принос на екстракцијата. Поради ниската работна температура, UAE произведува екстракти со висок квалитет. Придобивките од UAE се намалување на количество на растворувач, енергија и време на екстракција. UAE е многу ефикасна техника за екстракција на биоактивни супстанции од растенија и од други матрикси.

- **Екстракција со пулсирачко електрично поле (Pulsed electric field extraction, PEF extraction)** се користи за подобрување на сушењето, пресувањето, екстракцијата и дифузијата на природните производи.

PEF ја нарушува клеточната мембрана, а со тоа го зголемува приносот на екстракцијата. Кога материјалот се изложува на пулсирачко електрично поле, се генерира трансмембрански потенцијал. Ако електричниот потенцијал ја надмине критичната вредност (околу 1 V), клеточната мембрана се оштетува преку формирање на пори – електропорација. Во овој процес доаѓа до отворање на пори на клеточната мембрана и се зголемува нејзината пропустливост, со што се овозможува полесно ослободување на интрацелуларните соединенија, како што се флавоноидите, антиоксидантите, маслата и другите компоненти. Техниката е применлива кај растителни материјали како преттретман пред конвенционалната екстракција.

- **Ензимски потпомогната екстракција (Enzyme-assistant extraction, EAE).** Во растителните материјали, некои секундарни метаболити се дисперзирани во цитоплазмата, некои се сместени во клеточниот сок, а мал дел влегуваат во составот на полисахаридот лигнин, преку поврзување со хидрофобна врска или водородна врска. Преттретманот со ензими се смета за нов и ефикасен метод за ослободување на соединенијата и подобрување на приносот на екстракцијата. Преттретманот со ензими како целулаза, пектиназа и α -амилаза за време на процесот на екстракција овозможува пукање на клеточниот сид (разградување) и хидролиза на структурните полисахариди и липиди. Општо земено, се користат два типа EAE-методи: екстракција со вода потпомогната со ензими (Enzyme-assisted aqueous extraction, EAAE) и ладно цедење со помош на ензими (Enzyme-assisted cold pressing, EACP). EAAE главно се користи за екстракција на масла од семиња. Во случај на EACP-техника, ензимите се користат за хидролиза (разложување) на клеточен сид на семето. Фактори коишто влијаат на ефикасноста на екстракцијата се: видот и концентрацијата на ензимот, односот цврста фаза : вода, времето на хидролиза и големината на честичките на растителниот материјал. Техниката EACP се смета за идеална алтернатива за екстракција на биоактивни компоненти од маслодајното семе, бидејќи не се користат запаливи растворувачи и претставува еколошки прифатлив процес на екстракција. Некои испитувања покажуваат дека маслата екстрахирани со EAE содржат поголема концентрација на фосфор и слободни масни киселини, во споредба со традиционално екстрахираното масло со хексан.

- **Екстракција со течност под притисок (Pressurized liquid extraction, PLE)** е позната како подобрена екстракција со растворувач (Enhanced Solvent Extraction, ESE), забрзана екстракција со течност (Accelerated Solvent Extraction, ASE) или екстракција со растворувач под висок притисок (High-Pressure Solvent Extraction, HSPE). Во тек на PLE, се применува висок притисок којшто го одржува растворувачот во течна состојба, надвор од неговата точка на вриење. Ова резултира со намалена потреба од растворувач и намалено време на екстракција. Повисоката температура ја зголемува растворливоста на анализот и ги намалува вискозноста и површинскиот напон на растворувачите, со што се зголемува приносот на екстракција. PLE значително го намалува времето и потрошувачката на растворувачот во споредба со традиционалната Соксклет екстракција. За да се извлечат поларните соединенија, PLE се користи како потенцијална замена за SFE. Се користи за екстракција на биоактивни состојки од океански сунѓери. PLE се смета за техника на зелена екстракција, бидејќи користи мала количина на органски растворувач.

2.2. ИЗОЛАЦИЈА И ПРОЧИСТУВАЊЕ НА ПРИРОДНИ ПРОИЗВОДИ

Методите на изолација и прочистување на природните производи (секундарните метаболити) поминуваат низ еден иновативен развој во модерната ера, што резултира со развој на денешните напредни и модерни техники. Тие нудат можност за паралелно прочистување при изведување на биоанализи, истовремено обезбедувајќи изолација и сепарација, проследени со прочистување. Целта на ваков тип методи е при испитување на природните производи да се најде соодветна техника којашто може да ги следи и да ги провери супстанциите во однос на нивната биоактивност како што се антиоксидативна и антибактериска активност, цитотоксичност со поголема специфичност и др. Техниките што се спроведуваат *in vitro* генерално се претпочитаат повеќе отколку *in vivo* техниките, поради цената, времето потребно за надминување на етичките бариери и генерално работа со животни и нивно жртвување на крај од експериментот. Пример за ваква техника е биоавтографијата, техника за определување на антимикробната активност на биоактивното соединение од растителниот екстракт. Биоавтографските методи базирани на тенкослојната хроматографија (TLC), претставуваат комбинација на хроматографско разделување на тенок слој од адсорбенс и определување на активноста на самото место, олеснувајќи ја локализацијата и целно насочената изолација на активните состојки во смесата. Оваа методологија се смета за најефикасна анализа за детекција на соединенија со антимикробна активност. Биоавтографијата овозможува локализација и детекција на антимикробните соединенија на хроматограмот, со примена на три пристапи: 1. директна биоавтографија, каде што микроорганизмот расте директно на слојот од адсорбенс на TLC-плочата, 2. контактна биоавтографија, каде што компонентите со антимикробна активност се пренесуваат од TLC-плочата на инокулирана агарска плоча преку директен контакт и 3. агар-препокриена биоавтографија, каде што агарот со засадени микроорганизми како слој се нанесува директно на TLC-плочата. Зоните на инхибиција што се добиваат на TLC-плочите со една од горенаведените биоавтографски техники се користат за визуализирање на биоактивното соединение со антимикробна активност. Доколку се користат препаративни TLC-плочи со дебелина од 1 mm, со стругање на делот од адсорбенсот од плочата може да се изолираат активните компоненти. Идентификацијата на компонентите, понатаму може да се направи со високоефективна течна хроматографија (High-performance liquid chromatography, HPLC), течна хроматографија во спрега со масена спектрометрија (Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) и гасна хроматографија во спрега со масена спектрометрија (Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS). Иако има висока осетливост, биоавтографската техника има ограничена применливост, само на микроорганизми коишто лесно растат на TLC-плочи.

Поголемиот дел од природните производи (секундарни метаболити) може да се изолираат и прочистат со употреба на различни хроматографски техники како што се колонската и тенкослојната хроматографија. Двете наведени хроматографски техники се користат поради нивната ниска цена, соодветност и пристапност во различни стационарни фази. Сосема задоволително раздвојување на секундарни метаболити се постигнува на колона или на тенок слој на стационарни фази базирани на силикагел, целулоза, алуминиум или полиамид. Раздвојувањето на сложениите смеси може да биде пропратено со тешкотии, но со зголемување на поларноста на мобилните фази, што може полесно да се изведе. За побрзо и поефикасно раздвојување, изолација и прочистување на секундарни метаболити денес сè повеќе се користи HPLC. Моќта на HPLC-техниката е идеално прилагодена за анализа на повеќе компонентни примероци (екстракти), особено кај оние кај коишто биолошката активна компонента е присутна во помали концентрации. Раздвојувањето на компонентите може да се постигне со примена на HPLC врз основа на фактот дека одредени соединенија имаат различни степени на миграција на одредена колона и со определена мобилна фаза. Степенот на раздвојување најмногу зависи од изборот на стационарна фаза и на

мобилна фаза. Општо земено, идентификацијата и разделувањето на секундарните метаболити може да се постигне со помош на изократски систем (константен состав на мобилната фаза). Градиентното елуирање во коешто составот на мобилната фаза се менува со текот на времето на анализа може да биде пожелно и со поголема ефикасност на хроматографското разделување доколку се проучува повеќе од една компонента во примерокот и тие значително се разликуваат една од друга во задржувањето во воспоставените услови за работа. Прочистувањето на соединението од интерес со помош на HPLC-техника претставува процес на раздвојување или екстракција на целното соединение од мешавина со други соединенија или потенцијални контаминанти. Секое екстрахирано соединение генерира карактеристичен пик при специфични хроматографски услови. За да се постигне оптимално раздвојување, особено кога компонентите се тесно поврзани по своите физичко-хемиски својства, потребно е внимателно да се изберат хроматографските параметри, вклучувајќи: соодветна мобилна фаза, брзина на проток, тип и сензитивност на детекторот, како и најсоодветна хроматографска колона. Правилната селекција на овие услови овозможува прецизна и ефикасна изолација на целното соединение, што е клучно за понатамошна квантификација и карактеризација.

Комбинирањето на течната хроматографија (LC) со масена спектрометрија (MS) претставува моќна и високоспецијализирана аналитичка техника за анализа на сложени растителни екстракти, особено кога станува збор за природни производи и медицински растенија. Оваа комбинација овозможува детално структурно разјаснување на соединенија, дури и кога стандардите за идентификација на соединенијата не се достапни, како и анализа на компонентите во мали концентрации.

Во последните неколку години, имунохемиските методи се наметнуваат како мошне значајни алатки во анализата на биоактивните соединенија. Во овие методи се користат моноклонални антитела против активни супстанции и природни биоактивни соединенија со ниска молекулска маса, покажуваат висока специфичност и осетливост, а се користат за анализа на врзување на рецепторите, ензимски анализи и како квалитативни и квантитативните аналитички техники. Ензимскиот имуносорбентен тест (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) базиран на користење на моноклонални антитела (monoclonal antibodies, mAbs), е водечка имуноаналитичка техника што се користи за детекција и мерење на специфични биоактивни супстанции со висока прецизност. Во многу случаи, ELISA покажува повисока осетливост, особено кога се работи со трагови од соединенија или со биоматрикси кои бараат селективност. Моноклоналните антитела се произведуваат во специјализирани клетки со примена на хибридома технологија. Овој процес започнува со инјектирање на антиген во глушец (или во друг цицач), што предизвикува имунолошки одговор. Б-клетките од семејството на белите крвни клетки, произведуваат антитела коишто се врзуваат за инјектираниот антиген. Овие активирани Б-клетки потоа се спојуваат со канцерогени (бесмртни) клетки на миелом (канцерогени плазма клетки), за да се произведе хибридна клеточна линија наречена хибридома, којашто се карактеризира со долговечност и репродуктивност. Различните хибридоми може да се одгледуваат во клеточна култура. Секоја клеточна култура започнува со една одржлива хибридомска клетка, што произведува клеточни култури од коишто секоја се состои од генетски идентични клетки хибридоми што произведуваат едно антитело по култура (моноклонално), наместо мешавини на различни антитела (поликлонални). Моноклоналните антитела произведени од една линија на хибридома се хемиски идентични. Избраните хибридомски клетки се култивираат за производство на големо количество на моноклонални антитела против специфични растителни компоненти.

2.3. СТРУКТУРНА АНАЛИЗА НА ПРИРОДНИ ПРОИЗВОДИ

За определување на структурата на молекулите на природните производи се користат различни спектроскопски и спектрометриски техники, меѓу кои најзначајни се инфрацрвената спектроскопија (IR/FTIR), нуклеарната магнетна резонанца (NMR) и масената спектрометрија (MS). Овие техники овозможуваат детална анализа и идентификација на функционални групи, како и молекулска маса на природните соединенија.

- **Инфрацрвена спектроскопија, IR-спектроскопија (Infrared spectroscopy, IR-spectroscopy).** IR-спектроскопијата и Фурие-трансформираната инфрацрвена спектроскопија (Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR), се моќни аналитички техники коишто се користат за идентификација и карактеризација на фитокомпоненти и други природни производи. И двете техники се засноваат на принципот на интеракција на инфрацрвеното зрачење со молекулите. Кога молекулата апсорбира инфрацрвено зрачење, нејзините ковалентни врски вибрираат на карактеристични фреквенции. Овие фреквенции се единствен „печат“ за секоја молекула и го претставуваат нејзиниот IR-спектар. Секоја функционална група во молекулата има свој специфичен опсег на апсорпција. Со споредување на спектарот добиен со познатите спектри во базите на податоци, може да се идентификуваат присутните функционални групи. FTIR е еден од аналитичките пристапи што користи математичка трансформација (Фуриеова трансформација) со висока резолуција за препознавање на конституентите како и за разјаснување на структурата на молекулите. IR и FTIR-спектроскопијата се користат за брза и недеструктивна анализа на растителните екстракти и други природни матрикси, како и за потврдување на автентичноста на природните производи и откривање на фалсификати. Може да се користат за следење на квалитетот на сировините и готовите производи, како и на промените кои се случуваат при складирање или преработка, како и за откривање на нови биоактивни соединенија во растенијата.
- **Нуклеарна магнетна резонанца, NMR-спектроскопија (Nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR-spectroscopy).** Принципот на оваа метода се базира на магнетните својства на некои атомски јадра, особено водородното јадро (протонот), јаглеродот и јаглеродните изотопи. NMR се користи за проучување на структурата на молекулите со разгледување на разликата помеѓу различните магнетни јадра, за да се утврдат позициите на овие јадра во молекулата. Дополнително, NMR-спектроскопијата овозможува одредување на хемиското опкружување на атомите, како и присуството и типот на соседни атоми преку спин-спиновы спојувања (J-coupling). Со анализа на сигналите, може да се утврди бројот на атоми од даден тип (на пр., ^1H или ^{13}C) кои се наоѓаат во различни молекулски средини, како и нивната симетрија и број на водородни соседи. Поврзувањето со течната хроматографија доведува до воспоставување на тандем техника LC-MNR за идентификување и квантифицирање на различни секундарни метаболити: киселини, алкалоиди, бензофенони, флавоноиди, ксантони, флаванони, лигнани, токоферолы, сапонини, стилбени, хинони и др. секундарни метаболити.
- **Масена спектрометрија (MS).** Принципот на масената спектрометрија, се базира на создавање на брзодвижечки јони (со сноп од електрони или со пулсирачки ласер) од молекулите на аналитит, нивно разделување врз основа на нивниот однос маса/полнеж и детекција. Се користи за идентификација, структурна анализа и определување на молекулската маса на аналитите. Масената спектрометрија поврзана со гасна (GC-MS) и течната хроматографија (LC-MS) е моќна алатка за идентификација, структурна анализа и квантитативно определување на компоненти во сложени смеси. Во последно време, LC-MS има голема примена за анализа на фенолни соединенија.

2.4. МЕТОДИ ЗА КВАЛИТАТИВНА И КВАНТИТАТИВНА АНАЛИЗА НА ПРИРОДНИ ПРОИЗВОДИ

Анализата на природните производи (секундарни метаболити) во растителен материјал или во растителен екстракт започнува со фитохемиски скрининг при што се врши потврда на присуство на определени класи на секундарни метаболити во испитуваните примероци. Често за ваков тип на анализа се користи и терминот идентификација, при што се мисли на потврда на присуството во испитуваниот материјал, а не на структурна идентификација на компоненти. Фитохемиската скрининг анализа е едноставна, брза и евтина процедура којашто дава брз одговор за различните видови секундарни метаболити во смесата и претставува важна алатка во анализите на биоактивните соединенија. Краткото резиме на фитохемискиот скрининг на секундарни метаболити опфаќа:

– *Алкалоиди:*

а. Тест со Драгендорфов реагенс

Драгендорфовиот реагенс се состои од бизмут(III)-нитрат монохидрат ($\text{BiNO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$), винска киселина ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$) и калиум јодид (KI) и се користи за детекција на алкалоиди што содржат азотна група (терцијарни амини, но и секундарни амини) во својата структура. Терцијарниот амин се протонира во кисела средина (обезбедена од винската киселина) и се формира јонски пар што се состои од тетрајодобизмутатен јон $[\text{BiI}_4]^-$ и протониран терцијарен амин $[\text{R}_3\text{NH}]^+$. Ова може да резултира со формирање на нерастворлив обоен комплекс со жолта/портокалова/црвена или кафена боја во зависност од природата на терцијарниот амин (или алкалоид). Кај секундарните амини обојувањето е со послаб интензитет.

б. Тест со Вагнеров реагенс

Вагнеровиот реагенс претставува раствор на јод (I_2) и калиум јодид (KI) што се користи за докажување на соединенија што содржат двојни врски или незаситени јаглеродороди, но не е специфичен за алкалоидите. Некои алкалоиди што содржат двојни врски или други групи способни за редукција (како еноли или ароматични структури) може да реагираат со овој реагенс за да дадат кафено-црвен талог.

в. TLC-анализа

Разделување на компонентите од кисело-воден екстракт со мобилна фаза составена од хлороформ (CHCl_3) : метанол (CH_3OH) : 25 % амонијак (25 % NH_4OH) (8 : 2 : 0,5 v/v/v) и детекција на петната со Драгендорфов реагенс.

– *Антрахинони:*

а. Борнтрегеров тест

Специфичен тест за идентификација на антрахиноните агликонии, што имаат карбонилна група ($\text{C}=\text{O}$) којашто се активира под дејство на соседните ароматични прстени. Во алкална средина, карбонилната група може да депротонира, формирајќи фенолат јон. Овој јон се стабилизира и има карактеристична боја што може да се визуализира.

Антрахинонските гликозиди се хидролизират во кисел раствор (со хлороводородна киселина - HCl или сулфурна киселина - H_2SO_4) при што доаѓа до раскинување на гликозидната врска

и ослободување на агликонот (антрахинон) и шеќерната компонента. Ослободените антрахинони се екстрахираат со органски растворувач (како бензен - C_6H_6 или хлороформ - $CHCl_3$), по што се подвојува органскиот слој кој ги содржи агликоните и се третира со алкален раствор (како натриум хидроксид - $NaOH$ или амонијак - NH_3). Антрахинонскиот агликон реагира со алкалијата за да формира обоен (розово-црвено) фенолат јон.

– *Кардиотонични хетерозиди:*

а. Келер-Килиани тест

Специфичен тест за докажување присуство на лактонски прстен (естер на хидрокси киселина) во молекулата на кардиотоничните хетерозиди, што резултира со карактеристично црвено обојување.

б. TLC-анализа

Хетерозидите се екстрахираат со 70 % етанол (70 % C_2H_5OH), потоа со додавање на ацетат се преципитираат баластни компоненти коишто се одвојуваат со филтрирање, филтратот се обработува со натриум карбонат (Na_2CO_3) и се центрифугира, а супернатантот се суши до суво и раствора во хлороформ. Хроматографското разделување се врши со примена на мобилна фаза составена од етил ацетат ($CH_3COOCH_2CH_3$) : метанол (CH_3OH) : вода (H_2O) (80 : 10 : 10 $V/V/V$), а раздвоените петна се детектираат под UV-светлина на 254 nm.

– *Флавоноиди:*

а. Шинов тест

Метанолен екстракт се меша со магнезиум во прав (Mg) и концентрирана хлороводородна киселина (HCl) за хидролиза до агликон, при што ослободениот агликон реагира со Mg којшто се однесува како редуцирачки агенс и вклучува пренос на електрони од магнезиумот до молекулата на флавоноид, предизвикувајќи промена во неговата хемиска структура. Редуцираниот флавоноид во присуство на киселина формира обоен комплекс со розово-црвена до црвено-портокалова боја. Оваа реакцијата е бурна и мора внимателно да се изведува со заштитни очила и ракавици;

б. TLC-анализа

Екстрактот се раздвојува со мобилна фаза составена од хлороформ ($CHCl_3$) : метанол (CH_3OH) (19 : 1 V/V), а раздвоените петна се детектираат под UV-светлина на 254 nm;

в. Тест со NaOH

Метанолниот екстракт се меша со натриум хидроксид (NaOH) при што се добива жолто обојување коешто по додавање на разблажена хлороводородна киселина (HCl) се губи.

– *Пиролизидински алкалоиди:*

а. Тест со Ерлихов реагенс или *p*-диметиламинобензалдехид (*p*-dimethylaminobenzaldehyde, DMAВ – $(CH_3)_2NC_6H_4CHO$)

Хемиски тест за докажување присуство на пиролизидински алкалоиди. Принципот на овој тест се базира на електрофилан напад на алдехидната група на DMAВ на пироловиот прстен на јадрото од пиролизидинскиот алкалоид што води до формирање на нова C-C врска и генерирање на хромофор што е одговорен за појава на бојата.

– *Редуцирачки шеќери:*

а. Фелингов тест

Моносахаридите што имаат редуktivни својства односно слободна карбонилна група, се докажуваат најчесто со Фелингов реагенс, што се состои од смеса на два раствори: Фелинг 1 и Фелинг 2. Фелинг 1 претставува воден раствор на бакар (II) сулфат (CuSO_4 , сино обоен), а Фелинг 2, воден раствор на калиум натриум тартарат ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) и јака база (натриум хидроксид, NaOH). Со спојување на двата раствори (Фелинг 1 и 2) доаѓа до создавање на тартаратен комплекс со Cu^{2+} јони што го попречува таложењето на бакар (II) хидроксидот ($\text{Cu}(\text{OH})_2$). Во присуство на растворени алдехиди (слободни моносахариди) доаѓа до редукција на Cu^{2+} јоните во Cu^{1+} јони, при што се издвојува црвен талог од бакар (I) оксид (Cu_2O), а алдехидите се оксидираат до монобазни киселини со COOH -група односно до алдонски киселини. Повеќето прости моносахариди даваат позитивна Фелингова реакција, од дисахаридите лактоза и малтоза, додека сахарозата не ја дава оваа реакција, бидејќи не е редуktivен шеќер.

– *Сапонини:*

а. Тест на пенење (воден екстракт силно се протресува при што мора да формира пена на површината);

Кога сапонините се раствораат во вода, хидрофилните делови од молекулите се врзуваат за молекулите на водата, додека хидрофобните делови се стремат да се оддалечат од водата. Ова создава микроскопски структури, наречени мицели, каде што хидрофобните делови на молекулите се собираат во средината, а хидрофилните делови се насочуваат кон надворешниот дел, во контакт со водата. Кога овие молекули ќе се протресат во вода, тие ја нарушуваат нормалната структура на водата и го намалуваат површинскиот напон, односно се формира пена. Затоа сапонините се користат во производството на сапуни и детергенти.

б. TLC-анализа

Етанолниот екстракт се кондензира и соодветно се обработува со *n*-бутанол ($\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$), потоа се нанесува на хроматографска плоча, се разделува со мобилна фаза составена од хлороформ (CHCl_3) : глацијална оцетна киселина (CH_3COOH) : метанол (CH_3OH): вода (H_2O) (64 : 34 : 12 : 8 *V/V/V/V*), а по сушење се изложува на дејство на јодни пари, при што сапонините се идентификуваат преку жолтото обојување на петната).

– *Стероиди:*

а. Либерман-Бучардов тест

Колориметриски тест што се користи за докажување присуство на холестерол и други стероли. Вклучува реакција на стеролот со анхидрид на оцетна киселина ($(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$) и концентрирана сулфурна киселина (H_2SO_4), што резултира со низа промени во бојата (розова, потоа сина и на крајот зелена). Клучната функционална група вклучена во оваа реакција е хидроксилната група ($-\text{OH}$) присутна во молекулата на стеролот, конкретно на C_3 -позицијата во холестеролот. Оваа група реагира со јаката киселина и со анхидридоот по што се иницираат серија на реакции (дехидратација, оксидација и конјугација) по што доаѓа до формирање на боени соединенија.

б. TLC-анализа

Етанолниот екстракт се кондензира и соодветно обработува со *n*-бутанол ($\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$), се нанесува на хроматографска плоча, се раздвојува со мобилна фаза составена од хлороформ (CHCl_3): глацијална оцетна киселина (CH_3COOH): метанол (CH_3OH): вода (H_2O) (64 : 34

: 12 : 8 *V/V/V/V*), а по сушење се изложува на дејство на јодни пари, по што сапонините се идентификуваат преку жолтото обојување на петната.

– *Танини:*

а. Брамеров тест

Овој тест е познат како тест на фери-хлорид и се користи за докажување на танините врз основа на нивната способност да формираат обоени комплекси со јони на железо (Fe^{3+}). Оваа реакција првенствено ги вклучува фенолните функционални групи присутни во танините и тоа фенолни хидроксилни групи ($-\text{OH}$) кои се присутни во хидролизирачките танини како што се галотанини и елагнитетанини (се добива сино или црно-сино обојување), а кај кондензирани танини, проантоцианидините се добива зелено обојување поради флавоноидните единици. Реагираат и катехолните групи (дихидроксибензен) кај кондензираните танини (зелено обојување), галоил групи ($-\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3$) специфични за галотанините (сино-црно обојување), како и единиците на елагна киселина кои се среќаваат кај елагните танини (сино-црно обојување).

– *Терпеноиди:*

а. Либерман-Бучардов тест

Терпеноидите опфаќаат група на соединенија со различни структури и функционални групи, но оние кои имаат стероидна структура или хидроксилна група на одредена позиција, пример како што се тритерпеноиди (ланостеролот и циклоартенолот), може да дадат позитивна реакција при реакција со силна киселина и анхидрид.

б. Салковски тест

Терпеноидите што имаат стероидна структура или хидроксилна група на одредена позиција, пример како што се тритерпеноиди (ланостеролот и циклоартенолот), може да дадат позитивна реакција при реакција со концентрирана сулфурна киселина при што се добива црвено-кафено обојување.

– *Исфарливи (еџерични) масла.*

Растилен екстракт се меша со разблажен натриум хидроксид (NaOH) и разблажена хлороводородна киселина (HCl) при што се формира бело обоен талог.

Волуметриските техники се аналитички методи што се применуваат за квалитативно и квантитативно испитување на биолошки активни соединенија како што се алкалоидите, флавоноидите, танините, фенолите и органските киселини, а се засноваат на мерење на волуменот на реагесот кој стапува во реакција со анализираниот примерок. Волуметриските техники што можат да се применат кај секундарните метаболити вклучуваат:

1. Титрација

- Киселинско-базна титрација - се користи за квантитативно определување на органски киселини (како лимонска киселина, оксална киселина) и алкалоиди (на пример, никотин, кокаин, хинин) кои често се изолираат во форма на соли и се титрираат со киселини или бази.
- Комплексометриска титрација – овозможува квантитативно определување на метални јони (магнезиум и калциум) коишто може да бидат врзани со секундарните метаболити (на пр. фенолати или флавоноиди).

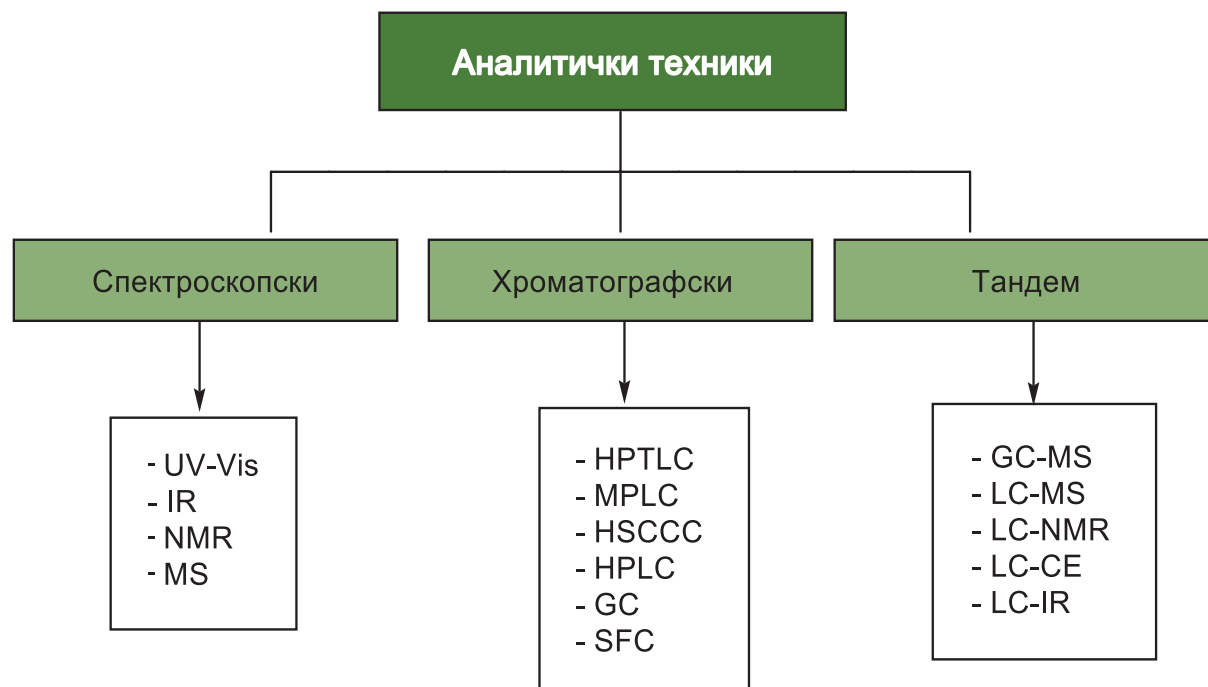
- Редокс титрација: се користи за квантитативно определување на антиоксидативниот капацитет на флавоноидите, антоцијаните, танините и полифенолите (пр. преку DPPH или FRAP-тестови).

2. Гравиметриски методи во комбинација со волуметриска анализа

Овие техники се базираат на мерење на масата на компонентата од интерес, врз основа на што се определува нејзината содржина. Иако не се прецизни како спектроскопските и хроматографските методи, сепак се едноставни, брзи и рентабилни односно економични.

Може да се користи во комбинација со волуметриските методи, често преку реакции на преципитација (на пример алкалоидите се таложат со драгендорфов реактент, а танините се таложат со тешки метали), по што се мери масата на талогот.

Дополнително, волуметриските методи се користат и во контрола на квалитетот на стандардизираниот растителен материјал со цел да се обезбеди негова конзистентност и потенција, што е клучно во фармацевтската и во козметичката индустрија. Но поради комплексноста на растителниот екстракт обично овие техники бараат дополнителен чекор на пречистување и се комбинираат со аналитички методи (хроматографија или спектроскопија) за да се постигне поголема точност и сигурност на резултатите.



Слика 18. Техники за квалитативна и квантитативна анализа на природни производи

Растителните материјали, растителните екстракти и готовите производи на база на природни материјали се состојат од стотици непознати компоненти, наместо од една компонента или едноставна комбинација на неколку компоненти. Исто така, многу од компонентите се застапени во исклучително ниски концентрации, што дополнително ја отежнува нивната идентификација

и квантификација. Дополнително, активните соединенија кои се одговорни за фармаколошкото дејство честопати сè уште не се целосно идентификувани. Терапевтската ефикасност на хербалните производи обично се припишува на повеќе активни компоненти, вклучувајќи макро- и микрокомпоненти, кои делуваат синергистички. Затоа, мултикомпонентната истовремена анализа претставува пореален и поцелосен пристап при проценката на квалитетот на ваквите производи. Понатаму, хербалните лекови, поединечно и во комбинација, содржат огромен број соединенија во сложени матрикси во кои ниту една активна состојка не е самостојно одговорна за севкупното дејство. Следствено, симултаната квантитативна анализа на различни видови активни компоненти е најефикасен и најважен метод за контрола на квалитетот. Во пракса се користат хемиски и хроматографски техники за идентификација, квантификација и карактеризација на присутните компоненти. Фитохемиската анализа вообичаено се изведува со користење на стандардизирани и валидирани аналитички методи кои обезбедуваат прецизни и репродуцибилни резултати (слика 18).

Денес, во анализата на природните производи се применува т.н. холистички пристап кој бара сема поинаква процедура од традиционалната анализа, бидејќи наместо фокусот на неколку избрани соединенија, императив е да се генерира профил од голем број конституенти. Најчесто користените техники за профилирање на метаболити и анализа на отпечаток од прсти (fingerprinting analysis) се NMR и течната хроматографија во комбинација со масена спектрометрија (LC-MS). Кога се користат непрочистени растителни екстракти за NMR-анализа, спектрите што се добиваат можат да содржат информации коишто се однесуваат на хемиските компоненти во екстрактот односно да обезбедат релативно непристрасни отпечатоци од прсти (fingerprints), но и информации кои се однесуваат на растворувачите коишто се користени за екстракција.

ЈАГЛЕХИДРАТИ

Јаглехидратите се универзални состојки на сите живи организми, покрај протеините, липидите, водата и минералите. Целата група, иако вбројува подгрупи со многу различни карактеристики, се означува со називот шеќери. Според Интернационалната унија за чиста и применета хемија - IUPAC се означуваат како глициди (од гликос = сладок) што доаѓа од слаткиот вкус на повеќето едноставни јаглехидратни соединенија. Во живите организми имаат повеќекратна функција. Во растенијата се составни елементи на градбените структури (целулоза, хемицелулоза и други полисахариди). Полимерите (како скроб) служат за депонирање на енергијата која се користи за извршување на физиолошките и на биохемиските процеси во клетките. Некои јаглехидрати се конституенти на различни метаболити, нуклеински киселини, коензими и др. состојки. Најзначаен производ на зелените растенија е јаглехидратот гликоза, што претставува енергетски извор на сите живи организми, а со негова трансформација и полимеризација се создаваат сите останати јаглехидрати.

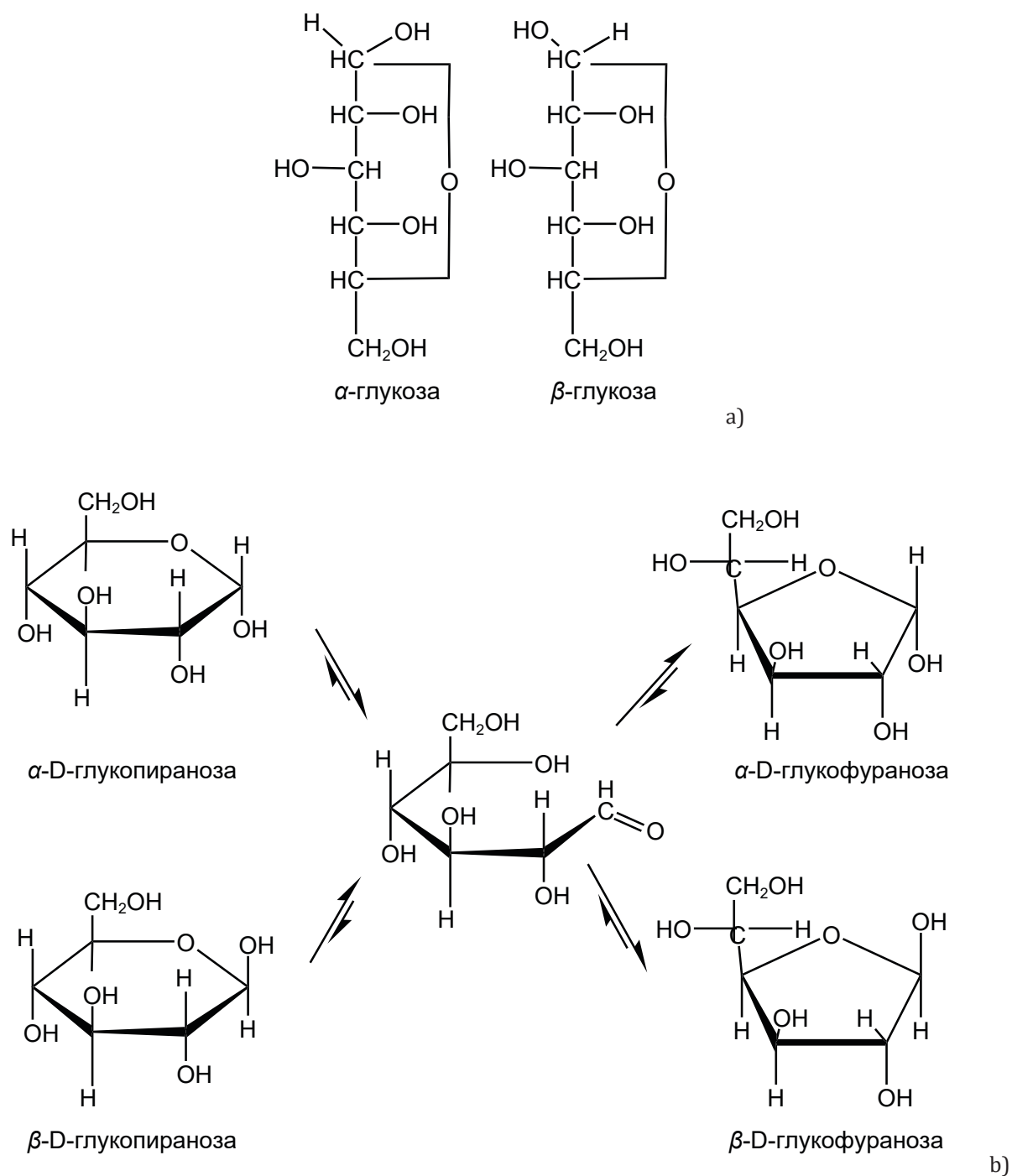
Јаглехидратите се составени од јаглерод, водород и кислород. Некои шеќери во молекулата содржат азот (аминошеќери), а некои сулфур (тиошеќери). Односот на водородот и кислородот е 2 : 1, исто како што е и во водата (оттаму е и изведено името хидрати). Мономерните структури (шеќери) се составени главно од четири до девет јаглеродни атоми поврзани во низа на што се врзани неколку хидроксилни групи и задолжително карбонилна група, алдехидна или кетонска. Оттаму, јаглехидратите се разгледуваат како полихидрокси карбонилни соединенија, односно полихидрокси алдехиди, полихидрокси кетони или соединенија коишто со хидролиза ги даваат овие состојки. Можат да бидат со едноставна градба или да се поврзуваат во помалку или во повеќе сложени структури. Оттука е изведена класификацијата на јаглехидратите на:

- Моносахариди, со општа формула $C_n(H_2O)_n$. Имаат алдехидна или кето група. Бројот на јаглеродните атоми се движи од 4 до 9.
- Олигомерни сахариди. Настануваат со гликозидно поврзување на моносахаридните молекули, во низа до 10 моносахаридни единици. Во оваа група спаѓаат дисахаридите, од кои најзначајна е сахарозата, потоа три, тетра и други олигосахариди.
- Полисахариди. Претставуваат полимерни сахариди што се составени од голем број (> 10) мономерни единици.

Ако гликозидната врска се остварува со нешеќерна молекула настануваат гликозиди (хетерозиди) или конјугирани сахариди. Гликозидите кај што врска е остварена преку кислороден атом се

нарекуваат кислородни или *O*-гликозиди. Покрај нив, постојат уште и *S*-, *N*- и *C*-гликозиди, кај што врската се остварува преку соодветните елементи.

3.1. Моносахариди



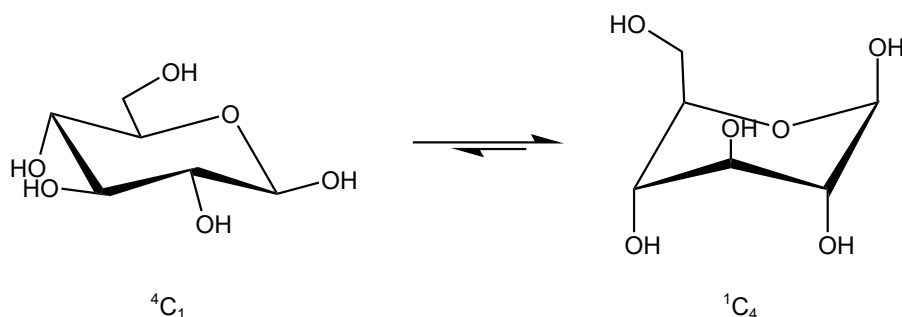
Слика 19. Циклични форми на моносахариди:
а) Фишерови проекции, б) Хавортови (Haworth-ови) проекции

Во зависност од бројот на С-атомите, моносахаридите се означуваат како тетрози, пентози, хексози, хептози и сл. Нумерирањето започнува од С-атомот на алдехидната група кај алдозите, а кај кетозите така што С-атомот од кето групата треба да има најмал можен број. Според IUPAC-номенклатурата се означуваат со кратенки од три букви (Glc = гликоза, Gal = галактоза, Man = маноза, Fru = фруктоза, Rha = рамноза и сл.). Моносахаридите поседуваат асиметрични С-атоми поради што покажуваат оптичка активност и ја вртат рамнината на поларизираната светлина десно (+) или лево (-). Според конфигурацијата на најоддалечениот асиметричен С-атом од карбонилната група, моносахаридите се јавуваат во два реда стереоизомери, за што конвенционално е прифатено да се означуваат како L- и D-шеќери.

Во природата моносахаридите егзистираат во циклична форма, во која се создава прстен или мост помеѓу карбонилната и хидроксилната група. Цикличната структура на моносахаридите може да биде фуранска, ако се остварува 1→4 врска, или пиранска, со 1→5 врска. Според тоа, шеќерите се означуваат како фуранози или како пиранози. Генерално пиранозите настануваат од алдохексози, а фуранозите од кетохексози. Циклизацијата доведува до создавање два изомерни полуацетали (хемиацетали) што се означуваат со α -и β -. Доколку аномерната -ОН-група (на C1) е на иста страна со -CH₂ОН-групата (на C5), се работи за β -аномер (*cis*). Ако се на спротивни страни, тоа е α -аномер (*trans*).

На слика 19 се прикажани α - и β -полуацетали на D-гликозата. Цикличната структура на моносахаридите може да се прикаже со Фишерови (т.н. планарни формули) и со Хавортови (Haworth-ови) проекции (т.н. перспективни формули). Кај Haworth-ови проекции прстенот се прикажува во хоризонтална рамнина, супституентите од десната страна на Фишеровата проекција се проектираат под, а оние од левата страна над прстенот. Хидроксиметилната група кај пиранозите се проектира над прстенот во d-серијата, и под прстенот во l-серијата (слика 18). Во молекулата на моносахаридите С-атомите во прстенот се sp^3 хибридизирани и главно не заземаат планарна положба, поради што шеќерите се јавуваат со повеќе конформации: стол, полустол, свиткан стол, чун и сл. (слика 20).

Моносахаридите се цврсти супстанции што тешко кристализираат и немаат добро дефинирани температури на топење. Растворливи се во вода, послабо во алкохол, а нерастворливи се во етер и во други органски растворувачи. Водените раствори се оптички активни и ги содржат сите можни изомерни форми. При загревање се топат и се карамелизираат. Во растителен материјал или во раствори се докажуваат најчесто со Фелингова реакција. Редукцијата на Фелинговиот раствор ја вршат и во полуацеталниот облик. Кетозите се докажуваат со реакција по Селиванов. Најзначајни моносахариди се гликоза и фруктоза, покрај редица други моносахарди.



Слика 20. Конформации на столица на β -D-глюкопираноза

3.1.1. Производи на моносахариди

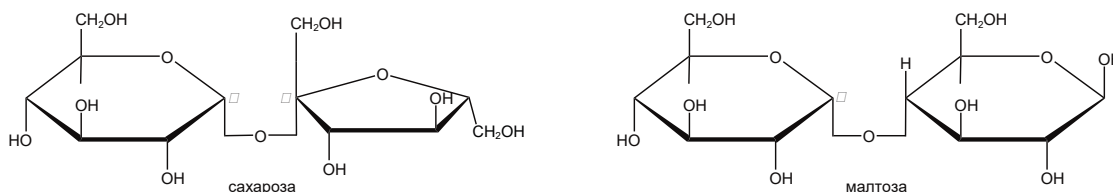
Во растенијата можат да се најдат соединенија што претставуваат деривати на моносахаридите, како што се: дезоксишеќери, шеќерни алкохоли, циклитолите и уронски киселини.

- Дезоксишеќерите за прв пат биле откриени во кардиотоничните хетерозиди. Тие содржат еден или два кислородни атоми помалку од обичните шеќери, најчесто на позициите 2 и 6, поради што се класификувани во две групи: 6-дезоксиди и 2,6-бисдезоксиди шеќери. Позначајни шеќери од овие групи се: дигитоксоза, цимароза, олеандроза и др. Кај повеќето шеќери од оваа група се јавуваат метилирани ОН-групи.
- Шеќерните алкохоли се редуцирани производи на шеќери. Распространети се во природата, а најзначајни се D-манитол и D-сорбитол.
- Циклитолите се хидроаромати, полихидроксилни производи на циклохексан. И покрај тоа што хемиски не претставуваат вистински јаглехидрати, во оваа група се вбројани поради слаткиот вкус. Меѓу нив, најголемо значење има инозитолот кој во природата се јавува во повеќе изомерни форми, а најмногу во форма на мезоинозитол. Често се среќава како естер со хексафосфорната киселина, чии Са-Mg соли се познати како фитин (растителен лецитин). Фитин е бел прав што се добива од обезмастени сончогледови семки, а се користи како нервно тонизирачко средство. Инозитолот е составна компонента на витаминскиот В-комплекс и е неопходен за раст на микроорганизмите.
- Уронските киселини настануваат со оксидација на моносахаридите, на терминалната алкохолна група. Најзначајни се D-глукуронската и D-галактуронската киселина, што ретко се наоѓаат слободни, многу повеќе се врзани во шеќерниот дел на различните хетерозиди.

3.2. Олигосахариди

Олигосахаридите што се составени од две молекули на моносахариди се означуваат како дисахариди. Во природата се среќаваат дисахариди со редуктивни особини (оние кај што едната редуктивна група од шеќерот останала слободна) и дисахариди што немаат редуктивни својства (во врзувањето на моносахаридите се вклучиле двете редуцирачки групи на двата шеќера). За шеќерите од првата група е карактеристично т.н. монокарбонилно врзување додека во втората група е присутно дикарбонилно врзување. Овие два начина на врзување се познати уште како:

- **трахелоза-тип**, нередуктивни шеќери, каде што врската се остварува помеѓу полуацеталните хидроксилни групи на двата моносахарида. Трахелозата се наоѓа во габите и во другите организми што не извршуваат фотосинтеза. Во оваа група шеќери спаѓа сахарозата (слика 21).
- **малтоза-тип**, редуктивни шеќери, каде што врската се остварува помеѓу гликозидната ОН-група од едниот моносахарид и една алкохолна група од другиот моносахарид. Од редуктивните дисахариди во природата најчести се малтоза и целобиоза (слика 21).



Слика 21. Структури на дисахариди со трахелоза и малтоза-тип на врски

Најзначаен дисахарид е сахароза, хемиски α -D-глюкопиранозил- β -D-фруктофураноза. Под дејство на киселини или на ензим инвертаза се хидролизира давајќи смеса од D-глицоза и D-фруктоза. Добиената смеса се нарекува инвертен шеќер (главна состојка на медот), со оптичка активност спротивна од онаа на сахарозата. Сахарозата е широко распространета во растенијата и особено е значајна за транспорт на енергија. Растенијата депонираат поголеми количества сахароза, најчесто во коренот, но и во други органи. Комерцијално сахарозата се добива: од шеќерна трска (*Saccharum officinarum*, Poaceae), во чии надземни делови се наоѓа до 15 %; од шеќерна репка (*Beta vulgaris*, Chenopodiaceae), која во суровите грутки содржи 16-17 % и од шеќерен јавор (*Acer saccharum*, Aceraceae), кој содржи помалку сахароза од другите извори. Сахарозата се користи во исхраната како главен засладувач, во прехранбената индустрија и во индустријата на безалкохолни пијалаци, а во фармацевтската индустрија се користи за изработка на сирупи. Наоѓа примена и во производство на таблети (во комбинација со малтодекстрин може директно да се компримира). Има различна друга комерцијална употреба.

3.3. Полисахариди

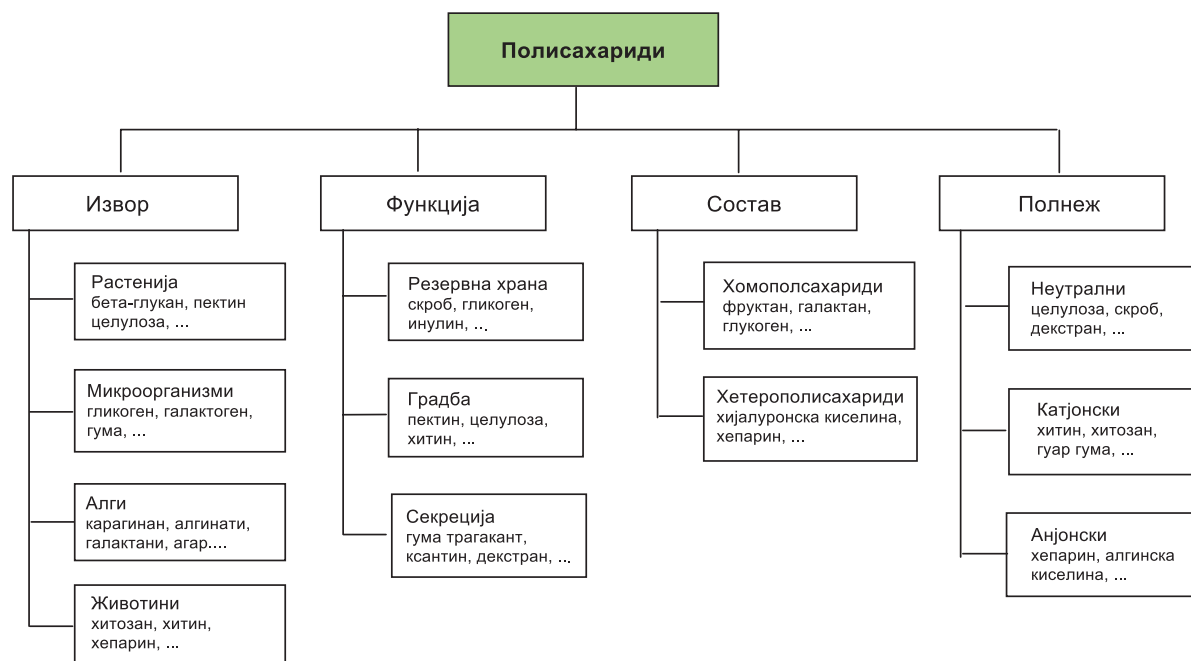
Полисахаридите се високомолекуларни соединенија, полимери што настануваат со кондензација на голем број моносахаридни молекули. Секој шеќер е поврзан со соседниот преку гликозидна врска, што се формира помеѓу две хидроксилни групи со одвојување на една молекула вода. Едната хидроксилна група е полуацеталната ОН-група на C_1 -атомот од едниот шеќер што се врзува за една од ОН-групите на другиот шеќер. Најголем број полисахариди се составени од преку 100 моносахаридни единици, но има и такви што содржат многу повеќе мономери (до 3000). Полисахаридите се карактеризираат со многу варијации во полимеризацијата и во молекуларната маса, а полисахаридните комплекси се уште посложени и содржат во себе и уронски киселини, аминокшеќери, сулфатни и фосфатни естри и други компоненти. Притоа, хомополисахаридите се полимеризати од еден ист моносахарид, а хетерополисахаридите се многу посложени соединенија, составени од различни моносахариди и од други нешеќерни компоненти.

Хемиски состав. Полисахаридните се сложени полимери, во кои D-глицозата е најзастапен моносахарид, проследен со D-маноза, D-галактоза, D-фруктоза, L-арабиноза, L-галактоза и D-ксилоза. Освен моносахариди, во градбата може да бидат вклучени аминокшеќерите (D-галактозамин и D-глицозамин), нивните деривати (N-ацетилмурамински и N-ацетилнемурамински киселини) и едноставните шеќерни киселини (идуронска и глюкуронска киселина).

Полисахаридните молекули, слично на други биополимери, претставуваат структури за кои се смета дека се формираат на 4 нивоа. Првото ниво на структурата се однесува на создавањето на базичните полисахаридни ланци со поврзување на мономерни, димерни или олигомерни едини-

ци. Сврзувањето се одвива со гликозидна врска, со еднаков или со различен тип и конфигурација. Моносахаридните единици може да бидат пентози, хексози и производи на хексози (хексауронски киселини, дезоксишеќери, хексозамини и др.). Од кетохексозите само D-фруктозата влегува во составот на некои полисахариди. Хидроксилните групи на моносахаридите може да бидат естерифицирани со оцетна, со сулфурна или со фосфорна киселина. Во пектинските материи е присутна галактуронска киселина. Моносахаридните единици се во прстенеста форма, а примарната структура на полисахаридите може да биде линеарна, циклична или разгранета. Својствата на полисахаридите зависат од својствата на мономерите и во голема мера од начинот на поврзувањето. Така, полисахаридната молекула може да биде изградена од единици на еден ист моносахарид, сврзани со ист тип гликозидни врски, а со различна конфигурација. Типичен пример за ова се целулозата и амилозата, составени од D-гликоза, поврзани со (1→4) тип на врска. Разликите се во конфигурацијата, така што целулозата претставува полимер на D-глюкопиранозни остатоци, поврзани со β -(1→4) врски, додека кај амилозата се присутни α -(1→4) врски. Различните својства на овие два полимери се очигледни и добро познати. Ако во молекулата се присутни други типови врски (1→6, на пр.), доаѓа до разгранување на низата.

Наредните нивоа на структурата се однесуваат на разликите во конформацијата на полисахаридните ланци (второ ниво), заемното дејствување, подредување, пакување и извиткување на полисахаридните единици од второто ниво и асоцирање еднакви или различни полисахариди од третото ниво, при што се формираат агрегати или асоцијати, со водородни врски, со меѓумолекуларните ковалентни врски и со друг начин на поврзување (четврто ниво).



Слика 22. Класификација на полисахаридите

Класификација и номенклатура. Полисахаридите се класификуваат во различни категории во зависност од природниот извор за нивно добивање, структурата, биолошките функции и другите фактори. Во однос на изворот за добивање се делат на полисахариди: од растително потекло (пектин, целулоза, скроб, гуми, слози итн.), од микробиолошко потекло (курдлан, декстран, целулоза итн.), од животинско потекло (хитозан, хитин, хепарин итн.) и од алги (агар, алгинат итн.) (слика 22). Според хемискиот состав полисахаридите се поделени во две основни групи:

- хомополисахариди (хомоглигани) составени од исти мономерни единици и
- хетерополисахариди (хетероглигани), со различен состав на мономерни.

Имињата на хомополисахаридите се прават кога од името на мономерот наставката -оза ќе се замени со наставката -ан (гликоза – глукан; ксилоза – ксилан, маноза – манан и сл.). Кај хетерополисахаридите, ако се составени од два мономерни името се формира со наставката анан (глуко-манан; галактоманан). Ако се составени од повеќе мономерни името завршува со гликан, а редоследот на шеќерите се прави по азбучен ред (галакто-глико-маногликан). Ако се познати типот и конфигурацијата на гликозидната врска и видот на цикличната форма, можат да се внесат во името на полисахаридот [инулин претставува β -(2 $\rightarrow$ 1)-D-фруктофуранан].

Особини. За разлика од моно и олигосахаридите, што по правило добро се раствораат во вода, полисахаридите се раствораат делумно, некои бабрат, а некои образуваат посебен вид раствори, на граница помеѓу вистинските и колоидните раствори. Најголема група се сепак растворливите во вода полисахариди. Водените раствори се вискозни, а при определена концентрација формираат гел. Оптички се активни. Под дејство на киселини или на ензими се разградуваат до соодветни моно или олигосахариди.

3.3.1. Хомополисахариди

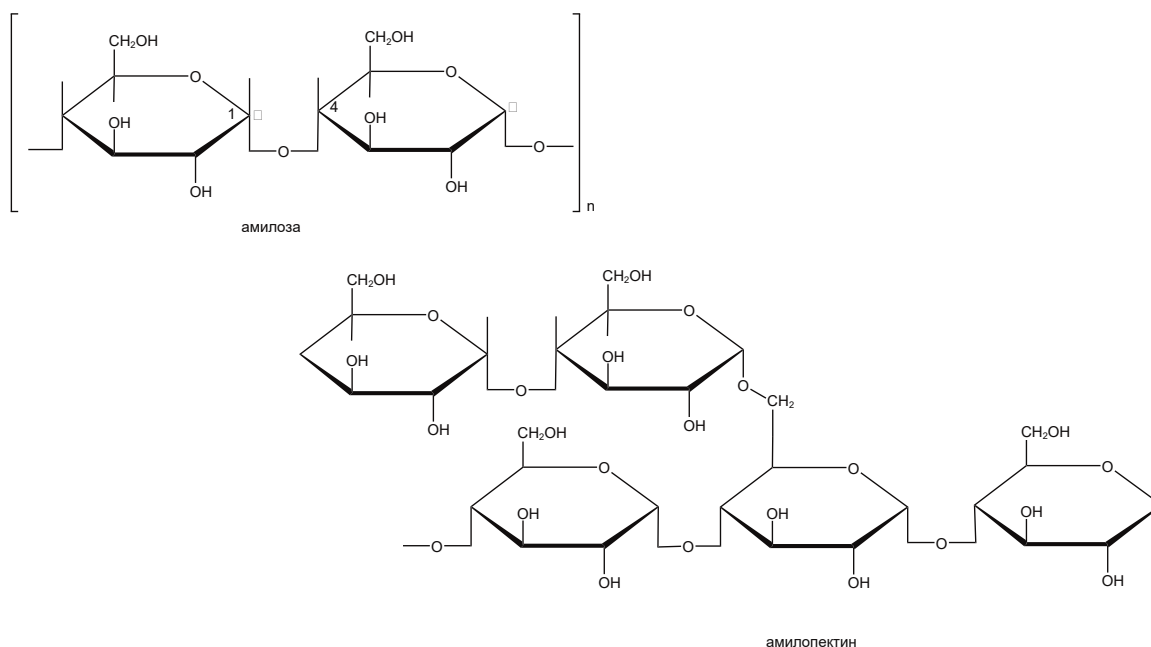
Хомополисахариди претставуваат сложени високомолекуларни соединенија составени од голем број молекули од ист моносahарид (мономер). Поголемо значење имаат следните хомополисахариди:

- **Скроб** - производ на фотосинтезата кој во облик на зрна се формира во амилопластите. Се состои од два полисахарида: амилоза и амилопектин. Амилозата се наоѓа во средишниот дел од зрната. Хемиски претставува линеарен полисахарид изграден од D-гликозидни единици поврзани со α -(1 $\rightarrow$ 4) врски. Молекуларната маса се движи околу 150 000. Растворлива е во вречка вода, а со лугол раствор се бои сино. Амилопектинот има разгранета молекула со молекулска маса од 40 000 до еден милион. Изграден е од D-гликозидни единици поврзани со α -(1 $\rightarrow$ 4) и α -(1 $\rightarrow$ 6) гликозидни врски (слика 23). Во скробот е застапен 70-80 %. Во вречка вода е нерастворлив, но набабрува и формира коиден раствор, што по ладење се претвора во гел. Со луголовиот раствор се бои црвено-виолетово.

Во практиката се користат неколку вида скроб: пченичен, пченкарен, оризов, компиров и др. Практична примена наоѓаат во фармацевтска технологија, како врзувачко средство во производството на таблети, а наоѓаат примена и во производството на пудри за посипување воспалена кожа и слузници. Големи количества скроб се трошат во прехранбената индустрија и во други комерцијални цели.

- **Декстрини** - смеса од јаглехидрати што се добиваат од скробот по хидролиза со јаки минерални киселини на повисока температура (до 200 °C) или со хидролиза во присуство на ензимот малтаза. Претставуваат жолтеникави аморфни прашести материи, со сладок вкус и со својствен мирис. Во вода даваат лепливи колоидни раствори. Со јод се бојат црвено и даваат позитивна Фелингова реакција (редуктивни шеќери). Се користат како нутритивни средства. Во фармацевтската технологија наоѓаат примена како средства за разблажување супстанции со силно/јако дејство и растителни екстракти. Комерцијално се користат во производство на лекала и во текстилната индустрија.

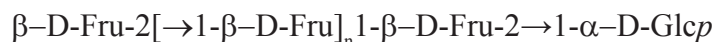
- **Циклодекстрини** - олигосахариди, составени од 6, 7 или 8 D-гликозидни единици поврзани со α -(1 $\rightarrow$ 4) врски. Се добиваат со делумна хидролиза на скроб под дејство на бактерии од родот *Bacillus*. Главниот интерес за овие соединенија доаѓа од нивното однесување во вода, во која се раствораат така што формираат нековалентни инклузии во кои може да се инкапсулираат помали молекули. На овој начин се подобрува стабилноста (термичка и хемиска), а постојат можности и за модификување на растворливоста и дисперзноста, подобрување на биорасположливоста, инхибиција на хемиски интеракции, одбегнување на гастрични или интраокуларни оштетувања и др. Циклодекстрините наоѓаат голема примена во комплексирањето на активните состојки, во производството на пестициди, детергенти, во стабилизирање на бои и ароми и др. Употребата во прехранбената индустрија е лимитирана до 3 % од масата на намирниците поради голема резистентност на ензимска хидролиза (отпорни се на α -амилазата).



Слика 23. Структури на амилоза и амилопектин

- **Декстрини** - сложени хомополисахариди што се синтетизираат од сахароза, под дејство на различни бактерии. Особено се интересни декстраните добиени од млечнокиселинските бактерии од фам. *Lactobacillaceae* (значајни се видовите: *Leuconostoc mesenteroides* и *Leuconostoc dextrinum*). Декстраните имаат разгранети молекули изградени од D-глюкопиранозни единици поврзани во главниот ланец со α -(1 $\rightarrow$ 6) врски, а во бочните ланци со α -(1 $\rightarrow$ 4) врски. Во декстраните се присутни и α -(1 $\rightarrow$ 3) врски. Молекуларните маси се движат од 10 000 до 20 милиони. Декстраните имаат повеќекратна употреба: како замена за крвна плазма (се користат посебен тип декстрини со помали молекули, од 40 000 до 100 000, со содржина од 6 до 10 %), за регулирање нарушена артеријална циркулација и за снабдување на црниот дроб со крв, во профилакса и лекување на улкусни заболувања, за лекување неспецифични колити и др. Комбинирани препарати на декстрини со железо (феридекстрини) се користат во лекување на сидеропенична анемија. Декстраните ја стимулираат синтезата на имуноглобулините, а некои имаат и антитуморно дејство. Комерцијално декстранските гелови наоѓаат примена за изработка на молекуларни сита (Sephadex G), смоли во јоноизменувачка хроматографија и др.

- **Инулин** - линеарен хомоплисахарид што се состои од D-фруктофураноза поврзана со β -(1 $\rightarrow$ 2) гликозидни врски, при што ланецот секогаш завршува со D-глукопираноза.



Инулин

Инулинот се среќава во подземните органи на претставниците од главоцветни растенија (Asteraceae). Се депонира како резервен полисахарид, некогаш во количини и до 50 %. Од растителниот материјал може да се добие со екстракција со алкализирана вода на 60-70 °C. По неутрализација и ладење, инулинот се пречистува со вриечка вода, од која со ладење прекристализира. Се раствора само во вриечка вода, а растворот се вискозни. Се користи за добивање фруктоза. Наоѓа примена и како засладувач во исхраната на лица со дијабетес.

- **Целулоза** - линеарен полимер составен од D-глукозопиранозни единици поврзани со β -(1 $\rightarrow$ 4) врски. Дополнителни интрамолекуларни, водородни врски овозможуваат формирање ланци во форма на микрофibriли со кристална структура, што може да се утврди со рендгенска дифракциона спектрометрија. Целулозата е универзален растителен полимер, задолжителен елемент во клеточните сидови на вишите растенија (Cormophyta). Претставува основна состојка на растителните влакна, што се користат за изработка на: ткаенини, коноп, рибарски мрежи, четки и низа други производи. Природните растителни влакна се користат како сировини во производство на завоен материјал (памук, дрвена вата, лен, јута и др.). Хидроксилните групи на природната целулоза можат да бидат естерификувани или етерирани. Естерификуваните деривати, нитрати и ацетати, се користат во производство на експлозиви, пластични маси, филмови, филтри, мембрани за дијализа и др. Ацетофталатите на целулоза се погодни за изработка на филмови што се резистентни на гастричен сок, додека хидроксипропилметилцелулоза фталатот се користи за изработка на микрокапсули и микрогранули со продолжено ослободување на лековитата супстанција. Естерификуваните деривати на целулоза се полимери растворливи во вода, значајни за низа технолошки апликации.
- **Диететски влакна.** Под поимот *влакна* најпрвин биле дефинирани целулозните влакна за подоцна да се усвои терминот *сурови влакна*, што означувал влакна или поточно остаток што заостанува по соодветна кисела и алкална обработка на растителниот материјал (притоа сите други органски материи се уништуваат, а заостанува само суровата целулоза и на неа сродни компоненти). Денес се користи терминот *диететски влакна*, што ги означува растителните резидуи што заостануваат по ензимска разградба на растителни производи во дигестивниот тракт на човекот, вклучувајќи ги и макромолекуларните соединенија од клеточните сидови и определени интрацелуларни полисахариди. Диететските влакна се со многу различен состав и нивната класификација е доста тешка. Во однос на растворливоста се делат во две групи: во вода растворливи и во вода нерастворливи влакна. Хемиски претставуваат сложени комплекси составени од: полисахариди (целулоза, пектини, хемицелулоза), лигнин (хетерополимер составен од фенилпропански единици, силно хидрофобен и карактеристичен за секундарната градба на клеточните сидови) и други елементи (мали количества од глукопротеини и минерали). Биолошката улога на диететските влакна за човекот е повеќекратна и сè уште е предмет на проучување. Потенцијалните ефекти зависат од хемиската природа на полимерите, порозноста, растворливоста, реактивноста на полимерите со другите молекули и сл. Досегашните резултати од низа студии укажуваат на значајни биолошки ефекти, што генерално може да се

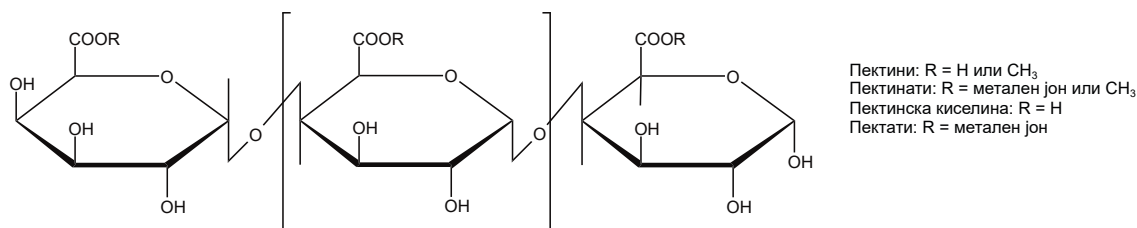
поделат во три групи: повољно дејство врз гастро-интестиналниот тракт, превентива од колоректален канцер и подобрена метаболна активност.

3.3.2. Хетерополисахариди

Полисахаридите од оваа група се изградени од различни моносахариди или од нивни производи. Во растителниот свет се многу распространети и голем број од нив наоѓаат примена во медицината, фармацијата, прехранбената и во другите индустрии. Во хетерополисахаридите спаѓаат:

- **Пектински материи** - структурни елементи на примарниот клеточен сид и на средната ламела. Во растенијата се создаваат два вида пектин, протопектини кој е нерастворлив и хидропектин кој се раствора во клеточниот сок, и во вода генерално. Во несозреаното овошје доминира протопектинот кој дополнително ја дава цврстината на плодот. Со зреење протопектинот преминува во растворлив пектин со што плодовите добиваат помека конзистенција. За производство на пектин за комерцијални потреби се користат плодови од различни цитрусни видови (агруми), јаболко, слива и отпаден материјал што заостанува по цедење на сокови. Дополнително се добива од пресуваните стеблики на шеќерна трска и од морковот.

Во хемиски поглед пектините претставуваат разгранети полисахариди составени од основен ланец од α -(1 $\rightarrow$ 4)-галактуронска киселина со странично врзани шеќери: D-ксилоза, D-арабиноза, D-галактоза и D-гликоза. Карбоксилните групи на киселината може да бидат естерифицирани со метанол или неутрализирани со метални јони (Ca^{2+} и Mg^{2+}) при што се создаваат неутрални или кисели соли. Естерските врски се најзначајни во градбата на пектинските материи бидејќи силно влијаат на нивните карактеристики. Во зависност од направените измени во основната структура разликуваме неколку групи пектински материи: пектини, пектати, пектинска киселина и пектинати (слика 24). Молекулите на пектинот може да имаат молекулска маса до 200 000 што одговара на степенот на полимеризација од илјада единици. Пектините реагираат и со амонијак и формираат галактуроно-амидни единици во пектинскиот ланец, а овој процес се означува како амидација на пектинот. Ако пектинот се користи како адитив во храната, процентот на галактуронската киселина треба да изнесува најмалку 65 %. За својствата на пектинот и неговата практична примена големо значење има степенот на естерификацијата и на амидацијата, што претставува процент на естерифицирани и на амидовани галактуронски единици во однос на вкупниот број единици. Согласно со интернационалните прописи најголемиот дозволен степен на амидација на пектинските адитиви е до 25 %. Во однос на естерификацијата, пектините со степен на естерификација поголем од 50 % се високоестерифицирани и растворливи во вода, а оние со помалку од 50 % се нискоестерифицирани и нерастворливи во вода.



Слика 24. Структури на различни пектински соединенија

Степенот на растворливоста зависи и од степенот на полимеризацијата, од рН, од температурата и од јонската сила на растворот. На растворливоста големо влијание има калциумот од водата, бидејќи ја намалува. Пектинот што содржи јони на калциум во вода создава аморфни гелови. При тоа, за раствори со помалку од 1 % пектини калциумот нема поголемо влијание, но поконцентрираните раствори покажуваат псевдопластично однесување кое уште повеќе е изразено под влијанието на калциумот.

Во зависност од појдовниот материјал пектините се како бел или светлокафеавкаст прав. Освен во вода, растворливи се и во врел глицерол, а не се растворливи во алкохол, во ацетон и во органски растворувачи. Калциумовите пектати се нерастворливи во вода. Најзначајното својство на пектинските материи е способноста при определени услови да образуваат гел. Во терапевтски цели се користат како: средства за запирање на крвавења, заместители на крвната плазма, антидоти при труење со тешки метали, за третман на гастроентерити, лекување рани што тешко заздравуваат и др. Во фармацевтската практика се користат како емулгатори и врзувачки средства во производството на голем број препарати. Пектините наоѓаат голема примена во прехранбената индустрија како гелирачки средства (производство на џемови, желеа, конзервирана храна, пијалаци и др.).

- **Хемицелулози** - хетерогена група разгранети хетерополисахариди. Влегуваат во составот на клеточниот сид. Ги има во сите растителни ткива. По физичките и хемиските својства се разликуваат од целулозата. Се екстрахираат со разредени водени раствори на бази и лесно се хидролизираат со разредени минерални киселини до моносахариди. Хемицелулозните комплекси се составени од хетерополисахариди со различен состав. Индивидуалните хемицелулозни полисахариди се делат на ксилани, арабинани, глукани, галактани, манани и др., во зависност од составот и од карактеристиките на основниот ланец.
- **Глукоманани** - резервни материи на вишите растенија слични на скробот и на инулинот. Може да бидат линеарни или разгранети хетерополисахариди, изградени од D-гликоза и D-маноза, во различен сооднос. Изолирани во чиста состојба претставуваат бел и светлокафеав аморфен прав, растворлив во вода и во алкални раствори. Голем дел од глукомананите не даваат обојување со јод. Се користат во фармацевтската технологија како емулгатори, врзиви и гелирачки средства. Некои покажуваат антивирусна активност.
- **Галактоманани** - резервни материи на вишите растенија. Во поголеми количества се наоѓаат во ендоспермот на семиња, особено во претставниците од мешункастите растенија. Галактомананите се разгранети хетерополисахариди, изградени од линеарни основни ланци, составени од D-галактоза и D-маноза. Изолирани во чиста состојба претставуваат бел до светлокафеав аморфен прав, растворлив во ладна и во загреана вода. Разредените водени раствори се многу вискозни. Поради своите карактеристични својства наоѓаат примена во фармацевтската и во прехранбената индустрија.

3.3.3. Гуми и слузи

Гуми и слузи се високомолекуларни хетерополисахариди што во вода бабрат или со вода даваат вискозни колоидни раствори (хидрогели). Се смета дека слузите се нормални состојки на растенијата, додека гумите настануваат како патолошки производ на стеблата од некои растенија, по повреда на стеблото. Молекуларните маси на гумите и на слузите се големи и се движат во широки граници, од 250 000 кај арапската гума до 800 000 во трагакантот. Гумите се лачат во форма на густ бел секрет што на воздух постепено зацврстува во аморфна стаклеста или рожеста маса. Процесот на настанување гума (*gummosis*) може да биде и нормална појава кај растенијата, но со повреда на стеблата *gummosis* се стимулира. Истекувањето на гумата може да настане како реак-

ција на неповолни надворешни услови, поради суша, при што се нарушува метаболизмот, поради инфекција предизвикана од микроорганизми, поради бодеж од инсекти или повреда нанесена од човек. Создавањето гума на некои дрва овозможува побрзо зараснување на повредите, поради што гумите имаат заштитна улога. Гумите се тврди, цврсти, крти, аморфни, на пресек стаклести (со мазна и кршлива текстура), матни или просирни грутки, што во допир со водата бабрат и даваат пивтиеста маса или колиден раствор. Водениот раствор од гумата е леплив. Гумите се создаваат во претставници од мешункасти растенија, овошните дрвенести растенија (вишна, слива и др.), како и кај фамилијата на цитрусни овошја и други растенија.

Слузите се нормална појава во клетките од ткивата што имаат функција да задржуваат вода. Во растенијата може да бидат застапени во различни количества, од 10 до 80 %. Распространети се широко во растителниот свет. Локализирани се во: листови, цветови, корени и ретко во другите делови. Според локализацијата, може да бидат мембрански (натрупани во клеточните сидови во облик на секундарни задебелувања) и клеточни слузи (во облик на безлична маса во клетките). Интерцелуларните слузи настануваат со промени на средишниот сид кај клетките (карактеристични се за алгите).

Хемиска градба и класификација. Гумите и слузите претставуваат сложени, макромолекуларни, хетерогени полисахариди со разгранети ланци, со неутрален или со кисел карактер. Во нивната градба влегуваат:

- моносахариди: алдопентози (арабиноза и ксилоза), алдохексози (галактоза, гликоза и маноза), кетохексози (фруктоза) и 6-дезоксихексози (фукоза, рамноза) и
- уронски киселини: галактуронска, глукуронска и поретко мануронска киселина.

Поради присуството на уронските киселини може да се дефинираат и како полиурониди. Притоа галактуронска и глукуронската киселина се речиси задолжителни елементи во гумите додека во слузите се застапени само во одредни случаи и таквите слузи имаат кисел карактер. Уронските киселини се карактеризираат со присуството на алдехидна и на карбоксилна функционална група. При нивното врзување во структурата на гумите и на слузите, уронските киселини се поврзуваат меѓусебно или со моносахаридните единици, на начин нивните COOH-групи да останат слободни. Доколку останат како такви, даваат кисел карактер, но можат и да градат соли со одредени катјони (Mg, Ca, K) или да се естерификуваат со определени алкохоли.

Според потеклото и според физичко-хемиските својства гумите и слузите се делат на следниот начин:

Гуми:

- растворливи гуми што содржат арабин (арапска гума),
- делумно растворливи гуми што содржат церазин (гума од цреша, слива, вишна),
- нерастворливи гуми што содржат басорин (трагакант).

Слузи:

- прости - пектински слузи,
- мешани - пектоцелулозни и хемицелулозни слузи,
- слузи со неодреден состав.

Гумите и слузите, изолирани во чиста состојба, имаат голема примена во фармацевтската, прехранбената и во другите индустрии. Во фармацевтската практика се користат изолирани гуми и слузи и растителни сировини што содржат слузи како медицински слузни сировини со демулцентно, смирувачко, навлажнувачко, антитусично и лаксативно дејство. Се користат во терапевт-

ски цели за третман на болести на респираторниот и на гастро-интестиналниот тракт и за решавање на проблеми на кожата и на слузниците.

3.3.4. Полисахариди на морски алги

Полисахаридите на морските алги во голема мера се сродни со полисахаридите на вишите растенија, но алгите содржат и специфични полисахариди, карактеристични само за нив. Количеството на вкупните полисахариди сметано на сува маса достигнува до 80 %, поради што морските алги претставуваат многу значаен извор за добивање определени полисахариди. Од црвените алги (Rodophyta) се добиваат агар и караген, а од кафеавите (Phaeophyta) алгинска киселина, ламинарин и др. Полисахаридите на морските алги имаат големо практично значење. Се користат во медицината и во фармацевтијата, во прехранбената индустрија и во други цели.

3.3.5. Протеоглигани (мукополисахариди)

Посебна група полисахаридни соединенија се протеогликаните. Претставуваат сложени биополимери составени од две компоненти, полисахаридна (до 95 %) и протеинска (до 5 %). Поради доминацијата на полисахаридниот дел имаат својства слични на полисахаридите. Имаат многу значајна улога за животинските организми. Од особено значење за фармацевтијата и за медицината се протеогликаните: хепарин и хијалуронска киселина.

- Хепаринот е изграден од две дисахаридни единици што се повторуваат, а меѓусебно се поврзани со протеин. Комерцијално се добива од црн и од бел дроб на говеда. Хепаринот е антикоагулантно средство. Се користи во третманот на: тромбо-емболични заболувања, миокарден инфаркт, венозни и артеријални стеснувања, флебити, тромбофлебите и др.
- Хијалуронската киселина е животински полисахарид. Се среќава во човечкиот и во животинските организми, слободна или во комплекси со протеини во сврзни, епителни и невронски ткива. Хемиски претставува низа од повторувачки дисахарид од D-глукуронска киселина и N-ацетилглюкозамин, што се меѓусебно поврзани со β -1,3-гликозидни врски. Има голема улога во регулацијата на пропустливоста на клеточните мембрани. Ова својство денес се користи во борбата против патогените микроорганизми. Со потполна хидролиза од хијалуронската киселина се добиваат еднакви количества од глюкозамин, глукуронска и оцетна киселина.

3.3.6. Дејство и употреба на полисахаридите

Употребата на различните полисахариди во терапевтски цели се базира на својството да создаваат колоиди. Во вода бабрат, создаваат вискозни коливни раствори што применети перорално, механички ја активираат перисталтиката на цревата, овозможувајќи лаксативен ефект. Применети во помали дози овозможуваат обратен ефект, т.е. ја впиваат течноста и дејствуваат како антидијароични средства. Некои полисахариди образуваат заштитен филм преку воспалената слузница и се користат при воспаленија на stomachно-цревниот тракт (при гастрити и enterити). Растенијата што содржат слузи и гуми се користат како антитусични и емолиентни средства. Некои слузни состојки покажуваат антибактериска и антивирусна активност. Препаратите што се добиени на база на декстрини, глюкомани и пектински материи се користат како заместители на крв-

на плазма, отпорни спрема α -амилазата од крвта. Калциум алгинатот и некои пектини се користат како антихеморагични средства. Некои полисахариди од морски алги се користат како антикоагуланси. Полисахаридите од групата на глуманани, како и некои хемицелулозни растителни комплекси (арабиноксилани, арабиноглукуроноксилани) покажуваат антитуморна активност.

Комерцијално полисахаридите широко се користат како емулгатори и стабилизатори во фармацевтската индустрија, при производство на емулзии и на суспензии, како пополнувачи при производство на таблети, дражеи, гранули и др. Широко се користат и во производството на козметичките препарати. Освен во фармацевтскиот сектор, растителните полисахариди нудат различни апликации во прехранбениот сектор со посебни предности во однос на синтетичките полимери, вклучувајќи ја достапноста (растенијата што ги содржат растат во природата во изобилство или се култивираат), биокомпатибилност, биоразградливост, ниска токсичност, способност за бабарење и растворливост во вода. Основната причина за рапидно зголемениот интерес за различни растителни полисахариди е погодност на растенијата за одгледување и берба, што обезбедува континуиран извор на сировини од растително потекло за екстракција на полисахариди. Овие биополимери се составени од повеќе моносахаридни единици со висока молекулска маса и стабилни структури поради нивните силни меѓумолекуларни интеракции. Шемите на разгранување, поврзувањето, секвенционирањето и дистрибуциите на страничните синцири на слични или различни моносахаридни единици се организирани во исклучително сложени молекуларни структури. Понатаму, растителните полисахариди содржат бројни функционални групи кои можат да се променат или изменат за да генерираат висококвалитетни полисахариди. Различни нови природни полисахариди од растенија, несварливи во дигестивниот тракт на човекот, се воведени во исхраната, вклучително и обезмастени сурови полисахариди од остатоци од кокос, гума трагакант и друго, кои придонесоа за развој на нова функционална и особено ферментирана храна. Се покажа дека овие полисахариди ја подобруваат текстурата, сензорните (мирис, вкус) и нутритивните својства и ја подобруваат ефикасноста на исхраната, биолошката активност и хранливите својства на ферментираната храна.

3.4. ЕКСТРАКЦИЈА И ИСПИТУВАЊЕ НА ЈАГЛЕХИДРАТИТЕ

3.4.1. Екстракција, прочистување и сепарирање

Екстракција на едноставни шеќери. Еден од најчесто користените методи за екстракција на јаглехидрати со мала молекуларна маса (моно и дисахариди, помали олигосахариди) е варење на обезмастениот примерок (од храна, од растителен материјал) со 80 % раствор на етанол. Моносахаридите и олигосахаридите се растворливи во разблажен алкохол, додека протеините, полисахаридите и диететските влакна се нерастворливи. Растворливите компоненти може да се одвојат од нерастворливите со филтрирање на зовриениот раствор и собирање на филтратот (делот што минува низ филтерот) и делот што заостанува на филтерот. Овие две фракции потоа може да се исушат и измерат за да се одредат нивните маси. Покрај тоа, алкохолниот екстракт што содржи моносахариди и олигосахариди може да има и разни други мали молекули кои се јавуваат како придружни компоненти, на пр., аминокиселини, органски киселини, пигменти, витамини, минерали итн. Обично е неопходно да се отстранат овие компоненти пред да се спроведе анализа на јаглехидратите. Ова најчесто се постигнува со третирање на растворот со средства за избистрување или со негово пропуштање низ една или низ повеќе јоно-изменувачки смоли. Најчесто употребуваните средства за избистрување се соли на тешки метали (како што е олово ацетат) кои формираат нерастворливи комплекси со придружните компоненти, кои може да се отстранат со филтрација или со центрифугирање. Притоа, битно е средството за избистрување да не таложи ниту

еден од јаглехидратите од растворот. Јоноизменувачките смоли вршат размена на јони. Многу од моносахаридите и олигосахаридите се поларни, но се ненаелектризираните молекули кои со пропуштање низ вакви смоли лесно може да се раздвојат од наелектризираните молекули. Со користење на комбинација од позитивно и негативно наполнета колона, можно е да се отстранат повеќето јонски придружни соединенија.

Екстракција и прочистување на полисахариди. Во вода растворливите полисахариди најчесто се екстрахираат со вода, на ладно или на собна температура. Растворливоста на некои полисахариди се зголемува со покачување на температурата или со промена на pH. Разликите во растворливоста се користат и за фракционирање на полисахаридите (со топла вода се издвојува амилоза од амилопектинот, кој само набабрува, а не се раствора). Киселите полисахариди најдобро се екстрахираат со разредени минерални киселини, додека хемицелулозата и растителните гуми со алкални раствори. Полисахаридите што се нерастворливи во вода и што имаат многу стабилна структура како што се целулозата и хитинот, од растителниот материјал се изолираат по минерализирање со јаки минерални киселини и оксидација на органските состојки со оксидациони средства, при што целулозата и хитинот заостануваат како остаток по ваква минерализација.

За екстракција и изолација на природните полисахариди се користат различни техники на екстракција, кои покрај тоа што треба да бидат ефикасни, мора дополнително да го задоволат основниот принцип, а тоа е спречување на денатурација на полисахаридите. Тековните методи за екстракција на растителни полисахариди вклучуваат UAE, ASE, EAE, ензимска екстракција со помош на ултразвук (UVE), MAE, екстракција со помош на ултразвук со микробранови (UMAE), екстракција со ултрависок притисок (UHPE) и SFE, кои покажаа многу поголема ефикасност на екстракција во споредба со традиционалната екстракција со топла вода (HWE). Секој пристап има посебни придобивки и ограничувања во однос на економските трошоци, сложеноста на материјалот, потрошувачката на време, ефектите врз животната средина, енергијата и ефикасноста на екстракцијата. MAE заштедува време и е еколошки обоена техника бидејќи користи помалку растворувачи и енергија и користи микробранова радијација за да го зголеми преносот на маса на целните компоненти. Сепак, микробрановите ја менуваат структурата на полисахаридите и самото изведување на постапката е релативно скапо. Методот UHPE ја зголемува растворливоста на целните соединенија, овозможувајќи подобро навлегување на растворувачот во матриксот на примерокот, со намалена потрошувачка на растворувачи. Негативната страна е што овој процес може да влијае на хемиската структура на полисахаридите. Екстракцијата со алкален растворувач е брз, енергетски ефикасен процес со најмалку растворувачи и може да произведе висок принос на екстракција. SFE е одличен метод за екстракција на растителни полисахариди бидејќи не е загадувач, не е токсичен и ја одржува активноста на полисахаридите. Сепак, поради високата цена и продолженото време на екстракција, најчесто се користи за екстракција и подготовка на други активни компоненти од растително потекло, а многу ретко за полисахаридните соединенија. Најчесто применуваниот метод за екстракција на полисахариди е комбинација на топла HWE и ензимски методи, кои покажаа дека генерираат повисоки приноси и поголема чистота на полисахариди, во споредба со други методи. Покрај тоа, ензимите целулаза, протеаза, пектиназа, и др. се користат за хидролизирање и разградување на растителните ткива во релативно умерени услови (благи услови на реакција, кратко време, намалено количество на хемиски реагенси), но мора да се нагласи дека цената на ензимите е релативно висока.

Изолирање на полисахаридите од примарните сурови екстракти се изведува со „перење“ со: етанол, метанол, ацетон или друг растворувач со кој се отстрануваат пониските јаглехидрати, моносахариди и олигосахариди и другите нискомолекуларни соединенија (пептиди, аминокиселини, соли и др.). За отстранување на протеините се применува претходна обработка на растителниот материјал со метанол или со етанол на водена бања, со што се врши денатурирање на протеините и инхибиција на ензимите. Со овие постапки се изведува првичното прочистување на полисахаридите. Понатамошните постапки на прочистување вклучуваат методи на дијализа, ултрафилтрација, хроматографски методи (гел филтрација на декстрански гел како што е Sephadex,

и др.). Прочистувањето на природните јаглехидрати може да се постигне со хроматографија со низок притисок. Фракционирањето на гликаните често се изведува со лектин-афинитетна хроматографија на различни комерцијално достапни лектински потпори. Недоволно дериватизирани природни гликани често се прочистуваат со гел-пермационна хроматографија (gel permeation chromatography) користејќи високоперформансна течна хроматографија.

Фракционирање на полисахаридите е доста тешко и деликатно. Често се користи нивно преципитирање со определени растворувачи во кои тие не се растворливи, со додаток на соли или со промена на рН. Во текот на нивното раздвојување и пречистување се користат физички и хемиски методи за следење на успешноста на постапките (се определува оптичката ротација, молекуларната маса, елементарниот состав, електрофоретските карактеристики и др.). Со цел подобро откривање и олеснето раздвојување, природните јаглехидрати може да се дериватизираат со користење на UV-активни хромофори, по што следува HPLC- прочистување и анализа на дериватизирани производи, најчесто со користење на реверзно-фазен систем (RP-HPLC).

Екстракција и прочистување на гуми и слузи. Изборот на постапката за екстракција на гуми и слузи е клучен фактор во испитувањето на овие состојки во растителни материјали. Вообичаено растителниот материјал се суши на сончева светлина или во сушилница на 105 °C. Од материјалот е потребно да се отстранат хлорофилот и другите пигменти, што се постигнува со обработка со петролетер или со хлороформ. Гумите и слузите потоа се екстрахираат со вода, а добиените изолати се сушат на ниска температура (не повеќе од 50 °C) или под вакуум и внимателно се складираат во десикатори, за да се спречи навлегување на влага и процеси на разградување. Екстракцијата може да се изведе со микробранови во микробранова печка. Овој метод е едноставен, чист, брз, еколошки и задоволително ефикасен.

3.4.2. Идентификација и квантификација

Идентификација на едноставни шеќери. Класични хемиски реакции за идентификација, односно докажување присуство на шеќери во храна или во друг природен материјал, се т.н. боени реакции, од кои најзначајни се:

- Молишов тест (Molisch's Test), општ тест за јаглехидрати. Сите групи на јаглехидрати реагираат со Молишов реагенс по дехидратацијата на јаглехидратите со концентрираната сулфурна киселина до алдехиди, кои во реакција со α -нафтол формираат виолетово обоен производ.
- Фелинг тест (Fehling's test), со кој се докажува присуство на редуktivни шеќери, односно јаглехидрати кои имаат слободни или потенцијално слободни карбонилни групи (алдехидна или кетонска). Растворот на Фелинг има интензивно сина боја и се состои од бакар сулфат измешан со калиум натриум тартарат и силна алкалија, најчесто натриум хидроксид. Ако по додавање на Фелинг тест во испитуваниот екстракт, по загревање се добие црвен талог, со сигурност го докажува присуството на редуktivните шеќери. Добиениот талог е купри оксид (Cu_2O), а се создава при редукцијата на Cu^{2+} јони од Фелинговиот раствор во Cu^{1+} јони, во алкална средина, под дејство на редуktivните шеќери.
- Бенедикт тест (Benedict's Test), со кој се докажува присуство на редуktivни шеќери во алкална средина. Се користи натриум карбонатот кој ја конвертира гликозата во енедиол, а енедиолот го редуцира купро јонот (Cu^{2+}) во купри јон (Cu^{1+}) формирајќи бакар хидроксид $\text{Cu}(\text{OH})_2$. Овој раствор се меша со натриум цитрат и се загрева до вриење при што се формира црвен талог од купри оксид (Cu_2O).
- Толеновиот тест (Tollen's Test), со кој се докажуваат редуktivните шеќери. Јаглехидратите во реакција со Толенов реагенс формираат сребрено огледало на внатрешните ѕидови од садот

во кој се изведува тестот (најчесто епрувета). Толеновиот реагенс е алкален раствор на сребро нитрат (AgNO_3) измешан со течен амонијак (NH_3), што резултира со формирање на комплекс – активен сребро-амонијум катјон $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ кој е примарната компонента на Толеновиот реагенс и е силен оксидирачки агенс. Комплексот ги оксидира алдехидните групи на шеќерите до карбоксилни киселини, а сребрените јони присутни во реагенсот се редуцираат до елементарно, метално сребро кое се распределува по дното и по ѕидовите на садот (со формирање на сребрено огледало).

- Реакција со јод. Се користи за докажување присуство на скроб, кој реагира со јоден раствор и формира комплекси со сина боја. При загревање сината боја исчезнува, а при ладењето сината боја повторно се појавува.

Идентификација на гуми. Сложеноста на хемискиот состав на гумите бара употреба на софистицирани техники на анализа, спојување на различни методологии и, често, дериватизација на конституентите. Еден од првите искористени тестови се заснова на реакцијата на *o*-толуидинскиот реагенс со компонентите на гуми, што резултира со развивање на боја чиј интензитет може да се мери со UV-Vis-спектроскопија. Гумите и слузите што се составени главно од алдохексози и алдопентози, во оваа реакција создаваат кафено обојување. За првична потврда на присуство на определени гуми може да се искористи различната растворливост и таложувањето на некои компоненти, како во случајот со арапската гума, која не се талози во неутрален раствор на олово, туку со една капка железен хлорид (10 %) формира талог, кој е нерастворлив доколку е присутен вишок на хлорид. Сепак, овие пристапи овозможуваат добивање само на прелиминарни информации. Значајна техника што се користи за идентификација на гумите е IR-спектроскопијата, со оглед дека гумите даваат карактеристичен „отпечаток од прст“ во регионите од 7 до 15 μm што води до класификација во четири главни групи: I (гуар гума), II (караја гума), III (арапска гума) и IV (пектински материи). Во оваа методологија, најдобри квантитативни резултати се добиени со користење на KBr-диск (калиум бромиден диск).

Хроматографските техники се многу корисни за раздвојување и идентификација на гумите. Првите хроматографски сепарации се извршени со примена на хартиена хроматографија, по вклучена блага хидролиза, за да се избегне распаѓање на некои од составните компоненти, но техниката се карактеризира со долгото време на изведба, со проблематична резолуција и со нејасни граници на детекција. HPLC и GC-MS ја заменија претходната техника, поради несомнените предности. Со помош на масената спектрометрија може да се идентификуваат т.н. сахаридни отпечатоци од прсти, по контролирана ензимска хидролиза на гумите. Гумите може да се анализираат и со капиларна електрофореза.

Идентификација на слози. Прелиминарна потврда за присуство на слози може да се направи со Молишов тест (Molisch's test) кој протекува со формирање на виолетово-зелена боја во присуство на јаглехидрати; со тест со рутениум (доведува до формирање на розова боја поради присуство на слуз); со тест со јод (не треба да се развие боја со што се потврдува чистота и отсуство на скроб); со ензимски тест (недостаток на развој на сина боја овозможува да се потврди отсуството на контаминација со протеини и да се направи разлика помеѓу исушена слуз и арапска гума). Изолираната и исушената слуз понатаму, мора да се анализира во однос на физичко-хемиските параметри, за што се користат различни техники: електронска микроскопија за скенирање, определување на молекуларна тежина, хроматографско одвојување заедно со индекс на рефракција и анализатор на маса, спектрометрија на дифракција на рендген, зета-потенцијал, IR-спектроскопија (FT-IR) и 1D (^1H и ^{13}C) NMR.

Квантификација на јаглехидрати. Методите за квантификација на јаглехидратите може да се класифицираат во четири главни групи: 1. хемиски, 2. физички, 3. ензимски и 4. имунохемиски методи.

1. **Хемиски методи.** Поголемиот дел од хемиските методи се засноваат на фактот дека моносахаридите и олигосахаридите се редуцирачки агенси кои во реакција со други компоненти даваат талози или обоени производи кои може да се квантификуваат. Истото важи и за јаглехидратите кои не се редуцираат, кои прво треба да се претворат во редуциони молекули со хидролиза. Понатаму, јаглехидратите може да се квантификуваат со бројни хемиски методи, вообичаено групирани во три главни категории: титрација, гравиметриски и колориметриски методи:
 - Титрација може да се примени за определување на редуциони шеќери во примерок, со метод што се базира на реакцијата на редуциониот шеќер со бакар сулфат, што резултира со промена на бојата на индикаторот од сина во бела.
 - Гравиметриските методи главно се базираат на оксидацијата на јаглехидратите во присуство на топлина и вишок на бакар сулфат и алкален тартарат што резултира со формирање на талог од бакар оксид. Количината на формираниот талог е директно пропорционална со количеството на редуционите шеќери и може да се определи гравиметриски (филтрација, сушење и мерење) или титриметриски (повторно растворање на талогот и титрирање во присуство на соодветен индикатор).
 - Колориметриските методи се засноваат на формирање на обоен производ. Пример е антрон-методот, каде што редуционите шеќери во примерокот реагираат во кисели услови со антронски реагенси за да се добие сино-зелена боја. Апсорпцијата на добиениот раствор понатаму се мери на 620 nm. Методот на фенол-сулфурна киселина е пример за колориметриски метод широко користен за определување на вкупното количество на јаглехидрати присутни во храната. Се заснова на реакцијата на шеќерите со додаден фенол и сулфурна киселина која го претвора растворот во жолто-портокалова боја. Апсорпцијата измерена на 420 nm е пропорционална со количеството на јаглехидрати присутни во оригиналниот примерок.
2. **Физички методи.** Овие методи зависат од физичко-хемиските карактеристики на примерокот. Најчесто се користат:
 - Полариметрија, која се потпира на способноста на асиметричниот јаглороден атом да ја ротира рамнината на поларизираната светлина. Големината на поларизацијата зависи од концентрацијата на оптички активните молекули во растворот, така што концентрацијата на јаглехидратите се одредува со мерење на аголот на ротација и споредување со кривата на калибрација.
 - Методи базирани на индексот на рефракција (прекршување) (RI). RI се дефинира како брзина на светлината во вакуум поделена со брзината на светлината во материјалот. Шеќерите имаат способност да ја прекршуваат светлината и индексот на рефракција на растворот на јаглехидратите се зголемува со зголемување на концентрацијата на шеќер во примерокот. RI зависи од температурата и од брановата должина, поради што мерењата обично се прават на дефинирана температура (20 °C) и бранова должина ($\lambda = 589,3 \text{ nm}$). Овој метод е брз и едноставен за извршување и може да се изведе со едноставни рачни инструменти. Оттука, овој метод се користи во рутински анализи на шеќери, на пр. во прехранбената индустрија, за мерење на количеството на шеќер во сирупи, мед, меласа и џемови. Се практикува користење на HPLC со детектор кој мери индекс на рефракција.
 - Методи базирани на определување густина. Методите од оваа група се базираат на фактот дека дека густината на водените раствори се зголемува со зголемување на концентрацијата на јаглехидратите. Оваа техника најчесто се користи во индустријата за да се одреди концентрацијата на јаглехидрати во соковите и во пијалациите.
 - Методи базирани на IR и на NMR-спектроскопија. Јаглехидратите поседуваат молекуларни групи кои апсорбираат на бранови должини на кои ниту една од другите главни сос-

тојки на храната не апсорбира. Тие не ја апсорбираат UV- светлината поради што во квантитативните мерења не се користи UV-спектро-скопијата. Во прехранбената индустрија и особено во производството на безалкохолни пијалаци често е потребна брза квантитативна анализа на присутните шеќери. Поновите испитувања покажаа дека FT-IR-спектроскопија во средно инфрацрвено подрачје ($4\,000 - 400\text{ cm}^{-1}$) овозможува многу побрза анализа во споредба со која било друга техника и има потенцијал за *on-line* мониторинг на шеќерите во текот на производството. За паралелно добивање на структурни информации за шеќерите се користат посовистичаните методи како што се NMR и масената спектрометрија, кои обезбедуваат информации за молекуларната структура на јаглехидрати покрај мерењето на концентрацијата. Анализата базирана на NMR-спектроскопија на јаглехидрати е важна за *in situ* карактеризација и изучување на структурата на јаглехидратите (на моносахаридите, дисахаридите, полисахаридите и нивните деривати).

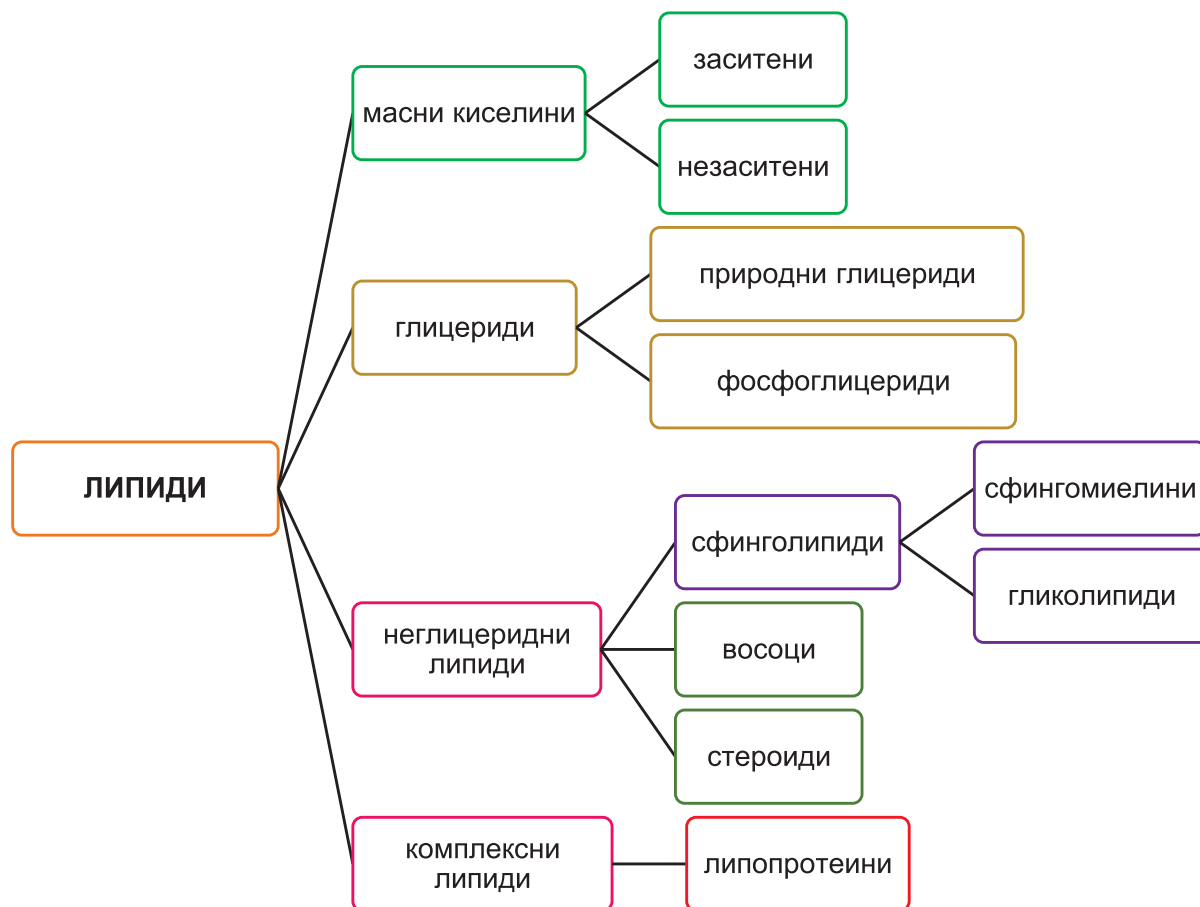
- GC и/или GC-MS по дериватизација - гасната хроматографија (самостојно или во спрега со масена спектрометрија) вообичаено не се користат директно како техники за квантификација на јаглехидратите поради нивната ниска испарливост и термичка нестабилност. За нивна анализа потребна е претходна дериватизација (силилација – добивање на триметилсилил деривати, ацетилација – добивање на ацетатни деривати или оксимација со силилација – за стабилизирање на аномерниот јаглерод), со цел трансформација на поларните ОН-групи во испарливи и термички стабилни деривати.
3. **Ензимски методи.** Овие методи се засноваат на способноста на специфични ензими да катализираат реакции со висока селективност. Овие техники широко се користени за одредување на јаглехидратите во храната, бидејќи се брзи, многу специфични, чувствителни на ниски концентрации на шеќер и обично бараат минимална подготовка на примерокот. Типичен пример е методот за определување на двата моносахарида, D-гликоза и D-фруктоза (гликоза и фруктоза). Во методот, прво, гликозата се фосфорилира во гликоза-6-фосфат (G6P) со помош на ензимот хексокиназа (HK) и АТР. Потоа, G6P се оксидира од гликоза-6-фосфат дехидрогеназа (G6PDH) при што NADP^+ се редуцира во NADPH, кој се мери спектрофотометриски на 340 nm. Количината на NADPH е пропорционална со концентрацијата на G6P во примерокот. Концентрацијата на фруктозата се одредува индиректно: таа прво се претвора во фруктоза-6-фосфат (F6P) преку фосфорилација, а потоа со дејство на фосфоглукоизомеразата (PGI) се изомеризира во G6P, кој влегува во истиот ензимски циклус за формирање на NADPH. Методот може да се примени и за определување на дисахаридите малтоза и сахароза, но само по нивна ензимска хидролиза до составните моносахарида, гликоза и фруктоза. Како техника се препорачува HPLC, а од други техники капиларна електрофореза и гасна хроматографија за микроаналитички цели.
 4. **Имунохемиски методи.** Овие методи се засноваат на способноста на имунолошкиот систем да препознава специфични јаглехидратни структури. За да се добијат антитела против јаглехидрати (кои по природа се слаби имуногени), тие најпрво се конјугираат со протеин носач. Добиениот комплекс потоа се инјектира во лабораториско животно, што резултира со продукција на антитела специфични за молекулата на јаглехидратот. По екстракција на производените антитела истите се користат за детектирање и определување на концентрацијата на јаглехидратите, најчесто преку ензимски имуносорбентни анализи (ELISA). Методите се базираат на комерцијално достапни китови, кои се брзи, високоспецифични, чувствителни и лесни за употреба.

РАСТИТЕЛНИ ЛИПИДИ

Липидите се производи на примарниот метаболизам. Претставуваат голема група органски соединенија кои имаат многу важна улога во сите биолошки системи. Тие се основни состојки за складирање на енергија, учествуваат во сигнализација на клетките и влегуваат во состав на клеточните структури, како градбени единици. Основно својство на липидните материи, што го дефинира липидниот карактер на овие соединенија, е нивното растворање само во неполарни, органски растворувачи, и истовремено нерастворливост во вода. Според тоа, липидите се липофилни соединенија и истовремено хидрофобни. Во хемиски поглед липидите се естри на определени алкохоли и виши масни киселини. Нивната градба може да биде едноставна и да има само естерски карактер, или сложена, кога во градбата дополнително се присутни делови од други соединенија. Направени се повеќе класификации, од кои класичната ги дели овие соединенија во две основни групи, а врз база на производите на нивната хидролиза како:

1. **Едноставни липиди**, кои се естери на масни киселини со алкохоли и при хидролиза ги даваат само тие два хемиски ентитета, алкохол и киселина. Тука спаѓаат:
 - Естери на масни киселини со алкохол глицерол, кои се означуваат како триглицериди, масти и масла. Масите се главно во цврста, а маслата во течна состојба.
 - Естери на масни киселини со монохидроксилни алкохоли со поголема молекуларна тежина. Вакви едностави липиди се означени како восоци.
2. **Сложени (комплексни) липиди** се естери на масни киселини со алкохоли, кои покрај алкохол и масни киселини содржат и други групи и при хидролиза даваат три или повеќе хемиски ентитети. Тука спаѓаат:
 - Фосфолипиди, липиди кои содржат, покрај масни киселини и алкохол, фосфатна група за која се врзани базни групи и други супституенти што содржат азот. При хидролиза даваат најмалку 4 ентитети (масни киселини, глицерол, фосфорна киселина и соединение со азот).
 - Гликолипиди (гликосфинголипиди), липиди кои содржат масна киселина, алкохол сфингозин и јаглехидратен дел. По хидролиза даваат 3 хемиски ентитети.
 - Други комплексни липиди, како што се сулфолипиди и аминокиселини. Во оваа група спаѓаат и липопротеините.

Денес се актуелни и други класификации, од кои позначајна е поделбата на две групи липиди врз база на алкохолот што влегува во градењето на естрите со масни киселини, од каде се дефинираат: естри на глицерол и естри на други алкохоли. Естрите на глицерол се означени како глицериди, а оние на други алкохоли како неглицериди. Глицеридите може да бидат природни глицериди (во кои спаѓаат природните масти и масла или триглицериди) и фосфоглицериди (или фосфолипиди), додека во неглицеридните спаѓаат: восоци, сфинголипиди и стероиди (слика 25).



Слика 25. Класификација на липиди

4.1. Едноставни липиди

4.1.1. Триглицериди

Триглицеридите се јавуваат како маслени инклузии олеозоми што се создаваат од ендоплазматичниот ретикулум. Со време прераснуваат во поголеми формации што се депонираат во ткива за складирање на резервни материи во семето, во ендоспермот или во котиледоните. Во семињата маслата можат да бидат застапени во количества преку 50 % од масата на семето. Содржината на триглицеридите се зголемува при процесот на зреење, додека при процесот на ’ртење и при развојот на ново растение тие се намалуваат, а потоа и потполно исчезнуваат од семето. Ретко, семето може да акумулира наместо триглицериди, естри на масни киселини со виши алифатични алкохоли или восоци, како што е случај со семето од растението јојоба. Некои растенија депонираат масни материи во перикарпот на плодот, како што е случај со маслинката, авокадото и др.

Хемиска градба. Простите масти претставуваат триестри на глицерол (трихидроксилан алкохол) и масни киселини што вообичаено имаат парен број C-атоми. Масните киселини се делат на две основни групи: заситени киселини и нивни незаситени хомолози (незаситени масни киселини). Најчесто се присутни оние со C_{18} и со C_{16} низи. Заситените масни киселини со пократки низи, помалку од C_{12} , ретко се среќаваат во растителни масла, освен киселините со C_8 и C_{10} низи што се јавуваат во маслата од палми. Ретки се и заситените масни киселини со повеќе од C_{20} атоми, освен во семето на кикиритката. Најчеста растителна заситена масна киселина е палмитинската (C_{16}) киселина.

Позначајни заситени масни киселини се:

$C_{6:0}$	хексанска киселина	капронска киселина
$C_{8:0}$	октанска	каприлна
$C_{10:0}$	деканска	капринска
$C_{12:0}$	додеканска	лауринска
$C_{14:0}$	тетрадеканска	миристинска
$C_{16:0}$	хексадеканска	палмитинска
$C_{18:0}$	октадеканска	стеаринска
$C_{20:0}$	еикозанска	арахинска
$C_{22:0}$	докозанска	бехенска
$C_{24:0}$	тотракозанска	лигноцеринска
$C_{26:0}$	хексакозанска	церотинска
$C_{28:0}$	октакозанска	монтанска
$C_{30:0}$	триаконтанска киселина	мелиса киселина

Називите во првата колона се според JUPAC, а во втората тривијалните имиња на киселините.

Незаситените масни киселини се многу позначајни за растителните масла. Најрас-пространети се киселините од C_{18} серијата. Може да имаат една, две или три двојни врски, ретко повеќе. Најчесто двојните врски се поставени во 1,4-диенски систем, а конфигурацијата на двојната врска на природните производи вообичаено е *cis* (Z). Киселините што имаат повеќе двојни врски се означени како есенцијални, бидејќи човекот не може да ги синтетизира и во организмот мора да ги

внесува преку храната. Масните киселини со помалку од C_{10} атоми се во течна состојба, а со повеќе од 10 се цврсти супстанции. Како и липидите, и масните киселини се растворливи само во органските растворувачи.

Најзначајни масни киселини од C_{18} серијата се:

$C_{18:1}$	9-октадеценска	олеинска киселина
$C_{18:2}$	9,12-октадекадиенска	линолна
$C_{18:3}$	9,12,15-октадекатриенска	α -линоленска

Масни киселини што се поретко присутни во растителни масла се:

$C_{14:1}$	9-тетрадеценска киселина	миристална киселина
$C_{16:1}$	9-хексадеценска	палмитолна
$C_{20:1}$	9-еикозенска	гадолна
$C_{22:1}$	13-докозенска	ерука киселина

Масни киселини од C_{18} серијата, позициони изомери, што се ретки во маслата:

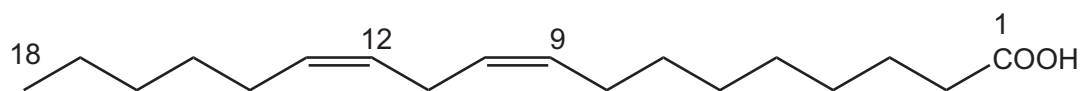
$C_{18:1}$	6-октадеценска киселина	петрозелинска
$C_{18:1}$	11-октадеценска	вакценска
$C_{18:3}$	6,9,12-октадекатриенска	γ -линоленска киселина

Масни киселини што се присутни само во одредени масни масла:

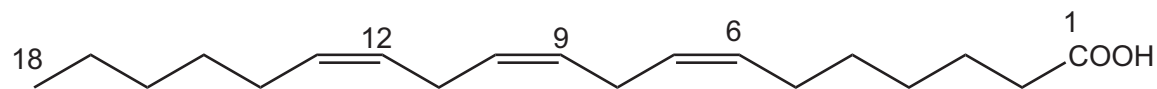
$C_{20:4}$	5,8,11,14-октадекатетраенска	арахидонска киселина

Означувањето на незаситените масни киселини може да биде различно. Како најсоодветно се смета означувањето во кое во супскрипт се дава број на C-атоми во низата и број на двојни врски, а позициите на двојни врски дополнително се даваат во заграда. Согласно ова, линолната киселина се означува со: $C_{18:2(9,12)}$ или $C_{18:2}\Delta^{9,12}$. Незаситените масни киселини се означуваат со бројот омега како омега-6 (ω -6) и омега-3 (ω -3) киселини, тип или фамилија. При ваквото означување омега (ω) означува оддалеченост на C-атомот на терминална метил група во однос на C-атомот на првата двојна врска. На пример, линолна, γ -линоленска и арахидонска киселина се од ω -6 фамилија, додека α -линоленска е од ω -3 фамилија (слика 26). Во природните масла се јавуваат и циклични масни киселини како што се некои циклопропански и циклопентански киселини. Ретко може да се јават и оксидирани производи како што се епоксиди или хидроксиди деривати, особено карактеристични за растителните восоци.

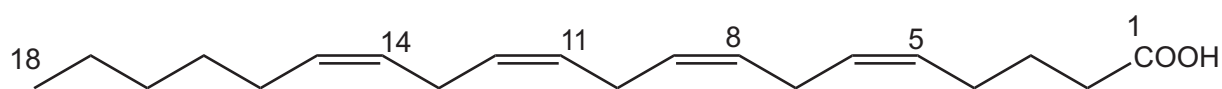
Естрите на глицеролот со заситените масни киселини се во цврста состојба, ретко се јавуваат во растенија и многу повеќе се карактеристични за животински организми. Во растенијата се јавуваат главно масла и тие претставуваат естри на глицерол со незаситени масни киселини. Може да бидат хомогени (со исти масни киселини) или хетерогени (со различни масни киселини). Растителните триглицериди, главно, имаат хетерогена структура, а растителните масла претставуваат сложени мешавини од различни хетерогени триглицериди и други состојки што се означуваат како дел што не се сапонификува (неосапунет дел). Структура на еден типичен хомоген триглицерид трипалмитат е прикажана на слика 27.

ω киселини

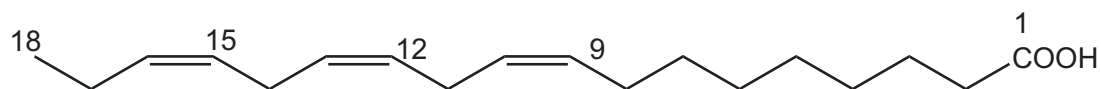
линолна киселина $C_{18:2(9,12)}$



γ-линоленска киселина $C_{18:3(6,9,12)}$

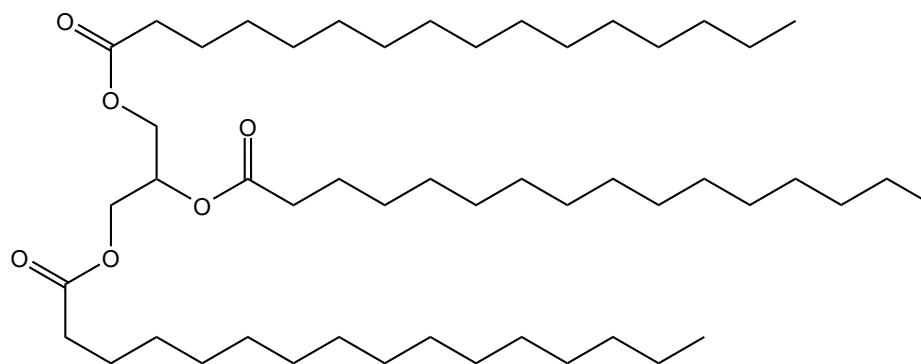


арахидонска киселина $C_{20:4(5,8,11,14)}$

ω-3 киселини

α-линоленска киселина $C_{18:3(9,12,15)}$

Слика 26. Карактеристични киселини од ω-6 и од ω-3 серијата



Слика 27. Триглицерид: трипалмитат

Физичко-хемиски особини. Физичко-хемиските особини на масите и маслата зависат од масните киселини што влегуваат во нивниот состав. На собна температура може да бидат во: цврста,

полуцврста или во течна конзистенција, зависно од видот на масните киселини (должината на ланецот, присуство на двојни врски и др.). Не се раствораат во вода, некои се растворливи во алкохол, а растворливи се во неполарни органски растворувачи. Сите липидни состојки се раствораат во органски растворувачи и се однесуваат како липофилни соединенија. Вистинските липиди, триглицеридите, се раствораат во ацетон, а фосфолипидите не, што е битно за раздвојување на овие две групи состојки. Со алкохолни или со водени алкални раствори на повисоки температури липидите се разложуваат, т.е. се сапунификуваат, при што ослободените масни киселини градат соли со алкални метали што се означуваат како сапуни. Значајно својство на липидите е што под дејство на кислородот од воздухот се оксидираат до пероксиди и се полимеризираат. Овие процеси се манифестираат со промена на миризбата, на бојата и на конзистенцијата на маслата, при што настанува усмолување и ужегнување. Овие промени се поврзани со оксидативните деградации на масните киселини.

Едноставните липиди, масти и масла, изолирани во чиста состојба, се производи што се карактеризираат со физичко-хемиски константи: релативна густина (помала од 1), температура на топење, индекс на рефракција, сушивост, количество на неосапунети материи, киселински, сапунификационен, естерски, пероксиден и јоден број и др. Прописите за испитување на квалитетот на мастите и на маслата задолжително вклучуваат определување на вредноста на константите, со оглед на нивната важност. Преку определувањето на константите се врши идентификација на мастите и на маслата, се проценува нивната чистота, се утврдува присуство на можните фалсификати и се проценува соодветноста на чување на овие производи.

Значење и употреба на мастите и на маслата. Растителните и животинските масти и масла имаат големо значење во исхраната. Некои масти и масла се користат во комерцијални цели, во индустрија на сапуни, бои и лакови, како растворувачи на сликарски бои, како индиферентни масла за техничка употреба и сл. Во фармацијата и медицината некои масла се користат во терапевтски цели бидејќи имаат фармаколошко дејство. Голем број масла се користат како индиферентни супстанции во фармацевтската индустрија, во производство на полуцврсти препарати (медицински креми и масти), за третман на болести на кожа.

4.1.2. Восоци - *Cera*

Природните восоци претставуваат смеси од моноестри на виши, заситени, монохидроксилни алкохоли и виши масни киселини. Во овие смеси секогаш се присутни слободни масни киселини, слободни алкохоли, различни јаглеводороди и стероли.

Особините на восоците зависат од својствата на алкохолите што влегуваат во составот на моноестрите, што е различно од триглицеридите, чии особини зависат од карактеристиките на масните киселини. Восоците што содржат алкохоли со поголеми молекулски маси се со поцврста конзистенција, потешко се растворливи и имаат повисоки температури на топење. Во природните восоци најчесто се среќаваат алкохолите: цетил C_{16} , лигноцерил C_{24} , мирицил C_{30} и мелисил C_{30} алкохолот. Можат да се сретнат и дихидроксилни алкохоли, алифатични и ароматични, со $C_{16}-C_{30}$ атоми, со неразгранета и со разгранета низа, стероидни алкохоли, како што е холестерол (C_{27}) и тритерпенски, како што е ланостерол (C_{30}). Масните киселини во восоците се главно заситени, со неразгранет низ и парен број на C-атоми, од $C_{16}-C_{34}$. Најчести се палмитинска C_{16} , церотинска C_{26} и мелисинска киселина C_{30} . Поретко може да се сретнат масни киселини со разгранет низ.

Особини. Восоците се цврсти, аморфни маси што со загревање се топат и даваат бистри течности со слаб и својствен мирис. Не се раствораат во вода, а растворливи се во органски растворувачи. Се карактеризираат со специфични физички-хемиски константи, а за проценка на нивниот квалитетот битно е количеството на пепел што се добива по нивно согорување. Природните

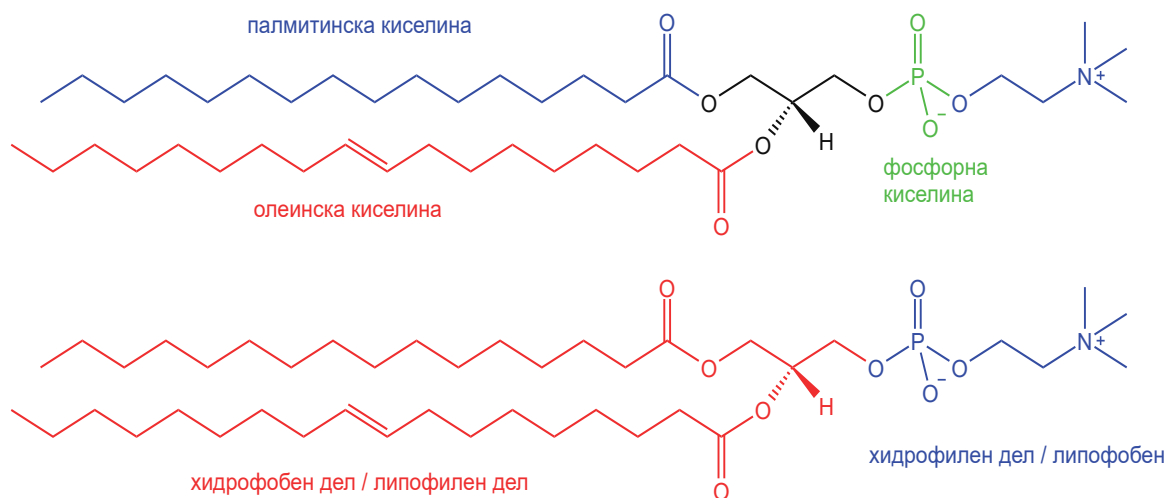
восоци можат да се сапунификуваат само со алкохолни раствори на алкалии, по што се разликуваат од триглицеридите, кои се сапунификуваат и со водени раствори на алкалии, на повисока температура. Бидејќи природните восоци често се фалсификуваат со масти, со постапката на сапунизација се утврдува присуството на евентуалните фалсификати.

Употреба. Природните восоци наоѓаат примена во фармацевтската технологија. Од восоци што имаат животинско потекло најзначајни се: *Cera alba* и *Cera flava*, пчелин восок, *Cetaceum*, спермацет, *Cera lanæ*, ланолин и др. Растителните восоци најчесто се наоѓаат како заштитен слој на надземните делови од растенијата, измешани со кутикула (кутикуларни восоци). Најзначајни растителни восоци се: *Cera carnauba*, карнауба восок, *Cera jojobæ*, јојоба восок, *Cera palmarum*, палмин восок, *Cera candelilla*, восок од канделила (*Euphorbia* spp.) и др. Наоѓаат голема примена во фармацевтската и во козметичката индустрија.

4.2. Сложени липиди

4.2.1. Фосфолипиди

Фосфолипидите претставуваат естри на глицерол во кои две ОН-групи се естерифицирани со масни киселини, а третата ОН-група со фосфорна киселина, за која дополнително е врзан: амин (холин, β -етаноламин), аминокиселина (серин, треонин и др.), циклитол или инозитол. За фосфолипидите е карактеристично што киселинските остатоци (ацилните групи) имаат 14–22 С-атоми и 0–6 двојни врски. Овој дел од молекулата има липофилно однесување. Остатокот што е врзан за фосфатната група речиси секогаш е хидрофилен.



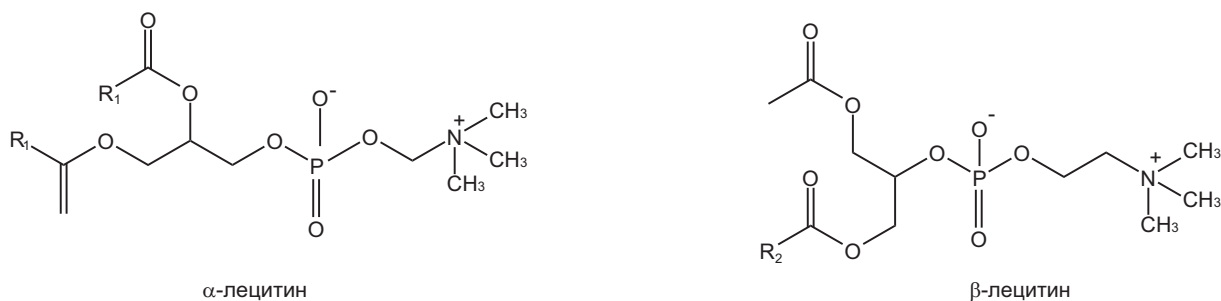
Слика 28. Основна градба на лецитин

Во зависност од хидрофилниот остаток (соединението кое е врзано за фосфорната киселина), се делат на повеќе групи од кои позначајни се лецитините. Фосфолипидите се распространети и во растителните и во животинските организми. Кај растенијата се јавуваат во семките на маслодајните видови, а кај животните најмногу во мозочното ткиво. Големо количество фосфолипиди се

наоѓа во жолчката од јајцето. Фосфолипидите се градбени елементи на клеточните мембрани, а имаат и други многу значајни функции во голем број биохемиски процеси, како што се трансформација на енергија, пренесување на нервните импулси, транспорт на соединенија и др.

Лецитините се фосфолипиди (глицеро-фосфо-амино-липиди), во кои е присутна азотната база холин врзана за остаток од фосфорна киселина (слика 28), што претставува хидрофилен дел и масните киселини што го естерификуваат глицеролот на слободните ОН-групи, што е липофилен дел од молекулата. Оваа градба условува специфики во физичко-хемиското однесување на лецитините на што се базира нивната практична употреба. Во зависност од местото на врзувањето на фосфатниот остаток на глицеролот се разликуваат α - и β -лецитини (слика 29).

Лецитините може да бидат од растително (*Lecithinum vegetabile*) и од животинско потекло (*Lecithinum ex ovo*). Поради своите особини и способноста да ги емулгираат маслата во вода, се користат како емулгатори во прехранбената и во фармацевтската индустрија, во диететиката и во другите области. Во фармацевтската индустрија дополнително се користат за производство на липозоми. Како лек, лецитинот го намалува нивото на холестерол во циркулацијата, дејствува против згоеност и други состојби што настануваат како последица на нарушен метаболизам, се користи против сушење на кожата и за други цели. Во текстилната индустрија се користи за премачкување на влакната пред ткаење со што се овозможува производство на ткаенини со многу подобри карактеристики.



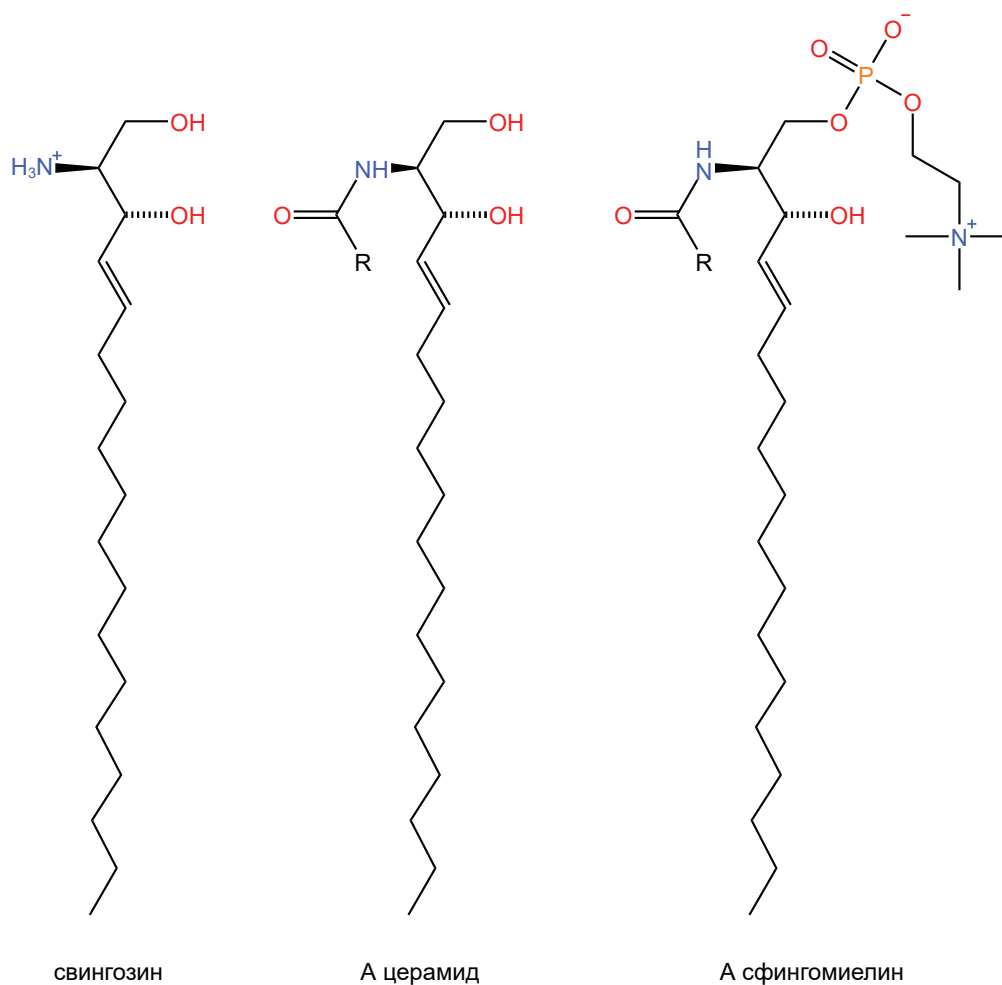
Слика 29. Структури на изомерните лецитини (R_1 и R_2 се масни киселини)

4.2.2. Сфинголипиди и други сложени липиди

Сфинголипидите се деривати на алкохол свингозин (ацилиран β -аминоалкохол со долг ланец) за кој естерски се врзува масна киселина и гради церамид (слика 30). Слично на фосфолипидите, ацилните групи се долги, од 14 до 26 C-атоми и имаат главно само една двојна врска. Групацијата на алкохол може да биде поврзана со фосфорил остаток за кој се врзува етаноламин со што се создаваат сфингомиелини (слика 30). Ако церамидот се поврзе со шеќер (гликоза или галактоза) се создаваат цереброзиди (гликофосфолипиди), а ако се поврзе со трисахарид и дополнително со сијалинска киселина се создаваат ганглиозиди (слика 31).

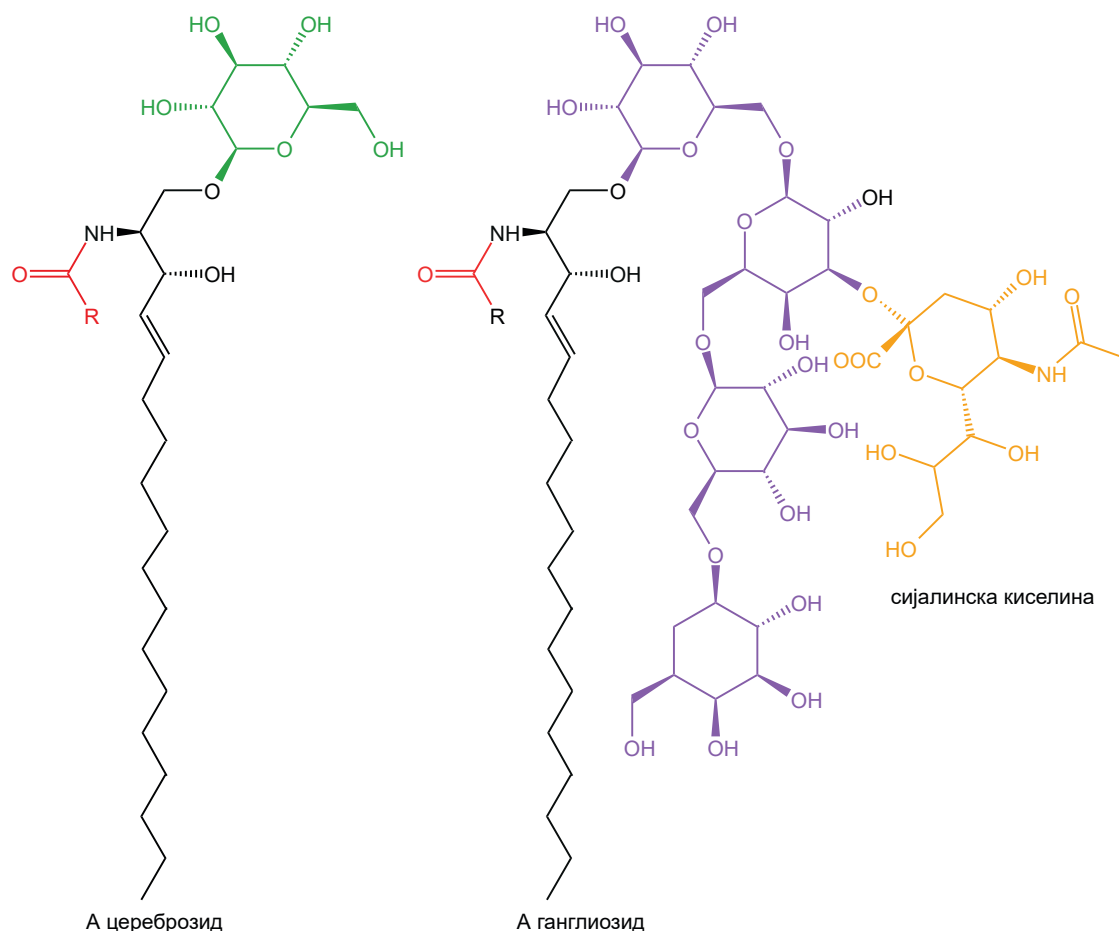
Сфинголипидите се ендогени липиди на сите еукариотски организми (растенија, животни, човек, помалку бактерии и фунги). Се смета дека ја штитат клеточната површина од штетните фактори на надворешната средина со формирање на механички стабилен и хемиски отпорен надворешен лист од липидниот двослој. Откриено е дека одредени комплексни гликосфинголипиди се вклучени во специфични функции, како што се препознавање и сигнализација на клетките. Испиту-

вањата покажале дека исхраната на експериментални животни со храна што содржи сфинголипиди инхибирала карциногенеза на дебелото црево и го намалила LDL (липопротеини со мала густина / лош холестерол), а го зголемила HDL (липопротеини со голема густина / добар холестерол) холестеролот.



Слика 30. Аминоалкохол сфингозин и негови производи

Церамидите се важни структурни елементи кои создаваат заштитна бариера во кожата, ја заштитуваат од неповолно надворешно влијание и од губење на влага. Денес се користат за производство на козметички препарати за нега на кожа и одложување на процесот на стареење на кожата. Медицинска употреба имаат во третманот на егзема, а се испитуваат во однос на потенцијалот за антиканцер дејство. За комерцијална употреба се изолираат од: соја, млечни производи, јајца, слатки компири, пченични никулци, пченка и кафеав ориз.



Слика 31. Претставници на сфинголипиди

4.3. ИСПИТУВАЊЕ НА ЛИПИДИ

4.3.1. Екстракција, изолирање и прочистување на липиди

Екстракцијата на липиди од биолошките ткива е клучен чекор во анализата на липидите. Изборот на соодветен растворувач и соодветна метода е најкритичниот фактор за ефикасна екстракција на липидите, а се заснова на потеклото на примерокот (растителни и животински), физичката состојба (ткиво или течност), содржината на влага и содржината на липиди. Класичните методи по Блај и Даер (Bligh and Dyer) и по Фолч (Folch) се објавени уште во 1957 и 1959 година, соодветно, а се сметаат за златни стандарди за екстракција на липиди. Иако овие методи првично беа развиени за екстракција на липиди од животински ткива, нивната висока ефикасност во екстракцијата на главните класи липиди, ги направи широко прифатени за извлекување на липиди од примероци и од растенија и од животни. Методот по Фолч генерално се претпочита за екстракција на липиди од цврсти ткива, додека методот по Блај и Даер се смета за поповолен за биолошките течности. Во двете методи како екстрактивно средство се користи смеса хлороформ/метанол/вода во сооднос 1 : 1 : 0,9 (v/v/v) во методот по Блај и Даер и во сооднос 2 : 1 : 0,75 (v/v/v) во методот по

Фолч. Двете методи дополнително се разликуваат во некои други параметри, како што се количеството на растворувачот во однос на количеството на примерокот, присуство на соли во водената фаза и сл. Со дополнителните оптимизирања од други автори, утврдено е дека највисок принос на липиди се добива ако соодносот растворувач : примерок е 20 : 1 (како што е предвидено во оригиналната метода по Фолч). Модификациите се правени и во насока на заменување на токсичните растворувачи хлороформ и метанол со релативно побезбедни и зелени растворувачи. Добри приноси може да се добијат со смеси од *n*-хексан/изопропанол (3 : 2 v/v) и изопропанол/цикло-хексан/вода (8 : 10 : 11 v/v/v). Во класичните методи за екстракција на липиди спаѓа екстракцијата по Сокслет. Не е погодна за екстракција на липиди од ткива што содржат високо количество вода. Се заснова на дифузијата на липидите низ клеточниот сид во растворувач, кој може да биде етанол, хлороформ или *n*-хексан, а од бинарните смеси хлороформ/етанол (1 : 1, v/v). Други растворувачи и други смеси даваат помал принос на липиди. Треба да се има предвид дека континуираното загревање на температурата на вриење може да доведе до оксидација на липидите и деградација на соединенијата кои се осетливи на топлина.

Од другите т.н. зелени екстрактивни постапки се користат суперкритична CO₂-екстракција (SCE), SPE, ASE/PLE, екстракција со посебен вид нови зелени растворувачи за липиди и др. Суперкритичната CO₂-екстракција е методот со кој се врши издвојување на липидите од биолошкиот матрикс со суперкритичниот CO₂ (зелен растворувач). Со менување на притисокот и температурата, можно е селективно екстракција на липиди, а приносот може да се зголеми со додавање на ко-растворувач, како што е етанол. Цврсто-фазната екстракција овозможува изолација и пречистување на одбрани липиди, а се изведува со мали патрони (колони) во кои се спакувани реверзни, нормални или јоно-изменувачки полнења. Овие полнења селективно ги задржуваат посакуваните фракции со поларни (нормална фаза), со хидрофобни (реверзна фаза) или со јонски интеракции (јоно-изменувачка фаза), додека непосакуваните соединенија минуваат низ нив. За елуирање на компонентите од интерес се користат соодветни растворувачи со кои липидните состојки се извлекуваат од колоните. Од другите методи треба да се спомене забрзаната екстракција со растворувач (ASE), со која се постигнува брзо и ефикасно извлекување на липидите, со користење на дуални смеси: хлороформ/метанол (2 : 1, v/v), метанол/диметил сулфоксид (DMSO) (9 : 1, v/v) и *n*-хексан/диетил етер (1 : 1, v/v), во еден или во два чекори. Во поново време станува актуелна екстракцијата со зелени растворувачи од растително потекло (на пример, D-лимонен, *p*-цимен и α -пинен) и јонски течности (неводени раствори на соли). Како подобра опција во однос на класичните растворувачи на липиди се препорачува користење на етанол и на етил ацетат, потоа изопропанол и *n*-пропанол кои се добри алтернативи на класичните растворувачи, со оглед дека се категоризирани како растворувачи од класа 3, имаат помал ризик за здравјето на луѓето, не се генотоксични ниту канцерогени. За одбележување е фактот дека етанолот е еден од најчестите растворувачи, земајќи ја предвид обновливоста, достапноста и ниската цена во однос на другите растворувачи.

4.3.2. Идентификација и анализа на липиди

Пристапот во испитувањето на липидите се разликува во зависност од тоа дали се врши анализа на изолирани чисти масти, масла, восоци и др. липиди или се врши испитување на липиди во определен природен материјал, со цел идентификација и квантификација на липидите во материјалот.

Испитувањата на изолирани масти и масла опфаќаат определувања на:

- физичко-хемиски константи,
- состав на масни киселини,
- состав на неосапунети материи и

— структура на триглицеридите.

Определувањето на физичко-хемиските константи се изведува според воспоставени класични методи, а опфаќа определување на: киселински, сапонификационен, естерски, јоден и пероксиден број. Дополнително се определуваат релативната густина, количеството на неосапунети материји и примеси од туѓи масла, а понекогш и индекс на рефракција и количество на вода. Добиените вредности за константите овозможуваат идентификација на маст или масло и секогаш укажуваат на квалитетот и на чистотата на испитуваната маст и масло. Составот на масните киселини за комерцијалните масти и масла исто така е константа и најчесто се определува со GC-MS, по сапонификација на триглицеридите, ослободување на масните киселини и нивно преведување во испарливи метилестри што се погодни за GC-MS анализа.

Во случаи кога е потребно определување на составот на неосапунетиот дел од масите и маслата, се работи за деликатна анализа со која треба да се определи составот на стеролите, на незаситени и заситени алифатични и тетратерпенски јаглеводороди (каротени), на тритерпенски алкохоли, на вишите масни алкохоли и на витамини (токоферол и други, во масло растворливи витамини). За идентификација на маслата најзначајно е определувањето на составот на стеролите, бидејќи за комерцијалните масла овој состав претставува еден вид на константа. Класичните постапки подразбираат сепарација на стеролска фракција со препаративни техники, дериватизација и преведување на стероли во силни деривати и нивно определување со GC-MS-анализа. Во маслата вообичаено се присутни од 2 до 5 структури, главно Δ^5 -стероли (ситостерол, кампестерол, стигмастерол и др.) како доминантни и повеќе други стероли, во многу мали проценти. Составот на стеролите и нивниот меѓусебен однос е добар идентификационен маркер на маслата. Некои стероли се специфични само за одредени масла (на пр., брасикастерол за масла што се добиваат од претставници на родот *Brassica*, во кој спаѓа маслодајната репка) или нивната содржина е значително поголема во некои масла во споредба со други (на пр., Δ^7 -стигмастеролот во најголем процент е застапен во сончогледовото масло, во споредба со други масла што се користат во исхраната). Со анализата на стеролите дополнително се откриваат евентуални недозволенни примеси, нечистотии и фалсификати. Определувањето на структурата на триглицеридите ретко се врши во рутинските анализи на квалитетот на масите и на маслата (на пр. задолжително се испитува во маслото од жолтото ноќниче - *Oenotera* видови). Составот на триглицеридите се определува со хроматографски техники, а најдобри резултати се постигнуваат со LC-MS-анализа.

Идентификација на липиди, во случај на анализа на липиди во определен природен материјал, се врши со TLC, која е една од најстарите и најшироко користените техники за идентификација на поединечни липиди. Може да се користи за пречистување на липидните фракции и за квантитативна анализа. Напредната форма на TLC, односно високоперформансна тенкослојна хроматографија (HPTLC), овозможува многу поголема хроматографска резолуција и брзо раздвојување на липидите, а уште подобри резултати се добиваат со примена на HPLC, која се карактеризира со голема брзина, репродуктивност и чувствителност. HPLC се користи за точна идентификација и квантификација на липидите од растителни матрикси, вклучувајќи го раздвојувањето на поединечните липидни класи од липидните фракции, како и за определување на содржината на токоферол во маслата. За определување на профилот на масните киселини во испитуваното масло се користи GC, со различни детектори: како пламен-јонизациски детектор (FID), детектор што работи на принцип на мерење на топлотна проводливост (TCD), електрон-врзувачки детектор (ECD) или комбинација со MS.

Квантитативната анализа на смесата на масни киселини и на неосапунети фракции може да се врши со гасно-течна хроматографија (GLC = gas-liquid chromatography). За раздвојување на неутралните и поларните липиди се препорачува колонска хроматографија. Квантитативна и квалитативна анализа на неполарни липиди (триглицериди) најдобро се врши со MS во комбинација со матрикс-олеснета десорпциска јонизација со ласер (matrix-assisted laser desorption = MALDI).

Тандем масена спектрометрија (MS/MS) е техника која обезбедува повеќе информации за структурата на липидите и има многу добра чувствителност. Моќна техника, која денес се користи за квантитативни и квалитативни испитувања на липиди е комбинацијата на HPLC и GC со NMR, со која се избегнува инвазивната манипулација со растителниот матрикс. Се користи за да се идентификуваат липидните структури и да се анализира присуството на двојни врски и нивната позиција во ланците на масните киселини.

4.4. РАСТИТЕЛНИ АЛКИНИ

4.4.1. Растителни ацетилени и полиацетилени

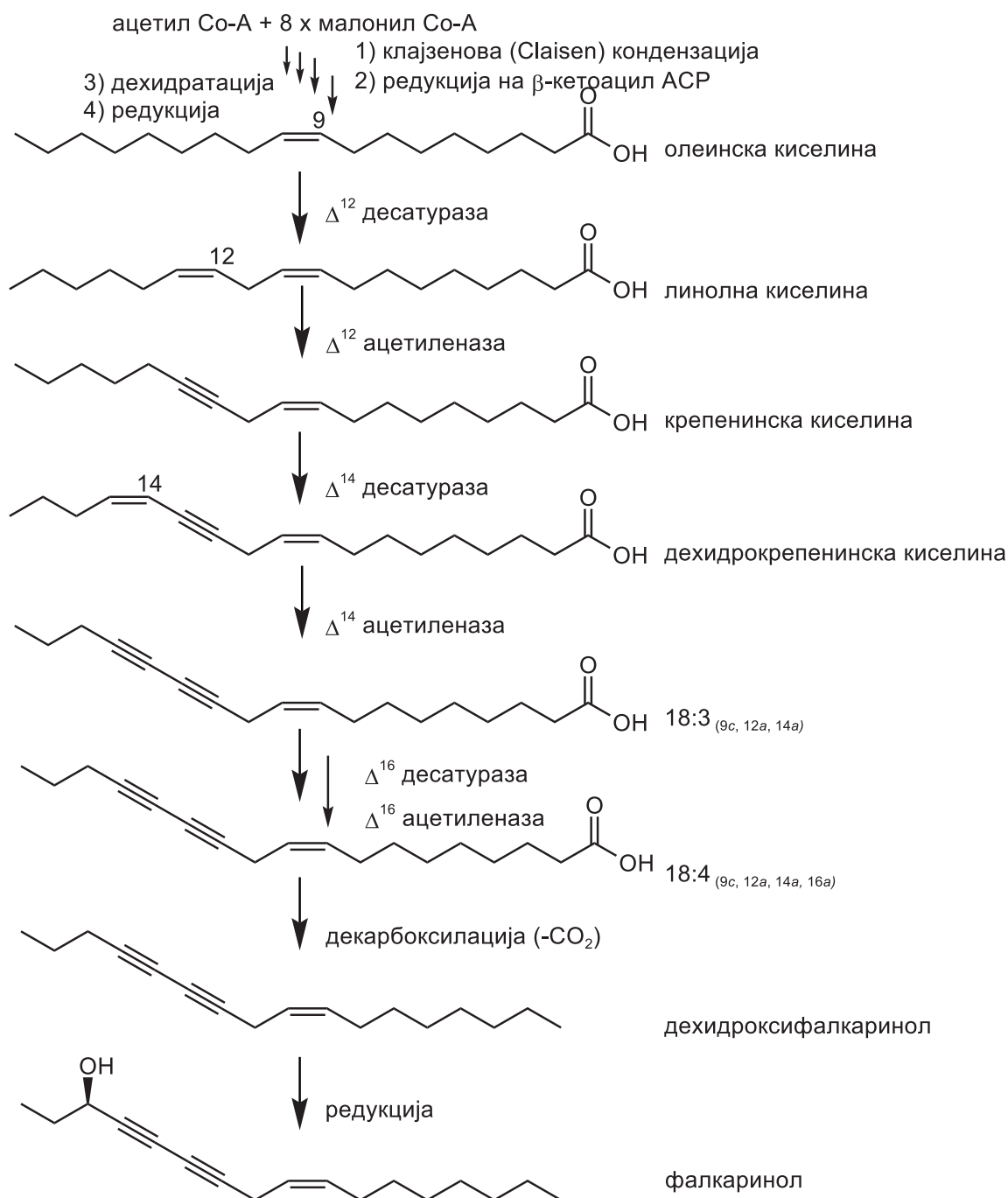
Растителните ацетилени и полиацетилени се голема класа на разновидни компоненти што биосинтетски се поврзани со масни киселини, а се создаваат во растенија, габи, морски организми и животни. Покажуваат широк профил на биоактивност, кој вклучува антитуморно, антибактериско, антимиembroно и антифунгално дејство, поради што побудуваат голем научен интерес. Хемиски претставуваат алкини што се карактеризираат со една тројна врска (ацетилени) и со две и повеќе тројни врски (полиацетилени). Во природата се создаваат многу често, но се ексклузивно врзани за точно определени фамилии, особено фамилијата на главоцветните растенија (Asteraceae), потоа Araliaceae и Apiaceae, некои мовови, лишаи и габи и некои морски организми (алги и мекотели). Лимитираната дистрибуција во точно определени фамилии на виши растенија и структурните варијации во рамките на групата, ги прават полиацетилениите многу погодни маркери во хемотаксономските испитувања, особено за видовите од Asteraceae. Во некои фамилии воопшто не се јавуваат, па утврдување на нивно присуство во претставници од вакви фамилии може да укаже на габично заболување, од габи што создаваат полиацетилени, а кои во растенијата се присутни како патогени. Денес се познати преку 2000 различни полиацетилени и сродни состојки што се јавуваат во различни природни материјали.

Хемиски карактеристики и класификација. Ацетилениите и полиацетилениите се главно алифатични соединенија, многу поретко циклични. Хемиската разновидност на овие соединенија е особено голема што наметнува дефинирање на положем број подгрупи, како што се:

1. полиацетиленски киселини,
2. ароматични полиацетилени,
3. алкамиди,
4. ацетилени со сулфур,
5. хетероцилични полиацетилени и
6. спироацетаноли.

Биосинтеза. Во текот на раните 1960-ти, беа предложени два модели за биосинтеза на растителните полиацетилени: 1. биосинтеза базирана на оксидативна дехидрогенација (десатурација) на масни киселини со ензим десатураза и 2. биосинтеза базирана на поликетиди. Првиот модел објаснува создавање на полиацетилени од липиди што содржат масни киселини како што е олеинска киселина (слика 32). На овој начин се создаваат полиацетиленот фалкаринол и неговите хо-молози. Вториот модел дефинира дека ацетиленски дел од молекулата се формира како производ на „de novo“ биосинтеза на масни киселини и ги објаснува полиацетиленските соединенија кои се создаваат како производ на поликетиди. Поновите проучувања укажуваат на важност на три масни киселини кои ги сочинуваат корените на повеќето ацетиленски природни производи: крепенинска, стеаролна и таринска киселина, кои се создаваат по патот на десатуразата или по

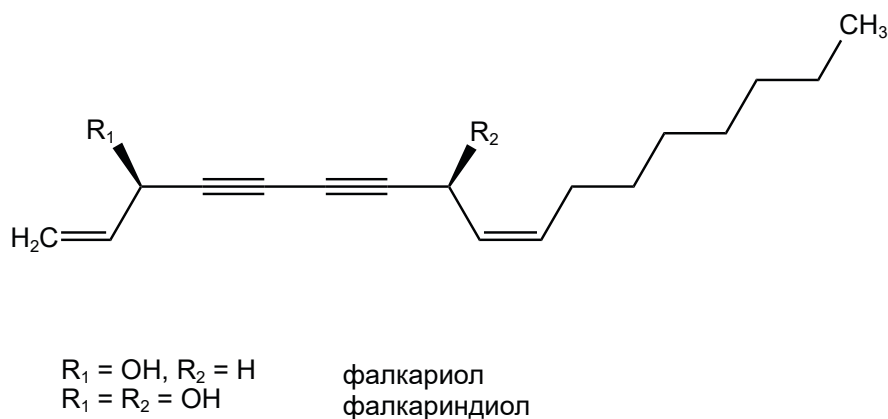
патот на поликетидите. Со оглед дека растителните полиацетилени се многу разновидна и комплексна класа на секундарни метаболити, различните групи на вакви соединенија се создаваат со вклучување на различни биосинтетски патишта. Во биосинтезата на ароматичните полиацетилени се вклучува патот на шикими киселината, а за некои терпенски полиацетилени е битен патот на изопреноидите. Во однос на биосинтетското потекло полиацетилени се делат на: полиацетиленски киселини (најчесто добиени од олеинска киселина), деривати на крепенинска киселина и алкинил групи (остатоци) што се вклучени во други, биосинтетички различни метаболити, главно во терпени.



Слика 32. Потекло на полиалкини (патот на десатураза)

Биолошка активност. Во најголем број случаи растителните полиалкини се фототоксични состојки. Активноста е особено изразена кон нематоди, ларви од инсекти, некои габи (на пр. *Candida*), бактерии и вируси. Употребата на некои претставници од Asteraceae во традиционалната медицина за третман на кожни заболувања се должи токму на присуството на полиацетилените во растителната суровина.

Фитофармаколошко значење и можна употреба. Полиацетиленските соединенија поседуваат антиинфламаторна, антитуморна и антимикробна активност. Полиацетиленските алкохоли како што е фалкаринол (=панаксинол) (слика 33) и неговите хомолози (панаксидол и панакситриол) се секундарни метаболити добиени од коренот на женшен (Araliaceae). Испитувањата покажуваат дека се фармаколошки активни и дека вршат инхибиција на пролиферацијата на туморските клетки, ја менуваат функцијата на тромбоцитите, ја промовираат цитотоксичноста и вршат индукција на инхибиторно дејство врз ацил-CoA. Фалкаринолот и многу други полиацетолени се предмет на опсежни научни истражувања со цел зголемување на апликативност на овие соединенија во медицината и во други области.



Слика 33. Алифатични полиацетиленски алкохоли што се изолирани од коренот на женшен

Токсични и алергени полиацетиленски. Растителните видови што содржат полиацетиленски се токсични. Најчесто предизвикуваат алергии. Меѓу нив за Европа се позначајни видовите цикута и бршлен. Во коренот од цикута се најдени повеќе компоненти (цикутоксин, цикутол, цикудиол и нивни изомери). Целото растение е токсично, особено кога е во свежа состојба. Труењата се случуваат ако коренот се замени со корени од некои јадливи видови од истиот род. Иако се ретки, овие труења се многу опасни и исходот е често летален. Бршленот спаѓа во групата растенија што можат да предизвикаат кожни реакции на лицето, на рацете и на другите делови ако повеќекратно дојдат во контакт со листовите. Досега не се направени испитувања во однос на тоа кои компоненти на бршленот ги предизвикуваат овие реакции, но се претпоставува дека се во прашање полиацетилените. Претпоставката се базира на сознанијата дека некои други видови од истата фамилија се токсични токму поради присуството на фалкаринол, а истиот полиацетилен е најден и во листовите од бршлен.

Екстракција и испитување на растителни полиацетилени. Растителните полиацетилени може да се екстрахираат со различни мешавини на растворувачи. За екстракција на липофилните полиацетилени, што главно се присутни во вишите растенија, се користат диетил етер, дихлорометан и етил ацетат. За екстракција на поларните полиацетилени (гликозиди и полихидроксилирани полиацетилени) најчесто се користи метанол, а екстракцијата треба да се изврши на 22 °C или на пониска температура и кисело рН, при намалена светлина или во темни услови, за да се намали ризикот од какво било распаѓање на полиацетиленските компоненти. За да се спречи ензимската деградација се препорачува растителниот материјал да биде замрзнат.

Во квалитативна анализа на полиацетилените, се користат различни методи и техники:

- тенкослојна хроматографија (TLC) (обично на силика гел),
- колонска хроматографија (CC) на силика гел или на Sephadex LH-20. Се препорачува Flash CC за брзо прочистување на полиацетилени, користејќи силика гел и азот (при низок притисок) за да се намали трансформацијата на полиацетилените во артефакти. Елуирањето на компонентите започнува со петролетер или со *n*-хексан и продолжува со мешавини од етил етер, дихлорометан, етил ацетат и метанол, во различни соодноси, со што се менува поларитетот на растворувачот и постигнува соодветна сепарација. Колонска хроматографија на Sephadex LH-20 протекува со користење на различни мешавини за елуирање (на пр., чист метанол или дихлорметан/ацетон, 85 : 15, v/v), а се користи за пречистување на екстракти или на фракции што содржат полиацетилени.
- UV-Vis-спектроскопија, се базира на UV-спектрите на полиацетилените во подрачје од 200-410 nm, со карактеристичен изглед, што може да овозможи идентификација на полиацетиленски компоненти, во споредба со референтен материјал.
- Раман спектроскопијата како техника се користи за анализа на соединенија од растителен материјал. Полиацетиленските состојки може да се идентификуваат директно во свежи примероци од растенија без претходни протоколи за подготовка. Техниката е многу битна за идентификација на структурно многу слични полиацетилени, што потешко се постигнува со други методи.

Најкористената аналитичка платформа за детекција и квантификација на различни полиацетилени е високоперформансна течна хроматографија (HPLC). Помеѓу различните варијанти, RP-HPLC, се покажа како најдобра опција. Се користат C18 колони, поларни мобилни фази (на пр., мешавини од метанол или ацетонитрил и вода), во градиентно елуирање и фотосетлив детектор изграден од серија фотодиоди (PDA, photodiode array detector) (на 210-260 nm) и/или MS-детектори. Заради сложеноста на смесите на полиацетилените или сложеноста на нивните хемиски структури, врзано за одреден растителен вид, потребно е дефинирање на параметрите како што се времето на анализа, брановите должини, карактеристиките на колоната, мешавините на мобилната фаза и градиентот и сл. Во квантитативната анализа на полиацетилените со RP-HPLC потребно е да се користат соодветни внатрешни стандарди или надворешна крива на калибрација со стандардни супстанции на определени полиацетилени. Во литературата се објавени податоци за RP-HPLC-карактеризација на полиацетилени во корените на морков и на женшен. Со оглед дека на квалитетот на квантитативната анализа влијае подготовката на примерокот за анализа, се препорачува изолацијата на полиацетилените да се направи со полупрепаративна или со

препаративна HPLC, со што може да се обезбеди поадекватно ракување со примерокот и за многу пократко време за подготовка, во споредба со другите техники. Дополнително, карактеризацијата на полиацетилените и евидентирањето на полиацетиленските профили, може да се изврши со LC-MS-анализа.

АМИНОКИСЕЛИНИ, ПЕПТИДИ, ПРОТЕИНИ И АМИНИ

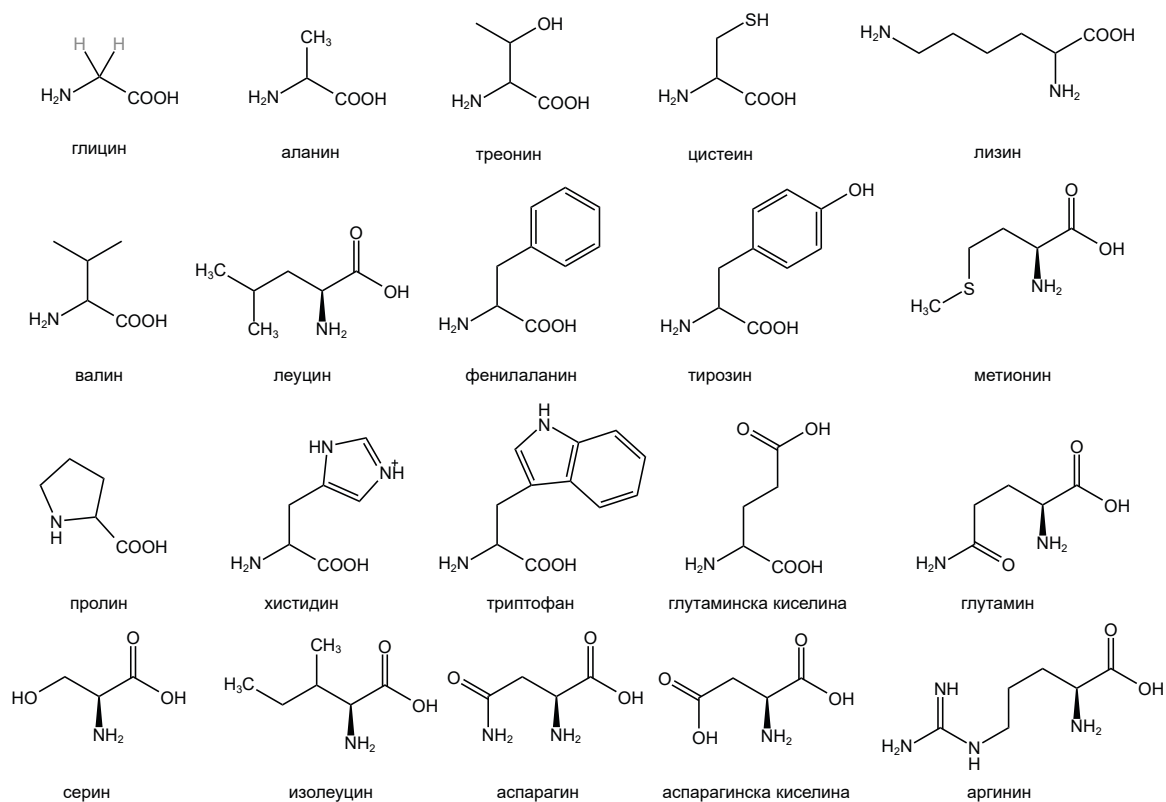
5.1. АМИНОКИСЕЛИНИ

Аминокиселините се органски соединенија што содржат и amino- и карбоксилна функцио-нална група, поради што имаат амфотерен карактер. Во зависност од локацијата на овие групи се означуваат како алфа- (α -), бета- (β -), гама- (γ -) или делта- (δ -) аминокиселини, кај кои аминокиселината во однос на карбоксилната се наоѓа на некоја од наведените позиции. За амоноокиселините и нивната класификација значајни се поларитетот, јонизацијата и типот на странична низа или присуство на прстени, од каде може да бидат: алифатични, со разгранета низа, ациклични, ароматични, хетероциклични, со една аминокиселина (моноамино) и со две (диамино) киселини и киселини што содржат сулфур. Имаат многу важна улога во различни процеси во биолошки системи, учествуваат во голем број биосинтези, со нивно поврзување се создаваат пептиди и протеини, кои се значајни како нутритивни елементи, како граѓени и како функционално важни соединенија и сл.

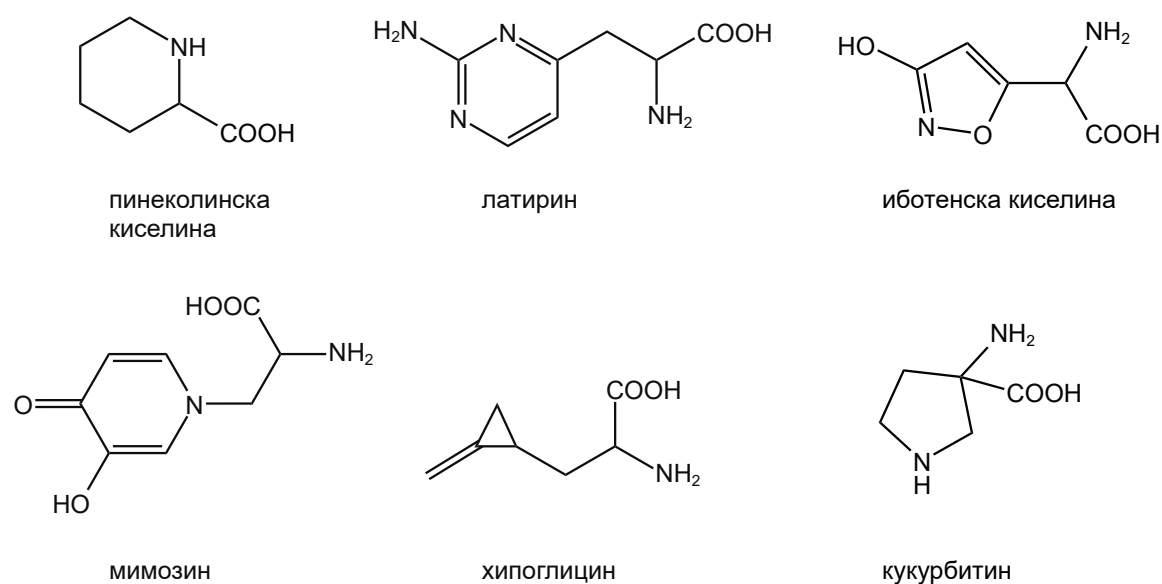
Аминокиселините се безбојни кристални супстанции, добро растворливи во вода, а помалку во алкохол, етер и во други органски растворувачи. Повеќето имаат сладок вкус. Оптички се активни и имаат високи точки на топење (220-315 °C), проследени со нивно распаѓање. Во природата постојат над 500 аминокиселини, од кои само 22 од групата α -аминокиселини се инкорпорирани во протеини и се нарекуваат протеински (слика 34). Сите протеински аминокиселини се L-аминокиселини, а во зависност од граѓбата и однесувањето може да бидат кисели, базни и неутрални. Според биохемиската функција во организмот на човекот, се делат на:

- Есенцијални, аминокиселини што ги синтетизираат само растенијата. Човекот и животните не можат да ги синтетизираат, а за нормално функционирање мора да ги внесуваат преку храната. Денес се познати 9 есенцијални аминокиселини: хистидин, валин, леуцин, изолеуцин, фенилаланин, триптофан, метионин, треонин и лизин.
- Условно есенцијални, што ги синтетизираат и растенијата и хетеротрофните организми, меѓутоа во определени физиолошки услови, како што се интензивно растење или болести, мора дополнително да се внесуваат преку храната во поголемо количество. Тука спаѓаат: цистеин, тирозин, аргинин и хистидин.

- Неесенцијални, што ги синтетизираат сите организми во доволни количества. Тука спаѓаат: аланин, глицин, аспарагин, глутамин, аспарагинска киселина и глутаминска киселина.



Слика 34. 20 протеински аминокиселини



Слика 35. Структури на некои непротеински аминокиселини

Аминокиселините што не влегуваат во биосинтезата на протеините се нарекуваат непротеински аминокиселини. Тие се многу различно дистрибуирани во растителниот свет. За нив се карактеристични структурни варијации од типот: диацидо или дибазни аминокиселини, аминокиселини со сулфур што се хомолози на цистеин и метионин, аминокиселини со селен, имино киселини и сл. Непротеинските аминокиселини можат да бидат алифатични, хетероциклични или ароматични соединенија. Некои позначајни непротеински киселини се прикажани на слика 35.

Непротеинските аминокиселини имаат D-конфигурација. Претставуваат секундарни метаболити со биолошка функција која сè уште не е потполно дефинирана. Азотниот атом може да биде дел од amino, имино или амидогрупа. Се претпоставува дека непротеинските аминокиселини можеби претставуваат облици за депонирање на азотот во растенијата. Нивниот голем број и распространетост укажуваат на тоа дека тие сигурно не настануваат како резултат на метаболни грешки.

Непротеинските аминокиселини не поседуваат фармаколошка активност и за нив не постои некој особен терапевтски интерес. Меѓутоа, токсичноста на некои од нив за човекот и за домашните животни е голема и заслужува внимание. Можеби е битно само да се спомене дека некои од овие состојки пројавуваат определени активности што би можеле да се искористат во третманот на некои паразитарни заболувања, како што е на пример теницидното дејство на аминокиселината кукурбитин, изолирана од семето на тиквата. Присуството и активноста на оваа состојка го објаснува традиционалното користење на семето од тиквата како антхелминтик. Некои непротеински аминокиселини се натрупуваат во семињата на одредени видови, како депоа со азот што исчезнуваат за време на герминацијата. Други се значајни во одржувањето и опстанокот на видовите, бидејќи не дозволуваат ртење на несоодветен полен. Многу од нив покажуваат токсичност во контакт со грабливци (фунги, микроорганизми). Токсичноста се должи на антиметаболна активност, што е многу едноставна, а настанува како резултат на интерференција помеѓу непротеинските и протеинските аминокиселини за време на биосинтезата на протеините. Непротеинските аминокиселини имаат иста или многу слична стерна структура во споредба со протеинските киселини. Ензимскиот систем на грабливците не може да ги разликува и ги вклучува непротеинските киселини во биосинтезата на протеините. Ваквите протеини не можат да ги извршуваат животноважните функции во биолошките системи. Во други случаи можна е и потполна блокада на протеинската синтеза. Оттука доаѓа и токсичноста на овие состојки.

5.2. ПЕПТИДИ И ПРОТЕИНИ

Аминокиселини поврзани во низа од неколку киселини создаваат пептиди, поголемите структури 20-30 аминокиселински остатоци се олигопептиди, а оние со повеќе од 50 остатоци се класифицирани како протеини. Поврзувањето настанува со пептидна врска во која учествуваат аминокиселината од едната и карбоксилната група од другата киселина. Биолошката функција на пептидите зависи од составот на аминокиселините и од другите компоненти во молекулата, но и од редоследот на поврзувањето на аминокиселинските остатоци во низата т.н. секвенца на пептидите. Некои растителни пептиди се физиолошки активни растителни соединенија (пептидни алкалоиди, пептидни антибиотици, пептидни токсини и пептидни хормони).

Протеините се високомолекуларни биополимери составени од преку стотина аминокиселински остатоци, поврзани со пептидни врски. Редоследот на аминокиселините (секвенца) е прецизно генетски кодирана, а биосинтезата на протеините се одвива во рибозомите со соодветна активност на рибонуклеинските киселини. Протеините се едни од клучните макромолекули во живите системи, кои играат улога во сите суштински важни биолошки процеси, како што се катализирање на метаболичките реакции (ензимско дејствување), репликација на ДНК, реагирање на

стимули, обезбедување структура на клетките и на организмите, транспортирање на молекули од една локација на друга, контрола на растот и диференцијацијата, обезбедување на механичка поддршка, имунолошка заштита и др.

Протеини што се составени само од аминокиселини претставуваат прости протеини и може да бидат глобуларни и фибрилари. Глобуларните протеини (албумини, глобулини, глутелини и проламини) имаат различна растворливост во вода, во кисела и во алкална средина, додека фибрилните протеини главно не се растворливи во растворувачите во кои се раствораат глобуларните протеини. Простите протеини се градбени и структурни елементи или најчеста форма на резервни протеини во семињата или во подземните органи. Сложените протеини се нарекуваат уште конјугирани протеини, а се карактеризираат според присуството на непротеинскиот дел во молекулата, што се нарекува простетична група. Оваа група може да биде со различна хемиска природа: шеќер, липид, нуклеинска киселина, метал, пигмент или фосфатен остаток, врз база на што се формира името на сложените протеини ставајќи го префиксот: глико, липо, нуклео, метало, хромо, хемо и фосфо, пред називот протеин. Сложените протеини имаат значајни биолошки функции во сите живи организми: гликопротеините (лектини) се често составни компоненти на клеточните мембрани, што го овозможуваат транспорт на материите низ мембраните, липопротеините се најзначајна група сложени протеини, одговорни за функционирање на клеточните мембрани, металопропротеините се ензимите каталаза, супероксид десмутаза, алкохол дехидрогеназа и др., додека нуклеопротеините имаат првостепено значење во пренесувањето на наследните особини.

Протеините се макромолекули кои содржат една или повеќе долги низи на остатоци од аминокиселини, но нивната севкупна градба е многу сложена. Како и кај другите природни полимери, и кај протеините постојат четири нивоа на структурата, кои ја одредуваат неговата конечна форма или конформација и, последователно, неговата функција:

- Примарната структура е наједноставното ниво на протеинска структура, која ја опфаќа линеарната низа на аминокиселини собрани во низа, почнувајќи од аминокрајот (*N*-терминал) на страната каде што аминокрупите не се вклучени во пептидната врска и завршувајќи со слободна карбоксилна група од другата страна, означена како карбоксилна завршница (*C*-терминал). Таквата структура е одредена од секвенцата на ДНК на генот што го кодира соодветниот протеин, кој хемиски претставува полиамид.
- Секундарната структура се однесува на интеракциите помеѓу атомите на полипептидниот столб и воспоставување на разновидни водородни поврзувања што доведува до извиткување во вид на спирала или друга форма, со што се стабилизира градбата.
- Терцијарната структура ја опфаќа целосната тродимензионална форма на целиот протеин, просторниот однос на секундарните структури една со друга, што е уреден на начин да обезбедува максимална стабилност и најниска енергетска состојба. Терцијарната структура генерално се стабилизира со формирање на хидрофобно јадро и со воспоставување водородни врски, дисулфидни врски, градење на соли, па дури и посттранслациони модификации. Значајно е што терцијарната структура е она што ја контролира основната функција на протеинот.
- Кватернарната структура е највисокото ниво и се однесува на целокупната единица формирана со агрегација на повеќе протеински молекули - полипептидни низи (подединици), кои функционираат како единствен протеински комплекс. Градежните мономерни полипептидни низи можат да бидат идентични или различни, давајќи хомо- или хетеродимери. Конечната форма на протеинот, во ова четврто ниво од структурата, се стабилизира со истите интеракции што се присутни во терцијарната структура.

Протеините содржат широк спектар на функционални групи, како што се алкохолни, карбоксилни, карбоксаидни, тиолни, тиестерни и др. Распоредот на овие групи е одговорен за протеин-

ските функции, како што е на пр., ензимската активност, т.е., каталитичкото дејство врз хемиските реакции во биолошките системи. Со интеракцијата едни со други или со други биолошки макромолекули, протеините се одговорни за точната репликација на ДНК. Важна карактеристика што ја одредува функцијата на протеините е флексибилноста. Цврстите протеини служат како структурни елементи на цитоскелетот или сврзното ткиво и најчесто се влакнести, на пример, колаген и еластин, кои формираат 'рскавица и кератин кој гради влакна, нокти, пердуви и школки од некои животни. Друго забележливо својство на протеините е денатурацијата, што претставува нарушување на тродимензионалната протеинска конформација поради распаѓањето на врските, без ефекти врз примарната структура, што резултира со целосно или делумно губење на биолошката активност. Средствата за денатурација кои ги менуваат секундарните и терцијарните протеински структури вклучуваат топлина, рН, зрачење и разни хемиски агенси како што се детергенти и органски растворувачи.

Значење и употреба. Протеините се многу значајни состојки на храната, што секојдневно мора да се внесуваат во организмот со консумација на различни животински и растителни производи. Покрај нивното огромно значење во оваа смисла, тие имаат и низа други апликативности во фармацијата, во медицината, во козметологијата и во другите полиња. За одбележување е огромното значење на некои полипептидни хормони кои денес се изолираат од природни материјали или се добиваат со комплетна синтеза, а кои во форма на лекови се користат при состојби на дефицит на природните хормони во организмот. Полипептидните хормони се сложени аминокиселински полимеризати, составени од протеинските аминокиселини, со молекулски маси од 1 000 до 6 000. Меѓу нив се значајни: окситоцин и вазопресин, адренотропниот хормон (АСТН) и инсулин. Окситоциот и вазопресинот се производи на лачење на задниот дел на хипофизата. Составени се од по девет аминокиселини т.н. нонапептиди, а составот на аминокиселините во двата хормона е различен, но потполно е дефиниран и тие денес се произведуваат синтетски. Нивното физиолошко дејство е различно. Окситоциот ја регулира функцијата на матката, особено контракциите на мазната мускулатура при породување. Вазопресинот е антидиуретичен хормон, ги стеснува крвните садови, го покачува крвниот притисок и ја задржува урината. Недостаток од овој хормон доведува до појава на нешеќерен дијабетес. Болеста се лекува со препарати што содржат вазопресин. Аденокортикотропниот хормон (кортикотропин, АСТН) се излучува од предниот дел на хипофизата, а претставува полипептидна низа изградена од 39 аминокиселински остатоци од 15 аминокиселини. Дејствува стимулативно на надбубрежните жлезди и придонесува за поголемо излучување на хормоните на кората на надбубрегот: хидрокортизон и кортизон. За медицинска употреба АСТН се добива од хипофизата на говеда. Се користи само во форми за парентерална употреба, при алергиски заболувања (серумска болест, бронхијална астма), инфламаторни заболувања (ревматизам) и др. Инсулиот е хормон што се синтетизира во β -клетките на лангерхансовите островца на панкреасот. Молекулата на инсулиот е изградена од 52 α -аминокиселини, поврзани во два полипептидни ланци, меѓусебно сврзани со дисулфидни мостови. Физиолошката улога на инсулиот е регулирање на јагленохидратниот промет во организмот, пред сè во одржување на нивото на гликозата во циркулацијата. Намаленото количество на инсулин доведува до покачување на нивото на гликозата во крвта и урината, а пролонгирање на оваа состојба доведува до пројавување клинички симптоми на шеќерна болест (diabetes mellitus). За медицинска употреба инсулиот се добива од панкреасот на говеда и свињи. Инсулинските препарати се користат за менаџирање на шеќерната болест и некои црnodробни заболувања. Се применуваат само парентерално.

Од изолирани чисти протеини, најголемо практично значење има желатинот, пречистен протеински производ што се добива со делумно кисело, со алкално, со термичко или со ензимско разградување на животинскиот колаген. Хидролизата доведува до добивање гелирачки или негелирачки производ. Најчесто се користи колагенот од животинските коски и 'рскавицата, што заостануваат како отпаден производ при преработката на месото. Желатинот има голема примена во фармацевтската индустрија. Се користи за изработка на желатински капсули (значајно во случаи кога леко-

витата супстанција треба да дојде непроменета во цревата, каде што капсулите се разложуваат), во производството на супозитории, како средство за врзување при производство на таблети, како стабилизатор за емулзии и др. Желатинот се користи за изработување микроскопски препарати, а во микробиологијата за изработка на микробиолошки подлоги. Наоѓа примена во прехранбената индустрија. Од други изолирани протеини, денес сè поголемо внимание побудуваат определени протеини со сладок вкус кои се користат за производство на протеински засладувачи, како замена за обичниот шеќер. Поголемо значење има смесата од протеини што се изолира од плодовите на африканското растение тауматококус (*Thaumatococcus danielli* Benth., Marantaceae), а која се означува како тауматин. Се екстрахира од месестиот дел на плодовите, а се состои од два протеина: тауматин I и тауматин II, што се составени од по 207 аминокиселини. Меѓусебно минимално се разликуваат во распоредот на аминокиселинските остатоци во молекулите. Тауматинот е лесно растворлив во вода и во разблажен алкохол. Максимална стабилност покажува при pH 2,7-3, а на pH пониско од 2 се хидролизира и станува кисел. Стабилен е при краткотрајна термичка обработка и на температура под 100 °C. Производите што содржат тауматин можат да се пастеризираат, но со пролонгиран третман (стерилизација) благиот вкус се уништува. Тауматинот има силно изразен сладок вкус, што се чувствува во концентрации од 10^{-8} M. Благиот вкус од тауматинот се задржува долго, 15-20 минути, поради што наоѓа примена во производство на производи како што се гуми за цвакање или освежувачи на здивот. Не е токсичен и не е канцероген. Од други африкански растенија изолирани се уште две други протеински состојки со многу сладок вкус, монелин и миракулин. Монелинот е протеин составен од два ланци изградени од 44 и 50 аминокиселини. Има 2000 пати поголем засладувачки потенцијал од сахарозата, но е термолабилен и осетлив на промени на pH. На температура од 50 °C и pH 3,2 го губи слаткиот вкус. Поради недостаток од токсиколошки податоци неговата употреба е сериозно лимитирана. Може да се произведува по биотехнолошки пат. Миракулинот е гликопротеин, изграден од 473 аминокиселини. Не е доволно проучен и неговата широка примена засега сè уште е неизвесна.

Токсични полипептиди. Некои полипептиди од габите на родот *Amanita* (*Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) Link) се токсични за човекот и за животните. Познати се две групи соединенија: аматоксини и фалотоксини, бициклични полипептиди, составени од осум аминокиселини кај првата, односно седум кај втората група токсини. Аматоксините се десет пати потоксични од фалотоксините, но дејствуваат значително побавно. Двете групи се хепатотоксични агенси при што аматоксините го напаѓаат ендоплазматичниот ретикулум, а фалотоксините јадрата на клетките на црниот дроб. Труењата со овие токсини се случуваат при консумација на печурки што ги содржат, а кои по грешка се собираат и јадат. Труењата често се фатални, ако брзо не се воведат соодветен медицински третман.

5.3. ИСПИТУВАЊЕ НА ПРОТЕИНИ, ПЕПТИДИ И АМИНОКИСЕЛИНИ

Испитувањето на аминокиселините и на протеините зависи од целта. Во случај кога треба да се одреди вкупното количество на протеини во храната се користат стандардизирани аналитички методи. Најчесто се применуваат методите на Кјелдал (Kjeldahl), Лори (Lowry) или Бранфорд (Bradford) и/или се определува вкупната содржина на аминокиселини. Правилното определување на содржината на протеини во храната е важно бидејќи, често, ја одредува економската вредност на прехранбениот производ, а може да влијае и на новите индустрии за алтернативно производство на протеини. Најзначајните методи за определување на содржината на вкупни протеини се:

- **Кјелдал метод (Kjeldahl method, 1883)** кој се состои во варење на храната со силна киселина, така што се ослободува азот кој потоа се квантифицира со титрација. Количината на присутен протеин се пресметува од определеното количество на азот во храната. Истиот основен пристап сè уште се користи и денес, иако се направени големи подобрувања за да се забрза процесот и за да се добијат попрецизни мерења. Обично се смета за стандарден метод за определување на вкупни протеини. Бидејќи методот на Кјелдал не ја мери содржината на протеини директно, потребен е фактор на конверзија (F) за да се претвори измерениот азот во количество на протеини. Најчесто се користи фактор на конверзија 6,25 што е еквивалентно на 0,16 g азот по грам протеин. Овој фактор претставува просечна вредност, бидејќи секој протеин има различен фактор на конверзија во зависност од неговиот аминокиселински состав.
- **Думас метод (Dumas method, 1831)**. Се заснова на целосното согорување на матрицата во атмосфера од кислород. Ова доведува до ослободување на јаглерод диоксид, вода и азот. Гасовите потоа се пренесуваат преку посебни колони (воден раствор на калиум хидроксид) кои ги апсорбираат јаглерод диоксидот и водата, азотот се мери со детектор за топлинска спроводливост. Измерениот сигнал од детекторот потоа може да се претвори во содржина на азот. Како и кај Кјелдал методот, конверзијата на количеството на азот во примерокот во содржината на суров протеин се врши со помош на фактори на конверзија кои зависат од конкретната аминокиселинска секвенца на измерениот протеин.
- **UV-Vis-спектроскопски методи**, кои ја користат природната способност на протеините да ја апсорбираат (или расејуваат) светлината во UV-Vis-регион на електромагнетниот спектар, или се базирани на хемиски или на физички модификации на протеините за да се „натераат“ да апсорбираат (или да расејуваат) светлина во овој регион. Основниот принцип зад секој од овие методи е сличен. Најпрво се подготвува крива на калибрација со користење на серија протеински раствори со позната концентрација. Апсорпцијата на растворот што се анализира потоа се мери на иста бранова должина и концентрацијата на протеини се одредува од кривата на калибрација. Главната разлика помеѓу методите се должи на видот на хемиските групи кои се одговорни за апсорпција или расејување на зрачењето, на пример, пептидните врски, ароматичните странични групи, основните групи и агрегираните протеини. Тука спаѓаат поголем број на т.н. класични методи за определување на содржината на вкупни протеини како што се:
 - Биуретски методи што се базирани на протеин-бакар хелација и секундарна детекција на редуцираниот бакар. Протеините (и, по правило, сите супстанции што содржат две или повеќе пептидни врски) реагираат со бакар и формираат обоен комплекс чија апсорпција ($\lambda_{\max} = 454 \text{ nm}$), во присуство на вишок од бакар, е пропорционална на количеството на присутниот протеин. Хелирањето на протеините со бакар е базичен принцип и на методот по Лори, кој се користи за биохемиска анализа и одредување на вкупното ниво на протеини во раствор. Методот по Лори се заснова на реакцијата на едновалентниот Cu^+ , што

е произведен со оксидација на пептидните врски со реагенсот Folin–Ciocalteu (мешавина од фосфотангстична киселина и фосфомолибдинска киселина). Механизмот на реакција не е добро разбран, но вклучува намалување на реагенсот Folin–Ciocalteu и оксидација на ароматичните остатоци (главно триптофан и тирозин). Резултатот од оваа реакција е интензивна сина молекула позната како хетерополимолибденско сино. Концентрацијата на хетерополимолибденско сино се мери преку апсорпција на 660 nm, од што понатаму се пресметува концентрацијата на протеинот во примерокот.

- Метод по Брадфорд (Bradford Coomassie Blue method). Колориметриски метод за определување на протеини, заснован на промената на апсорпција на бојата Coomassie брилијантно сина Г-250. Оваа боја постои во три форми: анјонска (сина), неутрална (зелена) и катјонска (црвена). Во кисели услови, црвената форма на бојата се претвора во нејзината сина форма, врзувајќи се за протеинот што се испитува. Кога бојата се врзува за протеинот, таа предизвикува поместување на апсорпцијата од 465 nm (апсорпционен максимум на неврзаната боја) на 595 nm (апсорпционен максимум на комплексот на бојата со протеинот). Зголемувањето на апсорпцијата на 595 nm е пропорционално на количината на врзаната боја, а со тоа и на количината (концентрацијата) на протеинот што е присутен во примерокот.

Во изминатите децении, аналитичките методи за определување на аминокиселини се развиваа со вклучување на современи инструментални техники и искористување на нивните перформанси. Тековните методи за анализа на аминокиселини вклучуваат TLC, HPLC, LC-MS, GC-MS, капиларна електрофореза, NMR и анализа со помош на аминокиселински анализатор. Анализатори на аминокиселини се автоматски инструменти специјално дизајнирани за анализа на протеински аминокиселини. Овие анализатори ги користат техниките на сепарација (на пр. ИЕС - Ion-exchange chromatography – јон-изменувачка хроматографија, HPLC или CE) и методите за откривање опишани погоре за да ги идентификуваат и квантифицираат аминокиселините во протеинските примероци.

Во случај кога е потребно да се определи за каков вид протеини станува збор, се применуваат три главни техники за анализа на протеини:

1. Сепарација (разделување) на протеини.

Протеинската електрофореза е процес на одвојување и прочистување на протеините со нивно ставање во гел и потоа набљудување на подвижноста на протеините во присуство на електрично поле. Најчесто користена техника за сепарација на протеините е електрофореза со денатурирачки средства (SDS-PAGE). Протеините може да се одвојат според растворливоста, големината, полнењето и сврзувачкиот афинитет. SDS-PAGE ги одвојува протеините главно врз основа на молекуларната тежина наспроти полнењето или преклопувањето. Тоа е техника која широко се користи во биохемијата, форензиката, генетиката и молекуларната биологија.

Други методи на сепарација на протеини вклучуваат:

- Изоелектрично фокусирање: во овој метод, различните молекули се одвојуваат со нивните разлики во електричното полнење. Оваа техника е тип на зонска електрофореза која обично се изведува во гел и го користи фактот дека полнежот на молекулата се менува со рН-вредноста на околината.
- Хроматски методи: Постојат две хроматски методи кои често се користат за сепарација на протеините, HPLC и TLC. И двата метода се особено корисни додатоци на пристапите базирани на гел. Иако хроматографијата е вообичаена техника во биохемиските лаборатории што се користи за прочистување, идентификација и квантификација на протеинските мешавини,

ласерската дифракција традиционално се користи за управување со големината на колоната и полидисперзитетот.

- Дводимензионална гел електрофореза: Ова е моќен метод базиран на гел кој вообичаено се користи за анализа на сложени примероци во интерес на карактеризирање на целиот опсег на протеини во примерокот, а не само на неколку специфични протеини.

2. Вестерн блот (Western blott).

Техниката на вестерн блот користи три елементи за да се идентификуваат специфичните протеини од сложената мешавина на протеини извлечени од клетките: одвојување по големина (електрофоретски), трансфер на интерна мембрана и означување на целниот протеин со користење на соодветно примарно и секундарно антитело за визуализација. Најчестата верзија на овој метод е т.н. имуноблотинг. Оваа техника се користи за откривање на специфични протеини во даден примерок од ткивен хомогенат или екстракт. Примерокот од протеини прво се електрофоризира со SDS-PAGE за да се одвојат протеините врз основа на молекуларната маса. Протеините потоа се пренесуваат на мембрана каде што се испитуваат со помош на антитела специфични за целниот протеин.

3. Идентификација на протеини.

Постојат два методи кои вообичаено се користат за да се идентификуваат протеините: Едман деградација и масена спектрометрија. Едман деградацијата е метод за секвенционирање на аминокиселините во пептид. Овде, аминокиселинскиот остаток е означен и одделен од пептидот без да се нарушат пептидните врски помеѓу другите аминокиселински остатоци. Протеинска масена спектрометрија е аналитичка техника која го мери односот маса-полнеж на наелектризираните честички. Претставува важен метод за точно определување и карактеризирање на масата на протеините, а денес се развиени разновидни методи и инструменти за многубројни намени. Примената на масената спектрометрија за проучување на протеините стана популарна во 1980-тите по развојот на посебните техники на јонизација MALDI и електроспреј јонизација (Electrospray Ionization, ESI). Овие техники на јонизација одиграа значајна улога во идентификацијата на протеините.

Современи, нови техники за анализа на протеини овозможуваат опсежна интерпретација на структурата и на функцијата на протеините, во рамките на анализа која денес се означува како протеомика. Притоа, протеом е целокупниот сет на протеини кои ги создава или модификува еден организам. Составот на протеомот може да се менува, во текот на времето и во зависност од различни услови на кои организмот е изложен. Современите техники за проучување и анализа на протеините вклучуваат: техника на расејување на светлината (Light scattering techniques), GPC/SEC со мултиоткривање (Гел-пропустлива хроматографија = Gel Permeation Chromatography - GPC/ Хроматографија со исклучување на големината = size-exclusion chromatography - SEC), метод на кружниот дихроизам (Circular Dichroism Spectrometry – CD), изотермална титрациона калориметрија (Isothermal titration calorimetry - ITC) и др.

5.4. СЛОЖЕНИ ПРОТЕИНИ - ПРОТЕИДИ

5.4.1. Гликопротеини - лектини

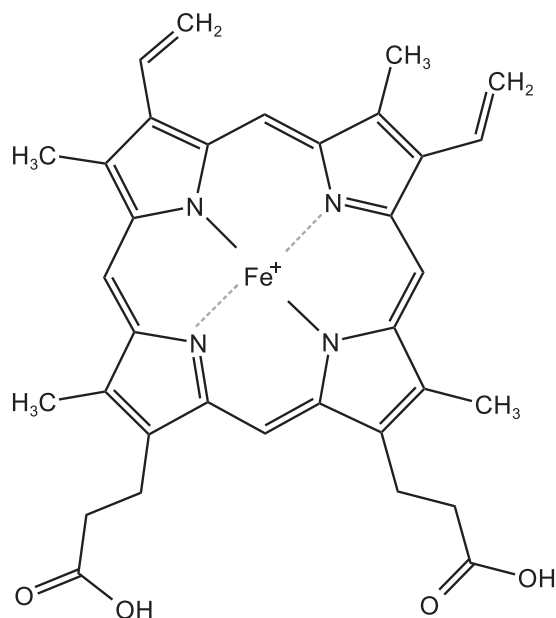
Лектините се гликопротеини, сложени соединенија што вклучуваат протеински и шеќерен дел во молекулата. Името го добиле од латинскиот збор *lego, legere, lectum* = чита, одбира, селектира, а што означува способност на лектините да ги наоѓаат, да ги одбираат и да се врзуваат за јаглезидратните остатоци на клеточните мембрани на специфичен, но реверзибилен начин. Голем број лектини покажуваат хемаглутинарачка активност, способност да ги аглутинираат еритроцитите, па се означуваат како фито-хемаглутини. Некои имаат способност за селективно аглутинирање на точно определени еритроцити и се користат во дијагностицирањето на крвните групи, како реагенси во хематологијата. Некои лектини се митозни отрови и дејствуваат цитотоксично, а некои дури можат да прават разлика помеѓу нормалните и туморските клетки и притоа цитотоксичната активност да ја насочат само кон туморските клетки. Сите лектини се токсични, а некои се многу силни отрови.

Лектините се карактеристични за вишите растенија, главно се сместени во семињата, се формираат за време на зреењето, а исчезнуваат за време на герминација. Ги има во кикиритки, соја, лека, зелен грав, рицинус и др. Консумацијата на семињата од лекуминозните зеленчукови растенија вклучува претходна термичка обработка, при што се денатурираат протеините, а меѓу нив и лектините, со што нивната токсичност се губи. Освен тоа, ензимите на човекот и животните ги разложуваат лектините во дигестивниот тракт така што труења со лектини настануваат многу ретко. До определени труења, сепак, може да дојде при внесување на храна што не е доволно термички обработена. Симптомите на труењето се манифестираат по 2-3 h од внесувањето, а се јавува повраќање, крвави проливи, дехидратација и состојба на шок.

Пример за лектин е рицин, кој се наоѓа во семето од рицинус (*Ricinus communis*). Токсичен е бидејќи ја нарушува протеинската синтеза во еукариотските клетки. Експериментално е утврдено дека минималната летална доза изнесува 0,4 mg/kg. Токсичноста се манифестира и при консумирање на рицинуово семе што резултира со гадење, главоболки, крвави проливи, дехидратации, ECG (електрокардиограм) модификации, некроза на црн дроб, губиток на свест и смрт. Рицинот е силен цитостатски отров што се покажал како моќен антитуморен агенс. Доста е проучуван во оваа смисла, како и во однос на активноста во доменот на вирусните инфекции и како имуносупресивен агенс. Рицинот претставува интересен агенс и во неврологијата.

5.4.2. Хромопротеиди

Во групата на хромопротеидите спаѓаат хлорофилот и хемоглобинот, соединенија што имаат многу големо физиолошко значење. Во молекулата на хемоглобинот, протеинскиот дел е глобин (96 %), а боената компонента е хем (4 %). Глобинот се состои од 4 полипептидни ланци, од кои два се алфа и два бета-ланци. Секој од нив содржи по една протетична група (хем) така што во молекулата има 4 хема. Во централниот дел од молекулата се наоѓа двовалентен јон на железо (Fe^{2+}). Со една врска железото од секој хем е поврзано со глобинот преку аминокиселината хистидин (слика 36). Дополнително, со глобинот се поврзани и две карбоксилни групи од пропионска киселина на хемот.



Слика 36. Структура на хемоглобин

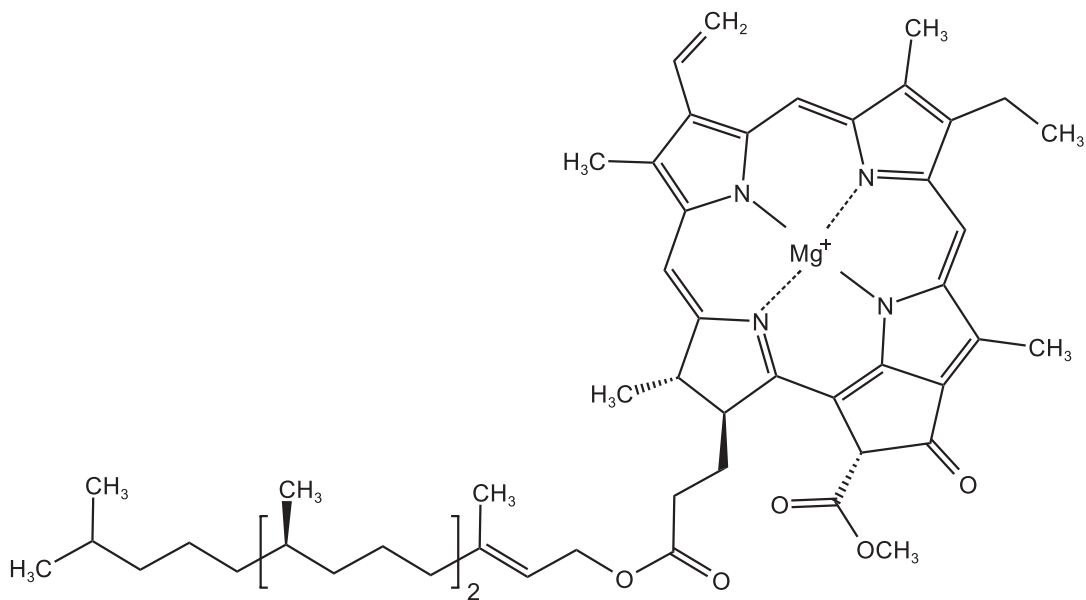
Хемоглобинот е значаен за респирацијата. Тој се соединува со молекуларниот кислород од вдишаниот воздух во лабилно соединение оксигемоглобин. Во оксигемоглобинот, молекулата на кислородот е координативно врзана за железото од хемот, кое не ја менува својата валентност, туку останува двовалентно. Оксигемоглобинот е молекулско соединение на хемоглобинот со кислородот, а не оксидационен производ на хемоглобинот. Процесот се нарекува оксигенација. Оксигемоглобинот го транспортира кислородот од белите дробови до сите останати делови од организмот. Во обратната насока хемоглобинот го пренесува CO_2 и H^+ јони.

Хлорофилот е пигмент со зелена боја кај растенијата, локализиран во хлоропластите и врзан за протеини, заедно со каротените и ксантофилите. Неопходен е за процесот на фотосинтезата, во кој со апсорпција на сончева светлина од неорганските соединенија вода и CO_2 се создава шеќер гликоза. Молекулата на хлорофилот се состои од четири пиролни јадра и еден карбоцикличен прстен, кои заедно чинат хетероцикличен порфириноскелет со централно поставен атом на магнезиум (Mg) (порфириноско јадро). Во хемиски поглед разликуваме 5 вида на хлорофил (a, b, c, d и e), од кои a и b се најзначајни и меѓусебно се разликуваат по видот на радикалите што се врзани за порфириноското јадро (слика 37). За медицинска и комерцијална употреба хлорофилот се изолира од сировини што содржат најмалку 1 % хлорофил, сметано на сува маса. Најчесто се користат: коприва, спанаќ, луцерка, целер и др.

Хлорофилот е деодорантно и антибактериско средство. Има ограничена терапевтска употреба, главно во дерматолошки препарати за третман на рани, изгореници и слично. Многу повеќе се користи во козметичката индустрија, во производство на пасти за заби, води за дезинфекција на уста, шампони, сапуни и други средства. Се користи во производството на гуми за цвакање и во прехранбената индустрија за боене намирници.

Техники на екстракција и прочистување на хлорофилот. За екстракција на хлорофили се потребни поларни растворувачи како што се метанол, ацетон и етанол. Екстракција може да се направи и со органски растворувач, најдобро со диметил сулфоксид (DMSO). Може да се користат

класични техники меѓу кои и Сокслет екстракција или некоја од т.н. зелени техники како што е екстракција со помош на микробранови (MAE), која дава поголем принос за многу пократко времетраење. За сепарација на хлорофил се користат тенкослојната хроматографија (TLC) и колонската хроматографија, а денес сè повеќе течната хроматографија со која се врши прочистување на хлорофилот користејќи комбинација на гел-филтрација и јоно-изменувачка хроматографија (на DEAE-Cellulose и Sephadex LH20, и DEAE-Sepharose CL-6B и Sepharose CL-6B). За прочистување на хлорофилот од растителниот материјал може да се користат и други методи (таложeње со диоксан, центрифугирање, диференцијално центрифугирање и др.).

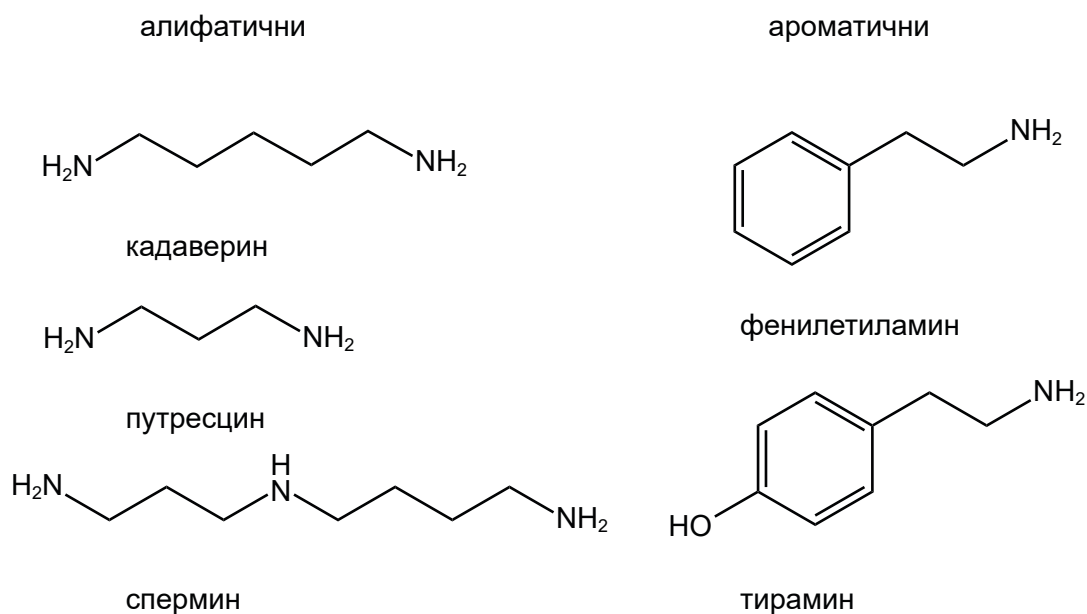


Слика 37. Структура на хлорофил а

Техники на идентификација и квантификација на хлорофилот. Структурното разјаснување на молекулите на хлорофил бара соодветен процес на екстракција во кој нема да настане или ќе дојде до минимална промена на оригиналната структура на молекулата на хлорофилот. Од суштинско значење е да се применат аналитички техники кои имаат потенцијал за раздвојување на различни молекули на хлорофил од други соединенија. За симултана идентификација и квантификација на хлорофил/и, најчестите техники се UV/Vis- спектроскопија, HPLC во комбинација со детектори: UV/Vis, детектор за флуоресценција, за масена спектроскопија (MS) или NMR-спектроскопија.

5.5. БИОГЕНИ АМИНИ

Биогените амини се биолошки активни молекули кои содржат една или повеќе аминогрупи врзани на основната алифатична, ароматична или хетероциклична структура. Природно се присутни кај животните, микроорганизмите, растенијата и човекот, претставуваат азотни соединенија со мала молекуларна тежина, што се одговорни за бројни биолошки ефекти. Врз основа на бројот на аминогрупите се класификуваат како моно- и полиамини. Од оние со алифатична структура значајни се путресцин, кадаверин, спермидин, од ароматичните фенилетиламин, тирамин, синефрин, хорденин, а од хетероцикличните хистамин, триптамин и др. (слика 38). Биогените амини се создаваат со бактериска декарбоксилација на аминокиселини или со трансаминација на алдехиди и кетони. Пронајдени се во многу видови храна од растително и од животинско потекло, а се наоѓаат и во ферментираниите производи како што се сирење, вино, пиво и др. Се создаваат и во текот на складирањето на храната, особено доколку условите се несоодветни и овозможуваат активирање на ендегени и екзогени ензими декарбоксилази.



Слика 38. Структури на позначајни биогени амини

Некои растителни биогени амини (путресцин, спермидин и спермин) се важни за клеточната делба, за цветањето, за развојот на плодовите, му помагаат на растението да се справи со негативно дејство на стрес фактори и сл. Кај животните и кај човекот неопходни се некои други биогени амини (фенилетиламин, тирамин, допамин) за одвивање на многу физиолошки функции како што се растот, обновувањето, метаболизмот, функционирањето на цревниот имунолошки систем, регулацијата на температурата, внесот на хранливи материи и одржувањето на нормалниот крвен притисок. Покрај сето наведено, биогените амини се и извор на азот и прекурсори во биосинтезата на многу примарни и секундарни метаболити, како што се хормони, нуклеински киселини, протеини и алкалоиди.

Урамнотежената исхрана гарантира соодветен внес на биогени амини. Во организмот амините се детоксикуваат со конјугација или со оксидација, со вклучување на определени ензими. Во случај кога храната содржи поголемо количество амини кое човековиот механизам за детоксикација не може да ги детоксикува, доаѓа до појава на токсични ефекти поради консумација на контаминирана храна. Симптомите на интоксикација варираат од единка до единка, а вклучуваат црвенило, главоболка, гадење, палпитации, промени во крвниот притисок и др. Како најтоксични се сметаат хистаминот и тираминот. Хистаминот е вазоактивна супстанција која може да предизвика псевдоалергиски реакции, хипотензија, главоболки и абдоминална болка, а големиот внес на тирамин може да резултира со хипертензија, мигрена, церебрална хеморагија и срцева слабост. Фенилетиламинот е значаен за создавање на невротрансмитерот допамин. Ниските физиолошки концентрации на допамин се вмешани во депресијата, додека високите концентрации имаат силна корелација со шизофренијата. Растителните амини путресцин и кадаверин можат да реагираат со нитрити и да формираат канцерогени супстанции нитрозамини, кои претставува ризик од развој на рак. Особено, високи концентрации на путресцин се најдени кај гастричен карцином поврзан со *Helicobacter pylori*, а се намалуваат доколку се елиминира бактериската инфекција. Високите нивоа на кадаверин и путресцин (50-100 mg/L) влијаат на органолептичките својства на ферментираната храна. Кај виното на пр., доведуваат до менување на карактеристиките и модификација на аромата која станува метална, месеста и гнила. Одредувањето на праговите вредности на таквите амини во храната е особено тешко бидејќи нивните ефекти не зависат само од нивното присуство, туку се под влијание на можните интеракции и ефикасноста на механизмите за детоксикација кај различни индивидуи. До денес, постои недостаток на заедничка регулатива која го ограничува количеството на биогени амини во храната и во пијалаците.

Некои растителни биогени амини се значајни поради своето биолошко-фармаколошко дејство. Горчливиот портокал (*Citrus aurantium* L.) се користи како активна компонента во додатоци во исхраната наменети за намалување на телесната тежина или за подобрување на општите физички перформанси. Најактивните состојки на горчливиот портокал се амини со адренергична активност: синефрин, октопамин, тирамин, N-метил-тирамин и хорденин. Квантификацијата на овие амини е критична за одобрување на прометот на производите, бидејќи нивната содржина во додатоците на исхраната е регулирана со национални и со меѓународни прописи.

Екстракција, прочистување и фракционирање. Биогените амини може да се екстрахираат од растителен матрикс со примена на различни техники: течно-течна екстракција (LLE) и екстракција во цврста фаза (SPE), микроекстракција во цврста фаза (SPME), микроекстракција на течна фаза на шупливи влакна (HF-LPME) и дисперзивна течно-течна микроекстракција (DLLME). Во случај на LLE, растителниот материјал (храна од растително потекло) може да се лиофилизира, а потоа да се екстрахира со кисели растворувачи. За течните примероци како што се вино, пиво и чај, главно не се потребни претходни третмани. Исклучок претставува виното, кое се обработува со поливинилпилипирилоидон (PVPP) со цел отстранување на фенолните соединенија кои можат да влијаат на аналитичкиот резултат. Понекогаш е потребно подолго време и поголемо количество растворувачи за обезбедување подобар принос на екстракцијата.

Валидна алтернатива на LLE е SPE. Овој метод е поволен бидејќи има широка комерцијална достапност на колони со различни полнења (анјонски и катјонски разменувачи или за неполярни функционални групи) и потребна е помала количина на органски растворувач. Негативна страна се долгото времетраење во случај на мануелна SPE односно висока цена на автоматска верзија на SPE. Дополнително, SPE може да биде проблематична во приносот на екстракција на триптаминот и фенитиламинот, поради нивното несоодветно задржување во колоната.

DLLME е нова техника за подготовка на примерок заснована на мешавина од три компоненти: воден примерок, дисперзивен растворувач и растворувач за екстракција. Предностите се едноставност, голем принос, брзина, ниска цена и еколошка прифатливост, благодарение на употребата на намалено количество органски растворувачи. Негативна страна е времетраењето на цело-

купниот процес (центрифугирање, елуирање и сушење со азот пред земање мостри). Техниката SPME е широко користена во последните неколку години поради нејзиниот еколошки карактер. SPME покажува предности во однос на SPE и LLE кои се: значително намалување или целосна елиминација на употребата на растворувачи (помалку од микролитар), леснотијата и практичноста на процесот на екстракција, и интегрирање на земање мостри, екстракција и прекоцентрација на аналитот во еден чекор. SPME се користи за анализа на биогени амини во храна, во додатоци на исхраната и во биоанализата. Негативната страна е: високата цена на влакната, ограничениот животен век и ефектите на пренесување помеѓу анализите. HF-LPME е релативно нова техника на екстракција, едноставна, евтина, со едноставно прочистување односно *clean-up*, висок фактор на збогатување (high enrichment factor) и побарување на помал волумен на органски растворувач. Негативна страна се смета и должината на екстрактивниот процес (15-45 минути) како и високата цена.

Идентификација и квантификација. За анализата на биогените амини во храна најчесто се користат хроматографски техники: LC, HPLC, UHPLC, IEC, GC, TLC и капиларна електрохроматографија (CEC). За детекцијата се користат UV-спектроскопија, масена спектрометрија (MS), флуорометриска детекција (FLD), кондуктометрија и др. Најчесто се користи реверзно-фазна HPLC, комбинирана со претколонска или со постколонска дериватизација на амините, со цел да се зголеми чувствителноста на детекцијата со UV или со флуоресценција. Спојувањето на HPLC со MS-детектори може да ја зголеми веродостојноста на идентификацијата на амините и да го намали времето на анализа и потрошувачката на хемикалии. Иновативната техника, UHPLC, се базира на истите принципи на кои е воспоставена HPLC, со тоа што UHPLC е значајно побрза (потребни се само 4 минути за анализа), почувствителна е и има поголема резолуција во споредба со другите методи. Негативната страна е што е многу скапа техника, сè уште несоодветна за рутинската анализа на која било состојка, вклучително и биогени амини во храната. Јонската хроматографија во комбинација со кондуктометрија е техника што поретко се користи за анализа на биогените амини, пред сè поради силните хидрофобни интеракции помеѓу протонирани амини и типичните катјон-изменувачки стационарни фази, што резултира со долго време на задржување и лоша форма на пиковите. Покрај тоа, потребни се високи концентрации на киселина за ефикасно елуирање на амините од колона. Позитивното во случај на оваа техника е избегнувањето на дериватизацијата (истата не е потребна) и добрата резолуција на пиковите. GC-MS може да се користи како алтернативна метода за анализа на амини во ферментирана храна, но потребна е дериватизација за да се подобри испарливоста на амините, кои се генерално неиспарливи. За рутинска анализа на биогени амини во вино, како алтернатива на HPLC, може да се користи TLC/денситометрија. Методот е едноставен и економичен, овозможува квантитативно определување на хистамин, тирамин, путресцин и кадаверин во примероци на вино, во концентрации помеѓу 1 и 20 mg/L. Развиена е и полуквантитативна верзија на овој метод, врз основа на интензитетот на даmkата на TLC-плочата.

Од други техники, широко се користи капиларната електрофореза. Методите базирани на оваа техника се едноставни и брзи, овозможуваат анализа на многу примероци за кратко време, бараат мали количини на реагенси и имаат прифатлива цена. Негативната страна е помала репродуктивност од течната хроматографија.

ЦИЈАНОГЕНИ ХЕТЕРОЗИДИ, ГЛУКОЗИНОЛАТИ И СУЛФИДИ

Директни производи на метаболизмот на некои аминокиселини се секундарни метаболити со релативно едноставни структури, што можат да се класификуваат во следните групи соединенија:

- цијаногени гликозиди/хетерозиди,
- глюкозинолати или сулфурни хетерозиди,
- сулфиди и други соединенија со сулфур.

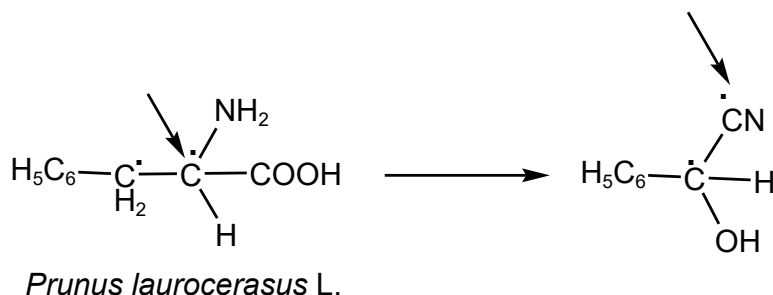
6.1. ЦИЈАНОГЕНИ ХЕТЕРОЗИДИ

Цијаногените хетерозиди се природни растителни производи што при ензимска хидролиза ослободуваат цијановодородна киселина, од каде што го добиле името (цијано + генеза = создавање цијановодород). Цијаногенеза е способност на растенијата да синтетизираат цијаногени супстанции, најчесто од типот на 2-хидроксинитрили, што во најголем број случаи се присутни како хетерозиди. Во литературата оваа група соединенија се означува со два термина: цијаногени (што се смета за посоодветен назив) или цијаногенетски хетерозиди. Во употреба се двата назива.

Цијаногени хетерозиди се создаваат во над 2 000 растителни видови, меѓу кои и голем број овошја кај кои се акумулираат особено во семето (семе од кајсии, јаболка, лен, горчлив бадем и др.). Прехранбениот производот марципан (хомогенизирани сомелени семки од бадем и кајсија) што се користи во производството на кондиторски производи и различни слатки има карактеристичен мирис кој потекнува токму од цијаногените хетерозиди.

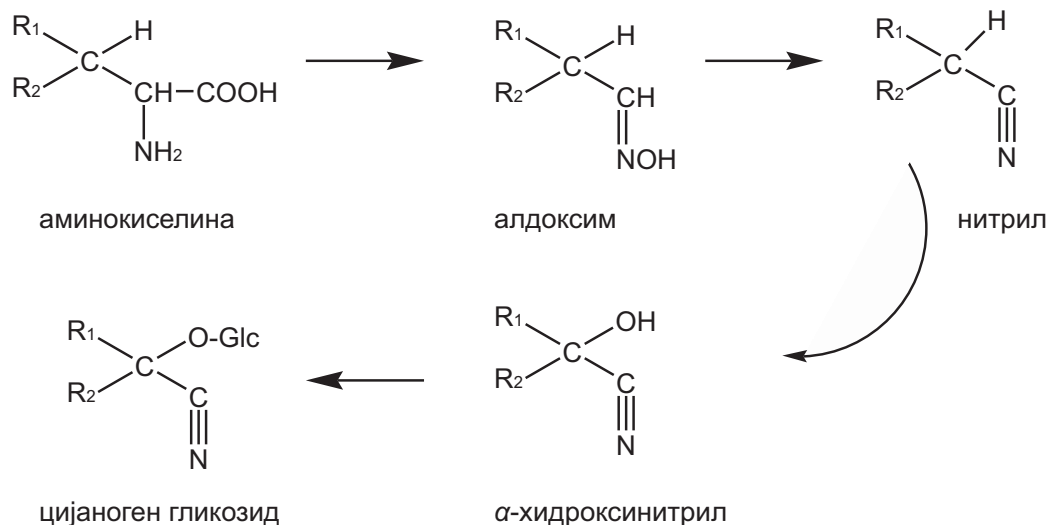
Биосинтетско потекло и метаболизам. Агликоните на цијаногените гликозиди/-хетерозиди настануваат од определени азотни интермедиери. Појдовни супстанции во синтезата се аминокиселините: валин, изолеуцин, фенилаланин и тирозин. Со декарбоксилирање, дехидрогенирање, хидроксилирање и други реакции тие се трансформираат во хидроксинитрили (цијанхидрини) коишто понатаму се врзуваат со шеќери, градејќи хетерозиди. Моделот на биосинтезата на цијаногените хетерозиди е поставен врз база на проучувања направени со аминокиселини со маркирани

изотопи на јаглерод (^{14}C). Се смета дека биосинтезата на прулауразин во листови од ловорвишна (*Prunus laurocerasus* L.) оди преку фенилаланин. Со проучување на хидролитичките производи на прулауразинот, изолиран од третирано растение, утврден е начинот на инкорпорирањето на маркираните изотопи на јаглерод во молекулата на прулауразин и потеклото на C-атомот во нитрилната група (слика 39).



Слика 39. Потеклото на C-атомот во нитрилната група на цијаногените гликозиди

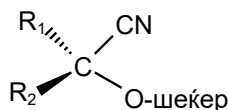
Идентични резултати се добиени при проучувањето на биосинтезата на амигдалинот во горчливиот бадем (*Prunus amygdalus* Batsch). Експериментите со двојно маркирани аминокиселини покажале дека азотот во нитрилната група на цијаногеното соединение потекнува од азотот од аминокиселината (слика 40). Резултати од други истражувања овозможиле да се детерминира природата на интермедиерите (оксими и нитрили) што се создаваат во текот на конверзијата на аминокиселините во цијаногеното соединение.



Слика 40. Биосинтеза на цијаногени хетерозиди (поставена во 1969 год.)

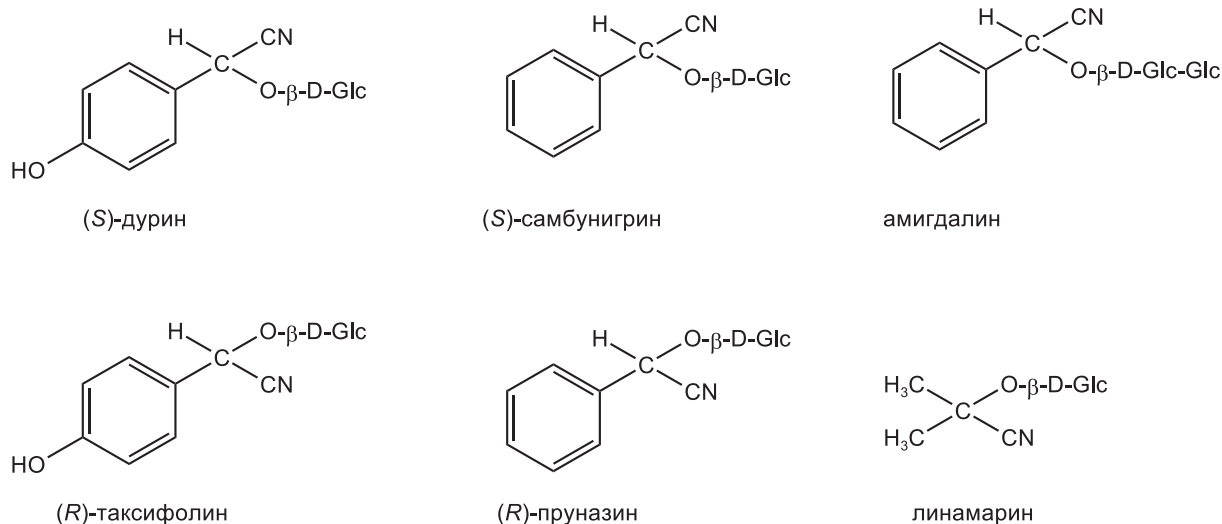
Хемиска градба. Досега се познати околу 50 компоненти од оваа група секундарни метаболити. Како нивни биолошки прекурсори се јавуваат протеинските аминокиселини: фенилаланин и тирозин (со ароматичен прстен = R_1) и леуцин, изолеуцин и валин (со алифатичен ланец = R_1)

и R_2) (слика 41). Во некои случаи R_1 и R_2 се делови од прстен. Цијаногениот агликон вообичаено содржи асиметричен C-атом бидејќи најчесто $R_1 \neq R_2$, поради што хетерозидите се јавуваат во епимерни парови. По правило различни растенија продуцираат различни епимери (на пр. *(S)*-ду-рин се синтетизира во растението соргум, додека неговиот епимер *(R)*-тахифолин во растението смрека).



Слика 41. Општа формула на цијаноген гликозид

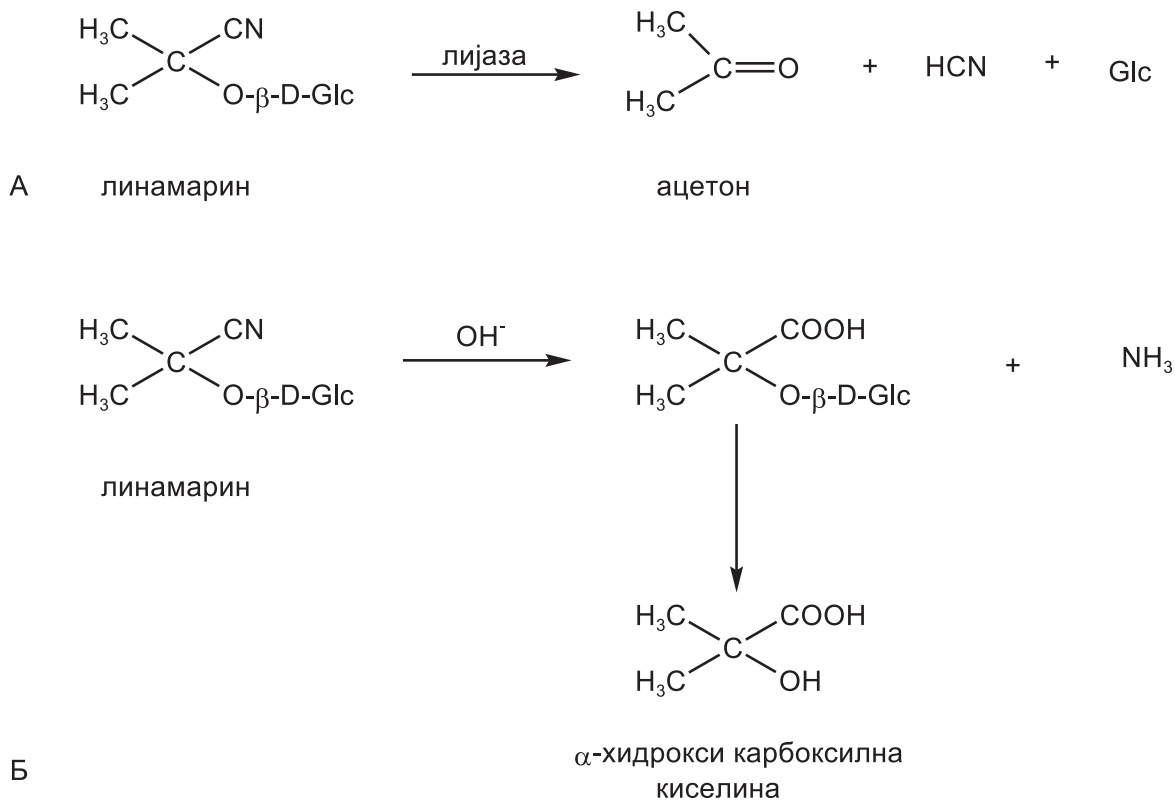
Најзначајни цијаногени гликозиди се пруназин, самбунигрин и прулауразин кои се нитрили на бадемова киселина, и тоа: пруназин на D-, самбунигрин на L-бадемова киселина, а прулауразин на нивниот рацемат (слика 42). Како гликон најчесто се јавува β -D-гликоза. Поретко се врзуваат дисахари, како што е случај со генциобиоза во амигдалинон. Гликозидите се од типот *O*-гликозиди.



Слика 42. Позначајни цијаногени хетерозиди

Хидролиза. Хидролизата на цијаногените хетерозиди што најчесто се сместени во вакуолите на клетките, се одвива со ензими ендогени гликозидази, до добивање на хидроксинитрил кој понатаму се разложува под дејство на ензим хидроксинитрил лијаза. До оваа реакција доаѓа по повреда на ткивата предизвикана од физички процеси, како што се гмечење, цвакање или инфекција со габи, при што доаѓа до контакт на вакуоларните цијаногени гликозиди со цитоплазматските ензими. Во интактно ткиво, контактот помеѓу гликозидите и ензимите не се остварува. Во *слабо кисела средина* и на повисока температура изолирани цијаногените хетерозиди се хидролизират како да се во присуство на гликозидази и распаѓањето на цијанохидрин се одвива спонтано и многу брзо. Однесувањето во *слабо алкален медиум* варира во зависност од структурата. Може да се формира HCN или нитрилната група да се трансформира во карбоксилна група, без хидроли-

за на гликозидните врски. Понатамошната трансформација може да оди во прилог на создавање на α -хидрокси карбоксилни киселини. Ако во структурата е вклучена електрон акцепторна група лесно доаѓа до епимеризација (слика 43).



Слика 43. Хидролиза на цијаногени гликозиди во неутрална (А) и во слабо алкална средина (Б)

Особини. Цијаногените хетерозиди во изолирана состојба се бели кристални супстанции, без мирис и со силно горчлив вкус. Растворливи се во топла вода и алкохол, а не се раствораат во органички растворувачи. Се хидролизираат под дејство на специфичните ензими и ослободуваат шеќер и испарлив агликон 2-хидроксинитрил. Агликонот е многу нестабилно соединение и во зависност од рН на средината, се разложува на HCN и алдехид или кетон.

Токсичност. Познато е дека цијановодородната киселина претставува силен отров, но при перорално внесување на производи што содржат цијаногени хетерозиди не постои поголем ризик од предизвикување сериозни интоксикации. До сериозно труење може да дојде само во случаи кога се внесува големо количество делови од растенија богати со овие состојки. Притоа, за да дојде до труење хетерозидите мора да се хидролизираат во дигестивниот тракт. Од друга страна, познато е дека човечкиот организам има способност брзо и задоволително да ги детоксицира цијанидите во тиоцијанати со помош на ензимот тиосулфатсулфур трансфераза (роденаза), и настанатите тиоцијанати да ги елиминира преку урина. Доколку, сепак дојде до обилна интоксикација, таа се манифестира со симптоми што резултираат од цитотоксична аноксија, предизвикана од блокирањето на цитохром-С-оксидаза со цијанидни јони, прекинување на процесот на реоксидацијата и прекин во врзувањето на молекуларниот кислород што резултира со дефицит на кислородот на ниво на клетките. Се јавуваат промени во респираторниот ритам, главоболка, вртоглавица и опие-ност, а понатаму длабока кома и респираторна депресија. Ако дозата е мала и ако не дојде до брза

смрт, третманот на затруениот треба да вклучува: празнење и перење на желудникот, терапија со кислород, амил нитрит, хелирање на цијанидниот јон со инфузија со хидроксикобаламин, стимулација на детоксификационите механизми (со натриум тиосулфат) и други мерки.

Дејство и употреба. Цијаногените хетерозиди покажуваат седативно и анестезирачко дејство. Позначајни соединенија од оваа група што наоѓаат практична примена се: амигдалин (горчлив бадем), пруназин (горчлив бадем), линамарин (ленено семе), самбунигрин (листови од бозел) и прулауразин (листови од зелениче, *Prunus laurocerasus*). Производите на нивната хидролиза се силни отрови, особено цијановодородот. Токсичниот ефект го даваат и цијаногените хетерозиди, но со една побавна реакција. Поради токсичноста, цијаногените хетерозиди во медицински цели се користаат строго ограничено.

Во исхраната цијаногените хетерозиди се внесуваат со консумација на семе од лен (линамарин), семки од кајсии (пруназин), марципан (амигдалин и пруназин) и други производи. Некои цијаногени хетерозиди се активни компоненти во производи од групата додатоци на исхраната. Пример за ваков производ е витамин B17 (амигдалин) или познат и под името лаетрил, кој содржи екстракт од семки од кајсија и кој се препорачува за превенција и третман на рак. И покрај масовното рекламирање на овој производ, треба да се напомене дека амигдалинот не претставува витамин и дека таквото означување е несоодветно. Од друга страна досегашните испитувања покажуваат дека, иако се очекува ослободениот цијановодород да дејствува врз малигните клетки, сепак, нема клиничка потврда на ефикасноста на амигдалинот (витаминот B17) во третманот на рак.

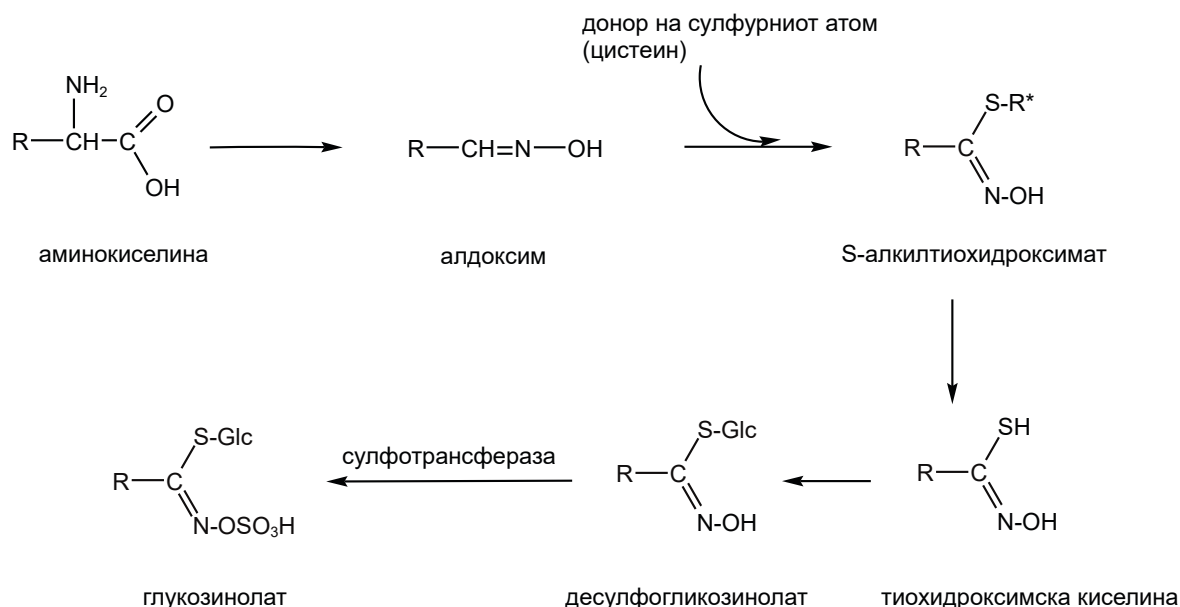
6.2. ГЛУКОЗИНОЛАТИ

Глукозинолатите (по стара номенклатура сулфурни хетерозиди) се природни производи што содржат сулфур. Имаат лут вкус и повеќето развиваат остар и специфичен мирис. Се создаваат во растенијата од фамилијата на зелка (зелка, кел, прокел, карфиол, брокула, репа, рен и др.), фамилија на синап (бел и црн синап, естрагон), и во некои медицински растенија. Во растенијата се локализираани во сите органи, а во значително количество се натрупуваат во семињата. Досега се изолирани околу стотина различни глукозинолати.

Биосинтеза. Појдовни супстанции во биосинтезата на глукозинолатите се аминокиселините: фенилаланин, триптофан, тирозин, хомометионин и 2-амино-4-фенил-бутерна киселина (хомо-фенилаланин). Првата фаза од биосинтезата е иста како и кај цијаногените хетерозиди, што укажува на поврзаноста и на биогенетската блискост на овие две групи состојки. Општо, за двете групи хетерозиди е трансформирањето на аминокиселините во соодветни алдокси, при што внесувањето на сулфурниот атом се изведува со вклучување аминокиселини што содржат сулфур, најверојатно цистеин (слика 44). За сулфхидрилната група се врзува шеќер од UDP-гликоза. На крај доаѓа до сулфонирање во присуство на ензим фосфаденозин фосфосулфат и создавање на анионски дел од агликонот. За анионскиот дел се врзува определен катјон, најчесто метален јон (K^+).

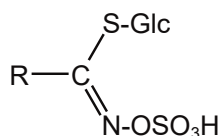
Номенклатура и хемиска градба. Според старата номенклатура, имињата на сулфурните хетерозиди се изведуваат со ставање на префиксот глауко пред името на растението (на пр. сулфурниот гликозид од зелка (*Brassica*) се нарекува глаубрасицин). Со воведување на поимот глукозинолати се наметна потреба од нова номенклатура со која како префикс се користи името на делот од молекулата што се менува, на што се додава генеричкиот термин глукозинолат. Оттука имињата на глукозинолатите се изведуваат како: метилглукозинолат, бензилглукозинолат итн. Така, глаубрасицинот со новата номенклатура се именува како 3-индол-метил глукозинолат. За некои глу-

козиниолати сè уште се користат нивните тривијални имиња (на пример: 2*R*-хидрокси-2-бутенил-глукозинолат е многу попознат како синалбин, изолиран од семето на бел синап).



Слика 44. Општа шема на биосинтеза на глукозинолати

Основната структура на еден глукозинолат вклучува: гликоза врзана за S-атом од органскиот дел на агликонот и сулфатна група во неорганскиот дел од агликонот, присутна како анјон, за кој лесно се врзува катјон и гради сол (слика 45).



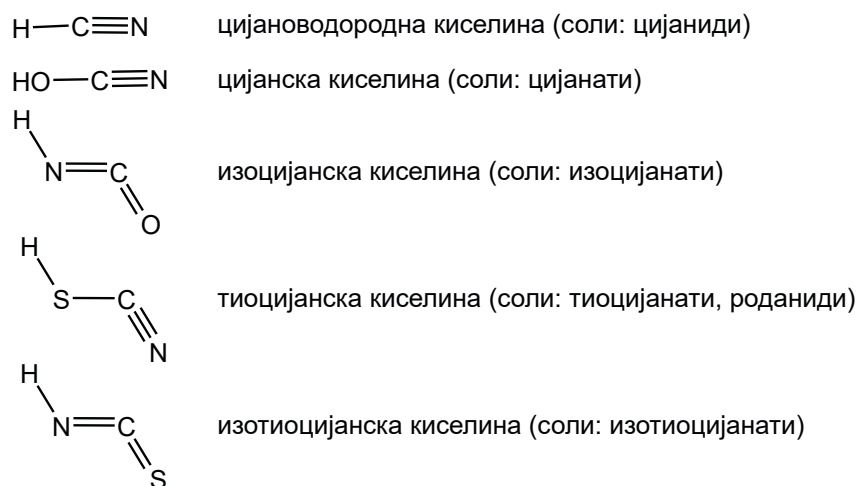
Слика 45. Основна структура на глукозинолат

Структурните разлики во органскиот дел од агликонот се резултат од разликите во хемиската градба на појдовните аминокиселини. Така, од определени аминокиселини се добиваат точно определени глукозинолати, како на пример:

- од тирозин *p*-хидроксибензил-глукозинолат (синалбин во бел синап),
- од фенилаланин бензил-глукозинолат (глюкотропеолин во растението *Nasturtium*),
- од триптофан 3-индолил-метил-глукозинолат (глюкобрасицин во зелка),
- од хомометионин алил-глукозинолат (синигрин во црн синап) и
- од хомофенилаланин фенетил-глукозинолат (глюконастуртин во растението *Nasturtium*).

Хидролиза. Глукозинолатите се хидролизираат лесно и брзо под дејство на специфични ензими, опфатени во еден ензимски комплекс наречен мирозиназа (припаѓаат на групата L-тиоглукозида-

зи). Ензимите, сместени во цитоплазмата и глукозидите, сместени во вакуолата, доаѓаат во контакт само при повреда на клетките, при гмечење, толчење и дробење, при што се ослободуваат состојки со остар и со продорен мирис и лут вкус, означени како изотиоцијанати.

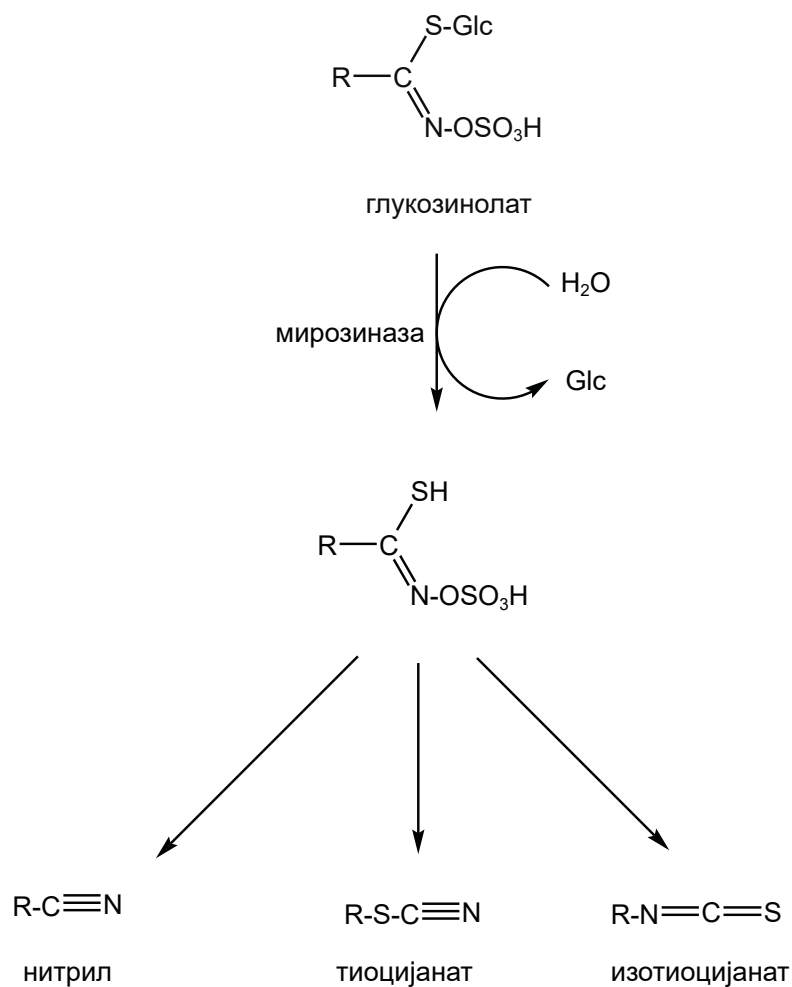


Слика 46. Кислородни и сулфурни хомолози на цијановодородната киселина

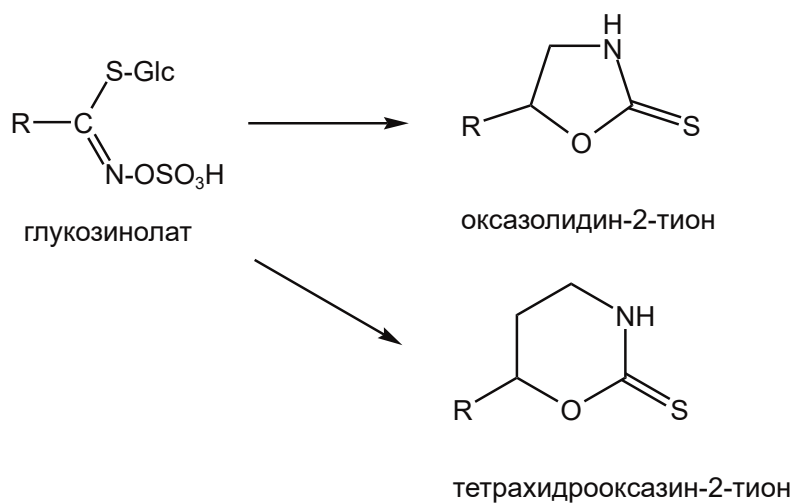
Како производи на ензимската хидролиза во *неутрално pH* се добиваат: изосулфоцијанат, калиум хидроген сулфат (KHSO_4) и гликоза. Во процесот на хидролиза истовремено се одвива и процес на реорганизација во органскиот дел од агликонот. Радикалот R се врзува за азотниот атом, за разлика од состојбата во глукозинолатот, во кој бил врзан за јаглерод. Ослободениот изотиоцијанат хемиски претставува естер на изотиоцијанска киселина (слика 46) со соодветен алифатски или ароматичен алкохол. Најзначаен претставник на изотиоцијанатите е алилизотиоцијанат $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}=\text{S}$, кој се добива со ензимска разградба на синигрин од семето на црниот синап (*Sinapis nigra*) (слика 47). Изотиоцијанатите претставуваат безбојни течности, со карактеристичен и лут вкус и силен и продорен мирис, што ги надразнува слuzниците на очите и органите за дишење, предизвикувајќи солзење, кивање и кашлање. Во допир со кожата предизвикуваат црвенило, а при долготраен контакт пликови.

Во *кисела средина* (pH 3-4) и во присуство на Fe^{3+} јони, наместо изотиоцијанат се формира нитрил, а реакцијата протекува со излучување елементарен S и сулфати. Можно е формирање тиоцијанати, особено кога глукозинолатниот агликон потекнува од триптофан (слика 47).

Особини. Глукозинолатите се кристални супстанции, што тешко се хидролизират под дејство на киселини или на алкалии. Хидролизата се одвива лесно само под дејство на ензими (мирози-наза). Хетерозидните форми се растворливи во топла вода и во етанол. Не се раствораат во непо-ларни растворувачи (етер, петролетер, хлороформ и др.). Агликоните на глукозинолатите се глав-но, испарливи течности, со многу остар мирис и лут вкус. Се ослободуваат само при гмечење, ситнење или други манипулации на растителните делови што содржат глукозинолати. Реагираат со алкохоли и формираат тиокарбамати. Реакција од овој тип се случува кога се присутни гидро-ксиларани агликоните. Ако содржат OH-група на C_2 -атомот, се циклизираат во оксазолидин-2-тио-ни или гоитрини. Ако OH-групата се наоѓа на C_3 , се создаваат тетраhydro-оксазин-2-тиони (сли-ка 48).



Слика 47. Хидролиза на глукозинолати



Слика 48. Конверзија на глукозинолати во оксазолидини и во тиони

Дејство и употреба. Медицинските растенија што содржат глукозинолати се користат во симптоматски третман на реума, ишијас, лумбаго, невралгии и други заболувања, што се проследени со јака болка во мускулите и во зглобовите. Традиционално се користат за подготовка на препарати за перорална употреба кај заболувањата на горниот респираторен тракт, за подобрување на апетитот и за регулација на стомачната и жолчната функција.

Внесувањето на глукозинолатите со исхраната богата со зеленчук од фамилијата на зелки овозможува антиоксидативна заштита на организмот и други здравствени придобивки. Во оваа смисла денес посебно внимание се посветува на глукозинолатот на брокулата – сулфорафанот, кој се смета за многу корисен агенс во заштитата на организмот од разни штетни надворешни влијанија, а меѓу другото и како превентивен агенс од развојот на канцер. Треба да се напомене дека внесувањето на глукозинолатите преку исхрана богата со зелка и друг сличен зеленчук може да биде штетно кај лица со дефицит на јод, бидејќи може да дојде до нарушување во функцијата на тироидната жлезда. Вообичаено се манифестира со појава на зголемување на обемот на жлездата или гушавост (струма). Со внесување на јод (јодирана сол) овој проблем се елиминира.

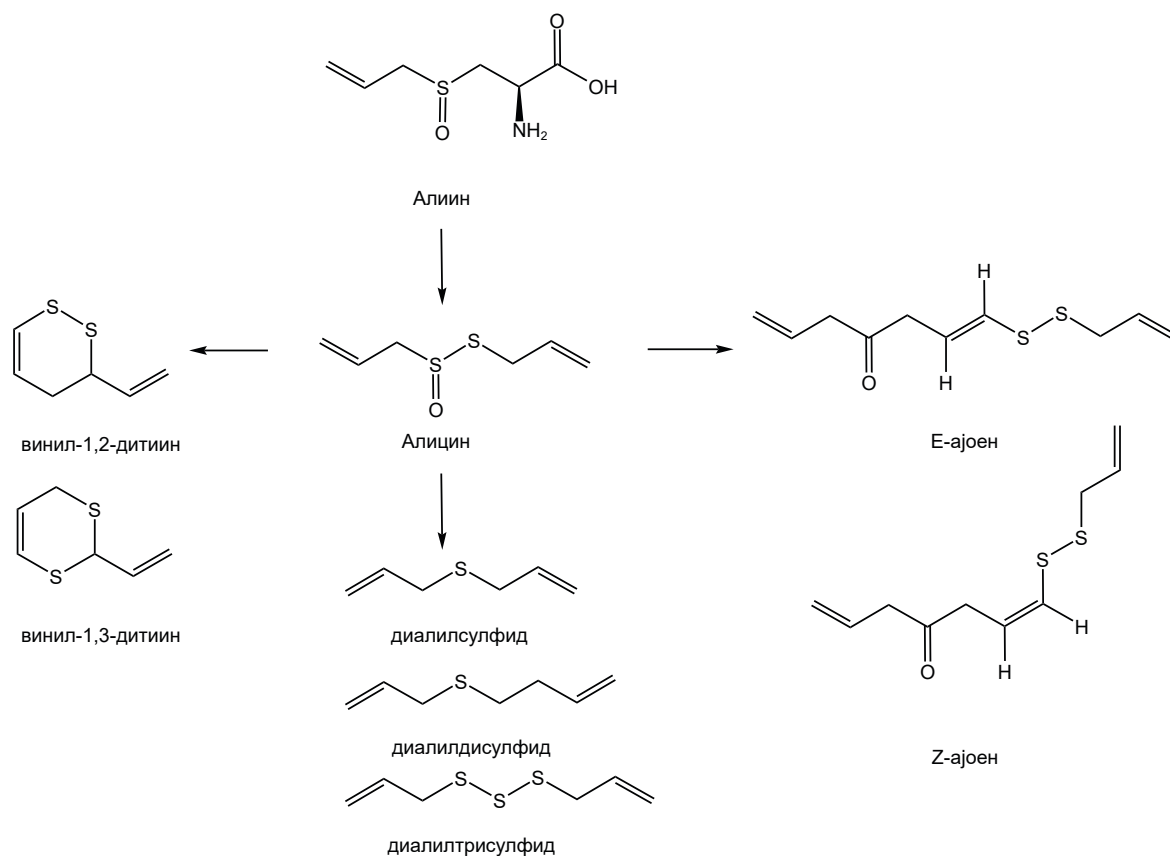
6.3. Сулфиди и други соединенија со сулфур

Од други соединенија со сулфур најзначајни се компонентите што настануваат како производ на цистеин, а коишто се јавуваат во претставниците од родот на лукот (*Allium*). Лукот (*Allium sativum* L.) во свежо растение содржи алиин (S-алил-L-цистеин-сулфоксид), кој многу брзо се разложува под дејство на ензимот алииназа, при гмечење, толчење или сечење на делови од растението, особено чешнињата. При хидролизата дава амонијак, млечна киселина и 2-пропенилсулфинска киселина, која веднаш гради димер диалилтио-сулфинат, познат како алицин. Од алицинон понатаму се создава испарливиот диалилдисулфид, од кој потекнува карактеристичниот мирис на лукот (слика 49). Во услови на кисело-катализирана деградација можно е да се создадат ајоени (алифатични деривати) или дитиини (циклични деривати) (слика 49).

Кромидот (*Allium cepa* L.) содржи слични соединенија од кои е најзначаен *trans*-(+)-S-(1-пропенил)-L-цистеинсулфоксид. Со ензимска хидролиза ова соединение дава различни дисулфидни соединенија, што ги иритираат очите и предизвикуваат солзење.

Сулфурните соединенија на лукот и на кромидот се многу силни антимикробни агенси. Алицинот и другите соединенија на лукот дејствуваат хипохолестеринемично, хиполипидемично и антихипертензивно, додека оние од кромидот се носители на фибринолитичкото дејство. Лукот и кромидот (кромид, праз, зелен кромид) со векови наназад се користат во народната медицина. Нивните состојки со сулфур – сулфиди, имаат докажано антимикробно, антиоксидативно и антиканцерогено дејство. Кромидот и лукот се богати со моќни биолошки активни компоненти со сулфур, кои во исто време се одговорни за лут (продорен) мирис и руги ефекти што позитивно влијаат врз здравјето. Бројот на сулфурни компоненти кои се наоѓаат во лукот е многу поголем отколку во кој било друг претставник од родот *Allium*. Лукот може да помогне во заштитата од многу дегенеративни процеси кои се случуваат при дијабетес-ретинопатија, нефропатија и невропатија, предизвикани од нерамнотежа помеѓу слободните радикали создадени во ситуации кога нивото на шеќер во крвта е високо. Свежи чешниња од лук содржат алиин до 1 %. Лукот е исто така богат со други соединенија со сулфур, како што се дитиини и ајоени. На ајоените се припишува антитромботично дејство и способност да ја инхибираат агрегацијата на тромбоцитите. Интересно е што лукот и кромидот имаат висока содржина на калциум. Истражувањата покажуваат голема

биорасположивост на калциум од кромидот, што може ефективно да се користи во превенција и третман на остеопороза.



Слика 49. Структура на алиин и производи на негова деградација

6.4. ЕКСТРАКЦИЈА И ИСПИТУВАЊЕ НА ЦИЈАНОГЕНИ ГЛИКОЗИДИ, ГЛУКОЗИНОЛАТИ И СУЛФИДИ

Екстракција и испитување на цијаногени хетерозиди. Екстракцијата на цијаногените хетерозиди од растителен материјал вклучува претходна инхибиција на ензими. Како екстрактивно средство најчесто се користи алкохол, а изолирањето и пречистување се изведуваат со хроматографски техники.

Идентификацијата на цијаногените хетерозиди во растителен материјал/екстракт се изведува со класични реакции со реагенси што даваат боена реакција со HCN. Најчесто се користат ленти од филтер-хартија импрегнирани со пикринска киселина/натриум карбонат или бензидин/бакар ацетат, што со цијановодород ослободен по гмечење на растителниот материјал во мало количество вода даваат карактеристично портокалово, односно сиво-црно обојување. Методот со пикратна хартија денес е унапреден и овозможува определување на вкупниот цијаноген потенцијал (total cyanogenic potential TCP), со вклучување на UV-Vis- спектрофотометрија.

Класичниот квантитативен метод за определување цијаногени хетерозиди се состои во суспендирање на растителен материјал во закиселена вода, дестилација со водена пареа и титрација на цијановодородната киселина во дестилатот со сребро нитрат. Може да се користи гасна хроматографија за идентификација и истовремено определување на хетерозидите, што е погоден метод дури и ако нивната концентрација е многу ниска. Цијаногените гликозиди може да се анализираат со LC-MS/MS-метод, со кој се постигнува прецизна идентификација и квантификација на интактни гликозиди.

Екстракција и испитување на глюкозинолати. Глюкозинолатите се испитуваат во растителен материјал откако претходно наполно ќе се уништат ензимите што лесно и брзо ги разградуваат. Најчесто инактивацијата се изведува со вречки алкохол. Екстракцијата на вкупните глюкозинолати од растителен материјал може да се направи со метанол : вода (70 : 30) во присуство или во отсуство на трифлуороцетна киселина, со константно мешање на термостатска бања, а по ладење и центрифугирање, супернатантите се филтрираат и впаруваат до суво. Сувиот талог што содржи глюкозинолат се реконституира со HEPES–KOH- пуфер (pH 7,0) и потоа понатаму прочистува и сепарира. Поради јонската природа, глюкозинолатите можат да бидат сепарирани со користење на јоноизменувачки смоли.

Идентификација на глюкозинолатите се прави органолептички, преку лутиот вкус кај глюкозинолатите, или уште повеќе кај нивните агликони (цвакање одредено количество дрога). Некои агликони се испарливи и ги дразнат очите и предизвикуваат солзење при толчење, гмечење, рендање на некои корени и сл. Хемиска идентификација се изведува преку создавање црни талози со сулфур (метални сулфиди). Најчесто се користи реакција со олово ацетат што се става на лента од филтер-хартија која се внесува во сад во кој се наоѓа сомелен растителен материјал во мало количество вода. При хидролизата на глюкозинолатите се ослободува испарлив изотиоцијанат што реагира со олово ацетатот и создава црно обоен олово сулфид (PbS). Реакцијата може да се изведе и со амонијачен раствор на AgNO₃, што се додава во етерски екстракт од растителен материјал што содржи глюкозинолати. Во реакцијата помеѓу аглуконот и Ag⁺ јон се создава црн талог од AgS.

Одредување на количеството на глюкозинолати се изведува индиректно, преку определување на количеството на ослободените изосулфоцијанати по ензимска разградба на хетерозидите. Вообичаено, сомелениот материјал се мацерира определено време, а потоа се изведува дестилација. Во дестилатот количеството на агликоните се определува најчесто јодометриски или аргентометриски. Определувањето на количеството на глюкозинолатите може да се направи и со други ме-

тоди. Може да се користи 1,2-бензендитиол кој со изосулфоцијанатите создава обоени 1,3-бензо-дителиол-2-тиони, погодни за спектрофотометриско определување. Квантитативна и квалитативна анализа се врши и со HPLC-методот. Денес е актуелен методот на реверзно-фазна LC-ESI-MS, со кој може да се сепарираат и квантификуваат глукозинолатите и изотиоцијанатите што настануваат како производ на хидролиза со мирозиназа. Методот може да се примени за понатамошно испитување на ензимската конверзија на глукозинолати во изотиоцијанати, во сложени мешавини.

Екстракција и испитување на сулфиди и други соединенија со сулфур. Аналитиката на сулфидите главно се однесува на алицинот, алиинот и другите соединенија со сулфур што се присутни во претставниците од родот *Allium*. Екстракцијата на алицинот може да се направи со ладна мацерација, со сонификација или во микробранова печка, а прочистувањето со додавање на заситен раствор со натриум хлорид и екстракција со дихлорометан. Дихлорметанските екстракти понатаму треба да се исушат со безводен натриум сулфат и да се впарат до суво, со помош на ротационен впарувач. Определување на содржината се врши со HPLC-метод, со UV-детекторот, на 254 nm. Квалитетот на производите од лук е поврзан со содржината на алиинот и потенцијалот за негово трансформирање во алицин. Со примена на HPLC-техника и со употреба на елуенти кои содржат реагенс за спарување на јони, може истовремено да се определува содржината на алицинот, на неговиот директен прекурсор алиин и на разните дипептиди. Како реагенс за спарување на јони најдобро е да се користи хептансулфонат. Детекцијата на компонентите може да се направи со користење на UV-DAD и масен спектрометар, во повеќекратен MS-режим.

РАСТИТЕЛНИ ОРГАНСКИ КИСЕЛИНИ

Растителните органски киселини се органски соединенија со киселински својства (одаваат протон) кои се разликуваат по бројот на карбоксилните групи. Во структурата на овие соединенија има до 10 јаглеродни атоми, со што се разликуваат од масните киселини кај кои тој број се движи од 12 до 24. Сите органски киселини се создаваат и кај растенија и кај животни, и затоа се широко дистрибуирани во природата. Храната од растително и од животинско потекло секогаш содржи определено количество органски киселини кои на храната ѝ даваат определени карактеристики.

Растителните органски киселини содржат една или повеќе карбоксилни групи, поврзани со алкилна група (RCOOH) или со арилна група (ArCOOH). Во структурата се можни и други функционални групи како што се: алкохолна, фенолна, тиолна, енолна и сулфонска ($-\text{SO}_3\text{H}$) група, кои може да бидат одговорни за целокупната киселост. Во поглед на нивните физички својства, органските киселини не се дисоцираат целосно во водата до минерални киселини. Киселините со помала молекуларна тежина се растворливи во вода, на пример, оцетна и мравја киселина. Растворливоста во вода се должи на формирањето на водородна врска помеѓу карбоксилните групи и молекулите на вода. Повеќето органски киселини се екстремно добро растворливи во органски растворувачи. Имаат повисока точка на вриење од соодветните алкохоли.

Основно својство на растителните органски киселини е киселост. Општо земено, тие се слаби киселини, при што оние кои во структурата содржат фенолни, енолни, алкохолни или тиолни групи се послаби киселини во однос на другите. Единствено оние што содржат сулфонска група ($-\text{SO}_3\text{H}$) се сметаат за силни органски киселини. За сите киселини е значајна константа на киселост (константа на дисоцијација) (K_a), која претставува однос помеѓу јонизиран и нејонизиран дел. Се изразува со pK_a што претставува негативен логоритам на константата на дисоцијација на киселината или на вредноста на K_a . Притоа, пониска вредност на pK_a означува посилна киселина, односно, киселината поцелосно/повеќе се дисоцира во водата. За едноставни карбоксилни киселини, pK_a е околу 4-5 и вредностите варираат само малку со температурата. Најважниот фактор на киселоста е ефектот на супституентите. Секој фактор што го стабилизира анјонот со дисперзирање на негативниот полнеж, како што се електрон-акцепторските групи (на пример, $-\text{NO}_2$) доведуваат до зголемување на киселоста, додека електрон-донорските групи (на пример, $-\text{CH}_3$), го потенцираат негативниот полнеж, го дестабилизираат анјонот и на тој начин, ја намалуваат киселоста. Така, оцетната киселина има повисока pK_a од мравјата киселина, што се должи на карак-

терот на метил групата што донира електрони. Битно е што кај неразгранетите алифатични карбоксилни киселини, вредноста на pK_a е речиси константна.

Класификација. Органските киселини варираат во бројот на хидроксилни и карбоксилни функционални групи и двојни $C=C$ врски во нивните структури, и затоа не се подредени во хомоложни серии. Се категоризираат врз основа на четири карактеристики: природата на јаглеродниот ланец (ароматичен, алифатичен, алицикличен и хетероцикличен), заситени и незаситени својства, супституирани или несупституирани карактеристики и број на функционални групи (моно, ди- или три-карбоксилни итн.). Денес најчесто се користи класификација на:

1. монокарбоксилни,
2. дикарбоксилни,
3. алфа-хидроксилни и
4. шеќерни киселини
5. циклични киселини.

7.1. Монокарбоксилни киселини

Монокарбоксилните киселини имаат само една карбоксилна група ($-COOH$), врзана за алифатичен или за цикличен јаглероден ланец. Овие киселини вклучуваат:

- заситени монокарбонски киселини (мравја, оцетна, пропионска, бутерна и др.),
- незаситени монокарбонски киселини (сорбински и циметни киселини),
- хидроксилни монокарбонски киселини (млечна, лимонска) и
- фенолни монокарбонски киселини (циметна, бензоева, салицилна).

Алифатичните монокарбоксилни киселини со C_1-C_4 се испарливи течности со карактеристичен мирис, додека киселините со повеќе јаглеродни атоми се главно цврсти липофилни материјали и имаат мала растворливост во вода. Најзначајни киселини (слика 50) од оваа група се:

- А. Мравја киселина, изолирана за прв пат од црвени мравки *Formica rufa*. Најдена е во копривата, како составен дел на холинот. Во природните производи најчесто се врзува како формил-група во различни секундарни метаболити.
- Б. Оцетна киселина, распространета во сите растителни и животински организми во активирана форма како ацетил- CoA , учествува во биохемиските процеси и во биосинтезата на разни компоненти, се јавува како ацетил-група во разни секундарни метаболити, како естер со разни алкохоли, како сол со некои алкалоиди и сл.
- В. Пропионска киселина, за прв пат е најдена меѓу производите што настануваат со разградување на шеќер. Има изразено антимикробно дејство, а се користи како: конзерванс, фунгицид, хербицид, агенс за контрола на pH , засилувач на вкус, закиселувач во исхраната на животните и во козметиката и др.
- Г. Бутерна и изобутерна киселина, може да се јават во слободна состојба или во форма на естри, бутирати. Во растенијата почесто се јавува изобутерна киселина. Присутна е во естерскиот дел на есцинот, а со некои алкалоиди формира соли.
- Д. Валеријанска киселина, се јавува во форма на 4 изомери: нормална, изовалеријанска, метилетил оцетна и триметил оцетна киселина. Најчесто се среќава изовалеријанската киселина, слободна или во форма на естри. Карактеристичен е борнил-изовалеријанат во етеричното масло од маче трева (*Valeriana officinalis* L.). Специфичниот мирис на коренот од ова расте-

ние доаѓа токму од изовалеријанската киселина. Значајна е за дејствата на естерските соединенија во чиј состав влегува.



Слика 50. Структури на некои монокарбонски киселини

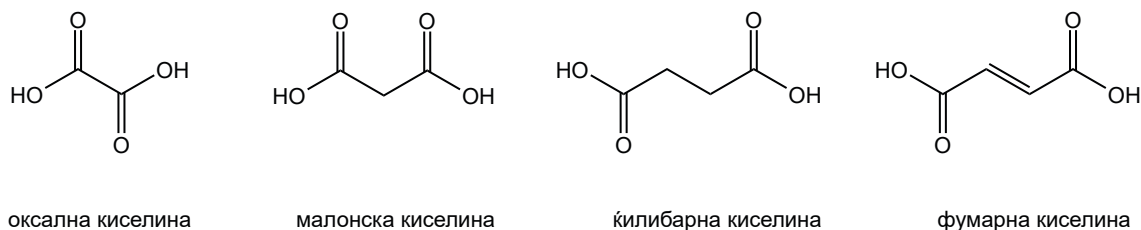
- Е. Ангелика киселина (*trans* изомер) и тиглинска киселина (*cis* изомер) се незаситени алифатични монокарбонски киселини, во растенијата присутни во форма на естри, на пр. во есцигот.
- И. Сорбинска киселина, слаба органска киселина со низа од 6 C-атоми, што природно се јавува како лактон (парасорбинска киселина) во бобинките од диво грозје (*Sorbus aucuparia* L., Rosaceae). Се јавува како сол, калиум сорбат и калциум сорбат. Практично се користи како додаток на храна поради мала токсичност и способност за заштита на млечни производи, суво месо, сирова риба, пулпа од сокови, брашно и пченица од развој на мувла. Сорбатите широко се користат во пијалаци и прехранбени производи како што се овошни сокови, вина, сирупи, џемови, желеа и конзервиран зеленчук. Ефикасно го контролира развојот на габите *Aspergillus niger* и *A. flavus*, а исто така и на одредени алги, квасци, бактерии и протозои.
- Ј. Бензоева киселина е ароматична монокарбоксилна киселина, која е значаен посредник во формирањето на други соединенија и природно се јавува во многу плодови како што се брусница, сливи, цимет, јагоди, јаболка и др. Се користи како сол натриум бензоат за заштита на овошје од габично или од бактериско расипување, како силен антимикробен агенс. Се користи како конзервас во безалкохолни пијалаци, јаболковини и преливи, но исто така и во овошни салати, џемови, желеа, кисела зелка и маргарин.

7.2. ДИКАРБОКСИЛНИ КИСЕЛИНИ

Во оваа група спаѓаат киселини што се многу широко распространети во растителниот свет: оксална, малонска, килибарна, фумарна и др. Овие органски соединенија содржат две карбоксилни групи (-COOH) и имаат хемиски својства слични на оние на монокарбоксилните киселини. Дикарбоксилните киселини се безбојни цврсти супстанции, со точки на топење околу 100 °C. Овие киселини се застапени како растворливи метални соли или како естри, од кои вторите се доволно испарливи за да можат да се анализираат со GC и имаат карактеристики на спектрална апсорпција соодветни за HPLC-анализа. Дикарбоксилните киселини можат да имаат бројни форми во однос на тоа дали се линеарни, разгранети ланци, ароматични или незаситени. Позначајни киселини од оваа група (слика 51) се:

- А. Аскорбинска киселина (витамин C) е присутна во сите растителните клетки и ткива особено во овошје и во зеленчук, но количината кај различни видови е многу варијабилна. Оваа киселина има различни функции и се користи како антиоксидант за спречување оштетување од слободните радикали и други реактивни кислородни видови, а дејствува како синергист со фенолни антиоксиданти. Влијае на многу метаболички процеси како што се одбранбените реакции, клеточната делба и генската експресија. Ја олеснува интестиналната апсорпција на железото и ги отстранува токсичните тешки метали како никел, олово и кадмиум, важна е за синтезата на карнитин. L-аскорбинска киселина и нејзините различни нуспроизводи се вообичаени конзерванси во производството на конзервирана храна.
- Б. Оксална киселина, застапена најчесто во форма на соли на калиум и калциум, при што калциум оксалатот создава нерастворливи кристали во форма на песок, друзи, призми, коцки, стилоиди и други форми значајни за идентификацијата на растителни суровини. Оксалната киселина е многу посилна киселина од оцетната. Претставува силно редукционно средство. Изолирана во чиста состојба се јавува како дихидрат со формулата $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Главните апликации на оксалната киселина вклучуваат чистење или белење, особено за отстранување на 'рѓа (бидејќи е многу добар агенс за комплексирање на железо). Оксалната киселина е состојка во некои производи за избелување на забите. Околу 25 % од произведената оксална киселина се користи како супстанција во процесите на боење. Се користи и во избелувачи, особено за пулпа, плута, слама, трска, пердуви и др.
- В. Килибарна киселина се јавува поретко во природата. Во живите организми има форма на анјон, сукцинат, кој има повеќе биолошки улоги како метаболички посредник кој се претвора во фумарат во транспортниот синџир на електрони и создавањето на АТР. Сукцинатот е значајна сигнална молекула која ја рефлектира клеточната метаболичка состојба. Во организмите се генерира во митохондриите преку циклусот на трикарбоксилна (лимонска) киселина. Дисрегулација на синтезата на сукцинат, а со тоа и на синтезата на АТР, се случува кај некои генетски митохондријални болести, а деградацијата може да доведе до патолошки состојби, како што се малигна трансформација, воспаление и ткивна повреда. Килибарната киселина е адитив за храна регистриран со ознака E363.
- Г. Фумарна киселина е незаситена дикарбоксилна киселина присутна во некои габи и во исландскиот лишај. Фумаратот е посредник во циклусот на лимонска киселина што го користат клетките за производство на енергија во форма на АТР. Се формира со оксидација на сукцинат, а се претвора во малат. Човечката кожа природно произведува фумарна киселина кога е изложена на дејство на сончева светлина. Фумаратот е производ и на циклусот на уреа. Фумарната киселина се користи како ацидуланс, состојка која дава остар и кисел вкус на храната. Одобрена е за употреба како додаток на исхраната во ЕУ, САД, Австралија и Нов Зеланд.

Генерално се користи во пијалаци и во прашоци за печиво, како замена за винската киселина и повремено наместо лимонска киселина, и како коагулант во мешавини за пудинг. Во медицински цели се користи киселината и нејзините деривати како лек за автоимуната псоријаза и за мултиплекс склероза. Комерцијално, фумарната киселина се користи во производството на полиестерски смоли и полихидрични алкохоли и како фиксатив за бои.



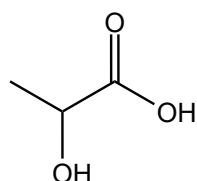
Слика 51. Структури на најзначајни алифатични дикарбонски киселини

7.3. Алфа-хидрокси киселини

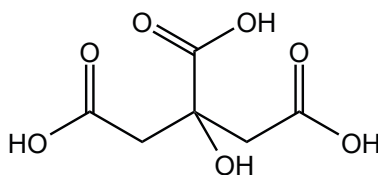
Алфа-хидрокси киселините се класа органски киселини кои се состојат од карбоксилна киселина ($-\text{COOH}$) супституирана со хидроксилна група ($-\text{OH}$) на соседниот, α -јаглероден атом. Најголемиот број растителни органски киселини спаѓаат токму во оваа група: јаболкова, лимонска, гликолна, млечна и др. (слика 52). Поголемо значење имаат:

- А. Млечна (лактична) киселина, поради присуство на хирален јаглероден атом, се јавува во две енантиомерни форми и има умерено силно кисел и горчлив вкус. Се користи во производство на храната, за закиселување, подобрување на вкусот и антимикробна заштита, иако се смета дека е помалку ефикасна во споредба со другите органски киселини. Се користи за производство на биокompatibilни и биоразградливи полимери, кои понатаму се користат во производство на средства за пакување, протетски помагала, конци и внатрешно пакување на лекови. Станува збор за полимлечна (полилактична киселина), која има бројни апликации во медицинската, фармацевтската и текстилната индустрија. Млечната киселина, слична на оцетната и на пропионската киселина, влијае на мембранскиот потенцијал на микроорганизми и ја намалува рН-вредноста на храната, со што го попречува растот на микроорганизмите. Овие дејства зависат од формата, лактат или киселина, од пуферскиот капацитет и од рН на храната.
- Б. Лимонска киселина, трикарбоксилна киселина и популарен ацидулант кој се користи во производство на конзервирана храна, поради способноста да го подобри вкусот на храната што е базирана на цитрусно овошје. Има остар кисел вкус поради што претежно се додава во пијалаци со вкус на цитрус. Не дејствува антиоксидативно, но ја подобрува ефикасноста на фенолните антиоксиданти со хелирање на металните јони кои може да катализираат липидна автооксидација. Заедно со аскорбинска киселина, се користи за спречување на ензимски продуцирана кафена боја во производи од зеленчук и овошје. Лимонската киселина и нејзините деривати се користат како регулатори на рН, средства за зацврстување, засилувачи на вкус, секвестранти (додатоци кои го подобруваат квалитетот и стабилноста на храната) и конзерванси.

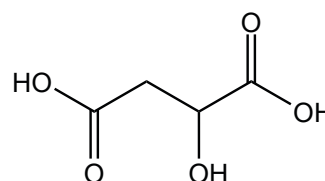
- В. Јаболкова (малонска) киселина, е природна состојка која се наоѓа во многу овошја и зеленчуци. Најчесто се наоѓа во јаболката, сливите, крушите и бананите. Се користи во производство на храна и лекови, за контрола на киселоста или како природен конзерванс, адитив за храна. Има голема комерцијална употреба за производство на различни материјали, меѓу кои мирисни и арома супстанции гама-ноналактон, циметна киселина и фармацевтски важно соединение валпроат, што се користи за лекување на епилепсија и биполарно растројство и за спречување на мигренозни главоболки. Малонската киселина се користи и за вкрстено поврзување на пченкарен и компиров скроб со цел производство на биоразградлива термопластика, која се користи за пакување храна, пакување на пена и за производство на кеси за компост.



млечна киселина



лимонска киселина



јаболкова киселина

Слика 52. Позначајни алфа-хидроксис киселини

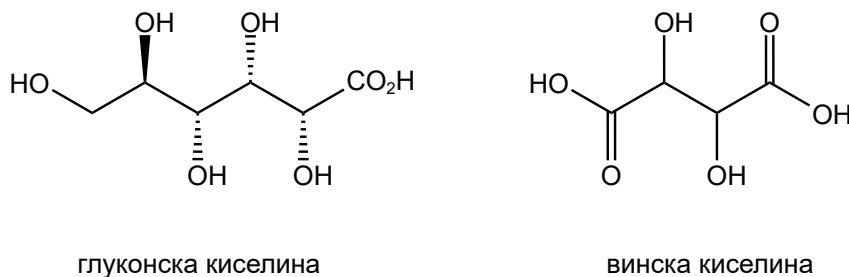
7.4. ШЕЌЕРНИ КИСЕЛИНИ

Шеќерните киселини вклучуваат четири главни класи:

1. алдонски киселини, од кои значајна е глуконска киселина,
2. улосонски киселини,
3. уронски киселини, од кои позначајна е глукуронска киселина и
4. алдарни киселини, во кои спаѓа винска киселина.

- А. Глуконска киселина (слика 53) е природна состојка присутна во големи количества во растенијата и во медот, виното и месото, а ја создаваат и различни бактерии и габи. Глуконската киселина и нејзините деривати (освен глюконолактон) се користат најмногу како адитиви во прехранбената и во фармацевтската индустрија, во хигиената и во градежништвото (солите на глуконската киселина - натриум глуконат се користи за подобрување на водоотпорноста на цементот, а калциум глуконат за инхибиција на блага корозија на челик и третман на метални недостатоци). Глуконатите на железо (II) и цинк (II) се користат како реактанти во медицинската област, а цинк (II) глуконат се применува за лекување на настинка и на многу болести што се предизвикани од недостаток на цинк, како што се промени на кожата и ментална летаргија.
- Б. Винска киселина (слика 53) е алфа-хидроксис киселина што најдобро се раствора во вода, во споредба со сите други цврсти ацидуланси. Има силно кисел вкус и ги подобрува вкусовите што се слични на грозје и на лимета. Природно се јавува во овошјето (грозје и ананас) и е најважната киселина во винскиот оцет. Винската киселина и нејзините производи се корис-

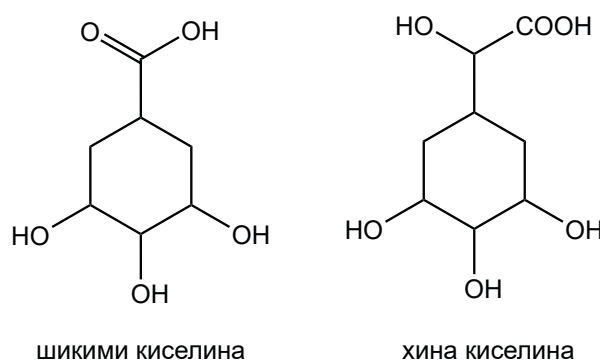
тат за подобрување на вкусот, за зачувување на храната, регулација на pH и хелирање. Се користи и како хумектант (навлажнувач), средства за зацврстување, адитив за печење и емулгатор.



Слика 53. Позначајни шеќерни киселини

7.5. Циклични ОРГАНСКИ КИСЕЛИНИ

Цикличните растителни органски киселини можат да бидат: алициклични, ароматични и хетероциклични. Во групата на алициклични киселини значајни се хина и шикими киселина. Хина киселина може да се разгледува како циклохексанска киселина. Во растенијата најчесто се јавува слободна (во кора од хина, во кафе, во боровинка и во други растенија) или врзана во депсиди, како што е хлорогенска киселина. Хина киселина е значен метаболит во биосинтезата на голем број секундарни метаболити (слика 54). Шикими киселина (слика 54) има слична структура, со двојна врска во циклусот и една OH-група помалку. За прв пат е изолирана од плодовите на свездестиот анасон. Има многу значајна улога во биосинтезата на фенилпропаноидните соединенија.



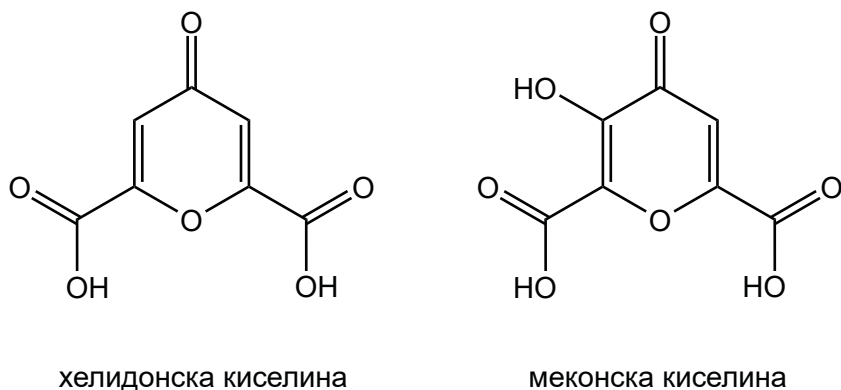
Слика 54. Структури на некои алициклични киселини

Ароматичните киселини се многу голема група соединенија, со една, две или со повеќе карбоксилни групи и различни радикали врзани за јадрото или во бочен ланец. Опфаќаат две големи групи соединенија што се дефинирани како:

- деривати на бензоева киселина (бензоева, салицилна, антранилна и др.), и
- деривати на циметна киселина (циметна, хидроксициметна, бадемова, тропна киселина и др.).

Бензоевата киселина се јавува во смоли и во балсами. Показува антисептична активност, а внесена интерно дејствува антитусично и секретолитично. Циметната киселина се јавува слободна или врзана во естерски соединенија. Често се јавува како состојка на етерични масла. Бадемовата киселина се добива при кисела хидролиза на амигдалин, цијаноген гликозид на горчлив бадем. Тропа киселината се добива со хидролиза на хиосциамин, естерски алкалоид изолиран од корен и лист на поамница, лист од датура и од буника и други извори.

Хетероциклични киселини опфаќаат неколку соединенија што се карактеристични за некои алкалоидни суровини во коишто специфичните алкалоиди градат соли со овие киселини. Позначајни во оваа група се: меконската киселина, карактеристична за опиумски алкалоиди и хелидонската киселина, што се јавува во млечниот сок на растението руса (*Chelidonium majus* L.) и гради соли со алкалоидите (слика 55).



Слика 55. Структури на некои хетероциклични органски киселини

7.6. ЕКСТРАКЦИЈА И ИСПИТУВАЊЕ НА РАСТИТЕЛНИ ОРГАНСКИ КИСЕЛИНИ

7.6.1. Екстракција и прочистување

Методите за екстракција на растителни органски киселини зависат од нивната поларност, стабилност и растворливост. Бидејќи повеќето имаат поларна природа и се добро растворливи во вода и алкохоли, најчесто се применуваат водно-алкохолни смеси, а екстракциите се спроведуваат при пониски температури, за да се избегне декарбоксилација или изомеризација.

Методите вклучуваат:

- Цврсто-течна екстракција (SLE). Постојат неколку техники што се користат во практиката, вклучувајќи екстракција со натопување, екстракција по Сокслет и дестилација. Овие техники се најкористените конвенционални техники и условите на процесот како што се температурата, механичките фактори (притисок и тресење) и природата на растворувачот влијаат на нивната ефикасност. Недостатоци на овој метод се голема потрошувачка на растворувачи и долгото време на екстракција. Општо земено, за екстракцијата на органските киселини се користат етанол и метанол со вода.
- Екстракција со помош на ултразвук (UAE). Се користи како релативно нова техника и со голем успех во обезбедување висок принос на екстракцијата. Ултразвукот со широк опсег на моќност и фреквенции се користи за дегазирање, филтрирање, хомогенизација, емулзификација, кристализација, екстракција и оксидација на ензими, сечење, готвење, сушење со замрзнување, депенење и инактивација на микроорганизми. Принципот на оваа екстрактивна постапка е кавитациониот ефект на ултразвукот (20–40 kHz) што ги разградува клеточните сидови на растителниот материјал, зголемувајќи ја дифузијата на органските киселини во растворувачот.
- Екстракција со помош на микробранови (MAE). Овој метод е брз и го забрзува процесот на десорпција на целните соединенија од матриксот со помош на микробрановата енергија која преку загревање на растворувачот доведува до пукање на клеточните сидови на растителниот материјал. Прифатен е како потенцијална и влијателна алтернатива за екстракција на органски соединенија и поседува многу предности како што се намалување на времето на обработка и намалување на волуменот на растворувачи, намалена потрошувачка на енергија и отпад, подобри производи со пониска цена и повисока стапка на екстракција. Овој процес е компатибилен со вода (како растворувач за екстракција), што ја намалува употребата на органските растворувачи. Овој метод на екстракција проследен со алатки за спектроскопија и хроматографија, како што се HPLC и GC-MS, може да овозможи брзо и прецизно определување на органски киселини.
- Забрзана екстракција со течност (ASE) е нова постапка на екстракција која користи органски растворувачи на високи температури (над точката на вриење) и притисок за да се забрза растворувањето и масовниот пренос. Екстракциите може да се изведат на температури кои се движат од собна температура до 200 °C (за да се забрза екстракцијата), при притисок од 5 до 200 atm (0,3–20 MPa) (за да се задржи растворувачот за екстракција во течна фаза). Мешавините на ацетон и *n*-хексан се покажаа како најсоодветен растворувач за екстракција со ASE-техника.
- Суперкритична екстракција (SFE). Методот и во случај на органски киселини е побрз и по-ефикасен од конвенционалните методи на екстракција, обезбедува поголема селективност и пократко време на екстракција, избегнување на употреба на големи количини на токсични растворувачи, овозможува различни класи на соединенија да се фракционираат со промена на

температурата на екстракција и/или притисок, и овозможува можност за директно спојување со аналитички хроматографски техники како GC или SFC. Како суперкритичен растворувач главно се користи јаглерод диоксид, кој е евтин, еколошки прифатлив и безбеден (според FDA и EFSA). CO₂ на собна температура и притисок е во гасовита состојба, што го прави обновувањето на анализите многу едноставно и произведува анализи без растворувачи.

- Ензимски потпомогната екстракција (EAE) е еден од најновите пристапи за екстракција на органски соединенија. Ензимите се користат за преттретман на растителниот материјал, за да се разгради клеточната сидна матрица и да се ослободи содржината богата со органски киселини, пред конвенционалниот метод за екстракција.

Техники што се користат за прочистување на суровите екстракти се главно хроматографски, со користење на смоли за размена на јони за да се одделат минералните соли, шеќери и органски киселини. Поминувањето низ слабо базна јон-изменувачка смола во хидроксилна форма ќе доведе до апсорпција на киселински ањони. По плакнењето на смолата, органските киселини се ослободуваат со хлороводородна киселина (HCl). Силно базни смоли треба да се избегнуваат поради шеќерите од екстрактите кои може да реагираат со смолата и да продуцираат артефакти од млечна или од гликолна киселина. Денес се воведени неколку различни системи за изолација и прочистување, како што се:

- Мембранска сепарација. Оваа технологија е значајна во индустријата, и се користи како замена за техниките на дестилација и рекристализација, кои бараат многу топлина поради што се скапи процеси. Мембранската сепарација е технологија која заштедува енергија, економична е и има висока ефикасност на сепарација. Општо за сите мембрански технологии е нивната селективна пропустливост што овозможува минување на целни состојки. Процесите најчесто се категоризираат како обратна осмоза, ултрафилтрација, микрофилтрација и нанофилтрација, според големината на честичките кои ги задржува мембраната. Постапките се едноставни за изведување, високо селективни, со ниска цена и со работа на собна температура.
- Препративна течна хроматографија (Prep-HPLC). Оваа техника е широко прифатена како многу ефикасна техника за прочистување. Prep-HPLC ги содржи истите делови како аналитичкиот HPLC, со тоа што се користат помали честички (prep-HPLC, 3–10 mm), се зголемува површина што резултира со воспоставување систем со голема моќност на резолуција, а поврзувањето со детектори, како што се диодната низа, индексот на рефракција, флуоресценцијата и др. овозможува брза идентификација и квантификација на органски киселини.
- Контраструјна хроматографија (CCC) е една од техниките на сепарација која користи две немешливи фази, едната е стационарната, а другата е мобилната фаза. Фундаментално се користи за раздвојување во големи размери на јонизирани соединенија, вклучително и органски киселини. Овој метод има бројни придобивки во споредба со традиционалната силикагел хроматографија, рекристализација и течно-цврстата сепарација, како што се: висококвалитетно прочистување при низок притисок со висок капацитет на примерокот, отсуство на неповратна адсорпција, обновување на примероците, минимална опашка на пиковите, способност за прифаќање на честички, ниска потрошувачка на растворувачи и низок ризик од денатурација на примерокот и отсуство на губење на примерокот.
- Тенкослојна хроматографија (TLC). Хроматографија што може да се користи за идентификација и прочистување на органските киселини. Вообичаено се користи слој од силика гел, а како мобилна фаза мешавина од етер и мравја киселина заситена со вода 88 % во сооднос 7 : 14 (v/v) и од хлороформ-метанол-мравја киселина (80 : 20 : 1 v/v/v). Може да се користат и полиамидни слоеви, со посложен систем на мобилна фаза составен од диизопропил етер-петролетер-јаглентетрахлорид-мравја киселина-вода (5 : 2 : 20 : 8 : 1 v/v/v/v).

7.6.2. Идентификација и квантификација

Методите за идентификација и квантификација на органски киселини главно се засноваат на хроматографски и на спектроскопски техники, вклучувајќи ја GC, HPLC, IC, капиларна електрофореза (CE), NMR-спектроскопија и LC-MS:

- **Гасна хроматографија (GC).** Бројни органски киселини со кратки ланци се испарливи и отпорни на топлина, со што ги исполнуваат клучните предуслови за GC-анализа. Другите органски киселини треба да се дериватизираат за да се преведат во помалку поларни и стабилни производи, соодветни за GC-анализа. Се препорачува користење на капиларните GC-колони обложени со поларни стационарни фази како што се полиетилен гликол или полиетилен гликол модифициран со нитротерептална киселина, што овозможува добра хроматографска резолуција, избегнувајќи го развлекувањето на пиковите (peak tailing). GC нуди значајни предности, вклучувајќи висока ефикасност на раздвојување, брзо време на анализа, минимална потрошувачка на примероци и едноставност во работа. Најдобро е да се користи комбинација со масена спектрометрија (GC-MS), која се смета за златен стандард во анализата на природните соединенија, општо, поради високата резолуција и големата репродуктивност, која овозможува воспоставување на библиотеки со масени спектри што може да се пребаруваат.
- **Јонска хроматографија (IC).** Оваа техника се покажа како многу погодна за јонска размена на анјони и катјони. Анјонскиот метод првично се користел за неоргански анјони, многу подоцна за органските киселини. Еден вид на овој метод е јон изменувачката хроматографија (IEC). IEC се користи за ефикасно одвојување на алифатични киселини со краток ланец, првенствено карбоксилни киселини, користејќи неорганска киселина како елуент, а се изведува на колони за силна размена на катјони, во кои сулфонатните групи со негативен полнеж создаваат штит околу стационарната фаза, наречена Донанова мембрана. Оваа мембрана одбива негативно наелектризираните јони на аналит, но дозволува неутралните или делумно јонизирани видови да влезат во мембраната и да комуницираат со основната смола. Со кисел елуент се потиснува дисоцијацијата на органските киселини и на тој начин се зголемува нивното задржување на смолата. Елуирањето на органските киселини е приближно по редослед на зголемување на вредноста на pK_a , но други променливи, на пример, дополнителна водородна врска и адсорпција и хидрофобноста на киселините, може да го модификуваат редоследот на елуирањето.
- **Капиларна електрофореза (CE).** Оваа изворедно добра сепаративна техника овозможува задоволителна сепарација на органските киселини кои потоа може да се определуваат со директна или со индиректна UV-Vis-спектроскопија. Капиларна зонска електрофореза (Capillary zone electrophoresis - CZE) се покажа како значаен метод за раздвојување на органски киселини со ниска молекуларна тежина и сè повеќе како систем за сепарација со високи перформанси, кој ја надополнува конвенционалната јонска хроматографија и HPLC-методите. Предностите на CZE-методот се брзо раздвојување, добра резолуција, едноставност, автоматизација, мала потрошувачка на хемикалии, намалена подготовка на примерокот, висока моќ на разрешување на проблеми, ниска цена и толеранција на сложени или високо концентрирани матрикси.
- **Високоперформансна течна хроматографија (HPLC).** HPLC е попопуларен, соодветен и попрецизен аналитички метод за различни примероци, вклучително и квантификација на органски и неоргански соединенија поради едноставноста, брзината и стабилноста. Анализата на органските киселини со овој метод е многу брза и ефикасна, што е битно поради улогата на органските киселини во биолошките системи, пред сè во растенијата. Така, определувањето на содржината на лимонската, оксалната и јаболковата киселина е значајно поради физио-

лошката улога на растенијата. Оцетна, винска, лимонска, килибарна, млечна и јабољкова киселина се сепарирани и квантифицирани на пр., во белите вина со HPLC-метод, за помалку од 45 минути и со минимална подготовка на примерокот. За детекција и определување на бензо-ева и на сорбинска киселина се препорачува користење на реверзно-фазна HPLC, со мобилна фаза составена од калиум дихидроген ортофосфат пуфер (pH 2,8).

- **Нуклеарно-магнетно-резонантна спектроскопија (NMR).** NMR-спектроскопијата се користи како висококвантитативна, репродуктивна и моќна техника за истовремена, едноставна, брза и недеструктивна идентификација на соединение во сложена смеса без барање за одвојување и хемиски модификации. Широко се применува за идентификување на органски соединенија во храната, како што се вино, млеко, кафе, соја сос, сокови, зелен чај, пиво и др. Меѓу овие соединенија вклучени се и органските киселини.
- **Течна хроматографија и масена спектрометрија (LC-MS).** LC-MS стана рутинска метода откако со развојот на електроспреј јонизацијата (ESI) се проширија автоматизацијата и можностите за примена на различни процедури, со обезбеден едноставен и робустен интерфејс. Може да се примени за различни биолошки молекули и употребата на тандем MS (LC/MS/MS) и на стабилни внатрешни стандарди обезбедува високочувствителни и прецизни методи за квантификација на состојки од интерес. Органските киселини биле анализирани со LC/MS/MS во тутун и во неговите производи, во коренски ексудати од пченка, од некои медицински растенија и сл.

ФЕНОЛНИ И ПОЛИФЕНОЛНИ СОЕДИНЕНИЈА

Фенолните и полифенолните соединенија претставуваат многу голема група природни растителни производи. Во најширока смисла на зборот, во оваа група се вбројуваат сите соединенија што имаат најмалку една фенолна ОН-група. Во фенолните соединенија главно се вбројуваат простите феноли додека сите други соединенија што ги создаваат растенијата и што имаат фенолна функција се вбројуваат во полифеноли. Терминот полифенол не е добро дефиниран, но општо е прифатено дека опфаќа природни производи со т.н. полифенолна структура (т.е. неколку хидроксилни групи врзани на ароматични прстени). Полифенолите вклучуваат повеќе од 8000 соединенија со различни хемиски структури, почнувајќи од едноставни хидроксициметни киселини и антоцијанини (растителни пигменти) до покомплесни флавоноиди и танини. Фенолните киселини и флавоноидите се најважните активни компоненти со полифенолна структура. Фенолните киселини се наоѓаат исклучиво во надворешните слоеви на растенијата и за нив се врзуваат низа здравствени придобивки за човекот. Здравствениот ефект на полифенолите зависи од земената количина и од нивната биорасположливост, а главно дејствуваат како антиоксиданти. Присутни се во растенијата како секундарни метаболити и вклучени се во заштита од ултравиолетово зрачење и заштита од патогени. Присутни се во многу медицински растенија, во чајот, потоа во црвеното вино, кафето, зеленчукот, мешунките, житариците и др.

Класификација на полифенолни соединенија. Полифенолните соединенија се класификуваат различно. Врз база на биосинтетско потекло се делат на:

- шикимати, што настануваат претежно преку патот на шикими киселината, и
- поликетиди, што настануваат преку поликетидниот биосинтетски пат. Овие соединенија се означуваат и како полиацетати, бидејќи активирана оцетна киселина учествува во нивната биосинтеза.
- производи со комбинирано биосинтетско потекло.

Во групата на шикиматите спаѓаат:

- фенолни киселини,
- кумарини,
- лигнани, неолигнани и сл.

Во групата на поликетидите спаѓаат:

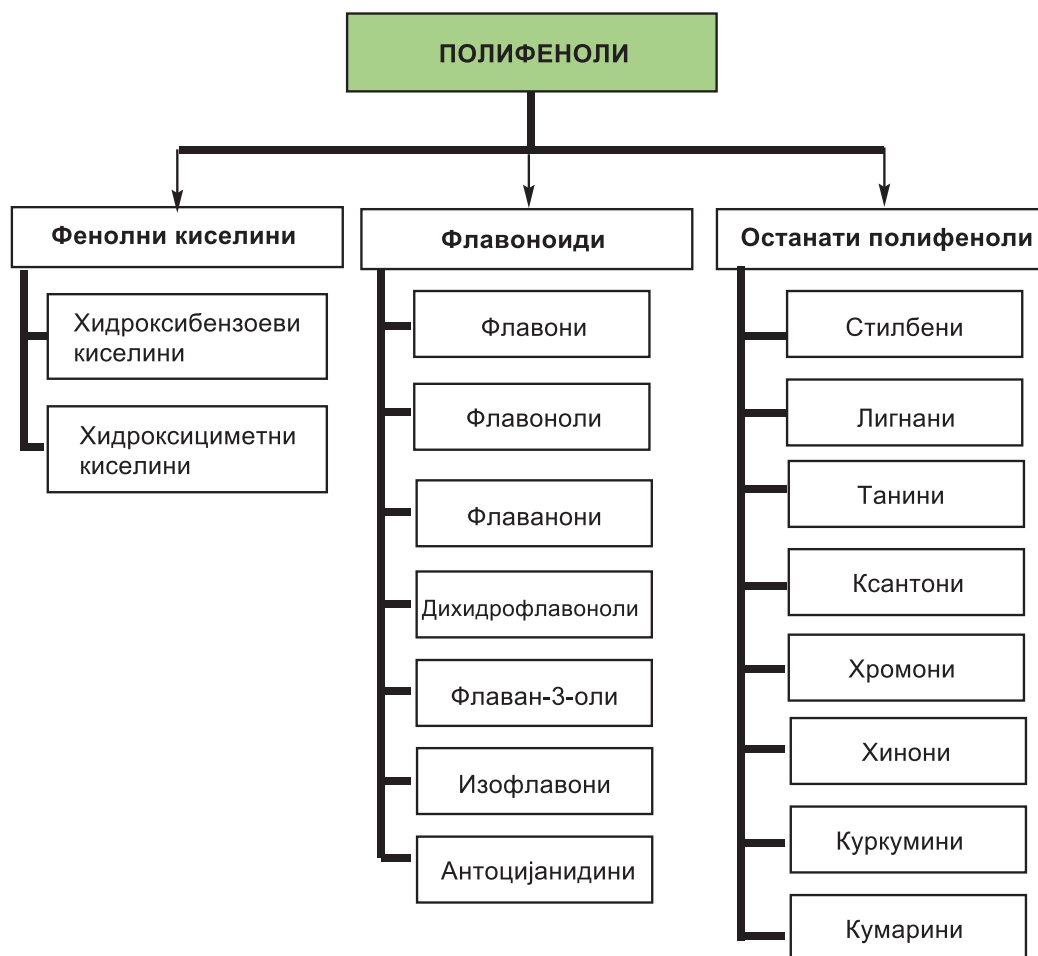
- хинони,
- флороглуциноли,
- канабиноиди.

Во производи со комбинирана биосинтеза спаѓаат:

- феноилпропаноиди со продолжена странична низа,
- флавоноиди,
- изофлавоноиди и неофлавоноиди,
- антоцијани,
- ксантони,
- танини.

Денес е прифатено полифенолите да се делат на три основни групи состојки (слика 56):

- фенолни киселини,



Слика 56. Класификација на полифенолни соединенија

- флавоноиди и
- останати полифеноли.

Врз база на бројот на ароматичните јадра и бројот на С-атомите во страничната низа или во низата којашто ги сврзува ароматичните остатоци (хемиска класификација) фенолните соединенија може да се поделат во четири основни групи:

1. Фенолни соединенија со едно ароматично јадро

Оваа група ги опфаќа следните групи соединенија:

1. C_6-C_1 - фенолни киселини, алкохоли и алдехиди
2. C_6-C_2 - ацетофенони и фенилоцетни киселини
3. C_6-C_3 - хидроксидиметна киселина и деривати
4. $C_6-C_3-C_3-C_6$ - лигнани
5. C_6-C_3 - кумарини, изокумарини и хромони
6. C_6 - флороглициноли и канабиноиди.

2. Фенолни соединенија со две ароматични јадра

Оваа група опфаќа:

1. бензофенони и ксантони, со две ароматични јадра сврзани со еден С-атом ($C_6-C_1-C_6$),
2. стилбени, ($C_6-C_2-C_6$) соединенија, кај што две ароматични јадра се сврзани со два С-атоми,
3. флавоноиди, ($C_6-C_3-C_6$) соединенија, кај што две ароматични јадра се сврзани со три С-атоми. Овие соединенија се делат на:
 - флавоноиди производи на хромон (бензо- γ -пирони)
 - флавоноиди производи на хроман (бензо- γ -пирани)
 - изофлавоноиди и неофлавоноиди.

3. Фенолни соединенија хинони, се делат на:

1. бензохинони (C_6),
2. нафтохинони (C_{10}) и
3. антрахинони (C_{14}).

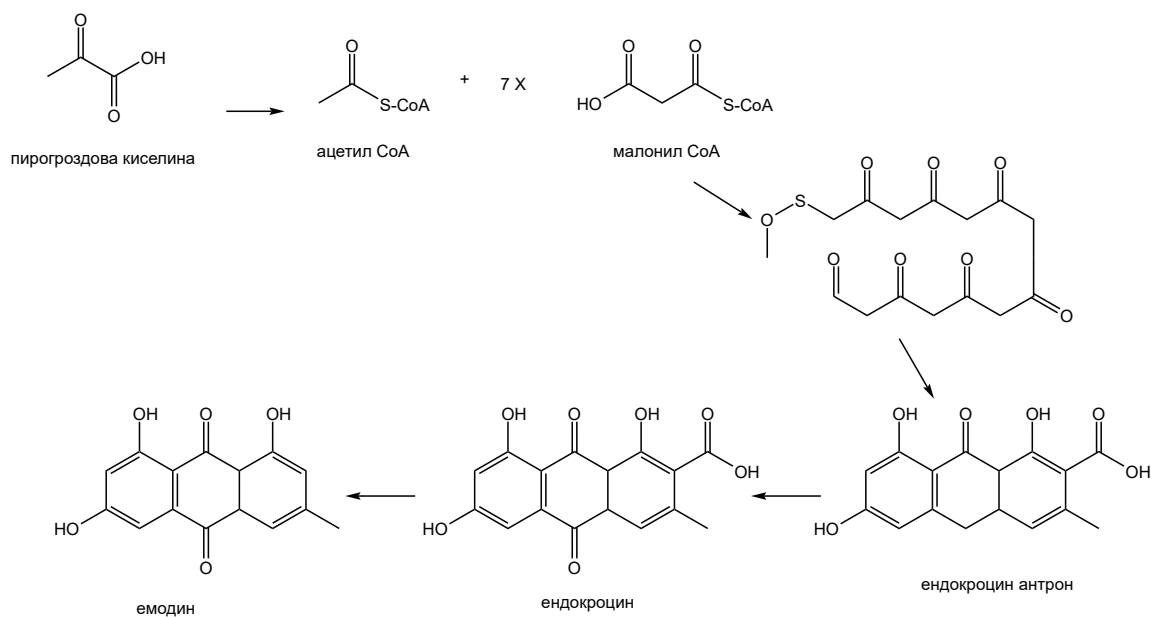
4. Полимерни фенолни соединенија, опфаќаат високомолекуларни полимерни соединенија како што се:

1. танини и
2. лигнини.

Биосинтеза на полифенолни соединенија (општи карактеристики). Биосинтезата на полифенолите се одвива преку две основни биосинтетски патишта: патот на шикими киселината и патот на поликетидите. Биосинтезата на фенолните фенилпропанонидни (C_6-C_3) соединенија се одвива преку патот на шикими киселината. Како појдовни супстанции се искористуваат јаглехидратите што настануваат во процесот на гликолиза (пирогроздова киселина) или алтернативните катабо-

лички патишта (тетрози). Шикими киселината во оваа биосинтеза е еден интермедиер од кој се создава многу значаен друг интермедиер, префенска киселина, а од неа понатаму фенилпропаноиди и хидрокси-фенилпропаноиди (слика 7). Биосинтезата на фенолните соединенија по патот на шикиматите е разјаснета со помош на радиоактивни изотопи на јаглерод (^{14}C). Со оваа биосинтеза се создаваат хидроксициметните киселини, кумарините, лигнаните и сличните соединенија.

Поликетидниот биосинтетски пат е биосинтеза во која учествуваат повеќе молекули активирана оцетна киселина при што настануваат соединенија означени како поликетиди, каде што групата $[-\text{CH}_2-\text{CO}-]$ се повторува n -пати, едноподруго (слика 57).



Слика 57. Поликетидна биосинтеза на антрахинон ендокроцин односно емодин

Поликетидната биосинтеза е проучувана кај антрахинонските соединенија при што е поставена хипотезата според која се создава соединението ендокроцин антрон, од кое со декарбоксилација се добива антрахинон емодин (слика 57). За голем број антрахинони е покажано дека и малонската киселина има важна улога во оваа ароматска синтеза, односно ланецот од кој се добива молекулата на антрахинонот настанува со поврзување единици од малонската киселина што терминално се врзуваат за ацетил единица. Оттука, поликетидната биосинтеза често се означува и како полиацетат-малонатен пат за создавање на полифеноли од групата на антрахинони. Сепак, за голем број антрахинони биосинтетските механизми сè уште не се потполно разјаснети.

Фенилпропаноидните структури во растенијата се често изложени на промени во правецот на продолжување на страничната низа, со „лепење“ (надодавање) на C_2 -единици, на начин како што е прикажано во случајот на циметна киселина (слика 9). Со оглед дека фенилпропаноидот се создава по патот на шикими киселината, а поврзувањето на активираната оцетна киселина е карактеристично за поликетидната биосинтеза, во случај кога делови од молекулата настануваат со вклучување на двете биосинтези, всушност зборуваме за комбинираната биосинтеза што е карактеристична за создавање на значајни класи секундарни метаболити. Во комбинираната биосинтеза на полифенолите се вклучува 4-кумароил CoA (фенилпропаноидниот дел) за кој се врзува-

ат C_2 -единици, од кои се создава поликетидниот дел од молекулата. Најзначајни групи состојки што се создаваат со продолжување на страничната низа се: стилбеноиди, ксантони, стирилпирони и флавоноиди.

Биолошка/фармаколошка активност и значење на полифенолите. Полифенолите се карактеризираат со широка палета на биолошки и на фармаколошки дејства поради што наоѓаат многу широка и различна примена во различни полиња, но особено се значајни поради дејствата што ги имаат врз човековиот организам и здравствените придобивки што се обезбедуваат со нивен редовен внес. Диететските полифеноли како што се флавоноидите, се силни антиоксиданти кои дејствуваат главно преу гаснење (блокирање) на реактивните кислородни видови (ROS). Куркуминот, на пример, е диететски полифенол со силна антиоксидантна активност што придонесува за запирање или за подобрување на состојбата при болести што се поврзани со стареење, како што е Алцхајмерова болест (АД).

Екстрактот од растението гинко содржи флавоноиди што се значајни, покрај дитерпенските лактони, за лекување на болести поврзани со стареење како што се намалувањето на когнитивните способности, деменција, тинитус и сл. Со слично дејство и примена се карактеризираат и полифенолите на чајот. Различни студии укажуваат дека сокови од зеленчук и овошје, кои се достапни комерцијално, исто така имаат високо ниво на полифенолни соединенија. Голем број медицински растенија се користат за третман на различни заболувања токму поради присуство на активните полифеноли. Флавоидите на цитрус овошје, антоцијанидините на боровинката и другите бобинки, флавоноидите и проантоцијанидините на глогот, флаваните и леукоантоцијанидините и другите полифеноли дејствуваат врз сидот на капиларите и ја подобруваат нивната функција, ја подобруваат состојбата при кардиоваскуларни заболувања, значајни се за третман на состојби врзани за ЦНС, дигестивен и уринарен тракт, дејствуваат антиинфламаторно и се користат за лекување на болести на кожа и сл. Оттука изучувањето на хемизмот на полифенолите и на нивната биолошко-фармаколошка активност сè уште се значајно присутни во науката.

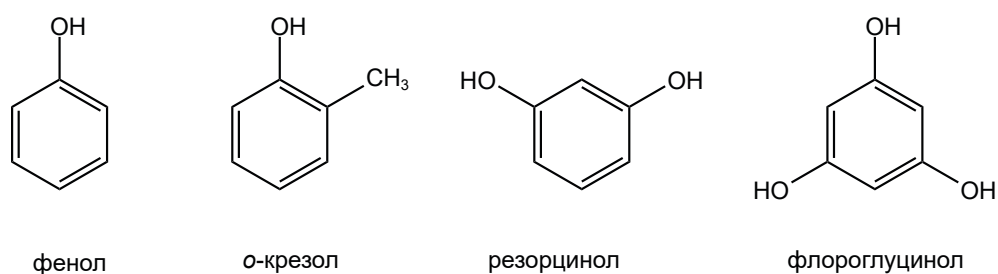
8.1. Едноставни ФЕНОЛИ И ФЕНОЛНИ ХЕТЕРОЗИДИ

8.1.1. Едноставни феноли

Едноставните феноли се јавуваат често во растителните организми и во надворешната средина, генерално. Се карактеризираат со најмалку една ОН-група врзана за ароматично јадро (слика 58). Моносулституирани деривати се означуваат со префиксите *orto*, *meta* и *para* (*o*-, *m*- и *p*-) во зависност од позицијата на супституентот во однос на фенолната група. Најзначајни се трите CH_3 -изомери на крезол, кои во природата се јавуваат поединечно или во смеса како трикрезол. Дифенолите имаат две ОН-групи (*o*-, *m*- и *p*-), од кои најзначајни се 1,3-дифенол или *m*-дихидроксибензен или резорцинол и 1,4-дифенол или 1,4-дихидроксибензен или хидрохинон. Можно е супституција на слободните положби на прстенот. Фенолите со 3 ОН-групи се трифеноли: 1,2,3-трихидроксибензен или пирогалол, 1,2,4-трихидроксибензен или хидроксихидрохинон и 1,3,5-трихидроксибензен или флороглуцинол. Ди- и трифенолите имаат друго биосинтетско потекло, друго биолошко-фармаколошко дејства и различна апликативност во однос на монофенолите.

Присуството на ОН-групата во монофенолите влијае врз физичко-хемиските карактеристики и врз биолошката активност. Таа го зголемува хидрофилниот карактер и ги дава киселите својства. Во водени раствори монофенолите дисоцираат на фенокси јон и H^+ . Широко се распространети

во храната (овошје, кафе, ориз, житарици, вино, пиво и др.), а во природата најголем извор на монофеноли е дрво. Некои монофеноли се значајни за мирисот и вкусот на храната (тимол, еугенол, ванилин, 4-хидроксibenзалдеhid и др.). Показуваат значајни биолошки дејства: антиоксидативно, антимиembroно, антивирално и антиинфламаторно. Се користат како антисептици и дезинфициенси (фенол, крезол) со широка примена и како антисептици во стоматологијата (гвајакoл). Резорцинолот се користи како фармацевтски агенс, за надворешен третман на акни и на слични заболувања на кожа. Како донори на H^+ имаат способност да ги гаснат реактивните радикали на кислород и на азот и да ги гаснат слободно-радикалските реакции. Дополнително имаат капацитет за хелирање на метални јони што се инволвирани во продукцијата на слободните радикали.



Слика 58. Структура на фенол и некои деривати на фенол

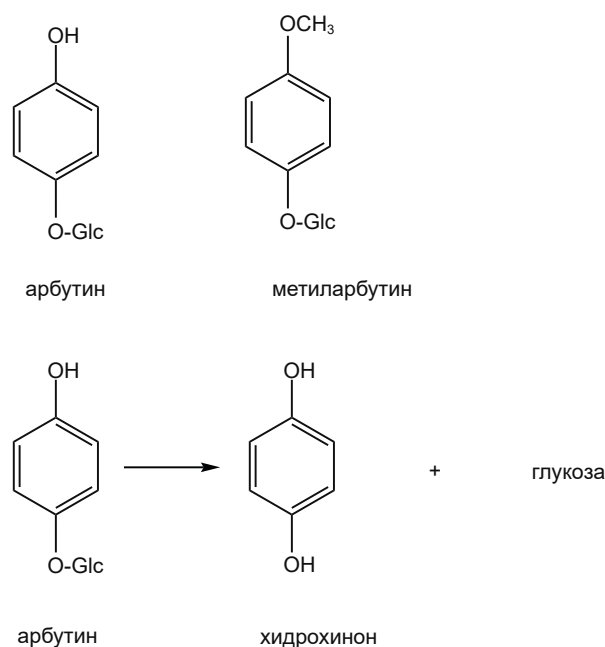
Монофенолите денес претставуваат значајна индустриска суровина во хемиската индустрија. Најмногу се користи чистиот фенол, како силен дезинфициенс, но и како појдовен материјал во производство на пестициди, експлозиви, бои и растворувачи за бои, текстил и др. Во индустријата големи количества фенол се произведуваат како меѓупроизвод при производството на бисфенол А (BPA) кој се користи како клучна компонента во производството на поликарбонати и на епоксисмоли. Фенолот се користи и во производството на фенолни смоли, кои се евтини терморегулатори и лепила за иверка. Овие смоли имаат голема апликативност во градежништвото, во автомобилската индустрија, во производството на кујнски и други апарати и др. Денес, сè поголемо внимание предизвикува резорцинолот, кој може да се добие од обновливи извори и да се користи во т.н. „зелен производствен процес“ за производство на материјали за обложување и пакување.

Токсичност на монофеноли. Широката апликативност на монофенолите овозможува нивно присуство во надворешна средина кога тие се користат во хемиската индустрија и како хербициди, инсектициди и фунгициди. Едноставните феноли се хидрофобни соединенија што создаваат реактивни радикали, поседуваат капацитет за предизвикување на пероксидација, дејствуваат хематотоксично, невротоксично и хепатотоксично и предизвикуваат мутагенеза и канцерогенеза кај човекот и кај другите живи организми. Чистиот фенол и *m*-крезолот често се додаваат во фармацевтските препарати, а во литературата се објавени податоци за појава на: алергија, уртикарија, осип, ангиоедем, хипотензија и диспнеа што веројатно се должат токму на присуството на наведените феноли. Во силно индустријализираните области човекот е изложен на вдишување на поголемо количество на фенол, а исхраната богата со димено месо и друга димена храна претставува ризик за внесување на токсични количества од фенол, кои се движат до 4 mg на ден. Пушењето цигари исто така претставува ризик за внесување на феноли со оглед на тоа дека околу 0,3-0,4 mg фенол се ослободува по цигара, при согорувањето на тутунот. Некои монофеноли можат да предизвикаат многу штетни ефекти: хидрохинолот сериозно влијае на централниот нервен систем, резорцинолот предизвикува генерализирана егзема, уртикарија и ангионевротски едем, а изомерите на крезол имаат сериозни ефекти врз црниот дроб, белите дробови, бубрезите и васкуларниот систем.

8.1.2. Фенолни гликозиди

Со поимот фенолни хетерозиди се означуваат прости феноли и хидрохинони што имаат шеќер врзан со гликозидна врска за фенолната ОН-група. Во оваа група соединенија спаѓаат релативно мал број структури, а најзначајни се следните:

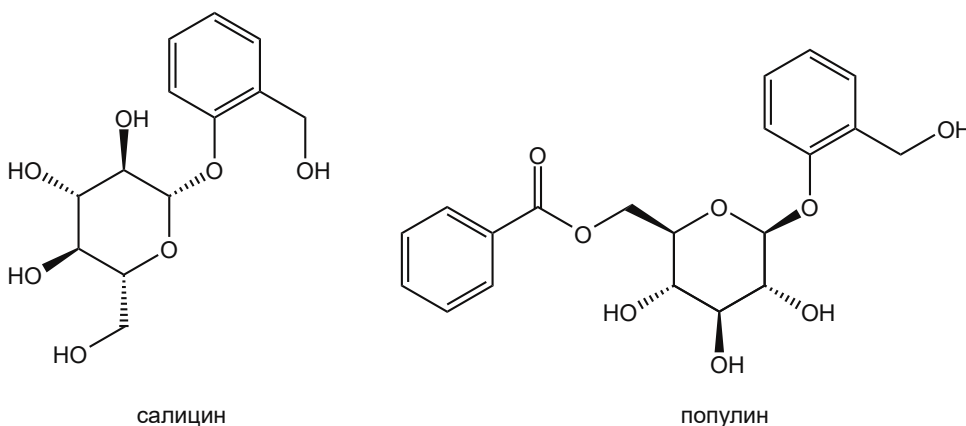
- Арбутин (слика 59), β -D-гликопиранозид на хидрохинон, кој за прв пат е изолиран од листот на мечкино грозје (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.). Овој лист е познат како уроантисептик и се користи како медицински чај за третман на циститис. Арбутинон е растворлив во вречка вода, а по ладењето се кристализира во форма на иглести кристали. Тешко се раствора во ладна вода и во алкохол, а многу добро е растворлив во етер. Со FeCl_3 дава сино обојување. Содржината на арбутинон во растенијата варира во широки граници, 0,5-20 %, а идентификуван е во претставници од само неколку фамилии. Денес се користи во производство на додатоци на исхраната кои се препорачуваат за одржување на здравјето на долниот уринарен тракт. Во природата се јавува и алфа-изомерот на арбутинон.
- Метиларбутинон (слика 59), β -D-гликопиранозид на метилхидрохинон, гликозид што го следи арбутинонот во сите растенија во коишто се јавува арбутинонот. Неговата содржина варира во зависност од географското потекло, така што растенија што потекнуваат од Северна Европа (скандинавските земји) содржат минимално количество, додека растенија од Јужна Европа (Шпанија) содржат метиларбутинон во количини во коишто е застапен и арбутинонот (1 : 1).
- Салицин (слика 60), β -D-гликозид на салигенин, присутен во кората на врбата (*Salix* видови) и во растението картоп (*Viburnum opulus* L.). Екстрактите од овие растенија имаат слабо антипиретично дејство, а се користат во производство на додатоци на исхраната наменети за третман на ревматска болка.



Слика 59. Арбутин и метиларбутин и нивна хидролиза до хидрохинон

- Популин (бензоилсалицин) (слика 60), гликозид на салицин кај кој гликозата на C₆ е поврзана со бензоева киселина. Го има во кората, листот и пупките на тополите (*Populus* видови). Се користи во комбинирани додатоци на исхраната.
- Салицилопопулин е производ на популин, кај кој алкохолната ОН-група е естерификувана со салицилна киселина. Го има во листот на посебен вид топола позната под името трепетлика (*Populus tremula* L.), околу 1 %. Екстракт од трепетлика се користи во производство на додатоци на исхраната со антиревматско дејство (за ублажување на болка).

Биолошко-фармаколошко дејство на фенолни гликозиди. Арбутилот и метил-арбутилот имаат поголемо значење поради уроантисептичната активност и екстрактите од растителните суровини што ги содржат овие фенолни гликозиди кои се користат за третман на циститис. Останатите фенолни гликозиди, особено деривати на салицилната киселина, дејствуваат антиинфламаторно и се користат за третман на артритис.



Слика 60. Структури на позначајните фенолни гликозиди

Значење и употреба на фенолни гликозиди. Екстракти богати со фенолни гликозиди се користат за производство на традиционални хербални лекови и на додатоци на исхраната со уроантисептично дејство или производи со антиинфламаторна активност што се користат за намалување на инфламацијата и за ублажување на мускулна болка.

8.1.3. Екстракција и испитување на едноставни феноли

8.1.3.1. Екстракција и пречистиување

Покрај класичните методи на инфузија и мацерација, за екстракција на едноставни феноли вообичаено се користи LLE и SPE. LLE претставува едноставен и брз метод за екстракција на испарливи монофеноли, но негативна страна е потребата од поголемо количество на органски растворувачи кои може да бидат потенцијално опасни. SPE зависи од афинитетот кон цврстата фаза, бидејќи течниот примерок се пушта низ цврстата фаза, а потоа фенолите од интерес се елуираат со соодветен растворувач. Недостаток на SPE е долгото времетраење при рачна манипулација, а во случај на користење на автоматизиран систем високата цена на чинење.

Денес методите на екстракција и подготовка на материјалот за анализа се насочени кон што е можно помала потрошувачка на органски растворувачи, а меѓу новите пристапи, најкористен е SPME-методот. SPME користи влакно од кое адсорбираните аналити се изолираат со загревање на влакната или со употреба на растворувачи. И покрај значајните предности во однос на SPE, сепак главен недостаток на SPME е краткиот животен век на влакната. Добра алтернатива на традиционалниот LLE-метод е CPE-екстракција (Cloud point extraction) која користи многу мала количина на незапаливи и неиспарливи сурфактанти кои не се штетни за животната средина. Во аналитичка хемија CPE се користи за концентрирање на фенолни соединенија, без да се испаруваат растворувачи, со што се намалува загубата на компонентите што се испитуваат. Друга техника која привлече големо внимание е DLLME, метод вклучен во т.н. зелена хемија (Green Chemistry) поради малиот волумен на органски растворувач. Методот вклучува три компоненти: растворувач за екстракција, дисперзивен растворувач и воден примерок, а ги покажува следните карактеристики: едноставност во работата, висок фактор на концентрирање на аналитот, ниска цена на чинење, евтина опрема и ниска потрошувачка на растворувачи. Може да се користи и течно-течна микроекстракција со помош на воздух (AALLME), техника слична на DLLME, но која не користи растворувач за дисперзирање.

Екстракцијата на арбутин најчесто се врши со метанол, со дихлорметан и со етилацетат, со метод на сонификација. Салицинот може да се екстрахира со метанол-вода (1 : 1 v/v) (сонификација).

8.1.3.2. Идентификација и квантификација на едноставниите феноли

За идентификација и квантификација на едноставните феноли најчесто се користат хроматографските техники. Монофенолите се квантификуваат со HPLC, GC, CE, со флуоресценција и со тенокслојна хроматографија (TLC). Наведените техники користат различни детектори (DAD, FID, UV и MS-спектрометрија). GC е соодветна техника за анализа, но бара дериватизација за да се подобри стабилноста и за да се намали поларитетот на монофенолите, со што се подобруваат хроматографските карактеристики. Вообичаена реакција е ацилација со анхидрид на оцетна киселина, а може да се користат и хлороформати (естри на хлороформска киселина).

Денес се развиени неколку методи за анализа на фенолни адитиви, на хидрохинон, на фенолни конзерванси и на други феноли кои користат спектрофотометрија, GC, CE и електрохемија. Подобри резултати се добиваат со методот на CE кој покажува поголема чувствителност со високи перформанси, брзина и економичност. За анализа на резидуи од монофеноли најдобро е да се користи HPLC, при што не е потребна претходна дериватизација. Екстензија на методот е CPE-HPLC/DAD која се користи за анализа на фенолни соединенија во примероци на отпадни води. Во поново време се покажа дека следењето на двата изомери на дихидроксибензен, катехол и хидрохинон, е од голем интерес поради воведувањето на овие феноли како сировини и синтетички прекурсори во хемиската и во фармацевтската индустрија. Покрај вообичаените методи (HPLC и GC) се покажа дека електрохемискиот метод има значајни предности заради: специфичноста, едноставноста, чувствителноста и другите перформанси, а дополнително задоволува во однос на времето за анализа и цената на чинење.

Идентификација и квантификација на фенолни гликозиди се прави со спектрофотометрија, класичната техника на квантификација на арбутин, при што се искористува реакцијата со железо(III) хлорид и создавање на комплекс што апсорбира на 292 nm. Може да се користи и индиректна спектрофотометрија со користење на перјодат во вишок, при што по реакцијата со арбутин вишокот од перјодатот ослободува јод кој се мери на 351 nm. Посовремена спектрофотометрија се базира на користење на 4-аминоантипирин во алкална средина во присуство на хексацијаноферат (III) при што се создава црвено обоен производ кој се мери на 514 nm. Арбутинонот може да се

квантифицива и со користење на флуориметрија и амперометрија, а се користат и голем број други техники на сепарација и определување, вклучително и тенкослојна хроматографија, електрофореза, мицеларна електрокинетичка капиларна хроматографија со амперометриска детекција, GC и особено HPLC. Со овие методи се определува содржината на арбутинол во лековити растенија, во хербални лекови и во козметика. Наведените методи овозможуваат определување на вкупен арбутинол без да се направи разлика помеѓу двата изомери на арбутинол (алфа и бета). Определувањето на содржината на двата изомери на арбутинол може да се направи со користење на хидрофилна интеракциска хроматографија во комбинација со UV-детекција (HILIC-UV).

За определување на содржина на салицин во кора од врба и производи што содржат екстракт од кората и за квантификација на останати фенолни гликозиди, деривати на салицилна киселина и салидрозидот, најчесто се користат различни HPLC-методи.

8.2. ФЕНОЛНИ КИСЕЛИНИ И ФЕНИЛЕТАНОИДИ

8.2.1. Фенолни киселини

Фенолните киселини се нефлавоноидни полифенолни соединенија кои понатаму може да се поделат на две главни групи:

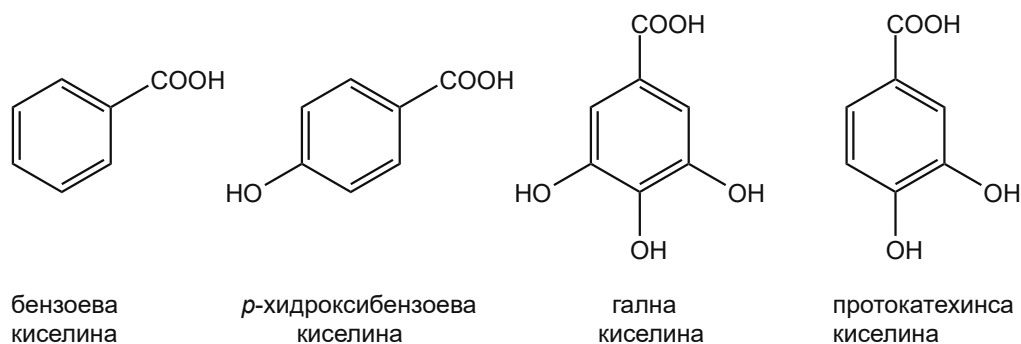
- деривати на бензоева киселина или C_6-C_1 деривати и
- деривати на циметна киселина или C_6-C_3 деривати.

Двете групи, покрај основните структури, всушност вклучуваат хидроксисоединици: хидроксисоединици и хидроксисоединици. Хидроксисоединиците киселини се јавуваат како слободни производи, во форма на естри или во форма на гликозиди. Повеќето хидроксисоединици киселини имаат C_6-C_1 структура што потекнува директно од бензоевата киселина, на пр., салицилна киселина, *p*-хидроксисоединици киселина, различни дихидроксисоединици киселини (изомерите 2,5-, 3,4-, 2,3-, 3,5-), гална киселина и ванилинска киселина. Структурните промени во хидроксисоединиците киселини настануваат поради хидроксилација и метилација на ароматичниот прстен. Во природата најчесто се четири киселини: ванилинска, протокатехинска, сиригинска и *p*-хидроксисоединици киселина (слика 60). Галната киселина и нејзиниот димер хексахидродифенска киселина, се јавуваат често во форма на депсиди и дидепсиди. Претставуваат базични структури во создавањето на хидролизирачките танини.

Циметната и хидроксисоединиците (фенилпропаноидните) киселини (кафена, ферула, синапинска, кумарна и други) се многу чести природни производи, присутни главно во форма на естри со алифатични алкохоли или со хина киселина, а многу поретко се среќаваат во слободна состојба (слика 61). Може да се сретнат и како амиди (спермидин, тирамин) или во соединенија со шеќери, во кои се врзуваат како естри или како етери. За циметните киселини е карактеристично и тоа што за фенолните групи често се врзуваат други соединенија, како што се: флавоноиди, сапонини, антоцијани па дури и алкалоиди. Различни деривати на хидроксисоединиците киселина се присутни во зеленчукот и во овошјето, особено во претставниците од фамилијата на зелки.

Биосинтеза на фенолни киселини. Синтезата на фенолните киселини се одвива од фенилаланин или тирозин преку патот на шикими киселина. Тирозин и фенилаланин се есенцијално важни аминокиселини во оваа биосинтеза бидејќи тие служат како заеднички претходници за многу природни фенолни производи. Прво, фенилаланинол и/или тирозинол се деаминараат што доведува до создавање на циметна и/или *p*-кумарна киселина, соодветно. Потоа, ароматичните пр-

стени на *p*-кумарна и на циметна киселина се хидрокселираат и метилираат со што се создаваат кафена и ферулна киселина (слика 62).

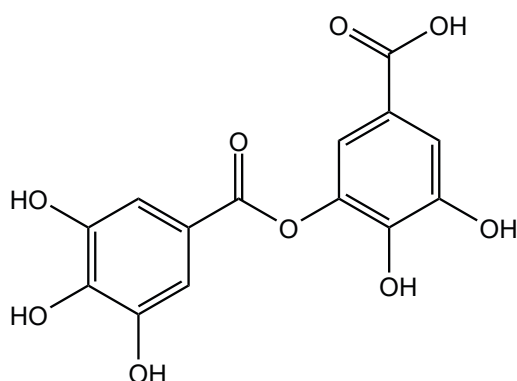


Слика 61. Некои прости феноли и некои бензоеви киселини

Трите главни реакции кои играат улога во формирањето на фенолните киселини се хидроксилација, деаминација и метилација. Деградацијата на страничната низа на циметна киселина доведува до формирање на бензоева киселина. Реакциите на метилација и хидроксилација може да се случат во бензенскиот прстен на киселината, што доведува до синтеза на соодветните деривати, *p*-хидроксibenзоева, протокатехинска и гална киселина (слика 61).



Слика 62. Циметна киселина и нејзини деривати

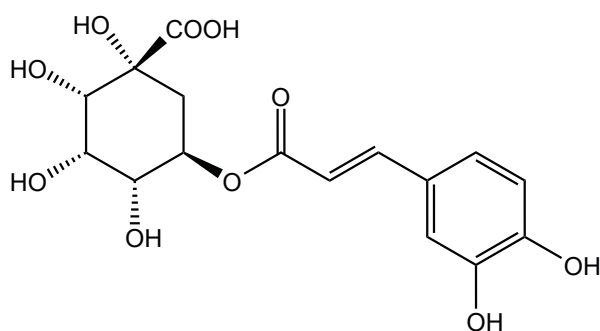


Слика 63. Дигална киселина (пример на самоестерификација или т.н. внатрешен естер)

Депсиди и дидепсиди. Растителните киселини во живите организми (растенија) се јавуваат како слободни, како соли или како естри, поретко во други форми. За фенолните растителни киселини е честа појавата самите да се естерификуваат на начин едната молекула од истата киселина во естерификацијата да влегува со карбоксилната, а другата молекула со фенолната група, градејќи т.н. внатрешен естер, како што е тоа случај со дигална киселина (слика 63).

Дигална киселина на ист начин може да врзе уште еден молекул од гална киселина и на тој начин да создаде дидепсид или со врзување со *n*-молекули гална киселина полидепсид. Вакви структури се јавуваат во градбата на хидролизирачките танини кои се создаваат како деривати на галната киселина. Денес е познато дека освен внатрешни естри од ваков карактер, растенијата може да создаваат и низа други внатрешни естри или депсиди од кои позначајни се следните:

- Хлорогенска киселина. Може да се означи и како хлорогена киселина (слика 64). Претставува естер на кафена киселина со хина киселина. Во растенијата се јавува како меѓупроизвод при синтеза на лигнини. Името на овој депсид се доведува во врска со полифенолни естри од фамилијата на хидроксициметните киселини во кои спаѓа кафената, ферула и *p*-кумарната киселина, кои градат внатрешни естри со хина киселина. Иако во името го содржи зборот хлоро, не содржи хлор туку името е изведено од грчките зборови хлорос (светлозелено) и гено (создава) поради фактот што при оксидација создава соединение со зелена боја.

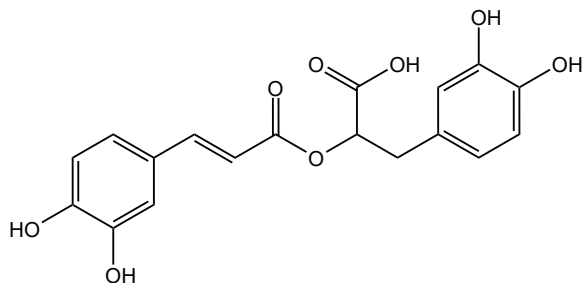


Слика 64. Структура на хлорогенска киселина

Структурно, хлорогенската киселина е естер што се формира помеѓу кафена киселина и 3-хидрокси-L-хина киселина. Изомерите вклучуваат кафеил естри со хина киселина и на други позиции: 4-кафеил-*O*-хина киселина (позната како криптохлорогена киселина) и 5-кафеил-*O*-хина киселина (позната како неохлоро-генска киселина). Во природата се сретнуваат структури со повеќе од една молекула на кафена киселина. Познати се неколку изомери како што се: 3,4-дикафеил-хина киселина и 3,5-дикафеил-хина киселина кои се јавуваат во семето од кафе и 1,5-дикафеил-хина киселина позната под името цинарин, што се јавува во листот од артичока.

Хлорогенската киселина и соодветните со неа поврзани структури се јавуваат во месестите делови од модриот патлиџан, праските и сливите, како и во листовите од растението хибискус и во листовите од боровинката. Изомерите на хлорогенската киселина се јавуваат во компирот. Хлорогенската киселина може да го намали крвниот притисок, има потенцијал за антиинфламаторно дејство и покажува изразено антиоксидативно дејство. Особено е присутна во зеленото кафе, а екстрактите од зеленото кафе се користат за производство на додатоци на исхраната со антиоксидативно дејство.

- Розмаринска киселина. Оваа киселина (слика 65) за прв пат е изолирана од листот на рузмарин од каде потекнува името (*Rosmarinus officinalis* L.). Претставува кафеил естер на 3-(3,4-дихидрофенил)-млечна киселина.



Слика 65. Структура на розмаринска киселина

Розмаринската киселина е особено присутна во растенијата од фамилијата на усноцветни растенија (Lamiaceae) што се користат како кулинарски зачини како што се босилек, маточина, рузмарин, оригано, жалфија, нане, мајчина душичка и др. Има изразено антиоксидативно дејство.

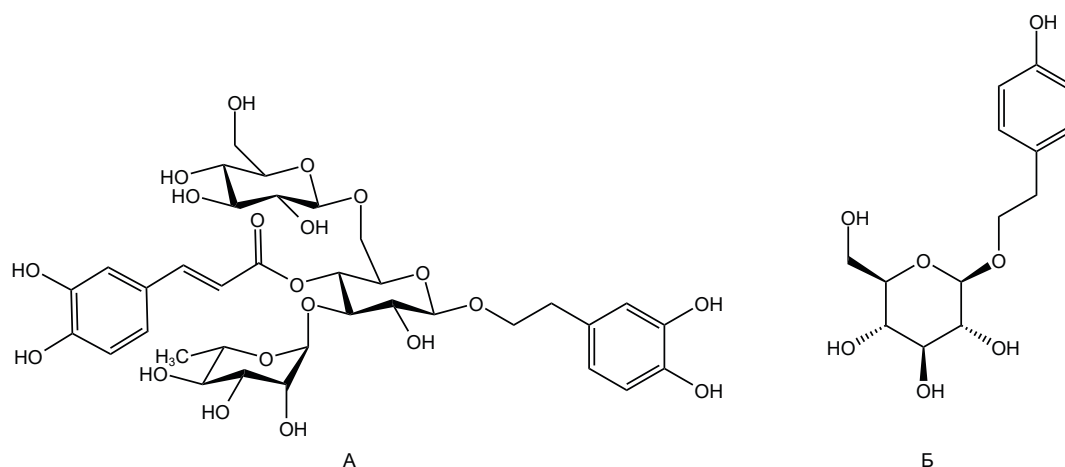
8.2.2. Фенилетаноиди

Фенилетаноиди и нивни гликозиди (заеднички означени како фенилетаноиди = ФГ) се природни производи што се изолирани од поголем број лековити растенија, а нивната широка дистрибуција сугерира дека се важни таксономски маркери. Се наоѓаат во корените, стеблата, лисјата, цветовите, плодовите и семките, во различни количества. Основната градба е C_6-C_2 (фенетил алкохол), а хемиски претставуваат деривати на фенолни киселини (кафена, кумарна, циметна, ферула и др.) и на хидроксифенилетил алкохол, врзан за β -глукопираноза со естерска или со гликозидна врска, соодветно. Покрај гликозата може да се врзат и други моносахариди (рамноза, алоза, арабиноза, галактоза, ксилоза и апиоза). Дополнително овие шеќери може да се врзат и на гликозата. Кај повеќето фенилетаноиди, гликозата е јадрото на молекулата, но може да биде и некој од наведените моносахариди. Првите сознанија за оваа класа полифенолни соединенија датираат од 1950 год. кога од *Echinacea angustifolia* DC е изолирано соединението ехинакозид (слика 66), чијашто структура е разјаснета дури во 1983 год. Најраспространет фенилетаноид е актеозид, изолиран од некои видови на *Verbascum*.

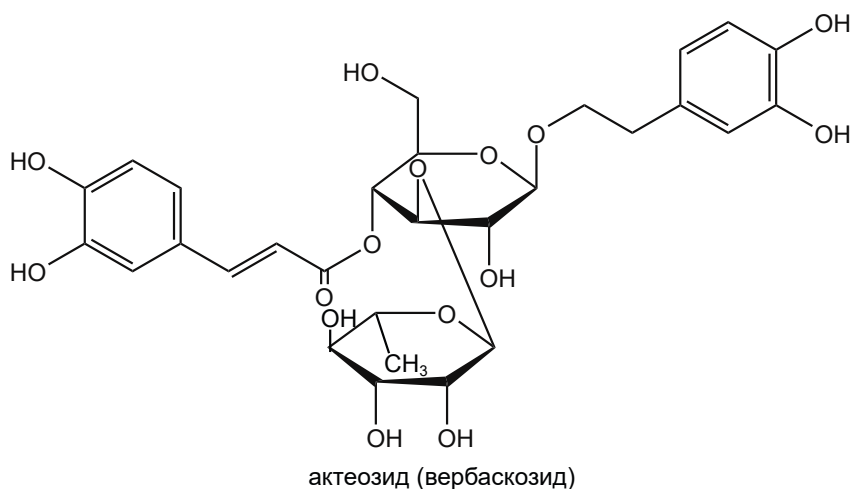
Класификација на фенилетаноидните гликозиди. Овие соединенија се класификуваат врз основа на својствата на шеќер (бројот, типот и локацијата на шеќерите во молекула) или промени во основните структури на шеќерот. Оттука разликуваме:

1. Моносахаридни фенилетаноиди, во кои спаѓа салидрозидот (слика 66). Салидрозид (родиолозид) е β -D-глукопиранозид на фенолен алкохол *p*-хидроксифенилетанол.
2. Дисахаридни фенилетаноиди. Оваа група може да се категоризира во неколку подгрупи според нивните олигосахаридни делови, а позначајни се гликозиди кои содржат рамноза-гликоза врска или ФГ од типот на актеозид (вербаскозид) (слика 67).
3. Трисахаридни фенилетаноиди. Кај овие соединенија основата ја сочинува дисахаридниот актеозид за кој се прикачува третиот шеќер (апиоза, арабиноза, ксилоза, рамноза или гликоза). Во оваа група спаѓа ехинакозидот (слика 66).

4. Тетрасахаридни фенилетаноиди.
5. Ацетилрани фенилетаноидни гликозиди. Познати се неколку структури со ацетил-групи во шеќерниот дел.
6. Фенилетаноидни гликозиди со шеќерно јадро што не е гликоза.
7. Фенилетаноидни гликозиди поврзани со секоиридоидна структура.



Слика 66. Структура на ехинакозид (А) и на салидрозид (Б)



Слика 67. Структури на дисахариден фенилетаноиден гликозид

Биолошки активности на фенилетаноиди. Фенилетаноидите што се изолирани од различни растенија покажале низа биолошко-фармаколошки дејства во студии *in vitro* и *in vivo*, а како најзначајни се издвојуваат:

- Антиоксидативно дејство.
- Невропротективни ефекти.

- Цитотоксично и антипролиферативно дејство.
- Хепатопротективно и аналгезично дејство.
- Антивирални, антибактериски и антопротозоични својства.
- Антиинфламаторна активност.
- Дејство врз кардиоваскуларниот систем и др.

Салидрозидот (родилозидот), моносахаридниот ФГ кој е изолиран од коренот на растението *Rhodiola rosea* L. (златен корен), има изразена антиинфламаторна активност. Актеозидот (вербаскозидот) е дисахариден ФГ, кафеил фенилетаноиден гликозид кај кој кафената киселина и хидрокситирозол формираат естерска врска и гликозидна врска со рамноза која е врзана за гликоза како главен шеќер (слика 66). Покажува потенцијал да биде водечка природна состојка што би се користела во идното лекување на карцином на црн дроб. Дополнително дејствува антимикробно и антиинфламаторно. Ехинакозидот, кој е првиот изолиран фенилетаноиден гликозид, од групата трисахаридни ФГ, тековно се проучува во однос на можностите за негово користење во третманот на Алцхајмеровата болест, Паркинсоновата, атеросклероза, остеопороза, акутен колитис, хепатис и повреди на кожата. Докажано е, меѓу другото, дека инхибира апоптоза во нервните клеточни линии со што покажува потенцијал за третман на невролошки состојби. Редица други фенилетаноидни гликозиди се изучуваат со оглед на големиот биолошко-фармаколошки потенцијал на овие соединенија.

8.2.3. Екстракција и испитување на фенолни киселини и на фенилетаноиди

8.2.3.1. Екстракција и испитување

Најголем дел од фенолните киселини можат да се екстрахираат од растителен материјал со употреба на органски растворувачи (најчесто алкохоли) со т.н. конвенционални техники на екстракција: Сокслет екстракција, мацерација, екстракција со топлински рефлукс и перколација. Основни карактеристики на конвенционалните методи се: употреба на големи количини на растворувачи, долго време на екстракција и зголемен интензитет на лабораториска работа. Се препорачува растворувачите да бидат незапаливи, нетоксични и хемиски неутрални. Дополнително, не треба негативно да влијаат врз стабилноста на испитуваните секундарни метаболити, ниту на кој било начин негативно да влијаат врз апаратурата што се користи. Најчесто се користат: етил ацетат, метанол, етанол и нивни мешавини со вода.

Денешните пристапи во екстракцијата на природните производи се ориентирани кон користење на што е можно поедноставни, брзи, сеопфатни и еколошки прифатливи методи. Притоа, треба да се има предвид дека поларните фенолни киселини не можат целосно да се екстрахираат со помош на чисти органски растворувачи, поради што се препорачува употреба на смеси ацетон-вода или комбинации алкохол-вода. За поголем успех на екстракцијата, може да се примени предекстракција со неполарни растворувачи како дихлорометан, хлороформ, бензен и хексан, за прво да се извлечат (отстранат) неполарните соединенија како што се: восоците, маслата, стеролите и хлорофилот. Врз ефикасноста влијаат и други фактори, како на пр., рН-вредноста, температура, бројот и временските интервали на одделните чекори на екстракција, односот на волуменот примерок-растворувач и др. Фенолните киселини се јавуваат и како нерастворливи комплекси со полимери што се врзани на клеточниот сид со гликозидни и со естерски врски. Во вакви случаи фенолните киселини не може да се екстрахираат со чисти органски растворувачи туку е потребна кисела или базна хидролиза или и двете пред самата екстракција. По направената хидролиза, најчесто се користи Сокслет екстракција.

UAE користи дејство на ултразвучни вибрации коишто ја подобруваат ефикасноста на растворувачот за пенетрација во примерокот. Оваа техника главно се карактеризира со голема брзина и едноставност и обично трае само неколку минути. Може да се користи и суперкритична екстракција со CO_2 , потоа ASE којашто се одвива на повисока температура (приближно 40-200 °C) и при повисок притисок (скоро 3,3-20,3 МПа), а од поново време екстракција со супкритична вода (SCWE = Subcritical water extraction). Главните придобивки на SCWE се висок квалитет на екстракт поради употребата на вода како растворувач, а приносот на екстракцијата зависи од температурата, од големината на честичките на примерокот и од pH-вредноста. Дополнително, денес е актуелна и MAE-екстракцијата) којашто се заснова на користење на микробранови како нејонизирачко зрачење на фреквенции од 300 MHz до 300 GHz (бранови должини од 1 m до 1 mm).

Фенолетаноидните гликозиди се растворливи во поларни растворувачи и за нивна екстракција се користат класични методи на екстракција. Вообичаено се подготвува првичен екстракт со етанол, којшто потоа се фракционира со петролетер, етил ацетат и *n*-бутанол. За подготовка на првичниот екстракт може да се користи 70 % етанол, метанол : вода (4 : 1 *V/V*) или 60 % етанол.

8.2.3.2. Идентификација и квантификација

Идентификација и квантификација на фенолните киселини. За квантификација на фенолните киселини најчесто е користен колориметриски метод со Folin-Ciocalteu реагенсот (FCR). FCR е редокс реагенс којшто во алкален раствор со феноли (полифеноли) создава сино обоен комплекс што се мери спектрофотометриски во видливо подрачје. Во реакцијата со FCR-реагенсот се формира сино обоен хромофор составен од комплекс фосфотангстик-фосфомолибден, каде што максималната апсорпција на хромофорот зависи од алкалниот раствор и од концентрацијата на фенолните соединенија. Недостаток на методот е што FCR-реагенсот брзо се распаѓа во алкални раствори, поради што е неопходно да се користи огромен вишок на реагенс за да се добие целосна реакција. Овој вишок може да резултира со преципитати и висока заматеност, што ја прави невозможна спектрофотометриската анализа. За да се намали преципитацијата и за да се спречи заматеноста, во реагенсот се додадени соли на литиум, така што реакцијата со оваа корекција генерално обезбедува точни и специфични податоци за неколку групи фенолни соединенија, меѓу кои и за фенолни киселини. Овој метод вообичаено дава податок за присуство на вкупни феноли во примерокот.

Сепаративните техники, колонската хроматографија и тенкослојната хроматографија (TLC), сè уште често се применуваат во анализа на фенолните киселини поради нивната практичност, цената и широка достапност на стационарните фази. Сепак, подобри резултати за карактеризација на фенолни киселини се постигнуваат со RP-HPLC при што за идентификација и квантификација на киселините се користи UV-Vis-детектор со PDA. Успешно може да се користат и други видови на детекција: електрохемија (EC), флуоресценција (F) и масена спектрометрија (MS). GC е уште еден важен хроматографски метод што се користи за анализата на фенолни киселини во растителен материјал, порано повеќе со FID, а денес повеќе со MS. HSCCC наоѓа сè поголема примена во анализата на фенолните киселини и на другите природни производи, поради значајни предности што ги овозможува во споредба со конвенционалната течна хроматографија. Друга повеќеенаменска хроматографска техника за анализа и идентификација на фенолни соединенија е SFC. Во споредба со другите вообичаени хроматографски техники (HPLC и GC), SFC овозможува пократко време за анализата, постигнува високо ефикасно раздвојување и моќност со висока резолуција, може да се користи со различни типови на детектори и е еколошки прифатлива (eco-friendly).

Од другите техники позначајни се: CE, SEC, мицеларна електрокинетичка хроматографија (МЕКС) и CZE, придружена со UV, со MS или со електрохемиска детекција.

Идентификација и квантификација на фенилетаноиди. За структурна идентификација на фенилетаноидите се користат спектроскопските техники: NMR, IR, UV-Vis- спектрофотометрија и MS. За спроведување на анализата потребна е мала количина на материјал и повеќето од овие техники се недеструктивни. Може да се користи и рендген-кристалографија, но само за анализа на добро формирани кристали. Наведените техники спаѓаат во т.н. органска спектроскопија и се применуваат во структурната органска анализа.

Од хроматографските техники, за идентификација и квантификација на фенилетаноидите, се користат:

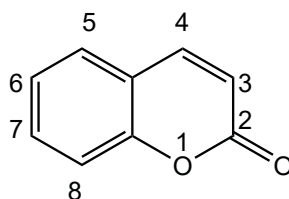
- течната хроматографија во спрега со масена спектроскопија (HPLC/MS), HPLC-QTOF MS, и HPLC IT-TOF-MS),
- течна хроматографија со тандем масена спектрометрија (High performance liquid chromatography-mass spectrometry/ mass spectrometry (HPLC-MS/MS),
- течна хроматографија со ултрависоки перформанси со тандем масена спектроскопија (Ultra high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectroscopy (UHPLC-ESI-MS/MS), и
- течна хроматографија со високи перформанси со детектор од низа на фотодиоди со хемиска јонизација во атмосферски притисок во тандем со масена спектрометрија (High performance liquid chromatography-photodiode array detector / atmospheric pressure chemical ionization/mass spectrometry (HPLC-PAD-APCI/MS).

За анализа на фенилетаноидите во растителен материјал може да се користи и капиларна електрофореза (CE).

8.3. КУМАРИНИ

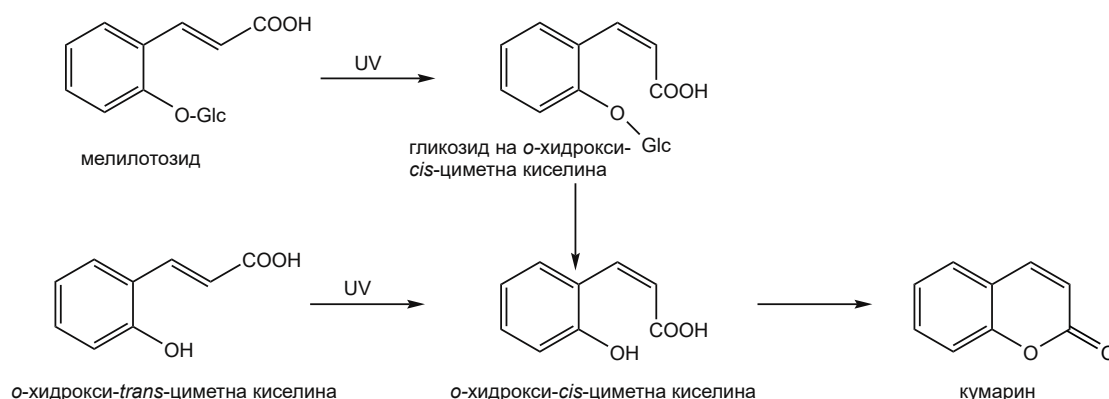
8.3.1. Растителни кумарини

Кумарините се хетероциклични соединенија во чија структура се наоѓаат два кондензирани прстени: α -пирон и бензолово јадро, во основен кумарински скелет што претставува бензо- α -пирон (слика 68). Можат да се сметаат за лактони на *o*-хидрокси-*cis*-циметна киселина. Во растителниот свет се многу распространети во голем број медицински растенија, а во храната особено во јагодата, кајсијата и во зачинот цимет.



Слика 68. Структура на кумарин

Биосинтеза на едноставни кумарини. Кумарините се фенилпропаноиди и во растителните организми се создаваат на начин што е вообичаен и за другите фенилпропаноиди, преку патот на шикими киселината. Значајна компонента во биосинтезата е хидроксициметна или *p*-кумарна киселина. За формирање на лактонскиот прстен (α -пирон) неопходно е киселината да биде во *cis*-форма и да има ОН-група во *o*-позиција. Во природата вообичаено се јавува гликозид на *trans*-циметна киселина, а за изомеризација во *cis*-форма потребна е UV-светлина и дополнително да се изврши хидролиза на гликозидната врска, по што спонтано доаѓа до лактонизација и затворање на кумаринскиот прстен. Поедноставена биосинтеза на чист кумарин е прикажана на слика 69.



Слика 69. Биосинтеза на кумарин

Распространување и локализација на кумарините. Кумарините се чести растителни состојки, распространети во претставници од фамилија на штитоцветни растенија (анасон, ким, коријандер, целер, магнона), на маслинка, на житарици, мешункастиот зеленчук, дивот костен, лимонот, пиперката, но и кај камилицата, нането, маточина и другите медицински растенија. Простите кумарини (хидрокси и метокси деривати) се јавуваат почесто од сложените кумарини (фурано и пирано деривати), што се карактеристични само за одредени видови и за одредени фамилии. Во растенијата кумарините се наоѓаат слободни или во гликозидна форма, а количеството им варира од 0,2 до 10 %. Во еден вид можат да се јават повеќе различни кумарински деривати. Локализираните се главно во подземните органи, во корени, во кори, во семки, во плодови и во цветни пупки, а помалку се присутни во стеблата или во листовите.

Хемиска градба и класификација на кумарините. За сите природни кумарини е карактеристично тоа што на C_7 - имаат ОН-група. Други хидроксилни или метокси групи најчесто се врзани на C_6 или на C_5 , C_8 и C_4 . Многубројните деривати на кумаринот се разликуваат по бројот и видот на супституентите во основниот скелет, но значајни карактеристики се пројавуваат кај кумаринските деривати што имаат странично врзани радикали (слика 70). Природните кумарини можат да се поделат во следните групи:

1. хидрокси и метоксикумарини (едноставни кумарини),
 2. фуранокумарини,
 3. пиранокумарини,
 4. други кумарински производи.
1. Хидрокси и метоксикумарините во зависност од бројот и од местото на супституицијата можат да бидат кумарин и гликозиди на *o*-дихидроксициметна киселина и монопроизводи со супституиција на C_7 , од коишто најзначајни се:

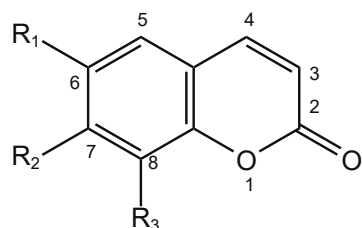
- умбелиферон, C_7 -ОН, (застапени во ким, анасон, камилица, пиперка и др.),
- херниарин, C_7 -ОСН₃, (камилица, цвет од лаванда).

Дипроизводи можат да бидат со супституција на C_7 и C_6 или C_7 и C_8 , од кои позначајни се:

- ескулетин, C_7 -ОН, C_6 -ОН, (див костен),
- ескулин, C_7 -ОН, C_6 -ОГлс, (цигура),
- скополетин, C_7 -ОН, C_6 -ОСН₃, (поманица),
- скополин, C_7 -ОГлс, C_6 -ОСН₃, (скополиа – лековито растение),
- скопарон, C_7 -ОСН₃, C_6 -ОСН₃, (медицински растенија),
- дафнетин, C_7 -ОН, C_8 -ОН, (медицински растенија),
- дафнин, C_7 -ОГлс, C_8 -ОН, (медицински растенија).

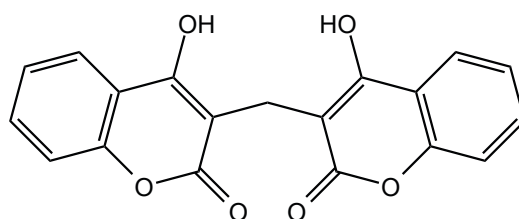
Трипроизводите имаат супституенти на C_7 , C_6 и C_8 . Од нив позначајни се:

- фраксетин, C_6 -ОСН₃, C_7 -ОН, C_8 -ОН, (див костен),
- фраксин, C_6 -ОСН₃, C_7 -ОН, C_8 -ОГлс, (див костен),
- фраксидин, C_6 -ОСН₃, C_7 -ОСН₃, C_8 -ОН, (див костен),
- изофраксидин, C_6 -ОСН₃, C_7 -ОН, C_8 -ОСН₃, (див костен).

	R ₁	R ₂	R ₃	
	H	H	H	кумарин
	H	HO	H	умбелиферон
	H	ОСН ₃	H	херниарин
	H	HO	HO	дафнетин
	HO	HO	H	ескулетин
	ОСН ₃	HO	H	скополин

Слика 70. Кумарин и некои негови моно-, ди- и трисупституирани производи

Дикумарини. Посебна група кумарински производи се дикумарини, кај кои два кумарински прстена се поврзуваат меѓусебно со метиленски мост. Дикумарините настануваат во процесот на ферментација на растителен материјал и под дејство на микроорганизми. Најголемо значење има соединението дикумарол (слика 71), составено од две молекули на 4-хидроксикумарин што се меѓусебно поврзани со метиленски мост на позициите 3-3'. Дикумаролот за прв пат е изолиран од мувლოსано сено од коњска детелина.

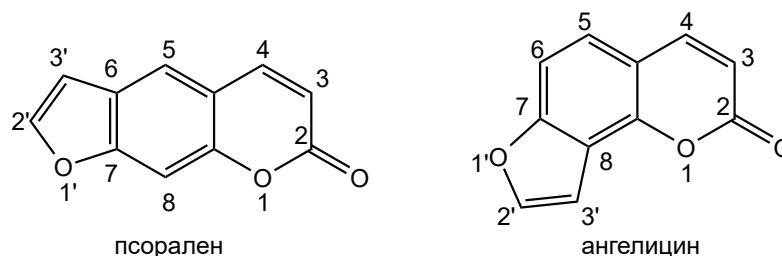


Слика 71. Структура на дикумаринско соединение дикумарол

Фуранокумарини. Фуранокумарините се деривати на кумарин што дополнително вклучуваат фурански прстен. Биосинтезата на овие соединенија вклучува молекула на диметилалил пирофосфат (DMAPP) во позициите 6 или 8 кај 7-хидроксикумарин, од каде потекнува дополнителниот прстен. Ако врзувањето настане на позиција 6 се создаваат линеарни, а со врзување во позиција 8 ангуларни фуранокумарини (слика 72).

Оттука фуранокумарините се делат во две групи:

- производи на псорален, линеарни фуранокумарини,
- производи на ангелицин, ангуларни фуранокумарини.



Слика 72. Структури на основни фуранокумарински соединенија

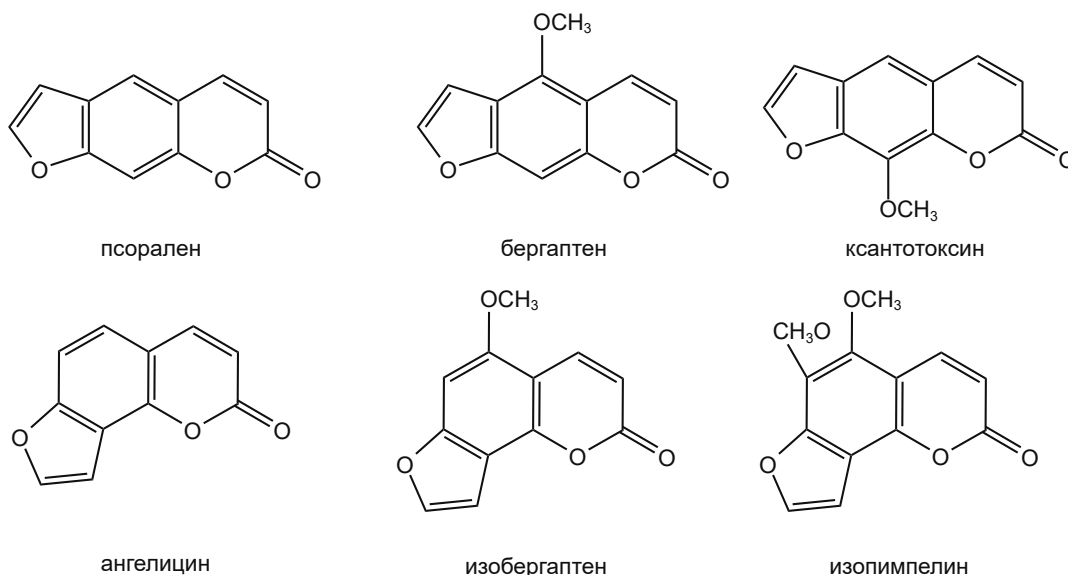
Производите на псорален имаат супституенти на C_5 или на C_8 , ретко и на двете позиции. Се среќаваат и производи што имаат радикали на фуранскиот прстен. Производите на ангелицин имаат супституенти на C_5 или на C_6 , но често имаат радикали и на фуранскиот прстен. Фуранокумарините се распространети главно во претставниците на фамилијата на штитоцветни растенија каде што спаѓаат анасонот, кимот, магносот, целерот, пашканатот и др. Се среќаваат и во некои мешункасти растенија (слика 73).

Најраспространети фуранокумарини, производи на псорален се:

	C_5	C_8	Распространување
псорален	H	H	Мешункасти растенија
бергаптен	OCH_3	H	Агруми
ксантоксин	H	OCH_3	Штитоцветни растенија
ксантоксол	H	OH	Штитоцветни растенија
изопимпинелин	OCH_3	OCH_3	Штитоцветни растенија

Најраспространети фуранокумарини, производи на ангелицин се:

	C_5	C_6	Распространување
ангелицин	H	H	Штитоцветни растенија
изобергаптен	OCH_3	H	Штитоцветни растенија
сфондин	H	OCH_3	Штитоцветни растенија
пимпинелин	OCH_3	OCH_3	Штитоцветни растенија



Слика 73. Структури на некои фуранокумарини

Пиранокумарини. Пиранокумарините се сложени кумарини кои дополнително содржат пирански прстен (слика 74). Во зависност од позициите на кои е врзан пиранскиот прстен може да бидат:

- производи на ксантилетин, кај коишто пирановиот прстен е врзан за позициите 6-7,
- производи на сезалин, кај коишто пирановиот прстен е врзан за позициите 7-8,
- производи на алоксантилетин, кај коишто пирановиот прстен е врзан за позициите 5-6.



Слика 74. Појдовни структури на пиранокумарини

Како биолошки активни состојки најмногу се проучувани дериватите на сезалин, кои имаат и најголемо значење.

Биолошко-фармаколошко дејство на кумарините. Кумарините покажуваат различна биолошка и фармаколошка активност. Како најважни и најдобро проучени се сметаат спазмолитичното, коронародилататорното и фотосензибилизирачкото дејство.

- Во поглед на спазмолитичното дејство, утврдено е дека носители на дејството се хидрокси и метокси кумарините, а интензитетот зависи од бројот и од распоредот на супституентите. Кумарините што имаат ОН-група на C_7 (7-хидроксикумарини) пројавуваат појако дејство од чистиот кумарин, 6,7-дихидрокси деривати се поактивни од 7-хидроксикумарин, а 7-метокси

и 6,7-диметоксикумарини се поактивни од оксидериватите. Најинтензивно спазмолитично дејство покажуваат ацетилирани кумарински деривати.

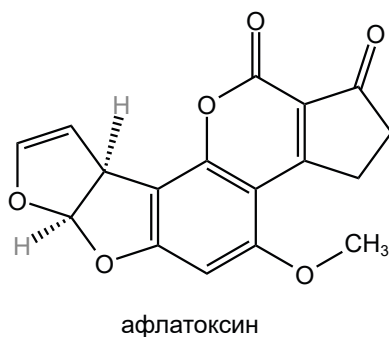
- Фотосензибилизирачкото дејство пројавуваат фуранокумарини, но само оние од псораленски тип. Дејството зависи од хемиската градба, а најјакото дејство покажува токму псораленот. Високо ефективни се и неговите монометокси производи, како што се бергаптен и ксантотоксин. С-метилните деривати се неколку пати поактивни од чистиот псорален. Фотоактивните фуранокумарини го зголемуваат бројот на меланоцитите и количеството на создадениот пигмент во поткожното ткиво. Поради изразено фотосензибилизирачко дејство, наоѓаат примена во лекување витилиго и леукодермии (псоријаза).
- Фуранокумаринските деривати на ангелицин, не покажуваат фотосензибилизирачко дејство туку, пројавуваат други ефекти, како што се спазмолитично и хипотензивно дејство или дејствуваат како депресори на CNS (смирувачко дејство). Голем број кумарини, воопшто, покажуваат слаб седативен ефект.
- Коронарнодилататорно дејство покажуваат пиранокумарините на растението *Ammi visnaga* (L.) Crantz, пред сè виснадинот.
- Некои кумарини покажуваат капиларопротективна активност (ескулин) и наоѓаат примена за третман на инфламаторни процеси на венски крвни садови.
- Некои хидроксиди и метокси кумарини ја зголемуваат гломеруларната филтрација и дејствуваат диуретично. Дикумаролот е антикоагуланс. Некои кумарини и фуранокумарини покажуваат бактериостатско и фунгистатско дејство.
- Невропротективна активност. Кумаринот се покажал корисен во случај на некои невродегенеративни заболувања како што се Алцхајмерова, Паркинсонова и Хантингтонова болест. Дејството е потврдено со експериментални испитувања на лабораториски животни.
- Антиканцер активност. Антиканцерогената активност на кумаринот интензивно се проучува во последните неколку години при што се добиени добри и ветувачки резултати што укажуваат на можното користење на кумаринот во третман на рак. Испитувањата покажале дека кумаринот ги намалува несаканите ефекти од радиотерапијата.

Значење и употреба на кумарините. Кумаринот има широка употреба во индустријата, главно поради силниот мирис. Речиси универзално е присутен во храната од растително потекло (плодови, семки, корени, стебло, кора, листови и гранки на голем број растенија). Во прехранбената индустрија се користи како арома супстанција и адитивен агенс. Се користи како фиксатор и засилувач на мириси во парфемии и во етерични масла. Се користи во козметичкото производство (сапуни, пасти за заби, гелови за коса), во тутунската индустрија како стабилизатор на вкус и мирис, во индустријата за производство на бои и гуми, во производство на средства за маскирање на мириси, во процесот на галванизација за намалување на порозноста и за зголемување на флуоресценцијата на различни депозити, како што е никелот и др.

Медицинските растенија што содржат кумарини се користат за производство на хербални лекови и за производство на додатоци на исхраната. И покрај присуството на голем број кумарински соединенија во растенијата, во изолирана чиста состојба економска важност имаат само чистиот кумарин и неколку природни и синтетички кумарински соединенија. Од нив се значајни 3,4-дихидрокумарин и 6-метилкумарин што се користат како средства за подобрување на мирисот, најчесто во производство на парфемии, 7-хидроксикумарин, се користи во креми за сончање, 4-хидроксикумарин кој е прекурсор во производство на антикоагуланси и сл.

Токсичност на кумарините. Растенијата што содржат фуранокумарини може да предизвикаат алергиски реакции и реакции на преосетливост, што се должат на фототоксичната активност на

фуранокумарините. Вообичаени симптоми се воспалителни процеси на кожа (фотодерматитис), осип, црвенило и хиперпигментација. Алергиски реакции најчесто настануваат во контакт со следните растенија: млечен сок од смоква, лимон и други агруми, целер, пашканат, ајдучка трева и др. Некои кумарини имаат изразено токсично дејство врз човечкиот организам, како што е тоа случај со соединението афлатоксин (слика 75), кој го создава габата (мувлата) *Aspergillus flavus*, што се развива на прехранбени производи. Потврдено е дека афлатоксинот има изразено канцерогено дејство.



Слика 75. Структура на токсичен кумарин од групата микотоксини

8.3.2. Екстракција и испитување на кумарини

8.3.2.1. Екстракција и пречистување

Најдоброто средство за екстракција на кумарин е етанол, но со успех може да се користат и некои органски растворувачи, како што се: бензен, хлороформ, диетилетер и петролетер. По упарувањето на екстрактивното средство, добиениот остаток се пречистува со хлороформ или со диетилетер за да се отстранат липофилните нечистотии. За понатамошното пречистување на екстрактите се користат: зовриена вода, активен јаглен, етанол-хлороформ (3 : 97) или етил ацетат и бутанол. Сепарирањето на одделни компоненти најдобро се постигнува со хроматографски техники, со хартиена или со препаративна тенкослојна хроматографија (TLC). Како адсорбент во TLC-методите најчесто се користи неутрален алуминиум оксид и силикагел. Алуминиум-оксидот вообичаено се смета за најдобар адсорбент за раздвојување и изолација на кумарин. Најчесто користени растворувачи во мобилни фази се: етил ацетат и петролетер (1 : 2), етилциклохексан и хлороформ петролетер (3 : 1) и бензен-етил ацетат. Ако се применува колонска хроматографија, се користат различни адсорбенти и системи на растворувачи за елуација. Раздвојувањето на хидрокси- и алкокси-кумарини може да се врши на колона од силика гел од која елуирањето на кумарините се прави со хексан и хексан хлороформ или со хлороформ-метанол. Во литературата се наоѓаат податоци за користење на системи на колони со алуминиум-оксид или со силициум диоксид гел, од кои елуирањето на кумарините е направено со бензен-хлороформ, со хлороформ-етанол или со бутанол-бензен. Фуранокумарините може да се сепарираат на колона од алуминиум-оксид и да се елуираат со етер, со хлороформ-петролетер (1 : 2) и со петролетер или сериски со хлороформ-етанол. Може да се користи мешавина од хексан-хлороформ доколку се работи на колона од силика гел. Денес како методи од избор за изолирање и пречистување на кумарини и на кумарински хетерозиди се сметаат препаративната течна хроматографија и гел-филтрацијата.

8.3.2.2. Идентификација и квантификација на кумарини

Кумаринските соединенија во растителен материјал и во растителните екстракти се идентификуваат со користење на хартиена или на TLC, при што детекцијата на петната се врши врз база на специфичната флуоресценција на кумарините во UV-светлина. По карактерот на флуоресценцијата (бела, сина, жолта, зелена), можат да се разликуваат различни групи кумарини. Повеќето од производите на кумаринот што содржат слободна ОН-група, флуоресцираат и во неутрална средина, а флуоресценцијата станува интензивна по додавање база или по изложувањето на TLC-плочите на дејство на пари од амонијак.

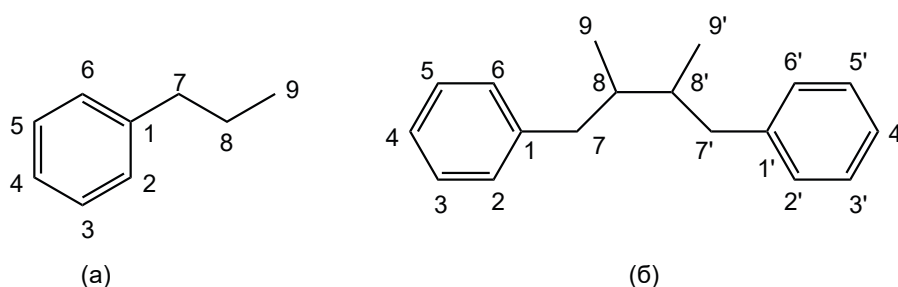
За определување на содржината на кумарините се користат:

- Титриметриски метод. Се користел порано и има историско значење. Методот се базира на способноста на лактонот (кумаринскиот прстен) да се отвори во алкална средина. Ако алкалијата се додаде во вишок, по реакцијата вишокот се определува титриметриски со раствор од сулфурна или од хлороводородна киселина. Предноста на овој метод е во тоа што не е потребна референтна супстанција, а негативната страна е ниската специфичност.
- Калориметриски метод. Овој метод се заснова на способноста на кумарините да создаваат стабилни обоени деривати (со светлокафена до темноцрвена боја) во реакција со дијазониум соли. Интензитетот на обојувањето се мери колориметриски со користење на соодветен филтер.
- Спектрофотометрија. Методот се базира на способноста на кумарините да апсорбираат во UV-подрачје и да даваат специфична спектрална распределба (UV-спектар) со висока апсорпција во опсегот од 220 до 350 nm. Денес за определување на вкупни кумарини спектрофотометријата се смета за метод од избор. Методот е едноставен, може да се користи и во квалитативната и во квантитативната анализа, но неопходни се соодветните референтни супстанции.
- GC. Гасната хроматографија главно се користи за анализа на фурукумарини во растителни екстракти. Искусствено се воспоставени и определени правила за сепарирање на компонентите: а) фурукумарини со О-алкил супституенти на C-5 (5-хидрокси изомери) се отстрануваат по 8-хидрокси изомери; б) од хидрокси до метоксикумарини, времето на задржување се намалува (поради помалата адсорпција преку водородни врски) и в) логаритмот на релативното време на задржување е линеарна функција од молекуларната тежина. GC се користи за утврдување на структурата и за проценка на времето на задржување на аналогниот кумарин.
- HPLC. Денес конвенционалната HPLC е најчесто користената метода за анализа на кумарини и на фуранокумарини. Често се применува изократски режим и истовремено квантитативно и квалитативно определување на кумарини, но и градиентно елуирање при што мобилната фаза главно се состои од ацетонитрил и вода. HPLC-UV-метод е погоден и за истовремено определување на содржина на повеќе кумарини, како што било направено во листови од бамбус во кои истовремено биле определувани 12 кумарини (скимин, скополин, скополетин, умбелиферон, 6,7-диметокси-кумарин, кумарин, псорален, ксантотоксин, 5,7-димпоксикумарин, императорин и остол). HPLC-DAD-метод е погоден за рутинска анализа на кумарин во храна и сокови, особено отако заради загриженоста околу токсичноста на кумаринот, нивото на кумаринот во храната е лимитирано на најмногу 2 mg/kg. HPLC со флуоресцентна детекција (HPLC-Fluorescence Detection) и со MS може успешно да се користат за анализа на кумарини. Во последно време објавени се резултати од HPLC-MS/MS-анализа на кумарини во повеќе растителни материјали.

8.4. ЛИГНАНИ, НЕОЛИГНАНИ И СЛИЧНИ ПРОИЗВОДИ

8.4.1. Растителни лигнани

Со поимот лигнани се опфатени компоненти што содржат структура настаната со поврзување на β -C-атоми од страничните низи на две молекули од 1-фенилпропан, со 8-8'-врска (слика 76). Неолгнани се компоненти кај што β -C-атомот од едната молекула на фенилпропанот се врзува за различни места од другата молекула на фенилпропанот (8-3', 8-1', 3-3' и др.). Во други производи, што се слични на лигнаните, спаѓаат норлигнаните со C_{17} -скелет, карактеристични повеќе за голосемени растенија (иглолисни) (*Gymnospermae*) и олиголигнаните што настануваат со поврзување на молекула на лигнан и неолгнан. Лигноиди се хибридни лигнани, со мешано биосинтетско потекло. Тука спаѓаат флаванолгнани, кумаролгнани, ксантолигноиди и др.



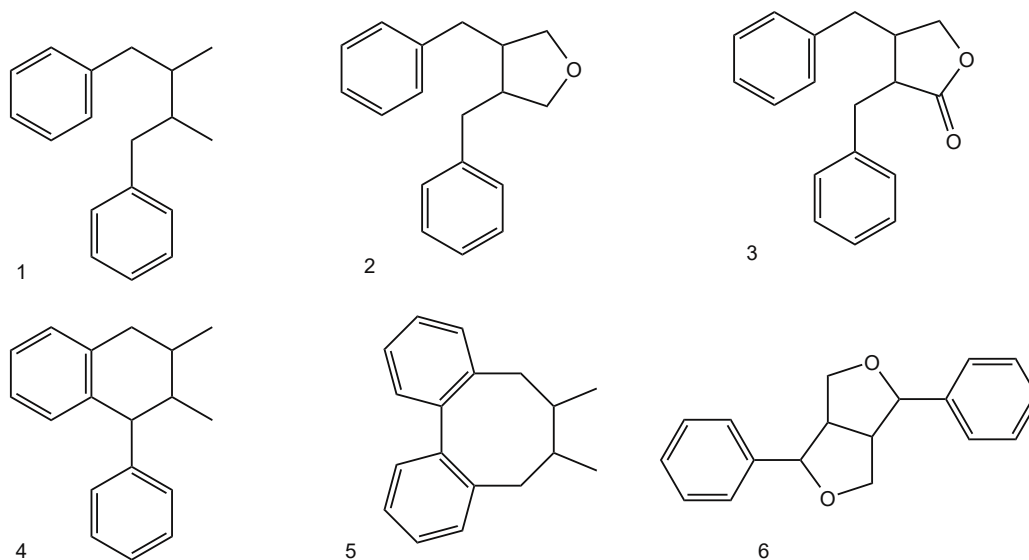
Слика 76. Основна структура на фенилпропан (а) и на лигнан (б)

Распространување на лигнани. Лигнаните се широко распространети во растителниот свет, во околу 70 фамилии. Досега се идентификувани стотици лигнански структури. Во претставници од голосемени растенија се наоѓаат во дрвото, а кај скриеносемениците во сите делови од растенијата. Се наоѓаат и во мешункастиот зеленчук, листест зеленчук (зелена салата, зелка), житарици и друго. Се смета дека биолошката улога на лигнаните е зголемување на одбранбените механизми на растенијата спрема бактериски и габични инфекции. Во ниски концентрации лигнаните се најдени во различни семиња, житарици, овошје и зеленчук, а во поголеми во сусамот и во семето од лен, кои спаѓаат во најголеми извори на лигнани, особено ленот. Што се однесува до житариците, лигнаните се локализирани во надворешните делови од семето и во алеуронскиот периферен слој, поради што се препорачува ингестија на цели семиња. Ингестијата на лигнаните може да биде многу различна, зависно од нивната биорасположливост и од видот на преферираната исхрана (медитеранска, азиска, индиска или друга).

Флаванолгнаните се широко распространети во растенијата, но практична примена и значење имаат само флаванолгнаните на млечниот трн. Локализирани се во ендоспермот на семето. Практично се користи плодот кој претставува вид на сув плод орехче со перјаница (се означува како ахенија). Изолација на флаванолгнаните подразбира отстранување на перјаницата, на надворешниот тврд дел и на семената обвивка до добивање на ендосперм од кој понамаму се изолираат флаванолгнаните.

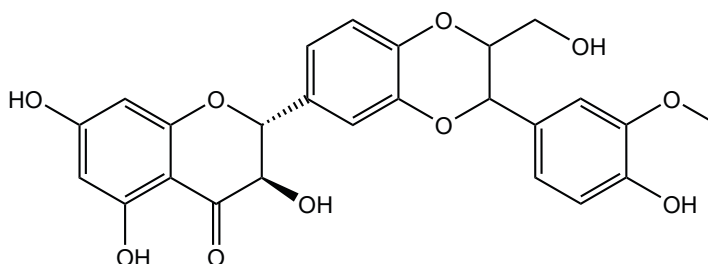
Хемизам и класификација на лигнани. Од досега утврдените структури на лигнани, можно е нивно класификување во шест основни групи (слика 77):

- едноставни дибензилбутани,
- ментофураноидни лигнани,
- бутиролактони,
- арилнафталени,
- дибензоциклооктани и
- фуранофураноидни лигнани.



Слика 77. Основни структури на различните типови лигнани (1-дибензилбутан, 2-ментофуран, 3-бутиролактон, 4-арилнафтален, 5-дибензоциклооктан, 6-фуранофураноид)

Флаванолигнанскиот комплекс на млечниот трн е познат како силимарин, а се состои од 3 главни флаванолигнани што се доминантни и неколку придружни соединенија: силибин, силдианин и силикрестин, дополнително изосилибин и др. (слика 78).



Слика 78. Силибини, флаванолигнан од комплексот силимарин

Биолошко-фармаколошко дејство на лигнаните. Значаен интерес за проучување на лигнаните потекнува од нивната структура која потсетува на структурата на стеридно соединение, поради што лигнаните покажуваат определено фитоестрогено дејство, но и антиинфламаторно, антиоксидативно и антитуморно. Во однос на антитуморното дејство, утврдено е дека голем број лиг-

нани покажуваат цитотоксична и антимиотична активност. По перорален внес, лигнаните под дејство на цревните бактерии се претвораат во ентеролигнани, етеродиол и етеролактон, кои се носители на дејството. Притоа создавањето на енетеролигнани зависи од индивидуалните карактеристики на човекот, па разликуваме единки што создаваат големи количества, но и единки коишто многу малку или воопшто не ја прават оваа конверзија. Оттука, зависно од количеството на создадените енетеролигнани, се објаснуваат различните ефекти што лигнаните ги имаат во случај на кардиоваскуларни заболувања и дислипидемии. Некои епидемиолошки студии укажуваат на намален ризик и појава на кардиоваскуларни заболувања, хипертензија, хиперлипидемија и др. при зголемен внес на лигнани со исхраната, особено со консумација на лененото семе, јачменот, пченичните трици, јаткастите плодови, сусамот, мешунките, овошјето и зеленчукот. Притоа, студиите јасно укажуваат на влијанието на создаденото количество на ентеролигнаните во обезбедувањето на здравствените придобивки.

Внесот на лигнани со исхраната и особено создавањето на енетеролигнаните е значајно во антиканцер заштитата, особено кај жени во однос на инциденцата од развојот на хормон-зависните тумори, на дојка и на ендометриумот на матката. Во оваа смисла особено се значајни лигнаните што се присутни во семето од соја. Лигнаните имаат антиоксидативен капацитет и можат да го намалат ризикот од развој на дијабетес тип I со намалување на оксидативниот стрес. Лигнани и лигнански деривати покажуваат низа други активности, како што се: инхибиција на дејството на некои ензими, спречување на агрегацијата на тромбоцитите, антихипертензивно дејство, антивирална активност, антиинфламаторно дејство, имуностимулативно дејство и др.

Флаванолигнанскиот комплекс силимарин има антиоксидантна, хепатопротективна, антиканцерогена, антиинфламаторна и антидијабетична активност.

Значење и употреба на лигнаните. Растителните суровини што содржат лигнани се користат за производство на хербални лекови и на додатоци на исхраната. Од медицинските суровини што содржат лигнани позначајни се шизандрата и млечниот трн. Екстрактот од плодот на шизандра се користи за производство на додатоци на исхраната со изразена антиоксидативна активност. Екстрактите од млечниот трн и изолиран силимарински комплекс се користат за производство на хербални лекови за третман на болести на црн дроб и за производство на додатоци на исхраната што се препорачуваат за одржување на здравјето и нормалната функција на црниот дроб. Силимаринот се користи во случај на оштетување на црниот дроб предизвикано од токсини и при хронични инфламаторни заболувања на црниот дроб (хепатитис). Познато е дека силимаринот има имуностимулаторни својства, а со векови наназад се користи како галактогог (средство за зголемено лачење млеко кај доилките). Резултатите од некои истражување покажаа дека силимарин може да се користи за лекување и превенција на астма. Во производството на додатоци на исхраната се користат и екстрактите од соја што се богати со лигнани. Производи со соја-лигнани се препорачуваат за намалување на симптомите од менопаузата (бранови на топлина и зголемено потење).

Изолирани чисти лигнани се користат помалку. Практична примена во медицински цели засега имаат само неколку полусинтетски деривати што се добиваат од лигнаните што се изолирани од ризомот на растението подофилум, кои се користат како цитостатски лекови.

8.4.2. Екстракција и испитување на лигнани

Класичните методи на екстракција вклучуваат мацерација, перколација, екстракција со помош на ултразвук, турбо екстракција итн. При мацерација, материјалот се натопува во растворувач, се премешува и потоа се меша континуирано со помош на магнетна мешалка. Техниката е едноставна, но бара повеќе растворувач. Методот на перколација е супериорен во однос на мацерацијата на поголем принос на биоактивни соединенија. Сокслетовата екстракција е една од наједноставните техники на екстракција, која бара помала количина на растворувачи, но биоактивните соединенија чувствителни на топлина може да се разградат во текот на екстракција. Екстракција на лигнани со висок принос на активни компоненти може да се изврши со користење на микробранова печка. Методот првично бил развиен за извлекување на лигнани од ленено семе.

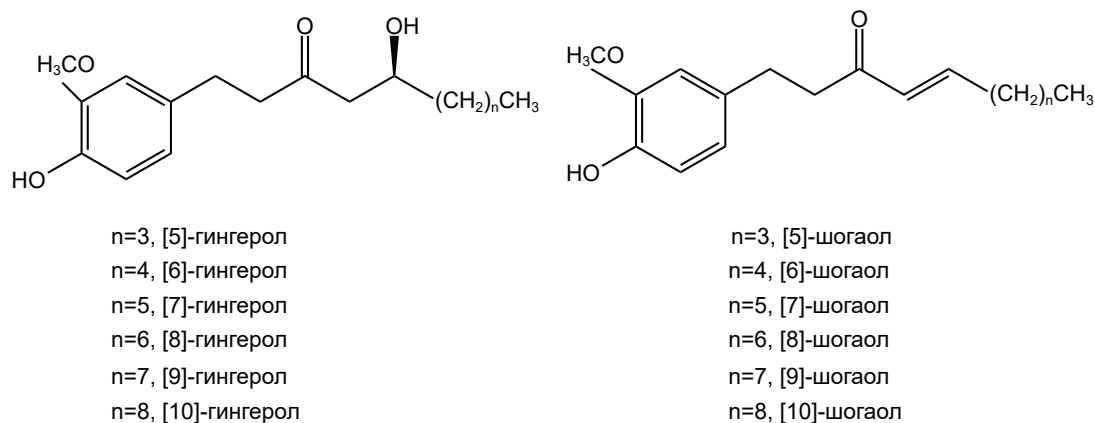
За идентификација и карактеризација на лигнаните и флавонолигнаните, во минатото се користеле различни методи како TLC, UV-спектроскопија, HPLC и CE. Во поново време е актуелно комбинирањето на HPLC со NMR или со MS, со што се добиени моќни техники за анализа на природни производи, воопшто. Освен идентификација и карактеризација на лигнаните и флавонолигнаните во растителните екстракти и во готовите производи, HPLC со масена спектрометрија се користи и за идентификација и квантификација на метаболитите на лигнаните и флавонолигнаните во плазмата, урината и изметот, со што се обезбедуваат податоци што се потребни за проучувањето на фармакокинетиката на лигнаните и флавонолигнаните. Како особено погодни за вакви потреби се покажале методите што користат електроспреј јонизација-масена спектрометрија (ESI-MS), што се дизајнирани така што овозможуваат анализа на метаболитите на лигнаните и на флавонолигнаните во органските течности.

За идентификација на лигнаните и флавонолигнаните и нивните конјугати во растителен материјал (црвената детелина) била користена UHPLC-техниката во комбинација со DAD. Едноставните лигнани и флавонолигнани успешно може да се анализираат со офлајн комбинација на имуноафинитетна хроматографија (IAC) и HPLC-ESI-MS.

8.5. ГИНГЕРОЛИ И КУРУМИНОИДИ

8.5.1. Гингероли

Гингероли се компоненти на свежиот ризом од ѓумбир. Во ѓумбирот (*Zingiber officinale* Roscoe), сите соединенија со лут вкус содржат во структурата ванилински дел (4-хидрокси-3-метоксфенил) и кетонска функционална група во странична низа. Гингероли, парадоли, зингерони и шогаоли се главните класи на лути фенолни соединенија во ризомот. Гингеролите се најзастапени и тоа во свежиот ризом. 6-Гингеролот е главното соединение на ризомот, додека другите гингероли (4-, 8-, 10- и 12-гингерол), се присутни во помали количества. Броевите од 4-12 означуваат број на C-атоми во страничната низа. Во процесот на сушењето на ризомот, гингеролите брзо преминуваат во соодветните шогаоли, кои се дехидрирани деривати на гингероли (слика 79).



Слика 79. Гингероли и шогаоли на ѓумбирот

Биосинтеза на гингероли. Одредени автори сметаат дека биосинтезата на 6-гингерол вклучува дихидроферулна и хексанска киселина. Целосната биосинтеза на гингероли е дефинирана во 1980 год. Според сознанијата, фенилаланин се претвора во дихидроферулна киселина, која потоа учествува во биолошката Клајзенова (Claisen) кондензација со малонат и хексаноат за да се формира 6-гингерол. Клајзенова кондензација е реакција во која се формира C-C врска помеѓу две естерски молекули или помеѓу естерско и друго карбонилно соединение, во присуство на силна база. Реакцијата доведува до создавање на β -кето естер или β -дикетон, во зависнот од реактантите.

Биолошка активност на гингеролите. Гингеролите се биолошко активни соединенија. Дејствуваат антиалергиски, анагетично, антипиретично, антиинфламаторно и антимикробно. 6-Гингеролот поседува антидијабетичен потенцијал и ја инхибира акумулацијата на липидите. Дејствува хепатопротективно и го намалува нивото на одредени ензими слични на аланин аминотрансфераза, аспартат аминотрансфераза, алкална фосфатаза и билирубин. Овозможува значајна кардиолошка заштита, го регулира крвниот притисок и го зајакнува срцето. Откриено е дека 6-гингерол поседува и антиканцерогено дејство преку неговиот ефект врз различни биолошки патишта

вклучени во апоптоза, регулација на клеточниот циклус, цитотоксична активност и инхибиција на ангиогенезата.

Значење и употреба на гингеролите. Ризомот од ѓумбир како најзначајна суровина што содржи гингероли, меѓу кои и 6-гингерол, се користи во производство на хербални лекови со антиеметично дејство и лекови за подобрување на функцијата на дигестивниот и на хепатобилијарниот тракт. Не е со сигурност утврдено дека 6-гингеролот е одговорен за антиеметичното дејство, иако веројатно придонесува кон истото. Екстрактите од ѓумбирот се користат за производство на додатоци на исхраната со антиеметично дејство што се препорачуваат при кинетози (болести на патување), за регулирање на функцијата на дигестивниот систем и на хепарот, како антидијабетично средство и како антиоксидант. Ѓумбирот има потенцијал за фибринолитичка активност и паралелно користење со антикоагулантни лекови треба да се одбегнува, заради зголемување на ефектите на антикоагулансите, што може да доведе до внатрешни крвавења.

Во последната деценија се зголемува интересот за употреба на медицински растенија како адитиви за добиточна храна. Ѓумбирот се користи во оваа смисла како адитив во храната за живина, при што придонесува за подобар раст, за зголемување на тежината, за зголемено производство на јајца, како антиоксидант и како средство за подобрување на биохемиските карактеристики на крвта.

8.5.2. Куркуминоиди

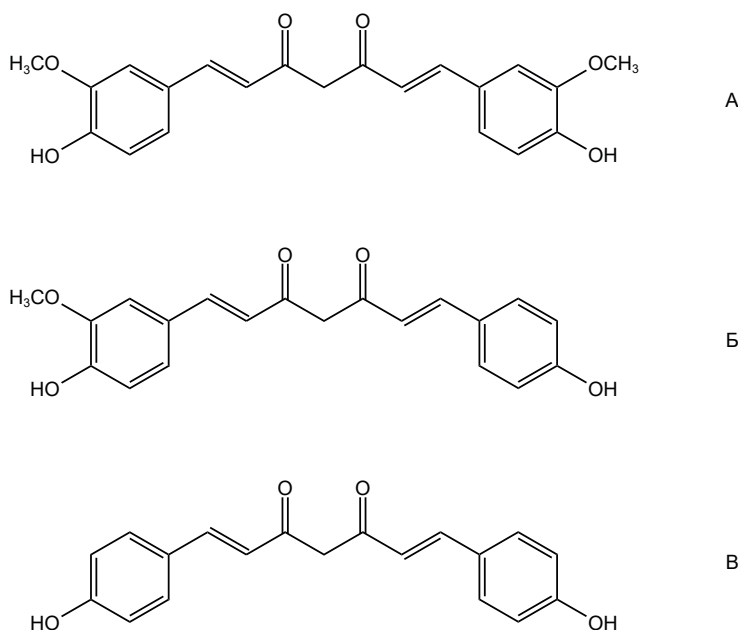
Куркуминоидите на куркума хемиски претставуваат диарилхептаноиди, имено структури во кои два арилни остатоци се поврзани со јаглеродна низа во која се присутни кетонска функција и алкохолна ОН-група. Низата вбројува 7 C-атоми, поради што куркуминоидите се означуваат како хептаноиди.

Куркумата (*Curcuma longa* L.) е растение на јужна и југоисточна, тропска Азија. Ризомот од куркума има широк спектар на употреба, но најзначајни се медицинската и кулинарската употреба. Употребата се базира на присутниот куркумин, пигмент во жолта боја, кој истовремено е и биолошки активно соединение. За прв пат е изолирано во 1842 год. но структурата е утврдена многу подоцна. Поаѓајќи од можната биосинтеза, во која, слично како и кај гингеролите, учествува дихидроферулна киселина, куркуминот денес хемиски се дефинира како диферулоилметан (слика 80). Чистиот куркумин е жолто-портокалов прашок, нерастворлив во вода и во етер, но растворлив во етанол, диметил сулфоксид и ацетон. Основниот и доминантниот куркумин се означува и како куркумин-I е природно присутен во коренот на куркума. Покрај куркумин-I, во ризомот се присутни и други куркуминоиди: деметоксикуркумин (куркумин-II), биздеметоксикуркумин (куркумин-III) и ново-откриениот циклокуркумин. Соодносот на трите куркумини е куркумин-I (77 %), куркумин-II (17 %) и куркумин III (3 %). Куркуминот има жолта боја на рН 2,5-7 и црвена на рН > 7. Во зависност од средината, куркуминот покажува разновидност на спектрални и фотохемиски својства како последица на повеќекратни патишта за демонстрација на фотодинамички ефекти.

Биолошки активности на куркуминоидите. Куркуминот има широк опсег на биолошки дејства вклучувајќи: антимикумно, антиинфламаторно, антиканцерогено, невропротективно, радиопротективно и кардиопротективно. Во *in vivo* студии на лабораториски животни (албино стаорци), куркуминот покажал антинефротоксична активност. Дополнително покажува антивирална активност кон вирусот на инфлуенца и антиоксидативната активност.

Значење и употреба на куркуминоидите. Екстракти од куркума, стандардизирани на содржина на куркумини, се користат за производство на хербални лекови за третман на болести на дигестивниот тракт и како силни антиинфламаторни агенси за намалување на воспаление и болка во

зглобовите, при остеоартритис и ревматоиден артритис. Во употреба се екстрактите што се добиваат од два вида куркума, *Curcuma aromatica* и *Curcuma longa*. Екстрактите од куркума широко се користат и за производство на додатоци на исхраната што се препорачуваат како природни антиоксиданти, средства за подобрување на физиолошките функции на дигестивниот тракт и како средства за намалување на болка при воспалителни процеси на скелетниот систем.



Слика 80. Главни куркуминоиди во ризом од куркума:
А. куркумин, Б. десметоксикуркумин и В. бисдесметоксикуркумин

Во прехранбената индустрија куркуминоидите се експлоатираат како природна боја, поради нивната карактеристична жолта боја. Дополнително стануваат сè поактуелни заради изразеното антиоксидативно дејство, антимикробната активност и потенцијалот да се користат како конзерванси при производство на храна. Во јужните и југоисточните делови од Азија куркумата се користи како конзерванс и како популарен зачин за подготовка на јадења. Куркуминоидите имаат способност да инхибираат одредени ензими (хијалуронидаза, еластаза и колагеназа) од каде произлезе сè поголемиот интерес за користење на куркумата во козметичкото производство. Производ во форма на куркумин гел нанесен на кожа го подобрува изгледот на кожата на која има фотосензибилизирачки оштетувања.

8.5.3. Екстракција и испитување на гингероли и куркуминоиди

Екстракција на гингероли. Може да се примени класична постапка на мацерација со 95 % етанол, по што следува впарување на екстрактот до добивање на смолеста маса што се суспендира во вода. Со филтрирање се раздвојуваат растворливите состојки, по што следува сушење на оваа фракција под вакуум. Неодамна, Гуо и сор. (2017) разви еколошки метод со јонски раствори за екстракција со помош на микробранови (ILMAE) базирана на течност за гингероли и шогоали. За екстракција на гингероли може да се користи екстракција во микробранова печка, мицеларна екстракција со помош на ултразвук (UAME), мицеларна екстракција со помош на микробранови

(MAME). Овие техники главно се користат за подготовка на екстракти (раствори за анализа) кои понатаму се анализираат, најчесто со UHPLC со UV-детектор.

Екстракција, прочистување и сепарирање на куркуминоиди. Екстракцијата на куркуминоидите може да се врши со конвенционални методи, по што следува прочистување и фракционирање до добивање чиста супстанција што може и да се квантифицива. Вака екстрахиран куркумин се карактеризира со многу придружни компоненти и со низок принос на чист куркумин. Може да се користи Сокслет екстракција, но и во овој случај приносот на чист куркумин е доста низок. Релативно нова техника за екстракција на куркумин е US-екстракција која вклучува индиректна сонификација на суровината во ултразвучна бања. Оваа техника дава три пати повеќе екстракт во споредба со традиционалниот метод. Сите наведени техники вклучуваат употреба на етанол како растворувач за почетен третман на растителен материјал. Екстракција со подобар принос на куркуминоиди отсекогаш била императив за истражувачите, па со цел да се подобри ефикасноста и да се минимизира времето потребно за извршување на постапката, дојдено е до техниката за SF-екстракција. Најчесто се користи течен јаглерод диоксид, добиените екстракти содржат високо количество куркуминоиди и спојување на апаратурата за екстракција со SFC дава одлични резултати во обезбедување на екстракт со висок квалитет. Друг нов пристап е екстракција со помош на микробранова печка, која вклучува внатрешно клеточно загревање на материјал, со што пука клеточниот сид во растителното ткиво, што доведува до полесно екстрахирање и до зголемување на количеството на куркуминоиди во екстрактот.

Со цел добивање на што почист куркумин, се применуваат различни постапки за прочистување на екстрактот и на изолатите. Кај куркуминоидите најдобри резултати се добиени со примена на контраструјна хроматографија, а може да се користи и HSCC која користи едноставен двофазен систем на растворувачи (хлороформ, метанол или вода). Куркуминоидите се одделуваат на филмот врз основа со различни хемиски својства. Оваа техника е краткотрајна, ефикасна, поконкретна и бара минимална потрошувачка на растворувачи. Во индустриски услови се користи метод на ладна кристализација, а добиените кристали потоа дополнително се прочистуваат. Нова техника вклучува магнетно прочистување, а се користи за прочистување на соединенија кои покажуваат склоност кон хелирање на железо. Се користат специфични наночестички (површински активни магемит наночестички = surface-active maghemite nanoparticles = SAMN) кои ги прочистуваат куркуминоидите со филтрирање и отстранување на други несакани соединенија, користејќи магнетно својство.

Сепарирање на куркуминоидите се врши со сепаративни хроматографски техники. Ако се користи TLC, куркуминоидите се раздвојуваат врз основа на молекуларната тежина на различните состојки. Куркумин, десметокси куркумин и бисдесметоксикуркумин куркумин имаат молекулски маси од 368, 338 и 308, соодветно. За раздвојување на куркуминоидите се користи метанол, а како стационарна фаза се користи силикагел. Куркуминоидите може успешно да се сепарираат со користење на СС. Друго ниво на сепарирање на куркуминоидите вклучува употребата на SFC. Оваа техника вклучува елуирање на куркуминоидите со суперкритична течност CO_2 . Дводимензионалната флеш-течна хроматографија (Two-dimensional flash liquid chromatography) овозможува ефикасно фракционирање на куркуминоидите, а во спрега со NMR овозможена е и квантитативна анализа и фракционирање на чисти соединенија.

Идентификација и квантификација на гингероли. Идентификацијата на гингеролите (главно 6-гингеролот) се изведува со различни методи како што се TLC и HPLC. Овие методи се користат и во постапките на квантификација на гингеролите. Во последно време се применува LC/ESI-MS/MS како сигурна техника за идентификација на гингероли во екстракт од свеж ризом од ѓумбир и во додатоци на исхраната на база на ѓумбир.

Идентификација и квантификација на куркуминоиди. Идентификацијата на куркуминоидите се врши со различни методи. Покрај класичната TLC може да се користи HPTLC за брза идентификација на куркуминоиди. Се користат плочи со тенок слој од силика гел како стационарна

фаза и ацетат/метанол како мобилна фаза. Со двете техники може да се врши симултана детекција/идентификација на различни куркуминоиди. HPLC-DAD се користи често за идентификација и квантификација на куркуминоидите во екстракти и во додатоци на исхраната. Може да се применува и UHPLC. Оваа техника е брза, специфична и сигурна.

Квантификација на куркуминоиди се врши со различни методи, зависно од примерокот што се анализира. Најконвенционалната техника што се користи е спектроскопската анализа, која може да се изведува во видливо (Vis), во инфрацрвено (IR) и во блиско инфрацрвено подрачје (NIR). Од хроматографски методи најчесто се користи HPLC со UV-видлива спектроскопија. Може да се користи и LC-MS. HPLC-UV-MS-метод се користи во последните неколку години за квалитативна и квантитативна анализа на куркуиноиди во растителен материјал.

8.6. ФЕНИЛПРОПАНОИДИ СО ПРОДОЛЖЕНА СТРАНИЧНА НИЗА

Фенилпропаноиди со продолжена странична низа опфаќаат неколку големи групи секундарни метаболити, меѓу кои е најголема групата на флавоноидите. Сите групи соединенија што настануваат со оваа биосинтеза всушност претставуваат секундарни метаболити со мешано биосинтетско потекло, каде фенилпропаноидниот дел од молекулата настанува по патот на шикими киселината, а со поврзувањето на C_2 -остатоци и продолжување на страничната низа на фенилпропанот, се создава поликетидниот дел од молекулата (слика 9).

Во фенилпропаноиди со продолжена странична низа спаѓаат:

- стилбеноиди,
- стирилпирони,
- ксантони и
- флавоноиди.

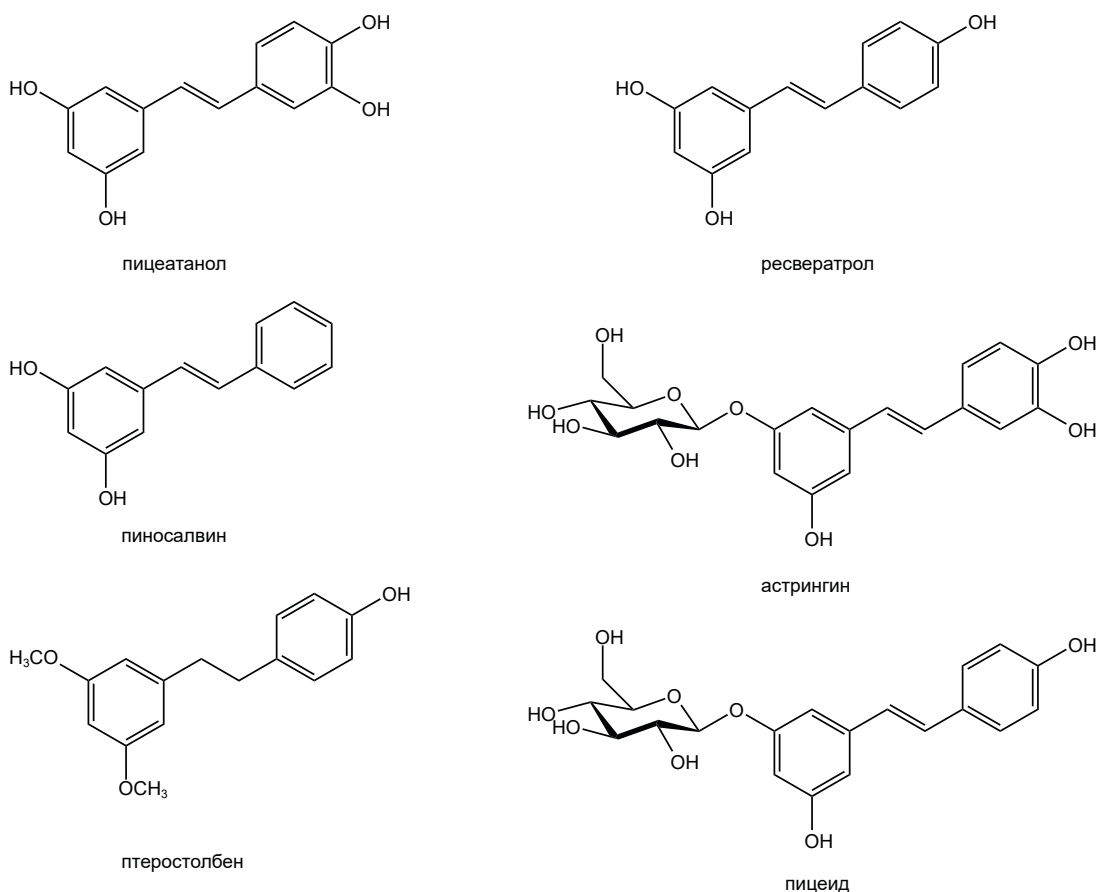
Флавоноидите, иако припаѓаат на оваа група секундарни метаболити, заради обемот и голем број различни класи флавоидни соединенија, ќе бидат обработени посебно.

8.6.1. Стилбеноиди

Стилбеноиди се полифенолни соединенија изградени од две бензолови јадра поврзани меѓусебно со етански или со етенски мост, а во зависност од врската се нарекуваат бисбензили и стилбени, соодветно. Стилбените се позначајки бидејќи имаат определена биолошка улога како фитотоксични, антимикробни и антифунгални агенси. Природните стилбени се јавуваат со околу 400 различни структури, но се лимитирано присутни во растителниот свет бидејќи за нивното создавање се неопходни специфични ензими. Хидроксиланите деривати на стилбените се нарекуваат стилбеноиди. Постојат два општи изомери на стилбените (*E* и *Z*), а хемиски тие се 1,2-дифенилетилен. Природно, стилбеноидите можат да се појават во мономерни и во олигомерни форми, но и како хетерозидни деривати. Главниот јаглероден скелет на овие соединенија е $C_6-C_2-C_6$. Групата е голема и разновидна и покрај гликозидација, можни се пренилација и формирање на фурански прстен, што ја усложнува хемиската градба и ја отежнува класификацијата на овие соединенија.

Најпознат стилбеноид е соединението ресвератрол, кој се смета за модел стилбеноид. Интензивно е проучуван и многу биолошки и хемиски информации за стилбеноидите доаѓаат од испитувањата што се направени токму на ова соединение. Ресвератролот за прв пат бил изолиран од коренот на растението *Veratrum grandiflorum* (Maxim. ex Miq.) O. Loes., во 1940 година. Тој е најпознат стилбен во храната. Претставува трихидрокси стилбен (слика 81), пронајден во грозјето, но и во уште 185 други растителни видови. Се јавува во сокови и екстракти добиени од црница, кикиритки, грозје и вино. Консумацијата на производи што содржат ресвераторол се смета дека обезбедува антиканцер заштита и заштита на кардиоваскуларниот систем.

Природните стилбеноиди имаат ограничена, но хетерогена дистрибуција во растенијата. Познати по нивната сложеност во структурата може да се карактеризираат со различен број на мономерни единици, а може да се јават и како хетерозиди. Агликоните (пицеатанол, пиносалвин, птеростилбен и ресвератрол) и гликозидите (астрингин и пицеид) се главните претставници на стилбеноидите (слика 81). Олигомерните стилбени се создаваат со спојување на хомогени или на хетерогени мономерни стилбени, што доведува до разновидни скелети, разновидна олигомеризација и зголемување на сложеноста на целокупната конфигурација. Видовите од фамилијата Vitaceae се најбогати во содржина на стилбени и нивни деривати, особено виновата лоза (*Vitis vinifera* L.), која е позната како најбогат извор на стилбеноиди. Ресвератролот може да се изолира од лушпата на грозјето, но денес главен извор за негово добивање е јапонското растение *Poligonum cuspidatum* Siebold & Zucc., кое содржи значајни количества ресвератрол. Корените на овој вид се користат стотици години наназад во традиционалната азиска хербална медицина за лекување на воспалителни процеси.



Слика 81. Позначајни стилбеноиди

Биолошки активности на стилбеноиди. Стилбените се испитувани во однос на нивниот биолошко-фармаколошки потенцијал и утврдено дека дејствуваат антибактериски, антиоксидативно и антиканцерогено. Антибактериско дејство покажале стилбените од групата тертастилбени (кобофенол А и В) што биле изолирани од видовите *Carex* (*C. kobomugi* и *C. pumila*). Во однос на антиоксидативното дејство, точниот механизам според кој стилбените ги чистат реактивните кислородни радикалите (ROS) сè уште не е доволно разјаснет. Испитувањата покажале дека стимулираат супресија на некои ензими, како што се NADPH-оксидаза и ксантин оксидаза. Во клеточни модели биле испитувани 19 чисти стилбеноиди во однос на нивната способност да влијаат на формирање на реактивните видови кислород и нивното антиоксидативно и прооксидативно дејство. Испитуваните стилбени, меѓу кои ресвератрол, пиностилбен, пицеатанол, пиностилбенозид, *cis* и *trans*-стилбен, птеростилбен и др., влијаеле врз експресијата на антиоксидативните ензими и врз активацијата на Nrf2 (транскрипционен фактор кој ја засилува експресијата на антиоксидативните ензими). Пиностилбенот покажал прооксидативно дејство и ја намалил и експресијата на каталазата во клетките, додека другите стилбеноиди, особено пицеатанолот, директно ги гаснеле слободните радикали.

Стилбеноидите (вклучувајќи птеростилбен, гнетол, пицеатанол и ресвератрол) на молекуларно ниво ги таргетираат циклооксигеназите, азотоксид синтазата, интерлеукините и другите фактори што овозможува да дејствуваат антиинфламаторно. Антиоксидантната активност и антиинфламаторното дејство имаат позитивни здравствени ефекти не само во однос на кардиоваскуларни заболувања, туку и во однос на дијабетес, невродегенеративни болести и рак. Антиоксидативното дејство директно се доведува во врска со антиканцергеното дејство. Неодамна беше утврдено дека некои стилбеноиди може да ја инхибираат топоизомеразата II, ензим кој влијае на одмотување на ДНК за време на процесот на клеточна транскрипција. Топоизомеразите играат специфична улога во намалувањето на торзиниот стрес на ДНК, поради што може да дојде до репликација на ДНК, транскрипција на ДНК во mRNA (messenger RNA) и рекомбинација на ДНК. Олигомерниот стилбен α -виниферин ја запрел прогресијата на клеточниот циклус кај клетките од рак на дебело црево за време на S-фазата (фаза од клеточниот циклус во која ДНК се реплицира), што довело до намалување на пролиферацијата на туморните клетки. Влијаел и врз транскрипциониот регулатор, нуклеарен фактор капа В (NFkB), протеински комплекс, кој е вклучен во преживување и пролиферација на клетките. Ресвератролот и неговите деривати исто така стапуваат во интеракција со NFkB и го модулираат овој моќен протеински комплекс.

Со оглед дека ресвератролот е најпроучуваниот стилбеноид во однос на биолошко-фармаколошката активност, утврдено е дека може да има значајна улога во намалувањето на развојот на невродегенеративните заболувања (Паркинсонова и Алцхајмерова болест), дека може да биде значаен во намалувањето на проблемите што се поврзани со дијабетес тип II и со миокардна исхемија, и дека, како и голем број други стилбеноиди, влијае врз процесот на стареењето. Апликацијата на овие соединенија го продолжила животниот век на младиот квасец (*Saccharomyces cerevisiae*) со механизам кој имитира калориско ограничување. Слични резултати се добиени и кај медоносната пчела, кај овошната мушичка и кај нематодите. Испитувањата на лабораториски глувци покажале дека ресвератролот има ефекти во ограничувањето на калориите, на пр., намалено воспаление, намалена албуминурија, намалено формирање на катаракта, зголемена моторна координација, стабилна минерална густина во коска и зголемена еластичност на аортата. Иако стареењето е сложен процес, ефектите на стилбеноидите против стареење предизвикуваат голем научен интерес, а добиените резултати се ветувачки со оглед на позитивното дејство на стилбеноидите врз повеќето физиолошки процеси во организмот. *Trans*-ресвератролот има релативно ниска биорасположливост и брз метаболизам што влијае негативно врз неговата активност, поради што денес се проучуваат други стилбеноиди со поголем обем на активност.

Значење и употреба на стилбеноидите. Стилбеноидите наоѓаат примена за третман на рани, изгореници и други дерматолошки проблеми. Имаат потенцијал за превенција и третман на различни заболувања, вклучително и рак, поради антиоксидативно и антиинфламаторно дејство.

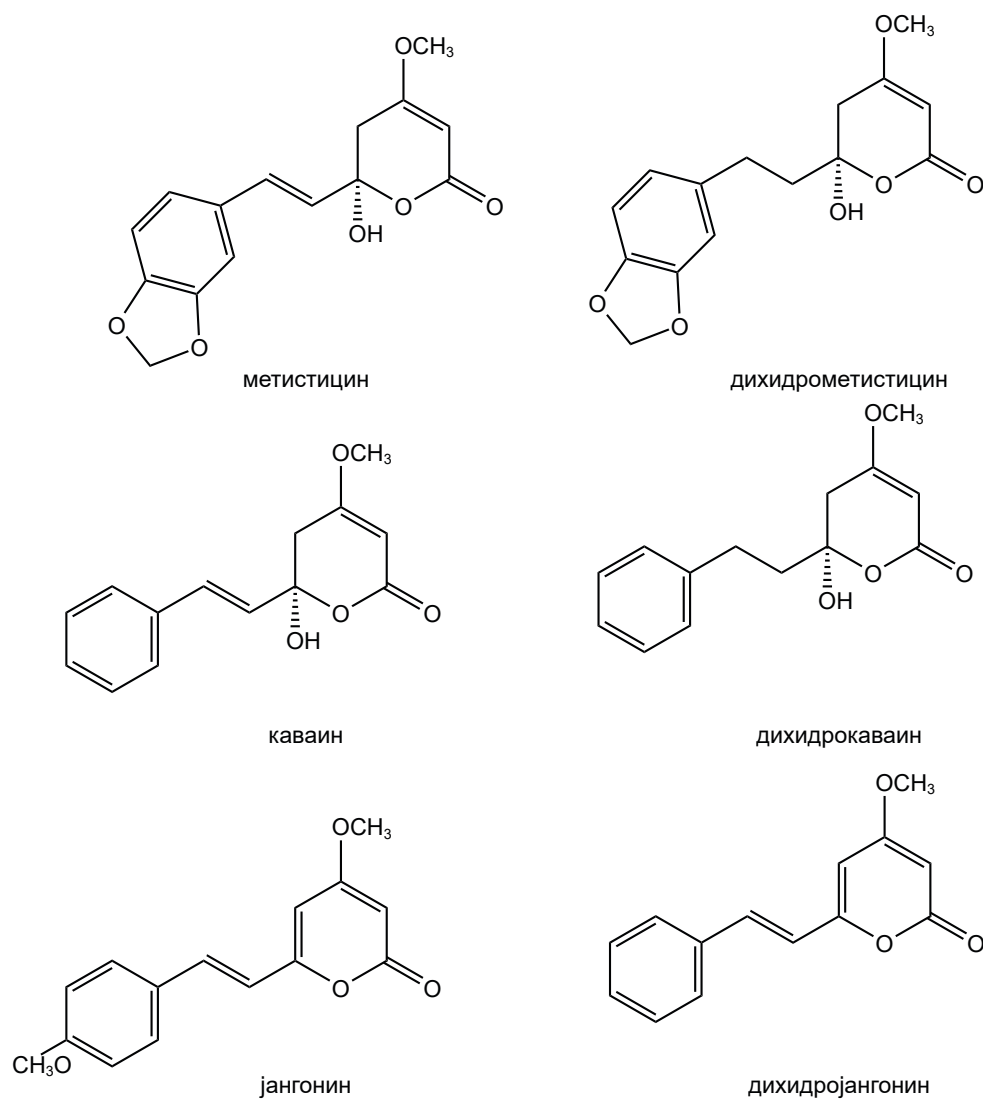
Природните стилбеноиди комерцијално се продаваат како нутрацевтски производи, а најголема примена има ресвертролот. Во прехранбената индустрија, стилбеноидите се поврзуваат со феноменот наречен „француски парадокс“, бидејќи внес на овие соединенија со комсумирање на вино може да го спречи развојот на кардиоваскуларни болести. Заштитната улога на *trans*-ресвератролот и неговите различни деривати е разјаснета со различни студии во светот. Стилбеноидите од други извори како кикиритки, ф'стаџи, путер од кикиритки и чоколади исто така се сметаат значајни и се препорачува нивна консумација, во оптимална количина. Со оглед на потенцијалот и влијанието на стилбеноидите на физиологијата на растенијата, земјоделскиот сектор е многу зафатен во однос на нивната примена. На пример, антигабичните ефекти на ресвератрол се од голема важност за заштита на растенијата. Стилбеноидите имаат фитоалексинско дејство и ги зголемуваат одбранбените механизми на растенијата, преку заштита од стрес, повреда или напад од патогени бактерии, габи или тревопасни животни.

8.6.2. Стирилпирони

Стирилпирони се незаситени α -пирони со врзани стирил или фенил групи, што дополнително може да имаат метокси или метилендиокси групи. Во природата главно се присутни во различни видови габи (*Basidiomycetes*), а особено во некои медицински габи кои традиционално се користат во лекување на ракот, на дијабетесот, на бактериски и на вирусни инфекции и на улцерации. Поновите испитувања укажуваат на фактот дека повеќето полифенолни соединенија од класата на стирилпирони поседуваат антиоксидативно, антиинфламаторно, цитотоксично, антитромбоцитно, антидијабетично, антидеменциско и антивирусно дејство. Денес е познато дека и растенијата создаваат стирилпирони и утврдено е нивното присуство во повеќе растителни видови. Најзначајни стирилпирони се кава-пироните (или кава-лактоните) што се јавуваат ексклузивно во растението кава – *Piper methysticum* G. Forst. Најзначајно соединение е кавоин, покрај низа други кава-лактони. За овие структури е утврдено дека поседуваат седативно дејство. Традиционално екстрактите од ризомот од кава се користат за третман на различни заболувања и се дел од традиционалната медицина на Пацифичките Острови. Растението денес е популарно во западноевропските земји, во Америка и во другите делови во светот. Се преферира користење на стандардизирани екстракти што порано се вршело преку кавоин, но денес се бара определување на 6 доминантно присутни кава-лактони (метистин, дихидрометистин, кавоин, дихидрокавоин, десметоксијангонин и јангонин) (слика 82). Вака стандардизирани екстракти се користат за производство на хербални лекови што се користат во третманот на несоница и анксиозност и на додатоци на исхраната кои се наменети за промоција на спиењето и седација на централниот нервен систем при анксиозност и нервоза. Важно е да се напомене дека растението кава, покрај кава-лактони, во ризомот содржи неколку други соединенија од групата на флавокаваини (слика 83) кои се биолошки активни компоненти. Во хемиски поглед флавокаваините се халкони. На квалитетот на растителната сировина и екстрактите од кава влијаат различни фактори како што се: сортата на култивираното растение, производството на растителната сировина, подготовката на екстрактите, селекцијата на растворувачи за екстракција и др.

Биолошки активните соединенија, кава-лактоните и флавокаваините, се карактеризираат со разлики во физичко-хемиските својства, но во однос на биолошката активност постои определено преклопување. Поголемиот број испитувања на биолошката активност на кава биле фокусирани врз горенаведените шест кава-лактони, од каде произлегла потребата екстрактите од кава и производите што ги содржат овие екстракти да се вреднуваат преку содржината на тие кава-лактони. Флавокаваини (А, В и С) се создаваат по слични биосинтетски патишта како кава-лактоните, присутни се во помали количества, но се биолошки активни како хепатопротективни и антиканцерогени компоненти. Со оглед на сè поголемиот интерес за оваа група состојки, можно е во иднина

определувањето на содржината на флавокаваините да биде вклучено во постапките за контрола на квалитетот на производите на база на кава.



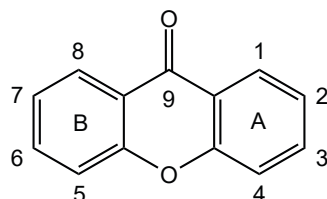
Слика 82. Најзначајните стирилпирон (кава-лактони) преку кои се врши стандардизацијата на екстрактот од кава



Слика 83. Најзначајни флавокаваини во кава

8.6.3. Ксантони

Ксантоните се една од најголемите класи на соединенија во хемијата на природните производи. Вообичаено се јавуваат во виши растенија, во габи и во лишаи, но во ограничен број видови. Имаат слична структура со флавоноидите (слика 84) од каде веројатно потекнуваат и сличностите во биолошко-фармаколошките дејства. Денес се познати нешто повеќе од 500 вакви структури.



Слика 84. Основна структура на ксантон

Класификација на ксантоните. Ксантоните што се изолирани од природни извори се делат во 6 главни групи: едноставни ксантони, ксантонски гликозиди, прениловани ксантони, ксанто-лигноиди, бисксантони и останати (мешани) ксантони.

Едноставните ксантони се оксигенирани (содржат кислород) и се делат според степенот на оксигенација на не-, моно-, ди-, три-, тетра-, пента- и хексаоксигенирани соединенија. Во овие ксантони супституентите се едноставни хидрокси, метокси или метил групи. Познати се околу 150 едноставни ксантони. Ксантонските гликозиди се во најголем дел C- поретко O-гликозиди. Главно се јавуваат во претставниците од само две фамилии: Gentianaceae и Polygalaceae. Денес се познати 61 структура на C-гликозиди и само 20 структури од O-гликозиди. Од првата група се проучувани различни магниферини, а од втората ксантонски гликозиди што се јавуваат во линцура. Во групата на прениловани ксантони познати се 285 соединенија што главно се јавуваат во претставници од фамилијата Clusiaceae. Ксантолигноиди се сложени структури што се ретко застапени. Денес се познати само 5 вакви соединенија кои се изолирани од определени видови кантарион. Бисксантоните се исто така мала група соединенија од кои 5 се изолирани од виши растенија, а 6 од габи. Во последната група спаѓаат неколку соединенија кои по својата градба не се вклопуваат во ниедна од горенаведените групи.

Биолошка активност на ксантоните. Некои ксантони дејствуваат стимулативно врз CNS, а механизмот на дејството е веројатно преку инхибицијата на моноаминоксидазата (MAO-инхибитори). За некои ксантони е утврдена антифунгална и антибактериска активност, а за некои антиинфламаторна. Се смета дека придонесуваат во дејството на голем број медицински растенија (линцура, црвен кантарион и др.). Некои ксантони овозможуваат хепатопротективно, антималярично, имуномодулаторно, антибактериско, антифунгално, кардиопротективно, антидијабетично и други фармаколошки дејства. Утврдено е дека голем број растителни суровини што редовно се користат во традиционалната медицина, содржат ксантони како активни конституенти. Екстрактите од плодот на растението *Garcinia mangostana* L., содржат ксантони со изразена антиоксидантна активност што е потврдена со голем број тестови. Екстрактот од плодот што содржи високо количество ксантони (ксантонскиот комплекс) се нарекува мангостин, а поединечните ксантони се означени како магостини α , β , γ , итн. (слика 85). Мангостин денес е предмет на многу различни испитувања меѓу кои спаѓаат и испитувањата на биолошко-фармаколошката активност.

Досегашните резултати укажуваат на потенцијалот мангостин да се користи за третман на Алцхајмеровата болест и дека дополнително дејствува антиинфламаторно, антибактериски, антималарично, антифунгално, антивирусно, анти-ХИВ, антиалергиски и антитуморно.



Слика 85. Структура на ксанон од комплексот на мангостин од *Garcinia mangostana*

Ксантоните покажуваат значителна стимулација на ЦНС и дејствуваат како антидепресивни агенси, додека ксантонските гликозиди може да дејствуваат обратно, како депресори на ЦНС. Понатаму, некои од ксантоните покажуваат активност против туберкулозата, дејствуваат холеретично, диуретично и кардиотонично. Антифунгалната активност е документирана за ксантони што се јавуваат во некои габи. Од особено значење е антивирусната активност, особено анти-ХИВ-1, на ксантоните од некои африкански растенија. Некои ксантони се покажаа како моќни антиканцер агенси како што е случајот со гамбогиска киелина (слика 86), ксантоид којшто е изолиран од смолата на еден вид *Garcinia* (*G. hanburyi* Hook.f.) којшто расте во Камбоџа, јужен Виетнам и Тајланд.



Слика 86. Ксантонско соединение со антиканцер активност

Некои ксантони ја инхибираат α-глюкозидазата и може да имаат примена во лекувањето на дијабетес тип 2, додека инхибицијата на ксантин оксидазата може да биде значајна за обезбедување здравје на кардиоваскуларниот систем.

8.6.4. Екстракција и испитување на стилбени, стирилпирони и ксантони

Екстракција и прочистување на стилбеноиди. Конвенционалниот пристап за екстракција на стилбеноидите е загревање со растворувач (најчесто етанол), по што следува филтрација, впарување и постапки на прочистување на добиениот екстракт. Оваа екстракција бара многу големо количество растворувач и трае многу долго, дополнително се смета и за скапа, што во денешни услови ја прави помалку прифатлива. Од други традиционални методи може да се користи мацерација на собна температура, екстракција на покачена температура, екстракција со Сокслет, екстракција со помош на микробранова печка и забрзана екстракција со растворувач. Друга стратегија подразбира SF-екстракција, користејќи течен јаглерод диоксид како растворувач. Иако оваа постапка се покажа многу ефикасна кај други природни производи, испитувањата покажаа дека во случај на ресвератрол, ефикасноста на овој метод е помала во споредба со Сокслет екстракцијата. Со цел да се зголеми ефикасноста на екстракција на ресвератролот, предложени се определени процедури на биотрансформација, како што е ензимска хидролиза. Сите предложени постапки за екстракција на стилбеноиди имаат определени негативности, но и покрај тоа се применуваат во практиката, во отсуство на други подобри постапки.

Во постапките за прочистување, кога се во прашање стилбените, течната хроматографија под висок притисок се смета за стандардна метода. Сепак, прочистувањето на овој начин е многу скапо, бара многу време и претрпелман со традиционални колони со силикагел. Како подобра алтернатива се предлага HSCCC, која е континуирана и ефикасна за сепарација, базирана е на течна хроматографија, не зависи од матрицот и ја намалува загубата на примерокот. Течна хроматографија со среден притисок (Medium-pressure liquid chromatography = MPLC) била користена за фракционирање на екстрактите во комбинација со полупрепаративна HPLC, со која биле прочистени стилбените изолирани од никулци на кикиритки.

Екстракција на стирилпирони (кава-лактони). Во литературата постапките за екстракција и прочистување на стирилпирони главно се однесуваат на кава-лактоните. За нивна екстракција може да се користат класичните методи на екстракција со користење на вода/ацетон и вода/метанол, при што треба да се има предвид дека растворувачите главно не се селективни и дека истовремено се екстрахираат и кава-лактони и флавокаваини. Традиционалната медицина користи исклучиво водени екстракти од кава. Со цел зголемување на екстракцијата на кава-лактоните започнато е со користење на други растворувачи, што резултираше со повисока содржина на кава-лактони, но и присуство на други, придружни компоненти кои може да бидат потенцијално опасни. Од досегашните сознанија се покажа дека сепак ацетонот е најдобар растворувач за екстракција на кава-лактони, потоа етанол и на крај вода. Денес за екстракција на кава-лактони се препорачува UAE и SFE.

Екстракција на ксантони. Постапките за екстракција влијаат значајно на својствата и на стабилноста на ксантонските соединенија. Во практиката се користат два типа на традиционални процедури: течно-течна и цврсто-течна екстракција. Цврсто-течна екстракција се користи почесто, а фактори што влијаат на ефикасноста на процесот се карактеристиките на растворувачот и особините на цврстата фаза, како што се големината, површината, инкапсулацијата (клеточниот сид), времето и температурата на екстракција. Зголемувањето на температурата може да ја зголеми растворливоста и дифузијата на компонентите од интерес, но може да предизвика и зголемено екстрахирање на нежелни состојки или оштетување на активните компоненти. Цврсто-течната екстракција се користи за екстрахирање на ксантоните од комплексот мангостин, од плодот на *Garcinia mangostana*. Перикарпот од плодот се меле во фин прашок, а за екстракцијата на ксантоните од прашокот може да се користат 7 различни растворувачи: етанол, ацетон, етил ацетат, метанол, хексан, оцетна киселина и вода. Испитувањата покажуваат дека секој од наведените раст-

ворувачи обезбедува различен принос на ксантони во екстрактот, а најдобри резултати биле постигнати со користење на етанол. Времето на екстракцијата влијае на обемот на истата, па така 48-часовна екстракција со ацетон обезбедува исто количество мангостин како 24 часовната екстракција со етанол. Од традиционалните цврсто-течни постапки се користат: мацерација, перколација, Сокслет екстракција со 50 % етанол, екстракција со помош на магнетна мешалка и екстракција со инфузија со ладна и со жешка вода.

Современите постапки за екстракција на ксантони обезбедуваат поголеми приноси, го скратуваат потребното време и користат помало количество растворувачи. Тие вклучуваат:

- Екстракција со помош на микробранови односно електромагнетни бранови (MAE), денес се применува за индустриска екстракција на мангостин. Принципот лежи во претворањето на електромагнетниот бран во топлина што влијае на растителните клетки и резултира со екстракција на активни супстанции. Факторите кои влијаат на MAE се: растворувач и односот растворувач-прашок, моќноста на микробрановата печка, температурата на екстракција, времето и циклусот на екстракција, карактеристиките на матриксот на растителниот материјал и ефектот на мешање.
- Екстракција со помош на ултразвук (UAE). Енергијата што се добива од изворот на ултразвучни бранови во текот на екстракцијата има хемиски, биолошки и физички ефекти преку феноменот познат како кавитација. Овој феномен се јавува кога постојат многу мали меурчиња во течноста, на површината на цврстото тело или на површината на контејнер кој ја содржи течност каде што доаѓа до компресија и засилување поради притисокот на ултразвучните бранови. Ова предизвикува меурчињата да растат и да се собираат бидејќи гасот во течноста најчесто дифузира во и надвор од меурчињата, предизвикувајќи силен ефект на мешање. На овој начин значајно се зголемува ефикасноста на цврсто-течната екстракција.
- Екстракција со течност под притисок (PLE) е техника која вклучува екстракција со помош на течни растворувачи при покачена температура и притисок, што ги подобрува перформансите на екстракција во споредба со техниките што се изведуваат на собна температура и атмосферски притисок. Оваа техника е позната и како забрзана екстракција со растворувач, течна екстракција под притисок и подобрена екстракција со растворувач. Во случај кога водата се користи како растворувач, техниката се нарекува екстракција со топла вода под притисок, супкритична водена екстракција и екстракција со прегреана вода.
- Суперкритична екстракција со течен CO₂ или со друг суперкритичен флуид (SFE). Оваа екстракција побудува сè поголем интерес во прехранбената и во фармацевтската индустрија, бидејќи претставува еколошки прифатлива и многу ефикасна техника на екстракција. Во литература се објавени податоци за примена на оваа техника во екстракција на мангостини.

За изолирање на чисти ксантони најчесто се користи хроматографија на колона од силика гел, со растворувачи со зголемен поларитет. Во случај на ксантонски гликозиди подобри резултати се постигнуваат со колона од полиамид, а прочистување на ксантоните се изведува на колона Sephadex LH20. Ако се користи TLC, стационарни фази може да бидат: силикагел, полиамид и целулоза, а мобилните фази се состојат од мешавина етил ацетат-метанол-вода во случај на силикагел, метанол-вода и метанол-вода-ацетон ако се користи полиамид и оцетна киселина во случај на целулоза.

Идентификација и квантификација на стилбеноиди. Бидејќи содржината на стилбеноидите и другите сродни соединенија во растенијата е релативно ниска, потребни се современи и чувствителни техники за определување и квантификација на овие соединенија. Притоа, подготовката на примероците за анализа бара посебен третман кој се врши со екстракција во цврста фаза (SPE)

со употреба на C-18 патрони. За мономери како ресвератрол, главно се користи полнењето со полимерен полистирен-дивинилбензен. За квантификација на ресвератрол во различни растителни екстракти се предлага течна хроматографија со ултравиолетова детекција, а за определување на *trans*-ресвератрол во црвено вино детекција со хемилуминисценција. Како метода од избор за определување на стилбеноидите се предлага RP-HPLC, особено за определување на ресвератрол во бобинки од грозје (*Vitis vinifera*), со користење на PDA-детектор или комбинација со MS. Може да се користи и RP-HPLC со UV и со DAD-детекција. Висока селективност и чувствителност при определување на стилбеноидите се постигнува со користење на LC-MS-техника. Подобро хроматографско раздвојување на стилбеноидите се постигнува со користење на UHPLC, а комбинацијата со масена спектрометрија (UHPLC-MS) се покажа како супериорна метода за идентификација и квантификација на стилбеноиди во црвеното вино. За определување на ресвератрол во грозјето била користена и течна хроматографија со микровисоки перформанси (micro-high performance liquid chromatography = MHPLC).

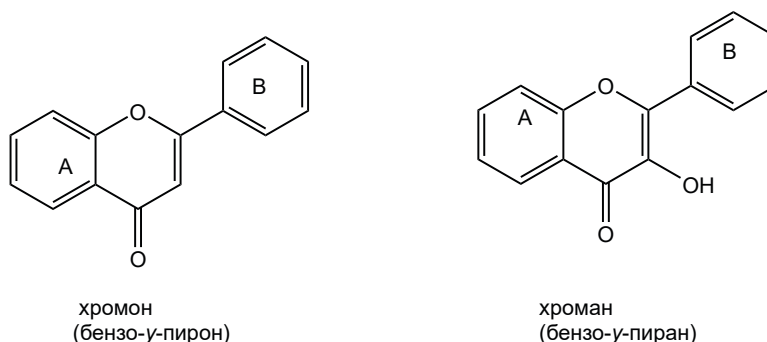
Идентификација и квантификација на стирилпирони (кава-лактони). За сепарирање и идентификација на кава-лактоните може да се користи GC, без претходна дериватизација на кава-лактоните и HPLC. Притоа, со GC двете доминантно присутни компоненти во комплексот на кава-лактоните, метистин и јангонин, не се раздвојуваат, додека при користење на HPLC, квантификацијата треба да се изведува во услови без светлина за да не дојде до *cis/trans* изомеризација на јангонин. Во практиката се користи и UHPLC за раздвојување на сите шест кава-лактони (метистин, дихидрометистин, кавалин, дихидро-кавалин, десметоксијангонин и јангонин). Притоа, за да се спречи изомеризацијата на јангонинот, примероците за анализа треба да се подготват со безалкохолни растворувачи или растворувачи без вода. За квантитативно определување на кава-лактони може да се користи SFC.

Идентификација и квантификација на ксантони. Најчесто користена техника за сепарација, идентификација и квантификација на ксантоните е HPLC со UV-детекција. Доколку е потребно раздвојување на поларни ксантони и ксантонски гликозиди се препорачува користење на реверзно-фазна HPLC. За сепарирање и изолирање на ксантони од групата мангиферини била користена HSCCC, а за сепарација на α -мангостин и γ -мангостин центрифугална партициона хроматографија со високи перформанси (High performance centrifugal partition chromatography - HPCPC). Симултана анализа на 6 природни ксантони од *G. mangostana* била извршена со HPLC со PDA-детектор и со LC-ESI-MS. Ксантоните биле идентификувани преку време на задржување и преку ултравиолетови (UV) спектри, а квантификација била направена на 320 nm. Идентификацијата на сите сепарирани компоненти била потврдена со LC-ESI-MS. Времето на анализата било 67 минути. Неодамна индиските автори објавија нов валидиран UHPLC-PDA-метод за анализа на α -, β -, и γ -мангостини во производи на база на екстракти од плодот на *G. mangostana*, со детекција на 254 nm, во траење од само 9 минути.

Во рутинските анализи на α -мангостин и γ -мангостин може да се користи TLC-дензитометрија. За определување на содржината на вкупни мангостини во производи што содржат екстракт од плодот успешно може да се користи UV-Vis-спектрофотометрија.

8.7. Флавоноиди

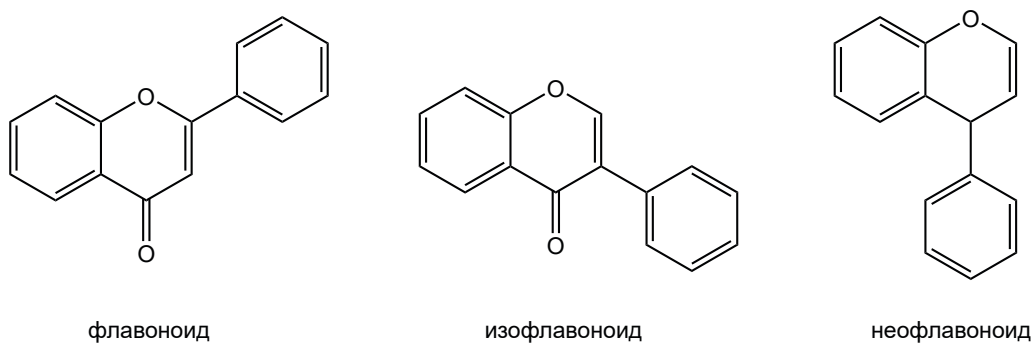
Флавоноидите се најголемата и најшироко распространета група растителни фенолни соединенија. Општа карактеристика за сите флавоноиди е јаглеродниот скелет $C_6-C_3-C_6$. Молекулата на флавоноидите е изградена од две ароматични јадра (фенилни радикали А и В) што се поврзани со тријаглероден (пропански) алифатичен низ што формира хетероцикличен прстен. Најчесто тоа е хетероцикличен γ -пиронски прстен, што кондензира со прстенот А во формација: бензо- γ -пирон (хромон) или бензо- γ -пиран (хроман) (слика 87).



Слика 87. Основни структури на флавоноиди

Флавоноидите може да се разгледуваат и како производи на хромон или хроман со арил-радикали на позициите 2, 3 или 4. Во зависност од положбата на фенилниот радикал (прстенот В) флавоноидите се делат на (слика 88):

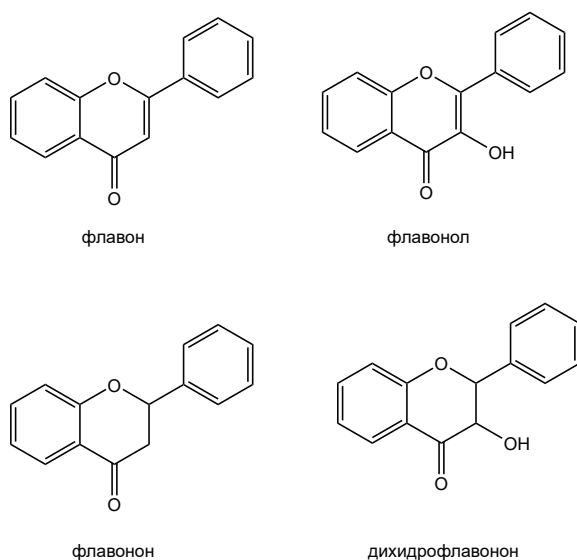
1. флавоноиди - со фенил радикал на C_2 (2-фенил хромон)
2. изофлавоноиди - со фенил радикал на C_3 (3-фенил хромон)
3. неофлавоноиди - со фенил радикал на C_4 (4-фенил хроман)



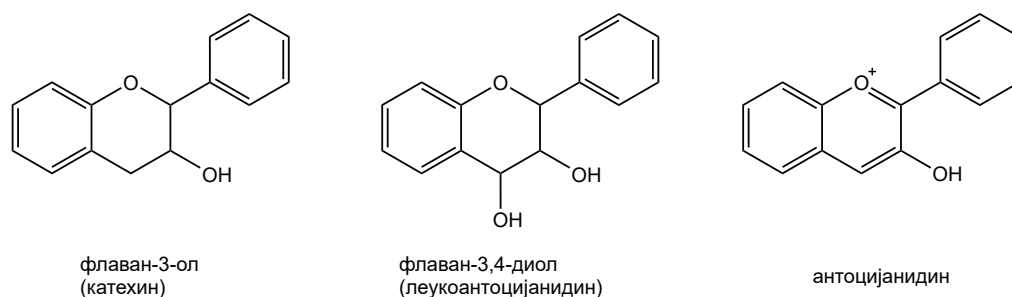
Слика 88. Основни структури на бензо- γ -пирони

Во зависност од степенот на киселоста на пропанскиот фрагмент (C_3) и од типот на хетероцикличниот прстен, флавоноидите се делат на:

- вистински (правилни) флавоноиди, производи на хромон (бензо- γ -пирон) каде што спаѓаат: флавони, флавоноли, флаванони и дихидрофлавоноли (слика 89),
- производи на хроман (бензо- γ -пирон) во кои спаѓаат: флаван-3-оли, флаван-3,4-диоли, антоцијанидини и дезоксиантоцијанидини, градбени единици на танини (слика 90),
- флавоноиди со отворен пропански низ или со фурански прстен, каде што спаѓаат: халкони, дихидрохалкони и аурони (слика 91).



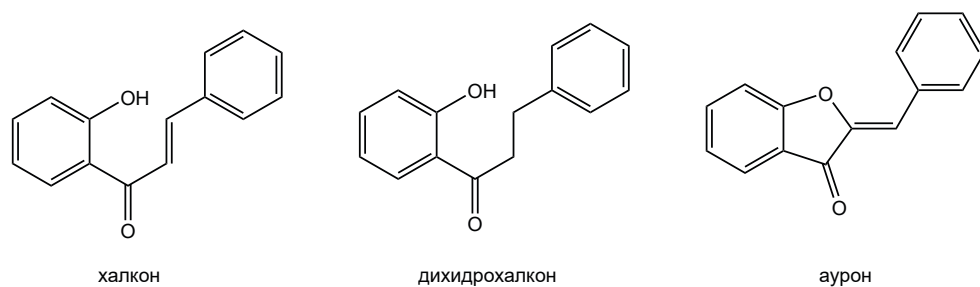
Слика 89. Основни структури на правилни (вистински) флавоноиди



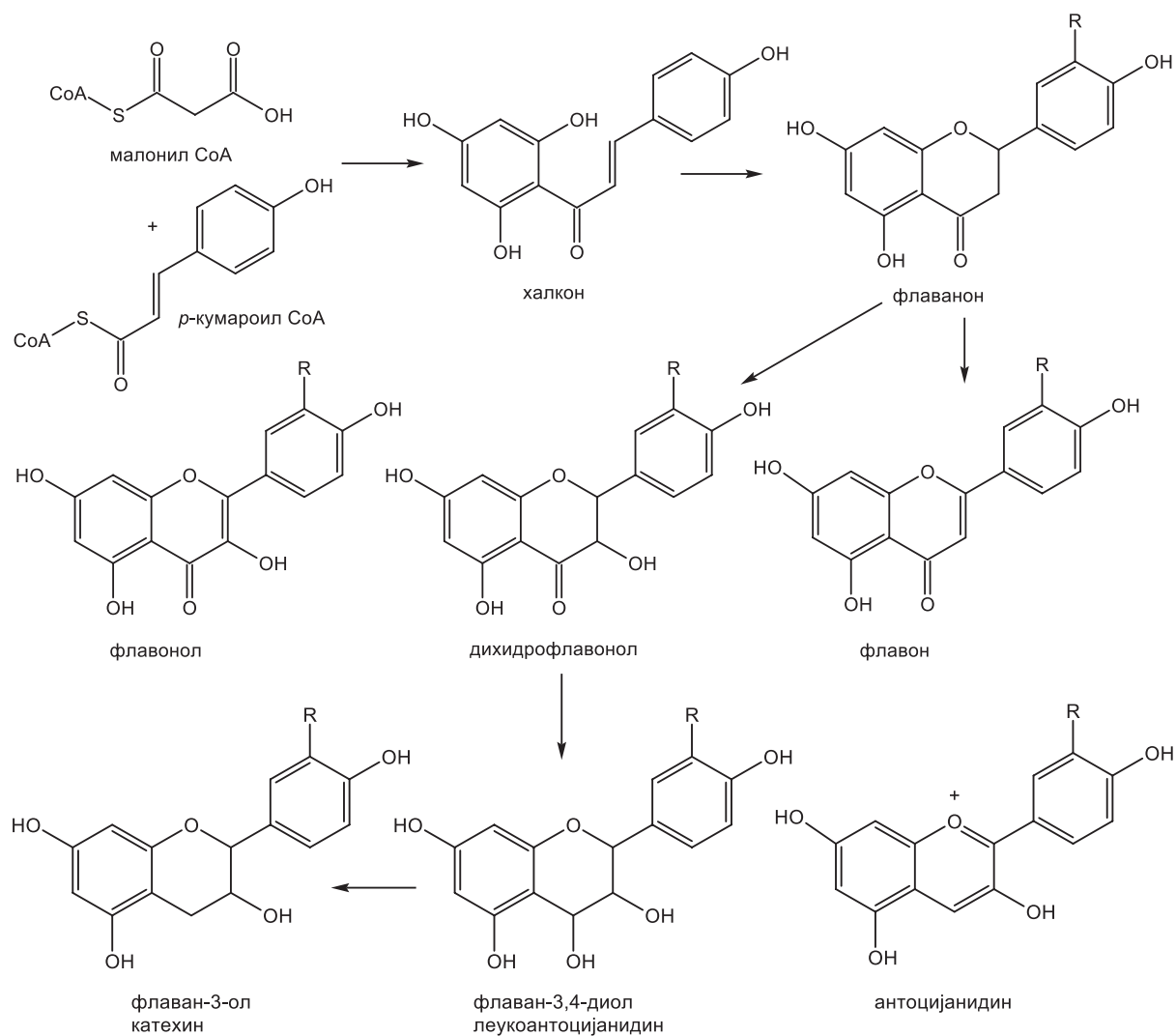
Слика 90. Флавоноиди, производи на хроман

Биосинтеза на флавоноидите. Образувањето на основниот ланец $C_6-C_3-C_6$ е врзано со формирање на прстенот А што се создава од активирани молекули на ацетат преку поликетидниот биосинтетски пат, и формирање на прстенот В заедно со пропанскиот ланец, што се создава преку биосинтетскиот пат на шикими киселината. Познато е дека шикими киселината се создава при гликолитично распаѓање на шеќерите. Со учество на АТР таа се фосфорилира во 5-фосфошикими киселина, која понатаму се поврзува со фосфофенолпируват (C_3 -фрагмент) и дава хоризмова киселина, од која со внатрешно прегрупирање се создава клучниот интермедиер, префенска ки-

селина. Како што е веќе спомнато (слика 7), од префенска киселина најпрвин се создаваат ароматичните аминокиселини, фенилаланин и тирозин.



Слика 91. Флавоноиди со отворена пропанска низа или со фурански прстен



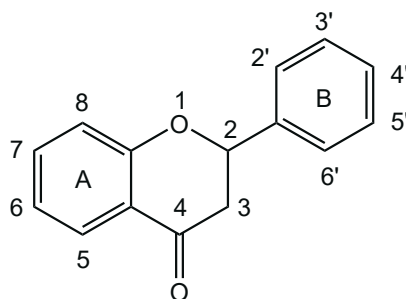
Слика 92. Биосинтеза на различни класи флавоноиди

Во биосинтезата на флавоноидите фундаментално значење има реакцијата во која фенилаланинот се деаминира и образува *trans*-циметна киселина, а тирозинот *p*-кумарна киселина. Во биосинтезата на флавоноидите се вклучува активирана *p*-кумарна киселина односно 4-кумароли-СоА. Формирање на прстенот А започнува со кондензацијата на ацетил-СоА и малонил-СоА што се формира ацетоацетил-СоА. Понатаму ланецот се продолжува со приклучување на нови C_2 фрагменти од малонил-СоА (слика 8). Во биосинтезата на флавоноидите поврзувањето на поликетидот со активирана кумарна киселина настанува пред да се изврши циклизацијата на поликетидот. Со затворање на прстенот најпрвин се формира халкон, којшто е прекурсор во биосинтезата на другите класи флавоноиди. Со оксидација на халконите се формираат флаволи, флавоноли и други бензо- γ -пирони, а со редуцирање се создаваат антоцијанидини, леукоантоцијанидини, катехини и други бензо- γ -пирани (слика 92).

Во дадената класификација се наведени 11 класи флавоноидни соединенија, од кои најредуцирани форми се катехините или флаван-3-оли, а најоксидирани се флавонолите.

8.7.1. Вистински (правилни) флавоноиди (2-фенил-бензо- γ -пирони)

Вистинските (правилните) флавоноиди се деривати на бензо- γ -пирон, со прстен В врзан на позиција 2 на пиронскиот прстен. Кај овие флавоноиди (слика 93) можни се супституции на различни позиции, при што ОН-групите може да бидат слободни, метилирани или гликозидно врзани. Најголемиот број флавоноиди имаат ОН-групи на положбите C_7 и C_5 . Се среќаваат и флавоноиди што имаат ОН-групи на C_6 и C_8 . Хидроксилни групи во прстенот В најчесто се наоѓаат на положбата $C-4'$ или на $C-3'$ и $C-4'$, а поретко се истовремено присутни три ОН-групи на положбите $C-3'$, $C-4'$ и $C-5'$.



Слика 93. Основна структура на флавоноид со нумерација на позициите

Вистинските флавоноиди се јавуваат почесто во форма на хетерозиди, а помалку како слободни агликони. Шеќерот се врзува најчесто на $C-3$, на $C-7$ и на $C-4'$. Шеќерниот дел е најчесто составен од D-гликоза, L-рамноза, D-галактоза, потоа L-арабиноза, D-ксилоза, а од дисахаридите рутиноза, софороза и др. Шеќерите се главно β -конфигурирани и во пиранозен облик. Покрај *O*-хетерозидите, за овие соединенија се карактеристични *C*-хетерозиди, кај кои шеќерот директно се врзува за C -атом од флавоноидното јадро, со стабилна ковалентна врска. *C*-хетерозидите се многу постабилни во однос на *O*-хетерозидите, отпорни дури и при подолго загревање со концентрирани киселини. Во растенијата се среќаваат и ацилирани гликозиди, а ацилните остатоци се врзуваат за агликонскиот дел или за шеќерот. Ацилирањето вообичаено настанува со оцетна, со бен-

зоева или со производи на бензоева киселина, а често и со хидроксициметни киселини (кафена, кумарна, ферула киселина и др.).

Распространување и локализација на флавоноидите. Флавоноидните соединенија се синтезираат и се натрупуваат во сите растителни ткива и органи, главно, во форма на гликозиди. Во таква форма се растворливи во клеточниот сок. Во растенијата се многу чести и речиси нема видови што не создаваат флавоноиди, но нивното количество варира во многу широки граници (од траги до над 20 %). Карактеристични се особено за скриеносемените растенија каде што имаат функција на растителни пигменти што се одговорни за бојата на цветовите, на листовите и на плодовите.

Биолошка функција на флавоноидите во растенијата. Флавоноидните соединенија името го добиле од придавката *flavus* што значи жолт, бидејќи поголем дел од нив се жолто обоени. Тие се растителни пигменти, значајни за бојата на листовите, цветовите и плодовите. Некои автори сметаат дека флавоноидите се битни за „дишењето“ на растителните ткива и дека учествуваат во фотосинтетското фосфорилирање. Докажано е дека флавоноидите влијаат врз растот и развитокот на растенијата и играат битна улога во оксидо-редуктивните процеси во растенијата, заедно со другите феноли ја зголемуваат отпорноста на растенијата кон болести и инфекции и сл. Интересен е податокот дека флавоноидите се идентификувани во хлоропластите на сите растителни видови што досега биле испитувани. Досега сè уште не е утврдено каква функција имаат во овие органели. Флавоноидните агликони како липосолубилни компоненти често се излучуваат како ексудат на површината на листовите и на цветовите, во форма на брашнеста покривка или се изменети со кутикула. Се смета дека површински локализираните флавоноиди имаат заштитна улога во спречувањето на штетното дејство на УВ-зраците. Хетерозидните форми често се локализираните во епидермалните клетки каде што веројатно ја имаат истата заштитна функција.

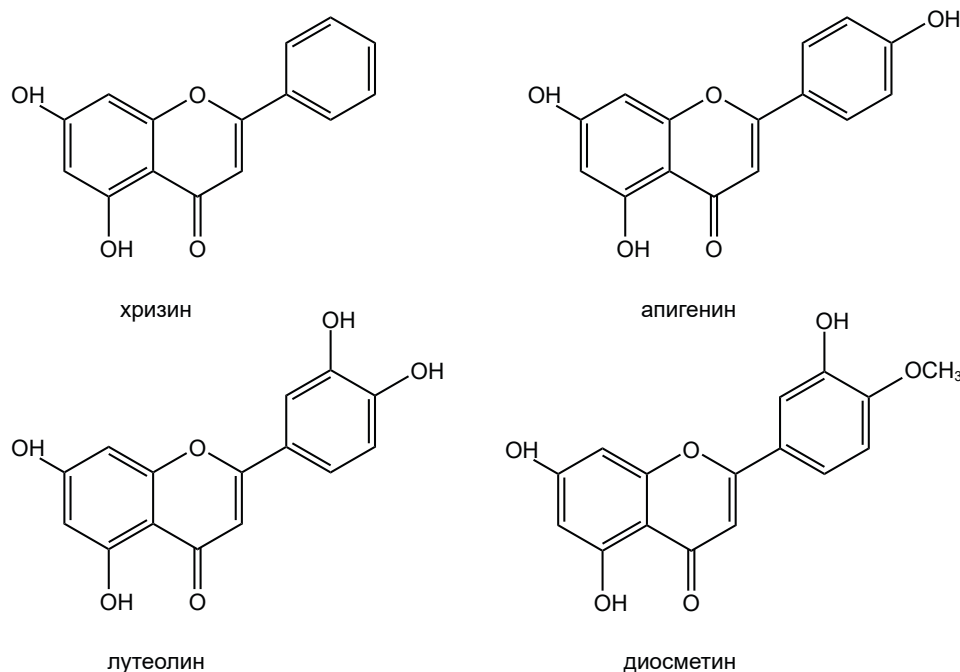
8.7.1.1. Флавони и флавоноли

Најраспространетата група флавоноиди во растителниот свет се флавони и флавоноли. Најчесто се среќаваат во форма на хетерозиди. Се наоѓаат во сите органи во вишите растенија. Во групата на флавоноидите се познати околу 150 агликони и околу 270 *O*-гликозидни деривати. Познати се и голем број *C*-гликозиди, што се главно производи на лутеолин и апигенин. Флавоноидските агликони се најчесто три-, тетра- и пента-хидрокси-производи и нивни метил-етри. Најшироко распространети флавоноиди (слика 94) и нивни хетерозиди се:

- Хризин (5,7-дихидрокси флавоноид) – изолиран од пупките на тополите. Го има во прополисот.
- Апигенин (5,7,4'-трихидрокси флавоноид) - еден од најраспространетите флавоноидски агликони, присутен во голем број лековити растенија. Од *O*-хетерозидите на апигенинот најчесто се среќава апигенин-7-*O*-гликозид, изолиран од листовите и од цветовите од камилица, ајдука трева и од други претставници од фамилијата главоцветни растенија (*Asteraceae*). Од *C*-гликозидите според значењето се издвојуваат два деривата: витексин (апигенин-8-*C*-гликозид) и витексин-2''-рамнозид. Апигенинот се среќава и во форма на димерни производи, бифлавоноиди (аментофлавоноид, гинкгетин, билобетин, изолирани од листови од растението гинко (*Ginkgo biloba*). Во поголемо количество е застапен во магнолоидот, а како *C*-гликозид во црниот и зелениот чај, во зеленчук, овошје, житарици, мед, маслини.
- Лутеолин (5,7,3',4'-тетрахидрокси флавоноид) е широко распространет флавоноид што многу често се среќава во хетерозидна форма, како лутеолин-7-*O*-гликозид и како 5-*O*-гликозид.
- Диосметин (5,7,3'-трихидрокси-4'-метокси флавоноид) се среќава во претставниците од усноцветни и штиццветни растенија (*Lamiaceae* и *Apiaceae*). Значаен е гликозидот диосмин (диосметин-7-*O*-рутинозид) кој наоѓа практична примена во третманот на флебит, проширени

вени, дијабетес и др. Во поголемо количество е застапен во бергамотот, мандарината, портокалот и грејпфрутот, во сокот од плодот.

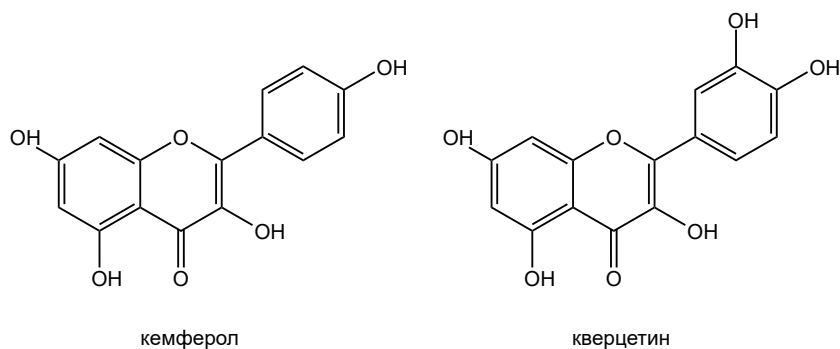
Флавонолите се карактеризираат со ОН-група на С-3. Други ОН-групи може да имаат на положбите 7, 5, 4' и 3'. Помал е бројот на флавонолите што имаат ОН-групи на С-6 и С-8. Се среќаваат и флавоноли со метилирани ОН-групи, од коишто е карактеристичен високометилиран дериват артемтин (5-хидрокси-3,6,7,3',4'-пентаметокси флавон) изолиран од растението пелин. Во листови и цветови флавонолите се најчесто гликозидно врзани за ОН-групите на С-3 и С-7, со монози, биози и поретко триози. Ацилирани флавонолни хетерозиди настануваат со поврзување со *p*-кумарна киселина, ферула киселина, кафена киселина, оцетна киселина и др. (на пр. тилирозид е флавонолски гликозид изолиран од цветот на липа, кој претставува кемпферол-3-*p*-кумароил гликозид).



Слика 94. Структури на најзначајни флаволи (агликони)

Од хидроксидни производи на флавоноли најзначајни се (слика 95):

- Кемферол - (3,5,7,4'-тетрахидрокси флавон), се наоѓа во голем број лековити растенија, главно во форма на хетерозиди. Познати се повеќе од 100 кемферол хетерозидни деривати. Распространет е во зеленчук и овошје, особено во морковот.
- Кверцетин - (3,5,7,3',4'-пентахидрокси флавон) е застапен најчесто во форма на хетерозидот рутин (кверцетин-3-О-рутиноза), каде рутинозата е дисахарид составен од рамноза и гликоза. Во цветови од јапонски багрем (*Sophora japonica*) е присутен во количини од над 20 % и од нив се изолира во чиста состојба. Повисока содржина на рутин се наоѓа во цвет од бозел. Присутен е и во овошјето и во зеленчукот (репа, боровинка, вишна, цитрус овошје, брокула), а најголем извор на кверцетин во исхраната е кромидот.



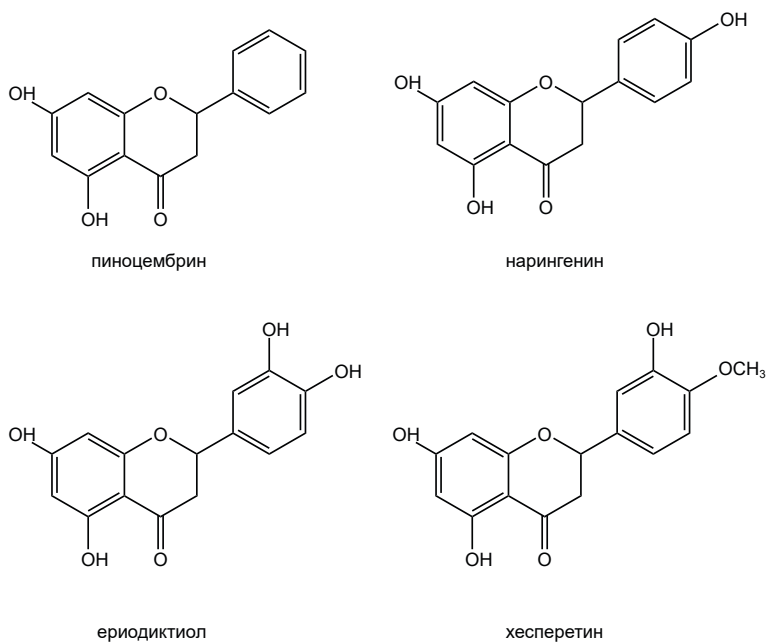
Слика 95. Најзначајни агликони на флавоноли

8.7.1.2. Флаванони и дихидрофлавоноли

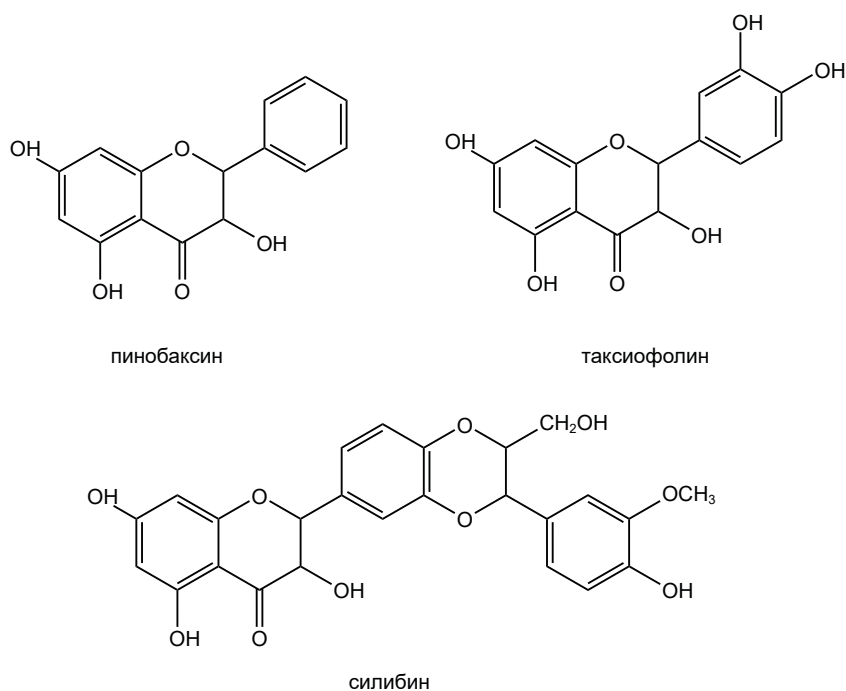
Флавоноидите од оваа група се тесно биогенетски поврзани. При биосинтезата флаваноните се образуваат од халконите. Доколку средината е базна хетероцикличниот прстен на флаваноните лесно се отвора и тие се изомеризираат во халкони. Во кисела средина халконите циклизираат во флаванони.

Најзначајни флаванони се (слика 96):

- Пиноцембрин, флаванон со две ОН-групи во прстенот А, присутен во некои видови цитруси, тополи, бор и др. растенија. Претставува еден од најзначајните флаванони во прополис.
- Нарингенин, се среќава во претставници од голем број фамилии. Најчесто е застапен во форма на хетерозид салипурпозид (нарингенин-5-О-гликозид) и нарингин (нарингенин-7-О-неохеспериозид).
- Ериодиктиол, изолиран е од видовите на родот *Prunus* (слива, цреша, вишна и др.). Најзначајни хетерозиди на ериодиктиол се ериодиктин (ериодиктиол-7-О-рамнозид) и ериоцитрин (ериодиктиол-7-О-рутинозид) изолирани од цитрус плодови.
- Хесперетин, најчесто се среќава во форма на хетерозидот хесперидин (хесперетин-7-О-рутинозид), во цитрус овошје.



Слика 96. Структури на најзначајните флавонони (агликони)



Слика 97. Структури на најзначајните дихидрофлавоноли

Дихидрофлавонолите се соединенија што може да се разгледуваат како 3-ОН производи на флаваноните или како дихидрофлаванолите, соединенија со заситена двојна врска помеѓу C-2 и C-3. Карактеристични се за голосемени растенија. Позначајни дихидрофлавоноли се (слика 97):

- Пинобаксин, се јавува во иглички и кора одбор. Го има во прополисот.
- Таксифолин, дихидродериват на кверцетин. Изолиран е од иглички на ела, ариш и тиса (иглолистни растенија).

Со блиска структура до дихидрофлавонолите се флаванолигнаните, изолирани од плодот на млечен трн (*Sylibum marianum*), означени со заедничко име силимарин. Силимаринот претставува комплекс, составен од три флаванолигнански компоненти: силибин, силикристиин и силидианин, кои се создаваат со различни поврзувања на таксифолин со фенилпропаноидното соединение кониферил алкохол. Силибинот и неговите деривати имаат изразено хепато-протективно дејство.

Биолошко-фармаколошки дејства на вистинските флавоноиди. Флавоноидните состојки внесени во животинскиот и во човечкиот организам, заедно со аскорбинската киселина (витамин С) влегуваат во низа оксидо-редукциски процеси. Изразената биолошка активност на флавоноидите е условена од распоредот на хидроксилните и на фенолните групи и на карбонилната група. Генерално гледано, а во зависност од структурата, флавоноидите се одликуваат со спазмолитично, хипотензивно и бактерицидно дејство, изофлавоноидите дејствуваат како естрогени, леукоантоцијанините пројавуваат антиканцерогено дејство, флаванолигнаните се хепатопротектори, а флавоноидите се антиоксиданти, диуретици, хипоазотемици и кардиотоници. Од наведените дејства следните заслужуваат посебно внимание:

1. *Дејство врз сидот на капиларниот крвен садов (капиларопротективно дејство).* Дејството врз пермеабилноста и крвотока на капиларните крвни садови е едно од најмногу испитуваните дејства на флавоноидите. Уште 1936 год. е утврдено дека скорбутот (дефицит на витамин С) многу поуспешно се лекува со употреба на лимони и портокали отколку со чист витамин С. Овој податок навел на размислување дека лимоните и портокалите освен витамин С содржат и некоја друга активна компонента која влијае на нормалната пропустливост на капиларите. Бидејќи состојката тогаш не била позната наречена е витамин Р (подоцна Р-фактор). Денес е познато дека активноста се должи на „цитринот“, смеса од повеќе флавоноиди, пред сè од флаванонски хетерозиди хесперидин и ериодиктин. Подоцна е утврдено дека освен флавоноидите од лимонот, и други флавоноиди во други растенија покажуваат капиларопротективно дејство, ги зацврстуваат капиларите, ја зголемуваат нивната еластичност и го намалуваат оштетувањето и пропустливоста. Експериментално е утврден механизмот на дејството. Според едниот пристап дејството се должи на инхибицијата на редукцијата на дехидроаскорбинската киселина, а според друга концепција флавоноидите ја потиснуваат активноста на ензимите хијалуронидаза, еластаза и катехол-О-метилтрансфераза, коишто се одговорни за разложување на еластинот од сидот на капиларите и зголемувањето на пропустливоста, а со тоа и за појавата на поткожните крвавења. Со изразено капиларопротективно дејство се карактеризираат кверцетинот и рутинонот. Ова дејство го поседуваат и други флавоноиди, процијанидини, антоцијанидини и други компоненти, коишто заради оваа нивна активност се означени како биофлавоноиди.
2. *Дејство врз кардиоваскуларниот систем.* Флавоноидите ја стимулираат срцевата функција. За некои флавоноиди (кверцетин, рутин, кверцитрин), катехини и антоцијани е утврдено дека го зголемуваат минутниот обем на срцето, дека го нормализираат нарушениот ритам и др. Докажано е дека некои С-гликозиди (витексин) и флавоноиди (хиперозид) покажуваат вазодилаторно и коронародилаторно дејство со што се овозможува подобро хранење на миокардот. Некои автори сметаат дека флавоноидите имаат и непосредно дејство врз миокардот и врз мускулатурата на крвните садови, а со тоа и хипотензивно дејство.
3. *Дејство врз дигестивниот тракт и црниот дроб.* Флавоноидните соединенија имаат разновидно дејство врз слузестата обвивка на хранопроводот, на неговата моторика и на секреторната функција. Катехинските состојки дејствуваат атстрингентно на слузниците, слично

на дејството на танинските материи, со што ја намалуваат надразнетоста и ги лекуваат површинските ерозии. Флавоноидите дејствуваат антиинфламаторно, што е битно за заздравувањето на ерозиите и поголемите оштетувања. Дејството на флавоноидите врз мазната мускулатура на дигестивниот тракт, на желудникот и на цревата, може да биде карактеризирано како спазмолитично. Ова дејство го покажуваат флавоноли (кверцетин, рутин), халкони, флаванони (ликвирицин и ликвирицигенин) и други флавоноиди. Утврдено е дека спазмолитичниот ефект има миотропен ефект, слично на дејството на папаверинот и дека дејството на агликоните е посилено изразено отколку на соодветните гликозиди. Ефектот се зголемува со зголемувањето на бројот на хидроксилните групи. Флавоноидите не покажуваат ефекти врз секреторната и детоксикационата функција на црниот дроб, но стимулираат секреција од жолчка. Оваа, холеретична функција ја покажуваат флавоноли, флаванони, флавоноли и нивните деривати. Флаванолангенините дејствуваат хепатопротективно.

4. *Дејство врз функцијата на бубрежите и врз диурезата.* Голем број флавоноли, флаванони и нивни гликозиди поседуваат диуретично дејство. Експериментално е утврдено дека флавоноидите можат да ја зголемат диурезата од 60 до 100 %. Лутеолинот предизвикува пролонгирано зголемување на диурезата додека катехинот ја намалува.
5. *Антиинфламаторно и антиоксидативно дејство.* Флавоноидите инхибираат некои фази од инфламаторните процеси, веројатно заради силниот антагонизам кој постои помеѓу некои флавоноиди и медијаторите на инфламаторните процеси (на пр. брадикинин). Флавоноидите покажуваат антиоксидативно дејство што се должи на нивната способност да ги „фаќаат“ (врзуваат) слободните радикали и да ги прекинуваат верижните реакции на создавањето на слободните радикали, кои од своја страна се промотори на липидната пероксидација. Слободните кислородни радикали настануваат најчесто при редукција на молекуларниот кислород, а се создават во организмот при аноксија, при која заради блокада на ензимот цитохром оксидаза и неможност за транспорт на кислород се создава реактивниот супероксид анјон ($O_2^{\bullet-}$). Флавоноидите се донори на водородни атоми па како такви реагираат со $O_2^{\bullet-}$ и вршат негова дизмутација во O_2 или во H_2O_2 . При инфламаторните процеси се создава поголемо количество $O_2^{\bullet-}$, а во присуство на Fe^{2+} јони тие преминуваат во многу пореактивни хидроксил радикали ($OH^{\bullet}$). Овие радикали и на нив слични, можат да предизвикаат сериозни биохемиски оштетувања. Липидната автооксидација во ткивата генерално се иницира со $OH^{\bullet}$ -радикалите, што отстрануваат H-атом од терминалниот C-атом во ланецот на масната киселина и формираат $R^{\bullet}$ -радикал. Реагирајќи со молекуларен O_2 овој радикал формира циклични пероксиди и хидроксипероксид радикали ($ROO^{\bullet}$), што понатаму пропагираат верижна реакција на липидна пероксидација. Слободните радикали се токсични за организмот, одговорни се за алтернација и мутација на нуклеинските киселини, за иницијација и пропација на канцерогенезата, клеточните оштетувања, стареењето, болестите, што се резултат од разградувањето на фосфолипидите од клеточните мембрани. Се смета дека слободните радикали имаат влијание и во создавањето на атероматозните лезии, невролошката дегенерација и други процеси. Во човечкиот организам прекини во верижните реакции на создавањето на слободните радикали се изведуваат со ензимски системи од нормалната ендогена антиоксидативна заштита, митохондријални или цитоплазматски ензими: супероксид дизмутаза (SOD) која врши дизмутација на $O_2^{\bullet-}$ во O_2 или во H_2O_2 , каталаза и глутатион пероксидаза што го редуцираат H_2O_2 во H_2O и др.

Антагонистичкиот ефект на флавоноидите како природни антиоксиданти спрема слободните радикали може експериментално да се определува. Ефектот зависи од афинитетот на флавоноидите спрема слободните радикали, односно од хемиската градба на флавоноидот. *In vitro* најголема антиоксидативна активност покажуваат флаваните и флавонолите, послаба флавононите, а најслаба флаваноните.

6. *Антиинфуморно (антиканцерогено) дејство.* Антиканцерогена активност покажуваат главно леукоантоцијанидините, но и други флавоноиди (некои флавоноли и флавоноли). Активноста се должи на инхибиторното дејство во однос на некои тумор промотори или на директната цитотоксичност, која во повеќето случаи експериментално е докажана *in vitro* во изолирани клеточни линии (на пр. HeLa клетки). Се смета дека за дејството се одговорни двојната врска помеѓу C₂-C₃, кето група на C₄, присуство на слободни фенолни групи во прстенот В и ОН-група на позиција C₃. Некои флавоноиди покажуваат и антимулагена активност.

Значење и употреба на вистинските флавоноиди. Растителните сировини што содржат флавоноиди се користат традиционално како хербални лекови за третман на различни заболувања, најчесто во форма на чаеви. Некои сировини се користат за индустриска екстракција на флавоноиди (цитрус флавоноиди, диосмин, хесперидин, рутин), коишто се користат за третман на заболувања настанати поради капиларна или венска инсуфициенција, во форма на венски тоници или разни комбинирани препарати за надворешна употреба што дејствуваат протективно врз крвните садови. Голем дел од медицинските растенија што содржат флавоноиди се користат за производство на екстракти што се вметнуваат во производи од категоријата додатоци на исхраната, а кои се наменети за одржување на здравјето и за потпомагање на физиолошките функции во организмот.

8.7.1.3. Екстракција и испитување на вистински флавоноиди

Екстракција и изолација. Големото разнообразје во градбата на флавоноидите, степенот на заситеноста како и бројот и распоредот на радикалите битно влијае на физичко-хемиските својства на соединијата, особено во однос на поларноста и растворливоста на различните класи флавоноиди. Поради тоа, за екстракција и изолација на флавоноиди се користат повеќе различни техники. Не постои универзален метод на екстракција на сите класи флавоноиди и секоја оптимизирана постапка е индивидуална за соодветни растенија и за определена група флавоноиди. За да се постигне задоволителна селективност, екстракцијата мора да комбинира оптимален растворувач или мешавина од растворувачи и соодветна техника. Притоа, оптимизацијата на екстрактивниот процес може да биде многу важна за различни апликации. Дополнително, доколку избраниот метод треба да се стандардизира, тој мора да обезбеди прифатлив степен на повторливост и репродуктивност.

Изборот на постапката за екстракција на флавоноиди од растителен материјал зависи од поставената цел (за каква намена е потребен екстрактот?), од поларноста на компонентите, од нивната термичка стабилност и од достапноста на опремата за екстракција. Екстракцијата на флавоноиди се базира на слични принципи каква што е екстракцијата на полифеноли. Процесот обично се изведува со метанол, етанол, ацетонитрил, ацетон или нивни мешавини со вода. Потребниот поларитет на растворувачот зависи од типот на флавоноидот. За помалку поларни флавоноидни структури како што се изофлавоноли, флавоноли и флавоноли, вистинскиот избор може да биде ацетон, хлороформ, метилен хлорид и диетил етер, а за повеќе поларни фракции на флавоноиди, растворувачот е обично алкохол или мешавина алкохол-вода. Во случај целните соединенија на екстракција да се неконјугирани флавоноиди (агликони), може да се користи свеж растителен материјал, кој директно се меле и се суспендира во избраниот растворувач или во мешавина на растворувачи. Флавоноидите на пр., се екстрахираат без сушење и мелење на растителниот материјал, од кората на различните цитрус плодови (портокал, лимон, грејпфрут, мандарина и сл.) или од растенија, чија подготовка пред екстракција вклучува ензимски третман. Присуството на липофилни супстанции може да влијае на профилот на составот на флавоноидите и нивните деривати во добиените екстракти, а во многу случаи е потребна дополнителна процедура за чистење (на пример, екстракција во цврста фаза). Многу истражувачи денес за отстранување на липофилни соедине-

нија од растителниот материјал користат *n*-хексан или петролетер. Можно е неполарните флавоноиди да се преведат во ваков неполарен растворувач. За мобилизација и екстракција на поларните флавоноиди следува екстракција со поларен, алкохолен растворувач.

Техниките на екстракција се поделени во две групи: конвенционални техники (мацерација, рефлукс и Сокслет екстракција) и модерни техники (UAE, MAE, PLE, SFE, EAE, дисперзија на матрикс во цврста фаза итн.).

1. Конвенционални техники на екстракција

Конвенционалните методи се лесни за изведување, не бараат посебна опрема, се применуваат за екстракција на голем број примероци и доведуваат до висок принос на добиениот екстракт. Сепак, тие не се селективни. Може да се постигне одредена селективност со вистинскиот растворувач, според поларитетот на целната флавоноидна фракција.

A. Мацерација

Мацерацијата се врши со натопување на сомелениот растителен материјал во затворен сад со соодветен растворувач. Примерокот се остава да отстои најмалку 3 дена на собна температура и често се протресува. За време на процесот, растворувачот го омекнува и го крши клеточниот сид на клетките во ткивата на растението со што се ослободуваат растворливите фитохемиски компоненти. Потоа следува филтрирање на мешавината. Изборот на растворувачи зависи од типот на целните соединенија и од брзината на екстракција. Некои автори го посочуваат ацетонот како најселективен растворувач за екстракција на флавоноиди. Честопати мешавините алкохол-вода се применуваат за екстракција на флавоноиди и нивни конјугати од растителен материјал. Метанол (70 %) е исто така ефикасен растворувач за екстракција на флавоноиди со мацерација. Екстрактите добиени со мацерација се сложени мешавини и неопходно е да се изврши понатамошно прочистување со повторна екстракција, со колонска хроматографија или со комбинација од двата метода. Главните недостатоци на овој метод се големиот волумен на растворувачи, долгото време на обработка и потребата за идно прочистување. Во случаи кога чистотата на екстрактот е проблематична, се препорачува користење на некоја напредна технологија на екстракција.

Б. Рефлукс и Сокслет екстракција.

Рефлукс и Сокслет екстракција се процедури за континуирана екстракција на висока температура. За изведување на Сокслет екстракцијата потребен е апаратот по Сокслет, во кој мелениот примерок се става во порозна „чаура“ односно капсула, која се наоѓа во комора. Растворувачите за екстракција се загреваат во долната колба, испаруваат преку чаурата, се кондензираат во кондензаторот и се враќаат назад во капки што паѓаат преку чаурата. Кога комората со чаурата ќе се наполни до определено ниво, преку странична цевка растворувачот се враќа во колбата и процесот се повторува. Во споредба со мацерацијата, оваа метода бара помал волумен на растворувач и пократко време на обработка. Општи недостатоци на Сокслет екстракцијата се: термостабилноста на флавоноидите што се екстрахираат, потреба од сушење на растителниот материјал пред да се стави во чаурата и користење на токсични и запаливи течни органски растворувачи, што е потенцијален фактор на ризик. Успешноста на оваа екстракција зависи од температурата, од односот растворувач - примерок и од брзината на мешање. Екстрактите добиени со Сокслет екстракција имаат комплексен состав и фракцијата на флавоноидите мора повторно да се екстрахира (LLE) со цел прочистување. Прочистувањето може да се врши и со LC.

2. Техники на „зелена“ екстракција (*Green Extraction Techniques*)

Главните недостатоци на конвенционалните техники на екстракција се долгото време на екстракција, потребата од скапи растворувачи, испарувањето на огромна количина на растворувач, слабата селективност на екстракција и тешкотиите во евентуалното автоматизирање на процесите. Денес се развиваат нови техники за да се пробијат ограничувањата на класичните методи на екстракција. Тие се означуваат како неконвенционални, т.е. „зелени“ техники на екстракција. Имаат многу предности: намалување на потрошувачката на органски растворувачи и деградација на примерокот, спречување на загадувањето, елиминација на дополнителни чекори за чистење и концентрација на примерокот, подобрување на ефикасноста и селективноста на екстракција и способност за автоматизација. Некои од најперспективните техники се екстракција со помош на ултразвук (UAE), екстракција со помош на ензими (EAE), екстракција со помош на микробранови (MAE), екстракција со течност под притисок (PLE), екстракција со суперкритична течност (SFE) и матрикс цврсто фазна дисперзија (MSPD).

А. Екстракција со помош на ултразвук (UAE)

Ултразвукот произведува кавитација, што го забрзува растворањето и дифузијата на клеточните состојки: ултразвучниот бран се шири во молекулите на медиумот и кавитационите меури се формираат со доволно висока моќност. Распаѓањето на овие меури генерира енергија, а млазовите на растворувач кон честичките од растителниот материјал поефикасно ги извлекуваат целните соединенија од нив. Покрај тоа, преносот на топлина ја подобрува ефикасноста на екстракцијата. Другите предности на UAE вклучуваат ниска потрошувачка на растворувач и енергија и намалување на температурата и времето на екстракција, што ги прави UAE едноставна и релативно евтина технологија. Најшироко користен апарат за UAE-екстракција е ултразвучната бања. Поради пократкото време на обработка, оваа техника е релевантна за екстракција на термички нестабилни соединенија. Сите параметри на UAE мора внимателно да се оптимизираат за да се избегне термичка деградација на фенолните соединенија (флавоноидите). Параметрите на техниката се: температура, време на екстракција, поларитет и количина на растворувач, количина и тип на примерок, фреквенција и интензитет на ултразвук и број на импулси. Во споредба со мацерацијата и Сокслет екстракцијата, UAE-екстракцијата има значајни предности како што се заштеда на време и растворувачи, пониски температурни нивоа и поголеми приноси на екстракт. Сепак, селективноста на UAE-техника е споредлива со онаа на конвенционалните методи на екстракција. Добиениот екстракт содржи мешавина од фенолни соединенија и мора да се прочисти пред понатамошната употреба.

Б. Екстракција со помош на микробранови (MAE)

MAE е техника на екстракција која користи микробранови за да промовира излегување на компонентите од интерес од матриксот на растителниот материјал и нивен премин во растворувач. Микробрановата радијација дејствува на диполите на поларните и поларизираните материјали и предизвикува загревање во близина на површината на материјалите што ја зголемува ефикасноста на процесот. MAE може да се смета како селективен метод во случај на поларни молекули и растворувачи со висока диелектрична константа. Во споредба со конвенционалните методи на екстракција, MAE нуди повеќе предности: можност да се користат помалку токсични растворувачи, намалено време на екстракција, количина на растворувач, енергија и трошоци за обработка. Сепак, оваа техника е ограничена на мали молекули коишто се стабилни под услови на загревање во микробранова печка. Некои автори направија споредба на ефикасноста на MAE и UAE со кон-

венционалните методи на екстракција. Добиените резултати покажаа дека методот на екстракција со микробранова печка е подобра опција за екстракција на вкупните флавоноиди.

В. Екстракција со течност под притисок (PLE)

PLE е забрзана екстракција која применува висок притисок, при што растворувачите остануваат течни над нивната точка на вриење. Добиените ефекти се висока растворливост и висока стапка на дифузија на хидрофобните соединенија во растворувачот и висока пенетрација на растворувачот во матриксот. Во споредба со другите методи опишани погоре, PLE бара помалку време на екстракција и помала потрошувачка на растворувач и има подобра повторливост. Покрај тоа, оваа техника може да се автоматизира што овозможува екстракција за пократко време со минимална количина на растворувач.

Екстракција со топла вода под притисок (Pressurized hot water extraction - PHWE) е варијација на PLE. Оваа техника е позната и како екстракција со вода под притисок со низок поларитет и екстракција со суперкритична вода: работните карактеристики на користената вода под притисок се температурен опсег над точката на вриење и под критичната точка на водата (273 K на 0,1 MPa и 647 K на 22,1 MPa, соодветно). Во супкритични услови, меѓумолекуларните водородни врски на водата се раскинуваат, а нејзината диелектрична константа се намалува. На ниво на температура од 250 °C, оваа константа се намалува на 27, што е блиску на диелектричната константа на етанолот ($\epsilon = 24$) и метанолот ($\epsilon = 33$). Замената на етанол или метанол со вода значително ги намалува трошоците и ја прави оваа техника поеколошка. Селективноста на овој метод се потпира на растворливоста на флавоноидите што зависи од температурните услови. Растворливоста во вода на различни хидрофобни соединенија се зголемува на температури над 373,15 K и водата останува некомп्रेसибилна со дополнително зголемување на притисокот во работните услови. Негативните страни на PHWE се високата температура која може да има некои неприфатливи последици, вклучително и деградација на термолабилните фенолни соединенија и неопходност од понатамошно прочистување. Оттука, за PHWE е важна внимателната оптимизација на температурата на екстракција.

Г. Суперкритична екстракција (SFE)

Суперкритичната течност (флуид) може да се дефинира како течност над нејзината специфична критична температура и притисок. Под овие услови, течноста постои во фаза, која ги има својствата и на течност и на гас. Температурата и притисокот се факторите што го одредуваат внесувањето на супстанцијата во нејзиниот критичен регион. Суперкритичната течност се однесува повеќе како гас, но има својства на растворање на течност. На пример, CO₂ ја има оваа карактеристика на температура од 31,1 °C и притисок 7380 kPa. Екстракцијата со суперкритичен CO₂ (SC-CO₂) има неколку многу важни предности: добро солватирање на неполярни компоненти, ниски трошоци и ниска токсичност на CO₂ и добивање на концентрирана сува материја (CO₂ може лесно да се елиминира). За да се постигне поголема растворливост на поларните соединенија, се додава мала количина на етанол или на метанол, кои се дефинираат како модификатори. Огромниот недостаток на оваа техника е високата цена на опремата.

Д. Екстракција со помош на ензими (EAE)

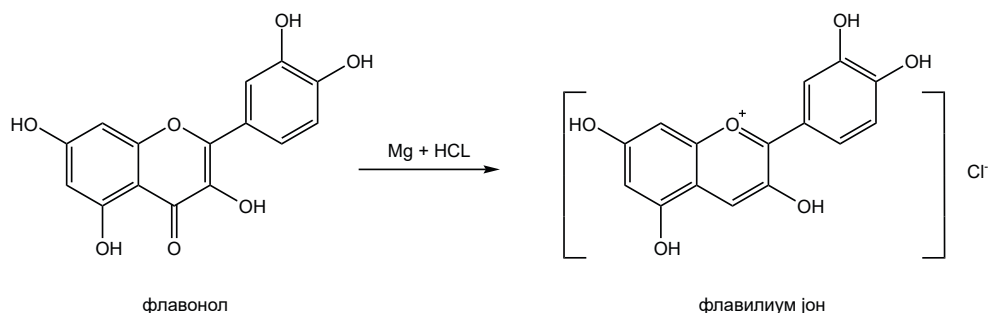
EAE вклучува ензимски преттретман кој се изведува со додавање на специфични ензими за хидролизирање (на пр., целулаза, α -амилаза и пектиназа). Со користење на ензими, клеточниот сид се крши и структурните полисахариди и липиди се хидролизирани во умерени услови, што се рефлектира со висок принос. Овој пристап се смета за нова и ефикасна техника за екстракција на голема група секундарни метаболити со антиоксидантни својства, вклучително и флавоноиди. На

ефикасноста на процесот влијаат повеќе фактори: температура на реакција, време на екстракција, pH на системот, концентрација на ензимот и големина на честички на материјалот. ЕАЕ е погоден за екстракција на различни биоактивни компоненти од растителни матрикси, вклучително и флавоноиди. Со оваа постапка, можно е да се изолираат флавоноидите чекор по чекор преку промена на pH-вредноста и додавање на различни растворувачи. Сепак, ЕАЕ спаѓа во неселективни методи за екстракција на флавоноиди од растителни материјали.

Е. Матрикс на цврсто фазна дисперзија (MSPD)

Со помош на оваа техника, целните соединенија се екстрахираат, фракционираат и се прочистуваат. Процесот вклучува симултана хомогенизација, екстракција и прочистување, при што се елиминираат повеќето проблеми поврзани со класичните методи. MSPD-екстракција била користена за екстракција и определување на 12 изофлавоноиди од цветот на црвената детелина: примероците од исушените цветови биле измешани со хидрофобна C18-смола, ставени во мали колонии, а изофлавоноидите биле екстрахирани со мешавина од дихлорометан и метанол. Спротивно на стандардните техники на екстракција, MSPD не бара специфична работна опрема, користи помалку растворувач и претставува брз, евтин и поеколошки метод. Селективноста зависи од изборот на елуентот.

Идентификација и квантификација на вистински флавоноиди. Идентификацијата на флавоноидните соединенија во растителен материјал може да се изврши со користење на различни методи, од класични хемиски реакции до софистицирани идентификации со користење на напредни инструментални техники и спектроскопски анализи. Класичните методи за идентификација се базираат на одредени хемиски реакции со реагенси што создаваат комплекси со флавоноиди со определена боја и апсорпција во UV-подрачје или ги редуцираат флавоноидите до флавилиум јони со карактеристична боја. Може да се користи NaOH (разреден раствор) во чие присуство флавоноидите даваат темножолто обојување, кое по додавање на слаби киселини капка по капка, се обезбојува. Често применувана хемиска идентификација е идентификацијата со концентрирана HCl и елементарен магнезиум, кои се додаваат во метанолан екстракт. Промената на бојата на екстрактот (црвена, жолта или портокалова) укажува на присуство на флавоноиди кои под дејство на концентрирана киселина и магнезиум (при што се ослободува водорот) се редуцират до флавилиум јони со карактеристично обојување (слика 98).



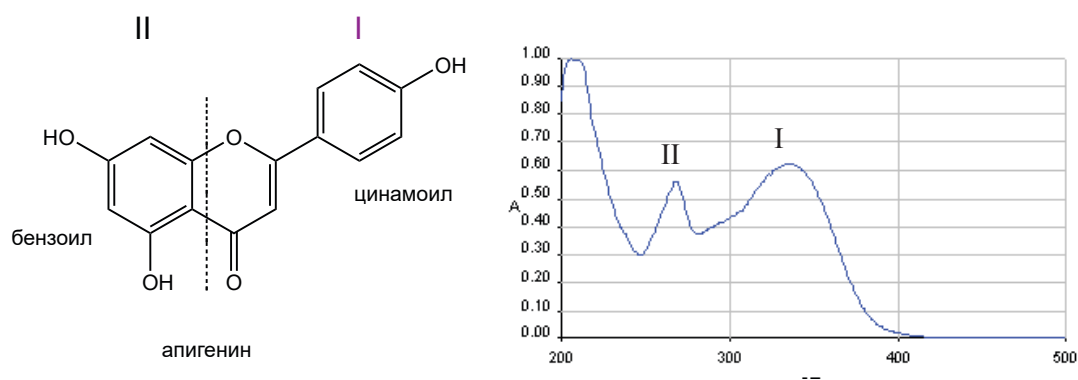
Слика 98. Создавање црвено обоени флавилиум јони при реакција на флавоноидите со елементарен Mg и концентрирана HCl

Едноставен метод за откривање на флавоноиди вклучува користење на 1 % раствор на алуминиум хлорид во чие присуство се создаваат комплекси со Al^{3+} со жолта боја, а во зависност од количеството можна е и појаваата на жолто обоен талог од флавоноидите.

Од класичните техники за идентификација често се користи TLC. Најчесто се користи стационарна фаза од силика гел G, а како реагенс за детекција раствор од AlCl_3 . Како мобилни фази може да се користат различни системи на растворувачи, вклучувајќи етил ацетат : метанол : вода (100 : 13,5 : 10, v/v/v); етил ацетат : мравја киселина : оцетна киселина : вода (100 : 11 : 11 : 26, v/v/v); хлороформ : метанол : вода (70 : 30 : 4, v/v/v); толуен : етил ацетат : диетил амин (70 : 20 : 10, v/v/v) и етил ацетат : метанол : вода : оцетна киселина (65 : 15 : 15 : 10, v/v/v/v). По развивање на хроматограмот и прскање на плочите со AlCl_3 , TLC-плочите се евалуираат во UV- TLC-комора на 254 nm и 366 nm. Петната од флавоноидите на 254 nm и 366 nm имаат различно обојување во однос на подлогата, а ако се користи и референтен материјал (стандарди на флавоноиди), можно е да се идентификуваат поединечни флавоноиди.

Нови методи што се користат за идентификација на флавоноиди вклучуваат UPLC-PAD, UPLC-ESI-QTOF-MS и UHPLC-MS.

Идентификацијата на флавоноидните соединенија може да се направи и врз основа на специфичната апсорпција во UV-светлина. Сите флавоноиди имаат ароматични хромофори, чии апсорпции може да се видат во нивните UV-спектри, во опсег од 250 до 285 nm. UV- детекторите обично можат да ги идентификуваат, па флавоните, флавонолите и соодветните гликозиди, обично се откриваат на 254-280 nm (првиот хромофор) или 340-360 nm (вториот хромофор). Систематската спектрална анализа на флавоноидите се прави токму врз база на UV-спектрите, кои, за повеќето флавоноиди и флавоноли, имаат два апсорпциони максимума означени како лента I и лента II. Лентата I се наоѓа во подрачјето од 300 до 400 nm, а се должи на апсорпцијата на цинамол системот, односно прстенот B. Ако се наоѓа во првата половина, односно во интервалот од 330 до 350 nm, може со сигурност да се каже дека испитуваното соединение припаѓа кон групата на флавоноли. Ако лентата I е лоцирана во втората половина, од 350 до 385 nm, испитуваното соединение има структура на флавонол. Лентата II се наоѓа во областа од 240 до 285 nm, а се должи на апсорпцијата на бензоил системот, односно на прстенот A (слика 99).



Слика 99. UV-спектар на апигенин со карактеристичните ленти I и II

Напоредно со UV-спектроскопијата, често се користи и IR-спектроскопијата бидејќи флавоноидите покажуваат карактеристични ленти во IR-спектрите (лента на $1700\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$ се должи на апсорпцијата на карбонилната група од γ -пиронскиот прстен). IR-спектроскопијата е особено битна за одредување на конфигурацијата на гликозидната врска и формата на шеќерната компонента во флавоноидниот хетерозид. Појава на три ленти во интервал од 1100 до 1010 cm^{-1} се должи на шеќери во пиранозна форма, додека појава на само две ленти во истото подрачје се

должи на шеќери во фуранозна форма. За α -конфигурација на гликозидната врска е карактеристична лента на 840 cm^{-1} , а за β -конфигурација при 890 cm^{-1} .

За определување на содржината на вкупните флавоноиди може да се користат различни методи: спектрофотометриски, фотоколориметриски, флуорометриски, поларографски, волуметриски (потенциометриско титрирање во неводена средина, комплексометриско титрирање и др.), гравиметриски и др. Најмногу се користат спектрофотометриски методи базирани на реакции на формирање комплекси со различни метали (најчесто AlCl_3), реакции со азосоединенија, со борна киселина и др. Спектрофотометриско определување на вкупни флавоноиди се базира на реакцијата со AlCl_3 , поставена во 1998 год. ОН-групите на C-3 и на C-5 и кето групата на C-4 кај флавоноли и флаволи со алуминиум хлорид формираат киселински стабилни комплекси, што е основа за колориметрискиот метод со AlCl_3 . Дополнително, орто-дихидроксилните групи на прстените А или В со AlCl_3 формираат киселински лабилни комплекси. Токму поради ова, методата со AlCl_3 е модификувана во 2002 год., со додавање на KCH_3COO по додавањето на AlCl_3 , со цел разградување на лабилните комплекси и избегнување на лажно високите вредности на вкупни флавоноиди. По додавање на калиум ацетат, максималната апсорпција на флавонолите (каемферол, кверцетин и мирицетин) се јавува на $\lambda = 415\text{ nm}$. Калибрационата крива вообичаено се прави со стандардна супстанција од кверцетин, вкупните флавоноиди се изразуваат во mg кверцетин или еквивалент на рутин по грам тежина на примерокот. Другите класи на флавоноиди покажуваат други апсорпциони максимуми. Методот со алуминиум хлорид не дава никакви резултати во случај на флаваноните и на изофлаваноните. За определување на содржината на овие класи флавоноиди се користи метод со 2,4-динитрофенилхидразин (DNP), реагенс кој реагира со алдехиди и кетони и генерира создавање на 2,4-динитро-фенилхидразон. Хидразоните на најзначајните флаванони, имено хесперитин, нарингин и нарингенин, покажуваат максимална апсорпција на 495 nm . Флавонолите, флаволи и изофлаваноните со C2-C3 двојни врски не реагираат со 2,4-динитрофенилхидразин и не создаваат хидразони. Во случај кога во некој примерок треба да се определува содржина на вкупни флавоноли и вкупни флаванони, потребно е да се применат двете методи, и со AlCl_3 и со DNP.

Квантификацијата на флавоноидите со HPLC исто така многу често се користи за определување на содржината на флавоноиди. Во последните 4 децении најчесто се користи системот HPLC-DAD, како важна алатка за сепарација на овие метаболити. Спојувањето на HPLC со голем број технологии за откривање или онлајн, во тандем или офлајн овозможува идентификација на флавоноиди во растителни, во храна и во биолошки примероци. За детекција и идентификација се користат UV-VIS, флуоресценција, електрохемиска детекција, MS и NMR-спектроскопија. HPLC-MS-системи во последните десет години ја подобрија селективноста и чувствителноста на анализата на флавоноиди. Предизвиците со кои се соочуваат сите современи аналитичари вклучуваат подобрување на својствата на стационарната фаза и создавање посложени инструменти, како и алатки за побрза и поефикасна подготовка на примерокот. Предизвик претставува развојот на поефикасни и побрзи процедури за нивна идентификација и квантификација, при што HPLC останува најмоќната техника за нивно раздвојување од сложените мешавини.

8.7.2. Флавоноиди од групата на 2-фенил-бензо- γ -пирани

8.7.2.1. Кетехини и леукоантоцијанидини

Во групата на хромани (бензо- γ -пирани) спаѓаат три најзначајни групи состојки: флаван-3-оли или катехини, флаван-3,4-диоли или леукоантоцијанидини и антоцијанидини. Катехините и леукоцијанидините, не градат хетерозиди. Тие образуваат димерни, олигомерни и полимерни соединенија и значајни се за создавање на полифенолни соединенија проантоцијанидини и тани-

ни. Проантоцијанидините и леукоантоцијанидините се безбојни состојки, но под дејство на разблажени минерални киселини многу лесно може да преминат во обоени антоцијанидини. Проантоцијанидините и леукоантоцијанидините ќе бидат обработени во поглавјето 8.8. Танини.

8.7.2.2. Анџоцијанидини/анџоцијани

Антоцијанидините се редуцирани деривати на 2-фенил-бензо- γ -пиран, кај кои кислородот во пиранскиот прстен има слободна врска, поради што се јавува како едновалентен катјон, наречен флавилиум јон. Со киселините од клеточниот сок формира флавилиум сол со карактеристична боја. Антоцијанидините се јавуваат слободни како агликон, но и како хетерозиди означени како антоцијани. Антоцијаните се хидросолубилни растителни пигменти, што во зависност од pH на средината можат да бидат црвени, сини или виолетови (слика 100). Задолжени се за бојата на цветовите и плодовите, а на есен и на листовите. Нивното име потекнува од грчките зборови *anthos* = цветови и *cyanos* = син.

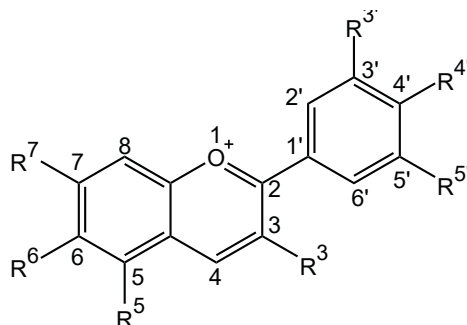


Слика 100. Промена на боја на раствор со антоцијани во зависност од pH на средината

Физичко-хемиски карактеристики. Антоцијанидините се многу распространета група растителни компоненти. Досега се познати околу 30 различни агликон (антоцијанидини), но бројот на нивните хетерозиди е многу поголем и се движи преку 400 различни структури. Основна структура на антоцијанидините е прикажана на слика 101.

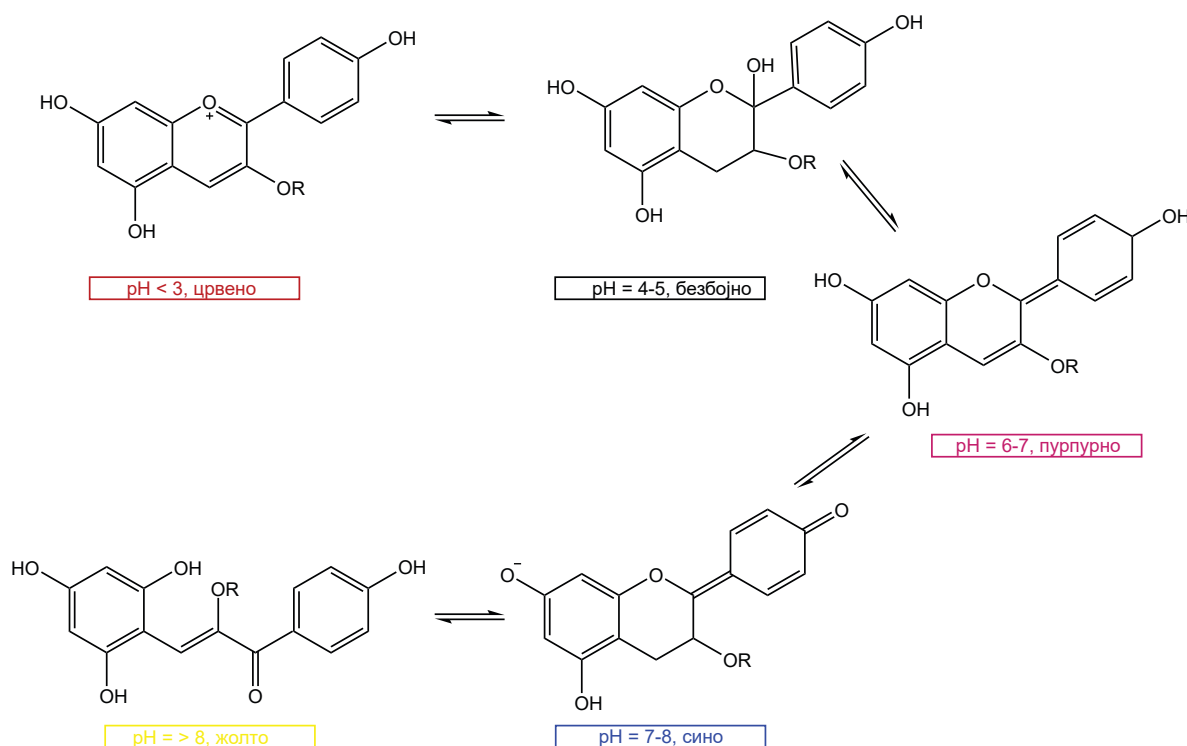
Во однос на хемиската градба, сите антоцијанидини:

- задолжително имаат OH-група на C-3, а други OH-групи на други 4-5 позиции, така што повеќето се пента или хексасупституирани деривати,
- OH-групите можат да бидат метилирани,
- шеќерниот дел во хетерозидите се врзува најчесто на C-3 или на C-5, а може и на C-7 или на C-3',
- во природата најчесто се јавуваат монозиди (со шеќер на C-3) и биозиди (со шеќери на C-3 и C-5- и на C-3 и C-7), поретко се можни и триозиди,
- OH-групите на шеќерите можат да бидат ацетилирани.



Слика 101. Основна структура на антоцијанидини

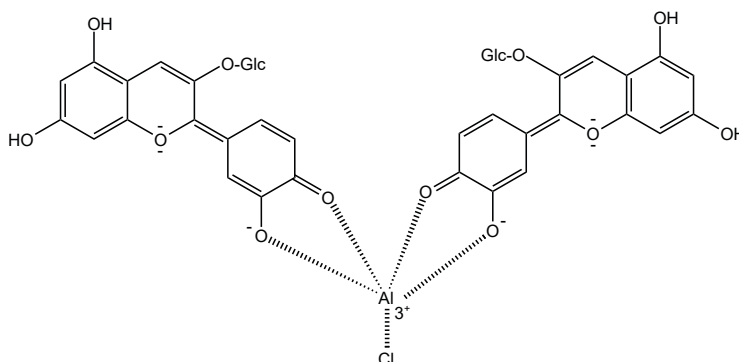
Во зависност од pH на клеточниот сок, бојата на антоцијаните се менува. Црвената боја се јавува само во кисела средина при услови на $\text{pH} < 3$. Во слабо кисела средина при $\text{pH} = 4 - 6$ антоцијанидинскиот (флавилиум) катјон губи еден или два протони и преминува во неутрална безбојна анхидро-база. Со зголемување на базноста, при $\text{pH} = 6 - 7$ преминува најпрвин во хинон со пурпурно црвена боја, а на $\text{pH} = 7 - 8$ со сина боја. Со хидратација на положбата C-2 и $\text{pH} > 8$ се создава соодветен халкон со жолта боја (слика 102).



Слика 102. Промени во структурата на антоцијанидините при различно pH на средината (R = гликон)

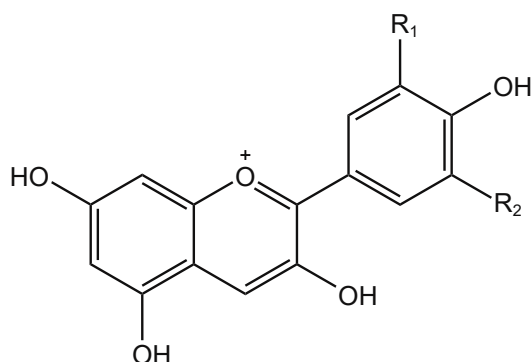
Во растенијата, бојата на антоцијаните зависи и од образувањето на метални комплекси со Al^{3+} и Fe^{3+} јоните. Овие комплекси ги градат антоцијаните што имаат слободни OH-групи на C-3' и C-4'. Создадените комплекси ја задржуваат сината боја и во кисела средина (на пр. гликозидите

на цијанидинот и на делфинидинот што се наоѓаат во цветовите на растението синчец (*Centaurea cyanus*) (слика 103) образуваат метални комплекси со сина боја, што можат да се разрушат само под дејство на многу силни киселини.



Слика 103. Растение синчец (*Centaurea cyanus*) и комплексирање на антоцијанидини со метален јон

Со зголемувањето на бројот на ОН-групите во структурата се зголемува интензитетот на синото обојување, а со зголемувањето на бројот на метоксилните групи се зголемува интензитетот на црвеното обојување. Најзначајни сино обоени хидрокси антоцијанидини во природата се: цијанидин > делфинидин > пеларгонидин (слика 104). Од црвено обоените антоцијанидини позначајни се пеонидин, малвидин и петунидин (слика 104).



пеларгонидин: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$

цијанидин: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$

делфинидин: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OH}$

пеонидин: $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{H}$

малвидин: $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OCH}_3$

петунидин: $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OH}$

Слика 104. Најчести антоцијанидини во растителниот свет

Антоцијанидините се растворливи во неполарни органски растворувачи, а антоцијаните во вода, алкохол и ацетон. Слободните антоцијанидини под дејство на светлината и во присуство на кисели состојки се нестабилни, лесно се распаѓаат или се полимеризираат. Нивните хетерозиди се многу постабилни во кисела средина.

Стабилност на боја кај антоцијаните. Антоцијаните се многу реактивни соединенија и лесно се разградуваат, поради што за одржување на пигментацијата извонредно важна улога игра околината во која се чува материјалот. Познато е дека светлината и температурата ги разградуваат, па материјалот што содржи антоцијани треба да се чува во ладни и во темни простории. Разградување-

то на антоцијаните се зголемува пропорционално со топлината на складирање и изложувањето на пигментите на температури од 65 до 90 °C, при што дури и краткотрајното дејство на топлината го намалува полуживотот на бојата на само неколку часа. Антоцијаните може успешно да се складираат на температури околу 2-4 °C, со траење на бојата неколку недели.

Антоцијаните се разградуваат и со оксидативни механизми кои го вклучуваат ензимот полифенол оксидаза (PPO). PPO може да се најде во различни бобинки (боровинки, јагоди, грозје и цреши), а се активира во присуство на киселини (кафена, хлорогенска или гална киселина) кои имаат *o*-дифенолни системи. Киселините преминуваат во соодветни *o*-хинони кои потоа го оксидираат антоцијанот и формираат кафено обоени полимери. Бидејќи формирањето на хинон од киселина е од витално значење во оксидацијата, редукцијата на хинонот ефикасно би ја инхибирала оксидативната деградација на антоцијаните. Така, додавањето на аскорбинска киселина го забавува губењето на бојата со тоа што делува како донатор на водород за да го врати хинонот назад, во неговата кисела форма. Сè додека аскорбинската киселина е присутна во реакционата смеса, антоцијаните остануваат зачувани во присуство на полифенол оксидаза. Треба да се има предвид дека, аскорбинската киселина (витамин C) сама по себе, има дополнително разградувачко дејство врз антоцијаните ако се тие долго изложени на нејзино дејство. При преработка на плодови што содржат антоцијани и производство на сокови или други преработки, значајно е зачувувањето на природната боја. За конзервирање на плодови генерално, се користи сулфур диоксид (SO₂), кој е многу ефикасен презерватив од расипување, но тој пак од друга страна, придонесува за брзото губење на бојата на антоцијаните и избелување на производите.

Други значајни аспекти што влијаат на нијансата и интензитетот на бојата на антоцијаните е присуството на копигмент. Копигментот е друго соединение кое по правило е безбојно, но кога се додава на антоцијаните, комуницира со антоцијанот и во голема мера ја подобрува бојата на растворот. Интермолекуларните реакции на копигментација се резултат на асоцијациите помеѓу антоцијаните и кофакторите како што се други полифеноли, метални јони или органски киселини за да се создадат слаби хемиски врски со зголемени физички и хемиски атрибути. Кога полифенолните соединенија дејствуваат како кофактори кон антоцијаните, двете соединенија се држат заедно со вертикално натрупување на хидрофобијата на ароматичните јадра. Флавилиумскиот катјон потоа се стабилизира со неговата интеракција со копигментот и ја избегнува хидратацијата со што би се формирала безбојна карбинолска псевдобаза. Наместо тоа, флавилиум-јони се присутни во растворот што доведува до интензивна црвена боја. Најчесто пронајдените органски копигменти вклучуваат катехин, епикатехин, процијанидин B2, кафена киселина, *p*-кумарна киселина, хлорогенска киселина, мирицитрин и кверцитин. Ефектот на копигментацијата врз бојата и интензитетот на растворот на антоцијаните варира во зависност од структурата на антоцијанинот и од pH на средината. Копигментниот ефект се зголемува со бројот на метоксилни групи и со бројот на гликозидни врски и шеќерни единици на антоцијанинот. Друга форма на копигментација што се јавува во сините цветови се должи на металните јони и формирање на металоантоцијани (слика 102). Метални јони што се вклучуваат се Fe³⁺, Al³⁺, Mg²⁺ и Ca²⁺ и истите се неопходни за сината пигментација на цветните ливчиња. Сите познати металоантоцијанински структури покажуваат хирално молекуларно натрупување на антоцијаните и флавоонските кофактори, што ги разликува овие пигменти од другите пигментни соединенија.

Интересен е фактот дека, иако копигментацијата се користи за интензивирање на нијансите на боите, таа не ја зголемува стабилноста на антоцијаните во однос на температурата и присуството на светлина. Загревањето на копигментираните антоцијани предизвикува дисоцијација на комплексот што резултира со губење на бојата со иста брзина како и неkopигментираните антоцијани. Влијанието на UV или на видливата светлина врз стабилноста на комплексот антоцијан-копигмент е слично на влијанието врз антоцијаните без копигменти.

Биолошко-фармаколошко дејство на антоцијаните. Антоцијаните се најзначајни растителни пигменти задолжени за бојата на цветовите, плодовите, листовите, лисните дршки, стеблики-

те и подземните органи на зеленчукот и овошјето (цвет од хибискус, различни бобинки како што се боровинка, брусница, капина, малина и др., лист од црвена зелка, лисни дршки и стеблики од црно нане итн.). Внесувањето на антоцијаните со исхраната има големи здравствени придобивки. Антоцијаните се внесуваат со исхрана богата со црвено, сино и сино-виолетово овошје (различни бобинки) и обоен зеленчук (црвена зелка, цвекло, модар патлиџан и др.). Денес се во употреба различни *добавоци на исхраната* кои претставуваат дополнителен извор на антоцијани. Особено се популарни производи што содржат антоцијански комплекс од: боровинка, црна рибизла, американска брусница, плод од бозел и др. Според извештаите од определени епидемиолошки истражувања, констатирано е дека антоцијаните имаат големо влијание врз зачувувањето на здравјето на срцето, преку намалување на нивоата на холестерол и успешното справување со оксидативниот стрес. Внесот на антоцијаните со храна има позитивно влијание врз регулирањето на покачениот крвен притисок. Прелиминарни испитувања покажуваат дека антоцијаните може да го заштитат организмот од натрупување на масно ткиво и појава на згоеност. Го зајакнуваат имунолошкиот систем. Помагаат при невролошки нарушувања како што се Алцхајмерова болест и деменција, ги подобруваат симптомите на ослабена когнитивна функција, слаба меморија и нарушена концентрација, му помагаат на организмот при слабост и замор и во закрепнување по зголемена физичка активност. Имаат позитивни ефекти кај лица со дијабетес тип 2, при што екстрактот од боровинката може да ја намали инфламацијата во адипозното ткиво, да ја намали хипергликемијата и да ги заштити ткивата од инсулинската резистенција. Во последно време станува актуелно антиканцер дејството на антоцијаните. *In vitro* испитувања покажале дека механизмите кои придонесуваат во антиканцер дејството се: изразена антиоксидативна активност, активација на ензимите од фазата II, намалена клеточна пролиферација од една страна и индукција на клеточна апоптоза од друга страна, антиинфламаторно и антиангиогенозно дејство и др. *In vivo* експериментални студии покажале протективен ефект на антоцијаните во однос на развојот на езофагијален, колонски, кожен, белодробен и канцер на дојка.

Во медицински цели се користат екстракти и изолирани антоцијански комплекси кои спаѓаат во група биофлавоноиди, природни производи што дејствуваат капиларопротективно (ја намалуваат пермабилноста и кртоста, а ја зголемуваат еластичноста на сидовите на капиларните крвни садови). Се користат за третман на заболувања што настануваат како резултат на инсуфициенција на венските крвни садови. Покажуваат антиинфламаторно дејство, а познато е дека придонесуваат и за регенерација на видниот пурпур. Наоѓаат примена за третман на ретинопатии настанати како последица од дијабетес. Во оваа смисла се посебно значајни антоцијаните на боровинката.

Екстракција и испитување на антоцијаните. Постапките на екстракција и изолација како и идентификација на антоцијанидините се многу отежнати заради изразената нестабилност на овие соединенија. Се користат многу различни техники за екстракција и за подготовка на примероци за анализа. Целокупниот концепт вклучува сушење на растителен материјал, мелење во прашок и екстрахирање со алкохол во ладни услови, поради подложноста на антоцијаните на разградување на повисоки температури. Растворот за екстракција треба да биде малку кисел за да се одржи формата на катјонскиот флавилиум-јон, која е црвена и стабилна во високо кисела средина, но не премногу кисела за да не предизвика делумна хидролиза на ацилните делови во ацилирани антоцијани.

Најчестиот метод за анализа на антоцијаните е HPLC. Често методите на сепарација, HPLC, се доведуваат во врска со методите за идентификација како што се UV/Vis-спектрофотометрија (LC/UV), масена спектрометрија (LC/MS) или нуклеарна магнетна резонанца (LC/NMR) спектроскопија, за да се разјаснат структурите на антоцијанините. Друга вообичаена техника што се користи за развојување на антоцијаните од сурови растителни екстракти е СЕ. Некои историски важни техники на сепарација на антоцијани вклучуваат хартиена хроматографија (PC) и TLC. PC беше еден од првите методи употребени за изолација и прочистување на одредени антоцијани и во зависност од специфичноста на примерокот и од различните мобилни фази, беше можна добра сепарација на некои пигментни смеси. За жал, со оваа техника не беше можно да се добијат пого-

леми количества чисти антоцијани и генерално, при изведување на истата беше потребно долго време за развивање на хроматограмите.

Во случај кога се користи течната хроматографија (LC-анализа), за детекцијата на антоцијанидините може да се користи UV/Vis-спектрофотометрија. Утврдено е дека антоцијаните имаат единствен максимум на апсорпција на ~ 520 nm што ги издвојува овие соединенија од другите флавоноиди во растителниот екстракт и ги поедноставува добиените хроматограми за изолација и прочистување. Де факто, идентификација на антоцијаните беше овозможена по воведувањето на технологијата со диодни низи (DAD), која овозможи акумулација на библиотеки на спектрални UV/Vis-податоци, помагајќи во идентификацијата на компонентите во хроматограмот. Оттука, LC-UV-DAD е техника што врши целосно спектрофотометриско скенирање на секој пик додека се елуира и обезбедува уникатен хроматограм за секое соединение на антоцијанин што последователно може да се спореди со други спектри на соединенија и да се користи за цели на идентификација. Општо земено, спектралните карактеристики на одреден антоцијанин се поврзани со степенот на хидроксилација на основното јадро на агликонот. Антоцијанидинот со само една ОН-група на В-прстенот, пеларгонидин, дава максимална апсорпција на приближно 520 nm додека ди-оксигенираните антоцијанидини, цијанидин и пеонидин, даваат максимум на 535 nm, а три-оксигенирани на 544 nm. Дополнително, гликозидните врски, исто така, влијаат на спектралните карактеристики, па се можни максимуми на апсорпција на други бранови должини. Различните шеќери кои вообичаено се присутни во гликонскиот дел, немаат битен ефект врз спектралната распределба и изгледот на UV/Vis-спектарот, но значително го менуваат времето на задржување на антоцијаните. Ацилацијата на антоцијаните резултира со значајно зголемување на времето на задржување во споредба со неацилираните антоцијани.

Во последната деценија, LC-MS-техниката има значаен ефект врз квантитативната и квалитативната аналитичка методологија на антоцијаните. Оваа комбинација ги обезбедува сепарационите предности на LC и идентификационите предности на MS. Сепак, физичкото спојување на овие две техники има некои проблеми, како што се: количината на ефлуент од колона што треба да се внесе во MS-системот и составот на елуентот и видот на соединенијата што треба да се анализираат. Најчестиот интерфејс за LC и MS користи аналитичка HPLC која користи помали колони и помали стапки на проток, олеснувајќи го спојувањето на LC со MS-инструментацијата. Анализата на одредени типови на соединенија бара соодветна техника на јонизација за внесување на молекуларните јони во инструментот и, до денес, не постои универзален интерфејс за оваа намена. Техниките за јонизација кои се најпогодни за хемијата на антоцијани се бомбардирање со брз атом со континуиран проток (CF-FAB), MALDI, хемиска јонизација во услови на атмосферски притисок (APCI) и електроспреј јонизација (ESI). Првите неколку години по воведувањето на системите LC-MS, CF-FAB беше најчеста MS-техника. Подоцна, ESI стана најчестиот LC-MS-интерфејс, бидејќи ги избегнува проблемите што се јавуваат со CF-FAB. ESI е метод на мека јонизација што произведува гасовити јони од високо наелектризиран капки течност што испаруваат, што го прави ESI соодветен за мали растителни метаболити како што се антоцијаните. Исто така, ESI има способност да воведат течни примероци во MS со минимална манипулација, успешно избегнувајќи ги вообичаените проблеми забележани со другите LC-MS-интерфејси. Различни типови на анализатори на маса се исто така достапни за различни LC-MS-интерфејси. TOF-анализаторот често се поврзува со MALDI поради прецизното време на јонизација забележано со MALDI. Квадрипол јонска замка (quadrupole ion trap) анализаторот е најчестиот тип на анализатор за LC-ESI-MS кој овозможува едноставни интерпретации на комплексни мешавини, а вклучува идентификација и на помали пикови. Примената на тандем MS (MS-MS или MSⁿ) може да се користи за карактеризирање на поединечни соединенија во смесата или за идентификување на структурата на соединенијата со посебни чекори на јонизација и фрагментација.

LC-NMR ги надминува претходните методологии за структурно разјаснување на непознати соединенија во сурови растителни екстракти. Кога првпат беше воведен, LC-NMR пројавуваше недостаток на чувствителност, но со напредокот во потиснувањето на растворувачите, градиентите

на пулсното поле, технологијата на сонда и магнетите со високо поле, оваа техника стана многу поефективна и со голема применливост.

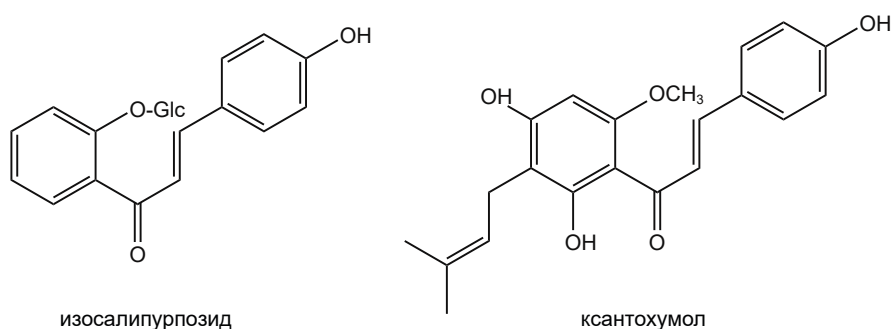
СЕ ги одвојува соединенијата врз основа на разликите во нивната електрофоретска подвижност и поседува одлична масена чувствителност, висока резолуција, мала потрошувачка на примероци и минимално создавање отпад од растворувачи. Во аналитиката на антоцијаните стана многу значајна техника, поради нејзините способности да одвојува сложени мешавини на антоцијани. Традиционално, детектор поврзан со СЕ-инструментацијата е речиси исклучиво UV/Vis-спектрофотометар, но посоефицицираниот метод вклучува масена детекција во систем СЕ/MS. СЕ/MS обезбедува значајни предности во однос на СЕ/UV-Vis со оглед на големите можности за сепарација со СЕ и моќта на MS како метод за идентификација и потврда на структурата на антоцијаните. Ако се користи CZE тогаш за раздвојувањето на антоцијаните од растителните екстракти треба да се користи кисела средина и да се конфигурира системот да работи од катода до анода.

8.7.3. Флавоноиди со отворен пропански низ или со фурански прстен

8.7.3.1. Халкони и дихидрохалкони

Халконите и дихидрохалконите се карактеризираат со отворен γ -пиронски прстен. Халконите се среќаваат во некои претставници од главоцветни растенија, во мешункастите растенија, и во претставници на дрвенести растенија кои содржат салицилни деривати како што се врба, топола и др. За нив е карактеристично тоа што во кисела средина спонтано се изомеризираат во флавонони, а по додавање на алкалија повторно преминуваат во халкони. Позначајни соединенија од оваа група се (слика 105):

- изосалипурпозид, најден во цветови од смиљ и во кора од врба и
- ксантохумол, најден во цветовите од хмељ.



Слика 105. Структури на најзначајните халкони

Халконите се сметаат за задолжителни посредници во биосинтезата на различните класи на флавоноиди, но за разлика од вистинските флавоноиди, халконите во растенијата не се акумулираат во значителни количества. Растенијата што сепак акумулираат халкони често се користат во традиционалната медицина поради низа докажани дејства на халконите: антиинфламаторно, антимикробно, антифунгално, антиоксидативно, цитотоксично, антитуморно и хемопревентивно. Антиканцерогеното и антиинфламаторното дејство веројатно се поврзани со директната антиоксидантна активност и со стимулирачките ефекти врз активирањето на ендогените одбранбени ензими. Антиканцер активност е докажана со *in vitro* и *in vivo* испитувања, а се одвива преку повеќе

механизми, вклучувајќи нарушување на клеточниот циклус, регулација на автофагија, индукција на апоптоза и индукција на имуномодулаторни и на воспалителни медијатори. Досегашните резултати влеваат надеж дека халконите во иднина ќе бидат третирали како нови антиканцер агенси, со реална апликативност во терапијата. Дополнително, комбинацијата на халкони и други антиканцер терапии се очекува да биде ефикасен начин за подобрување на терапевтската ефикасност. Бидејќи сè уште нема доволно податоци, потребни се нови испитувања и особено испитување на можната токсичност на халконите.

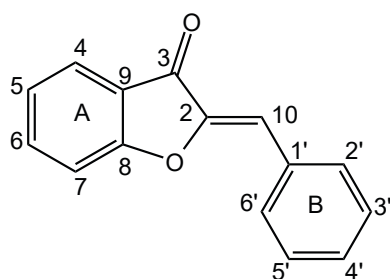
Дихидрохалконите се ретки во растителниот свет. Карактеристичен претставник е гликозидот флоридизин, изолиран од коренот на јаболкото, токсично соединение што предизвикува гликозурија.

Испитување на халкони. Квалитативната и квантитативната анализа на халконите во растителен материјал најчесто се врши со течна хроматографија со реверзнофазен систем (RP-HPLC), со користење на C-18 реверзнофаза колона, мобилна фаза составена од метанол и разредена фосфорна киселина и детекција на 220 nm.

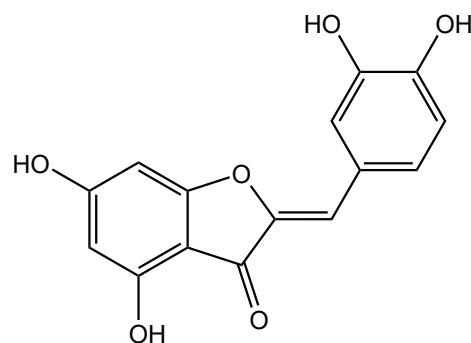
8.7.3.2. Аурони

Ауроните се растителни пигменти одговорни за жолтата боја на растителните органи. Се карактеризираат со оксидиран фурански прстен (слика 106), настанат со реаранжирање на халконска структура. Природните аурони имаат ОН-групи на сите позиции на кои тие се јавуваат кај вистинските флавоноиди.

Ауроните играат важна улога во пигментацијата на цветовите и плодовите и особено придонесуваат за светло жолта боја на цветовите. Покажуваат силна и широка разновидност на биолошки активности. Дејствуваат како: антифунгални агенси, агенси против инсекти, инхибитори на тирозиназата и антиоксиданти. Не се широко распространети во природата, помалку се познати и помалку се проучени во споредба со структурно сличните флавонони и изофлавонони.



Слика 106. Основна структура на аурон со нумерација на позициите



Слика 107. Структура на ауреусидин

Постојат неколку значајни аурони што наоѓаат примена во практиката. Ауреусидин (слика 107), е инхибитор на јодотиронин-дејодиназа, ензим вклучен во синтезата и во регулацијата на тироидните хормони. Некои синтетски добиени аурони се врзуваат на нуклеотидите на Р-гликопротеинот и ги инхибираат киназите што се доведува во врска со антипролиферативните својства и антиканцерогеното дејство.

Биолошки дејства на ауроните:

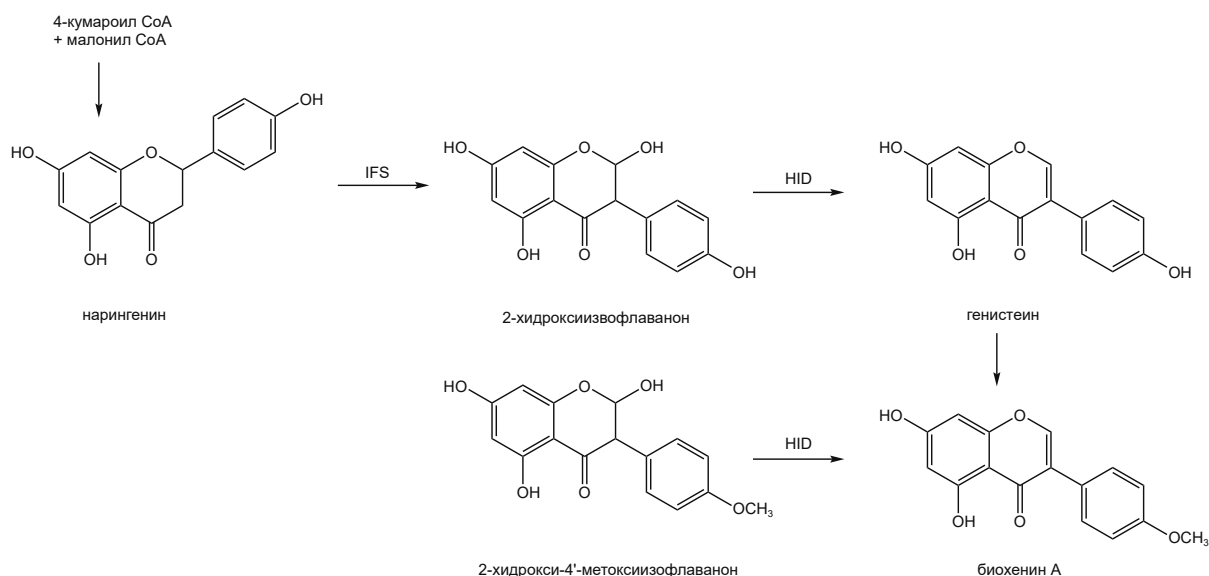
- Ауроните дејствуваат антипаразитарно, особено против предизвикувачот на маларијата. Полусинтетските деривати се покажаа поефикасни а за антималяричното дејство се посебно значајни метоксилни групи на позициите C4 и C6, атом на халоген (најчесто хлор) на позиција 4' и замената на кислород во фуранскиот дел со N-H група.
- Антибактериско и антигабично дејство. Една неодамнешна студија објавена во 2010 година покажа дека серија синтетички аналози на аурон се ефикасни антибактериски и антигабични агенси против повеќе бактериски и габични соеви (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и *Proteus vulgaris*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Candida albicans* и *Penicillium chrysogenum*).
- Антивирусно дејство. Анализирани се различни аурони во однос на антивиралната активност против вирусот на инфлуенца. Во однос на структурните карактеристики и нивното влијание врз дејството, утврдено е дека гликозидната функција на која било позиција и хетероатом на C3 или на C4 го намалуваат ефектот, додека ОН-групата на C6 или на C4', двојна врска помеѓу C2 и фенилетенот и хетерофункцијата на C3 се од суштинско значење за активноста. Некои синтетски аурони биле испитувани во однос на активноста против вирусот на хепатитисот C. Биле утврдени структурни карактеристики што се битни за активноста.
- Антиинфламаторно дејство. Ауроните, особено некои синтетски добиени деривати, го инхибираат производството на цитокините: TNF- α (туморнекротичен фактор алфа) и IL-6 (интерлеукин-6). Познато е дека токму овие цитокини се значајни за развој на автоимунни болести, дијабетес, артросклероза и канцер. Неколку аурони биле синтетизирани како деривати на сулфуретин, позната супстанција со антиинфламаторно дејство, која може да го намали создавањето на проинфламаторните молекули азот моноксид и простагландин E2. Резултатите покажале дека хидроксилната функција на C6 е важна за намалување на синтезата на простагландин E2 и дека метокси групите на прстенот B се корисни за намалување на производството на азот моноксид.
- Антиканцер дејство. За ова дејство се важни неколку синтетски добиени аурони, со 4'-супституција на 5-хидроксиаурон. Цитотоксичното дејство на овие аурони било испитувано во клеточни линии на канцер клетки и линии на неканцер клетки. Резултатите покажале дека некои аурони се цитотоксични кон клеточните линии на канцер, без да ги засегнат во голема мера неканцер клетките. Овие соединенија во *in vitro* услови имаат способност да ја инхибираат клеточната подвижност и ангиогенезата, два процеси што се вмешани во инвазијата на клетките на ракот и развојот на метастази. Испитувањата на антиканцер дејството на природните и на синтетските аурони денес се многу актуелни.
- Аурони за лекување на кожни болести: Некои аурони се способни да го инхибираат ензимот тирозиназа, кој игра важна улога во синтезата на меланин. Меланинот е природен пигмент на кожата кој може да биде вмешан во развојот на неколку дерматолошки заболувања.
- Алцхајмерова болест: Некои синтетски добиени аурони можат да ги откриваат β -амилоидните плаки кај Алцхајмерова болест. Резултатите од *in vitro* испитувања покажуваат дека ауроните имаат висок афинитет за врзување за β -амилоидните пептиди. Експериментални испитувања на глувци покажаа дека ауроните може да бидат важни агенси во дијагностицирањето и утврдувањето на степенот на Алцхајмерова болест.

Со оглед на потврдени биолошки дејства: антиоксидативно, антиинфламаторно, антибактериско, антивирусно, антималярично и антиканцерогено, ауроните може да се сметаат за иновативни кандидати за лекови. Поради изразеното флуоресцентно својство, може да се разгледуваат и како добри дијагностички алатки. Природните и особено синтетските аурони денес се предмет на многу испитувања со цел да утврди механизмот на дејството и да се испита можната апликативност.

Освен во медицински цели, каде сè уште се потребни многу дополнителни испитувања, ауроните практично се користат како комерцијални природни бои, со голема технолошка важност.

8.7.4. Флавоноиди од групата на 3-фенил-бензо-γ-пирони

Во оваа група природни состојки спаѓаат: изофлавоени, изофлавоноли, изофлаванони, изофлава-ни, птерокарпани, ротеноиди, куместани и други соединенија. Основна карактеристика на овие соединенија е што прстенот В е врзан на положбата 3 за бензо-γ-пиронскиот дел. Заедничко име за сите класи на овие соединенија е изофлавоноиди, но најголемо практично значење имаат изофлаваноните.



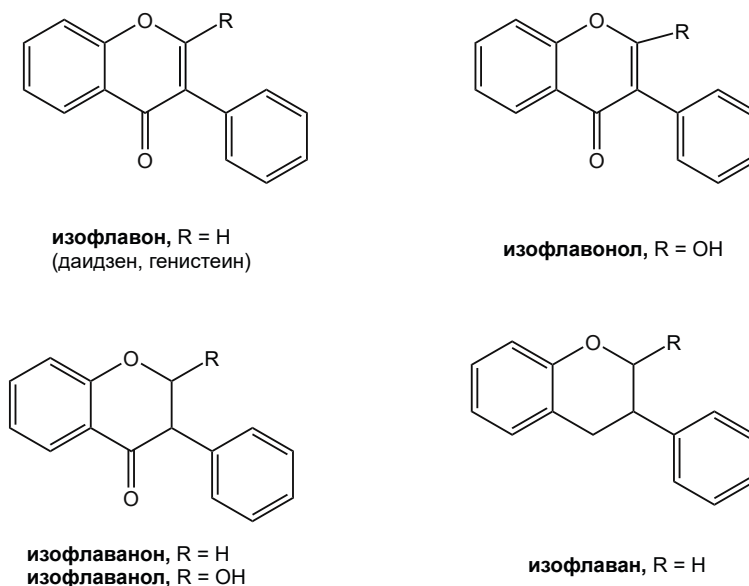
Слика 108. Биосинтеза на изофлавоноиди во мешункасти растенија

Првите изофлавоноидни меѓусоединенија се генерираат од флаванони под дејство на IFS (изофлаво-синтаза), за да се формираат 2,4'-дихидроксиизофлавоени (2-хидрокси-даидзеин и 2-хидрокси-генистеин) или 2-хидрокси-4'-метокси изофлавоени (2-хидрокси-формонетин и 2-хидрокси-биохинин А) со вклучување на 4'-метокситрансфераза. Од овие соединенија со вклучување на HID се врши дехидратација на C-2 и се создаваат даидзеин, геистеин, биохинин А и формонетин. Со вклучување на други ензими и други соединенија се создаваат други класи изофлавоноиди (куместани, птерокарпани и др.).

Биосинтеза на изофлавоноиди. Биосинтезата на изофлавоноиди се случува по шикими патот по кој се создаваат фенилпропаноиди. Особено е карактеристична за мешункастите растенија. Од различните групи соединенија што настануваат по патот на шикими киселината, создавањето на изофлавоноидите оди преку флаваноните, а за самата биосинтеза се неопходни некои специфични ензими од кои особено се важни изофлавоноидна синтаза (IFS) и хидроксиизофлаванон дехидратаза (HID). Биосинтезата на изофлавоноидите протекува со одвојување на водород на C3 од бензопиронскиот прстен, миграцијата на ароматичниот прстен В од C2 во C3 во γ-пиронот, под дејство на IFS и хидроксилацијата на C2, под дејство на HID. Изофлавоноидна синтаза (IFS) е протеин од групата P450, која ја катализира реакцијата на формирање на 2-хидроксиизофлаванон, кој се дехидрира за да произведе даидзеин и генистеин, спонтано или со вклучување на HID (слика 108). Најзначајните изофлавоноиди се даидзеин и генистеин (слика 109) кои се доминантно присут-

ни во семето од соја. Со нивна метилација се добиваат биоханин А и формонетин, кои се присутни во поголемо количество во цветот од црвена детелина и во други мешункасти растенија. Како резултат на оксидацијата на γ -пиронскиот прстен и присуството на други, главно хетероциклически прстени, се создаваат вкупно 13 поткласи на изофлавоноиди.

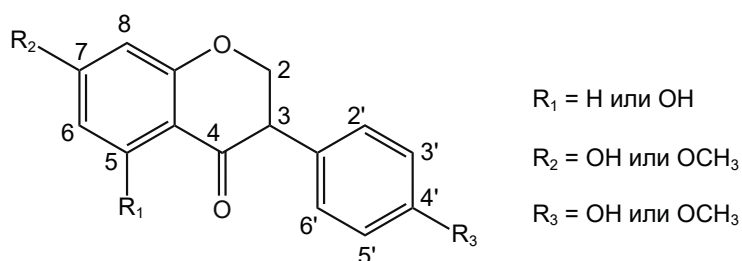
Најзначајни класи изофлавоноиди се (слика 109): изофлавоноли, изофлаванони и изофлавани.



Слика 109. Различни класи изофлавоноиди

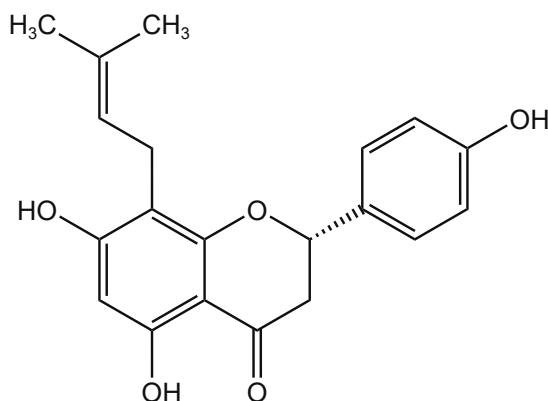
8.7.4.1. Изофлавоноли

Изофлавонолите се изомери на флавонол, имено 3-фенил-бензо- γ -пирони, кои имаат супституенти, главно OH или OCH₃-групи, најчесто на позициите C-5, C-7 и C-4' (слика 110).



Слика 110. Структура на изофлавоноли и најчестите супституенти на C₅, C₇ и C₄

Најзначајни хидроксиизофлавоноиди се даидзеин и генистеин што се наоѓаат во семето од соја, со ОН-групи на позициите С-7 и С-4' (даидзеин) и на С-5, С-7 и С-4' (генистеин). Метилирани изофлавоноиди се биоханин А и формонетин, кои се соодветни на структурите на даидзеин и генистеин, со метилирана ОН-група на С-4'. Метилација на ОН-групата на С-5 кај генистеинот доведува да создавање на глицитеин, кој е присутен во соја, но во помало количество. Супституцијата на С5 или на С8 со изопреноидниот остаток (пренил остаток) се нарекува пренилација, а резултира со создавање на пренил-изофлавоноиди кои се карактеризираат со зголемена липофилност, што позитивно влијае врз нивниот афинитет кон биолошките мембрани, со што се подобрува комуникацијата со целните протеини. Еден од позначајните е 8-пренил-нарингенин (слика 111) кој се јавува во цветот од хмељ. Докажано е дека ова соединение има силно изразено хормонско естрогенско дејство и спаѓа во групата на фитоестрогени.

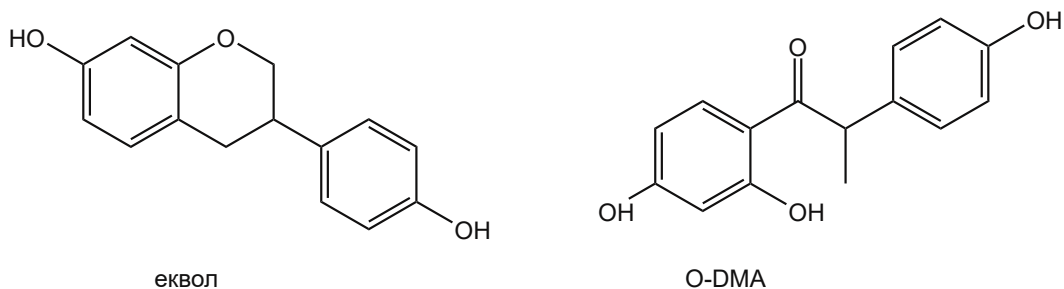


Слика 111. Структура на 8-пренил-нарингенин

Изофлавононите во растенијата се акумулираат како О-гликозиди, како што се генистин и даидзин во сојата. Во природата, иако поретко, се јавуваат и С-гликозиди, што се идентификувани во некои растенија или се добиваат по пат на индустриска синтеза. Информациите за биолошката активност на С-гликозиди се ретки, а најголемо значење има природниот генистеин-С-гликозид или пуерарин, што се јавува во растението пуерариа (= куцу). Врз основа на својствата и метаболизмот, може да се очекува зголемена отпорност на С-гликозидите на деградација од бактеријската флора во гастроинтестиналниот тракт. Познато е дека О-гликозилацијата ја намалува биоактивноста на флавононите, додека С-гликозилацијата може да ги подобри некои од придобивките на флавононите врз здравјето на човекот, вклучувајќи го и нивниот антиоксидативен и антидијабетичен потенцијал.

Биолошко-фармаколошки дејства на изофлавонони. Изофлавоноидите покажуваат антиоксидативен потенцијал, што често е причина за позитивните ефекти врз човековото здравје. Докажано е нивното учество во редокс реакции и во чистењето на слободните радикали. Се сметаат за корисни хемосинтетички маркери. Поради структура што е слична со женските полови хормони (естрогени), дејствуваат слично на естроген и се вбројуваат во групата фитоестрогени. Се врзуваат за естрогенските рецептори и ги блокираат штетните ефекти на природниот естроген, при што овозможуваат заштита од развој на хормон-зависни канцери, како што се канцер на дојка и канцер на матка. Во менопаузата кај жените овозможуваат заштита од штетните дејства што се должат на недостаток на ендогените естрогени, намалувајќи ги симптомите на менопаузата (обилно потење и топли бранови, инсомнија и асцијативно однесување) и обезбедувајќи заштита од појава на остеопороза, покачен крвен притисок и други кардиолошки и васкуларни проблеми. Фитоестрогенското дејство на изофлавоноидите се смета за најзначајно дејство на овие соедине-

нија. Испитувањата покажале дека позитивните ефекти на фитоестрогените од групата изофлаво-ни зависат од нивниот метаболизам. Во растенијата се присутни во хетерозиден облик и по перо-лен внес се хидролизираат под дејство на гастричниот сок, при што се ослободуваат агликони кои понатаму поминуваат во цревата. Под дејството на цревната микрофлора даидзеинот се метабо-лизира давајќи два типа на активни производи: еквол и О-десметил-анголензин (О-DMA) (слика 112). Притоа, испитувањата покажале дека метаболизирањето до еквол е многу значајно за ефек-тите на даидзеинот, но и дека екволот не се создава задолжително и количеството на создадениот еквол не е во корелација со количеството на внесениот даидзеин. Имено, некои организми имаат карактеристики на микрофлората што се погодни за создавање на еквол, а другите не. Така стану-ва јасно зошто различни организми различно реагираат на изофлавононите од соја и зошто само некои можат да ги почувствуваат позитивните ефекти од дејството на овие соединенија. За разли-ка од даидзеинот, генстеинот од сојата се метаболизира во дихидрогенистеин, а потоа во 6-хидро-кси-DMA (6-OH-DMA). Така, по внес на соја и соини производи, со анализа на крвта и на урината може да се најдат: даидзеин, генистеин, еквол, О-DMA и 6-OH-DMA. Еквол може да се изолира како чиста супстанција или да се синтетизира и истиот може да се користи во форма на додатоци на исхраната за регулирање на менопаузалните проблеми кај жената.



Слика 112. Метаболитите на даидзеинот што се создава под дејство на цревната бактериска флора кај човекот

Освен што ја покажуваат фитоестрогенската активност, изофлавоноите промовираат неколку биолошки процеси како што се: вклучување во регулацијата на клеточниот циклус, инхибирање на апоптозата, инхибирање на тирозинкиназата и сл. Најголем број податоци за дејствата се однесуваат на генистеинот од сојата за кој е утврдено дека: игра улога во спречувањето рак на простатата и на дојка, има изразено антифунгално и антибактериско дејство, учествува во третманот на мукополисахаридоза и на цистична фиброза, ја спречува атеросклерозата со инхибиција на оксидацијата на LDL, што е суштинско во атерогенезата и сл. Се смета дека изразените антиоксидативни својства на генистеин и на сличните изофлавоноиди, се значајни за нивните антиканцерогени ефекти.

Значење и употреба на изофлавоени. Најголемо практично значење имаат изофлавоените со фитоестрогенска активност. Тие во поголема мера се присутни во мешункастиот зеленчук и особено во семето од соја. Иако сојата и нејзините производи се конзумираат насекаде, сепак сојата главно е застапена во исхраната во: Кина, Кореја, Јапонија и во земјите од Југоисточна Азија. Испитувањата покажале дека токму внесот на фитоестрогените со храна базирана на соја овозможува заштита од развој на хормон-зависните канцери, како што се канцер на дојка и канцер на матка, што се гледа преку многу ниската инциденца на ваквите канцери во Кина, во Јапонија и во другите земји од Далечниот Исток. Овие ефекти се особено значајни во репродуктивниот период на жената, кога нивото на ендогените естрогени хормони е високо. Дополнително, утврдено е дека жените во Јапонија речиси и да не развиваат симптоми на менопауза и не страдаат од губење на

густината на коскено то ткиво (остеопороза), што повторно се должи на ефектите на фитоестрогените од сојата, но во овој случај фитоестрогените ги надополнуваат недостатоците на ендогените хормони и овозможуваат заштитно дејство.

Денес практичното значење на изофлавоноидите, освен како фитоестрогени, се гледа и во следното:

- Даидзеин и неговиот метаболит еквол покажуваат својство на инхибиција на растот на тумори во експериментални услови, на човечки клеточни линии од тумор на дојка. Резултатите од овие испитувања се покажаа корисни при дизајнирање на нови лекови против ракот на дојка и во иднина би можеле да играат важна улога во ова поле. Поновите испитувања покажуваат дека изофлавоноидите може да се користат како биомаркери за откривање на тумори.
- Диететските изофлавоноиди, кои главно потекнуваат од соја, може позитивно да влијаат на учењето и на меморијата.
- Генистеин покажува динамична контрола против фотооштетувањето предизвикано од UV-B-зрачење врз човечката кожа.
- Изофлавоноидите на соја поседуваат изразени антимикробни својства и може да се користат во производство на заштитни вештачки полимерни или хемиски базирани облоги, со што играат улога како антипатогени биофилмови.
- Генистеин ги заштитува нормалните ткивата и ја намалува сензибилизацијата при зрачење на тумори. Радиолошката употреба на изофлавоноидите станува сè позначајна и свртува големо влијание во последно време, со оглед на потенцијалот за заштита и намалување на оштетувањата што се предизвикани од зрачење.
- Некои изофлавоноиди на соја се смета дека ги подобруваат вредностите на серумските липиди и го намалуваат LDL. Во оваа смисла значајно е што во 90-тите години од минатиот век, Американската агенција за храна и лекови (FDA) го одобри здравственото тврдење дека 25 грама протеин од соја на ден може да има корисен ефект во однос на ризикот од срцеви заболувања. Ова тврдење е поддржано од голем број клинички испитувања кои покажале дека со користење на протеински концентрат од соја успешно се намалува нивото на лошиот холестерол во циркулацијата. Не е со сигурност утврдено дека дејството се должи токму на изофлавоноидите од сојата.
- Чистите изофлавоноиди, генистеин и даизен, ја инхибираат гликозилизацијата на хемоглобинот. Инхибицијата на овој процес може да биде корисна кај лица со дијабетес.
- Изофлавоноидите во комбинација со витамини, протеини и други естрогени може да се користат во контролата на многу болести како што се остеопорозата и злоупотребата на наркотични средства.

Екстракција и испитување на изофлавоноиди. Изборот на методот на екстракција на изофлавоноидите зависи од нивната структура и од карактеристиките на растителниот материјал. Традиционалните методи како што се: мацерација, перколација и Соксклет екстракција се користат со децении. Новите методи вклучуваат:

- Екстракција со помош на ултразвук, која е тип на забрзана екстракција што го намалува времето и ја зголемува продуктивноста на екстракција.
- Екстракција со растворувач или со примена на колонска хроматографија се користи за екстракција на изофлавоноидите од семето на соја. За сепарирање на компонентите се применува фракционирањето со пена (анг. foam), добиените производи се нарекуваат фоамати. Од нив се изолираат агликони на изофлавоноиди.

- Водена двофазна екстракција (Aqueous two-phase extraction = АТРЕ). Екстракцијата се комбинира со помош на микробранови (МА-АТРЕ). Во споредба со традиционалните техники овој метод на екстракција е динамичен и моќен. Користена е за екстракција и збогатување на екстрактите со генистеин и биоханин А од определени растителни суровини.
- Екстракција со кавитација со негативен притисок (Negative pressure cavitation extraction = NPCE) се користи за забрзување на мешавината супстрат-растворувач и поедноставување на преносот на масата. Користена е за екстракција на значајни биоактивни изофлавоноиди: прунетин, текторигенин, генистеин и биоханин А.
- Цврсто-течна екстракција со мешавина од метанол и вода или етанол и ацетонитрил, како растворувачи, се користи за екстракција на изофлавоноиди од цврсти материјали. Овој метод бил применет за екстракција на изофлавоноиди од некои традиционални кинески растителни суровини. За идентификација на компонентите била применета масената спектрометрија (ESI-MS во негативен мод).

За идентификација и карактеризација на изофлавоноидите, во минатото се користеле различни систематски методи како TLC, UV-спектроскопија, HPLC и CE. Во денешно време, реверзно-фазната HPLC е често применувана техника за анализа на растителни екстракти. Комбинирањето на HPLC со NMR или со MS, овозможува идентификација и карактеризација на изофлавоноидите, но и на нивните метаболити во плазмата, урината и изметот, со што се обезбедуваат податоци за фармакокинетиката на изофлавоноидите. За идентификација на изофлавоноиди и нивни конјугати во црвена детелина успешно може да се користи UHPLC во комбинација со DAD-детектор и во комбинација со масена спектрометрија (q-TOF-MS).

8.8. Танини

Танините се растворливи во вода, нетоксични, полифенолни соединенија, со молекулски маси што се движат од 500 до 3000 Da (далтони). Имаат опор (трпкав) вкус што се должи на врзувањето на танините со протеините и мукополисахаридите од усната шуплина (атстрингетно дејство). Реагираат со соли на тешки метали, алкалоиди и протеини, градејќи стабилни и тешко растворливи комплекси. Својството да се врзуваат и да ги таложат протеините се користи многу одамна во процесот на штавење на животинската кожа. Всушност, самиот поим танин за прв пат бил употребен токму за означување на растителна штавена суровина. Соединенија што имаат помали молекуларни маси од 500 или поголеми од 3000 не реагираат како танини, со протеините не градат стабилни талози, поради што и не се сметаат за танини.

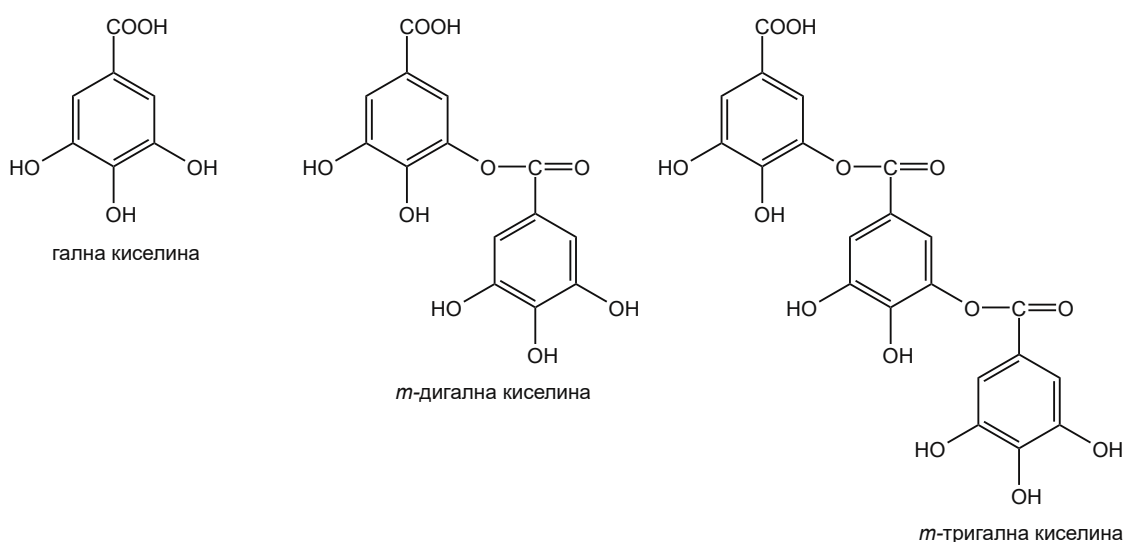
Танините се доминантно присутни во растенијата, веднаш по целулозата, хемицелулозата и лигнинот. Една петтина од содржината на сува маса на растенијата во најголем број случаи отпаѓа на танините. Во зависност од хемиската градба танините се делат во две основни групи:

- хидролизирачки танини (естри на фенолни киселини и шеќери) и
- кондензирани танини (кондензирани производи на флавани).

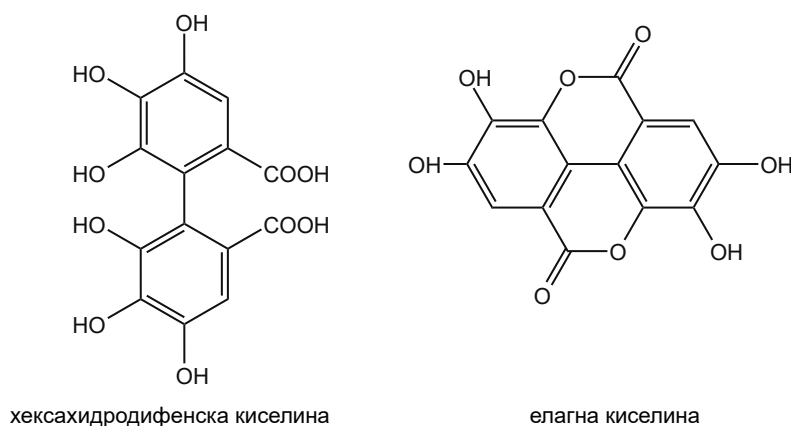
Некои автори танините што се формираат со конјугација на проантоцијанидините и хидролизирачките танини ги означуваат како „комплексни танини“.

8.8.1. Хидролизирачки танини

Хидролизирачките танини претставуваат естри на гална киселина или нејзини деривати, врзани за еден централен молекул на шеќер. Под дејство на киселини и ензими танази се хидролизират до полифенолни киселини и шеќер. Естерификувањето на ОН-групите на шеќерот може да биде со слободна гална киселина или со нејзини производи: две или три молекули гална киселина меѓусебно се естерификуваат и градат депсиди, односно дидепсиди (најчесто *m*-дигална или *m*-тригална киселина) (слика 113) што се врзуваат за ОН-групите на шеќерот. Можна е и кондензација на киселините со C2-C2' поврзување, при што се создава хексахидроксидифенска киселина, која спонтано кондензира во елагна киселина (слика 114).



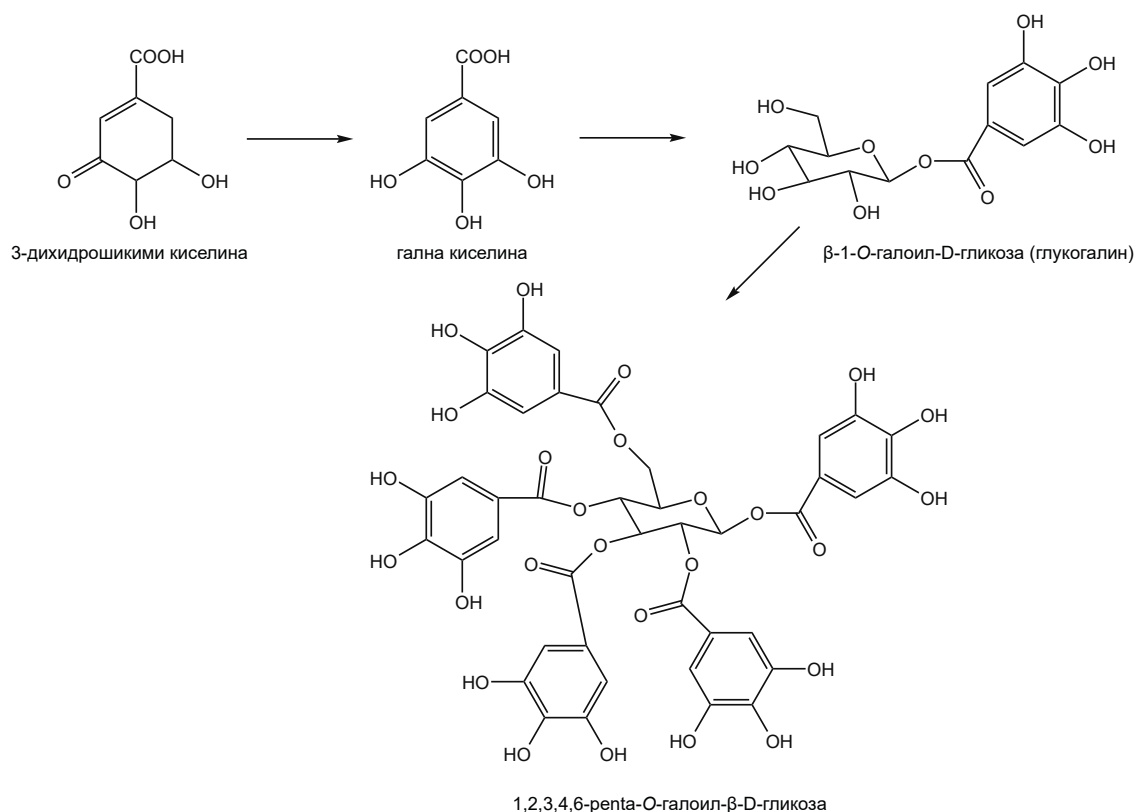
Слика 113. Полифенолни киселини и естри (депсиди) на гална киселина што влегуваат во градба на хидролизирачки танини



Слика 114. Кондензирани производи на гална киселина

Хидролизирачките танини се создаваат според шемата прикажана на слика 115. Биосинтетските генерално потекнуваат од шикими киселина, од која се создава гална киселина. Централно место во биосинтезата има пентагалоилгликоза, галотанин што растенијата многу лесно го синтетизираат со естерификација на ОН-групите на гликоза со гална киселина. Понатамошната биосинтеза може да оди во две насоки: формирање гални танини (галотанини) или формирање елаготанини (елагни танини). Моногалоилгликоза и дигалоилгликоза не покажуваат танински својства (не таложат протеини) бидејќи имаат многу мали молекули (< 500).

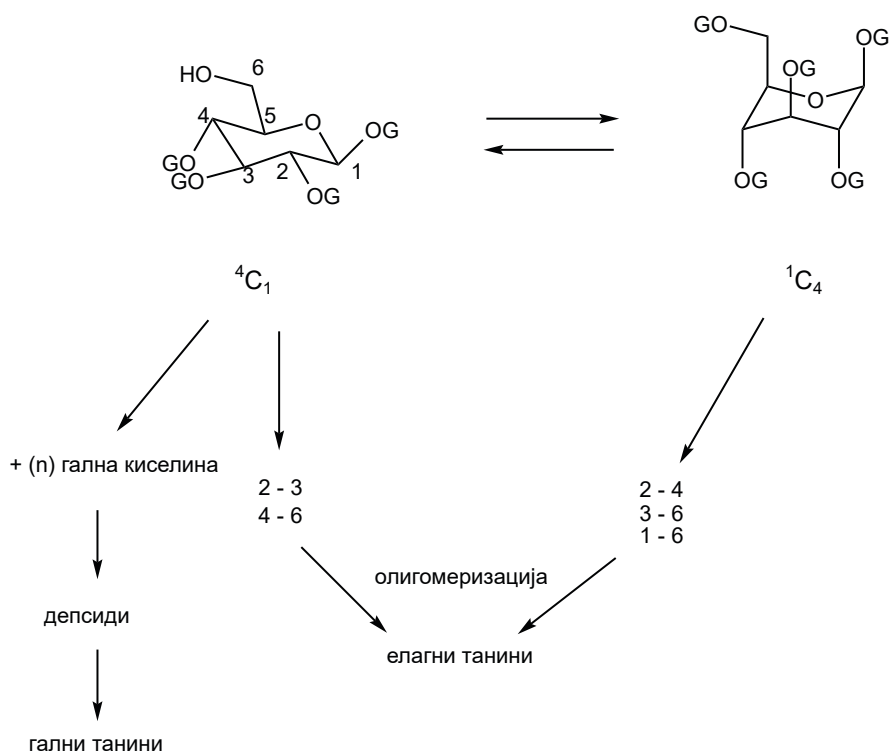
1. Формирање галотанини. Создавањето поголеми молекули од галотанините (од хекса до ундекагалоил гликоза) настанува со врзување бочни ланци од гална, од дигална или од тригална киселина најчесто на C_3 , на C_4 и на C_6 позиции на гликозата (ретко и на C_1 и на C_2). Можно е и врзување на ланци со поголем број молекули од гална киселина. Овие танини во литературата се среќаваат и со називот пирогални танини.



Слика 115. Биосинтеза на хидролизирачки танини

2. Формирање елагни танини. Елагните танини можат да се создадат на два начина:
 - Преку создавање на хексахидроксидифенска киселина (HNHP) со $C2-C2'$ врзување на галната киселина и формирање естри со гликоза (моно или диестри со HNHP на позициите 1,2 или 1,3 и формирање хексахидроксидифенил моноестер на гликоза или бис-естер на гликоза) и врзување гална или дигална киселина на други слободни хидроксилни групи на гликозата, најчесто на $C2-C3$ или $C4-C6$ позиции, во случаи кога гликозата има $^4C_1$ конфигурација (слика 116).

- Со оксидирање на хексахидроксидифенска киселина (HHDP) во дехидрохексахидроксидифенска киселина (DHHDP) и формирање естри со гликоза (моно или бис како во претходниот случај) и дополнително врзување на гална и на дигална киселина на C2-C4 или C3-C6 позиции, при што гликозата најчесто има $^1C_4$ конфигурација. Ако се отвори пиранскиот прстен на гликозата, тогаш и алдехидната група на C₁ може да стапи во реакции на естерификација и дополнителни врзувања настануваат на C1-C6 места. Вакви танини во природата се јавуваат многу поретко (слика 116).

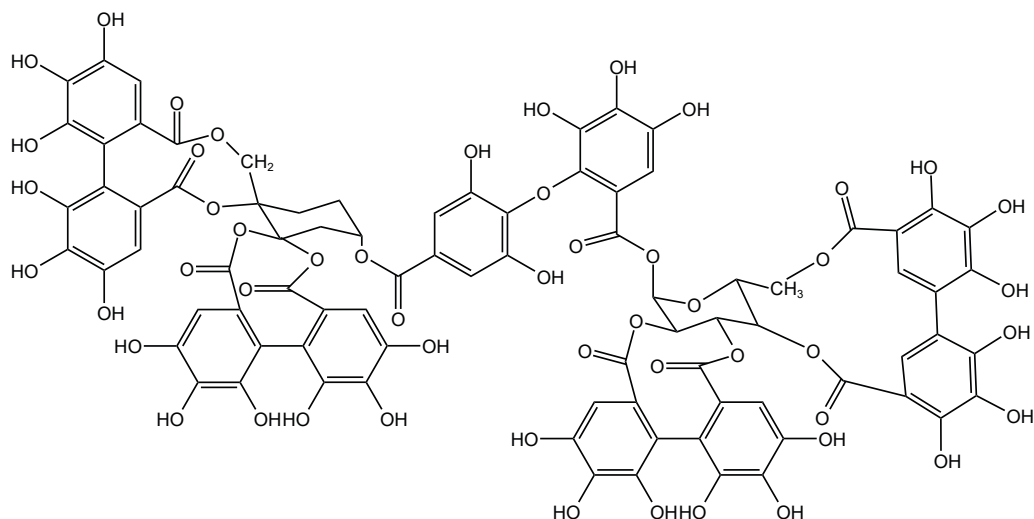


Слика 116. Формирање на елагни и посложени гални танини

Галотанините (пирогалните танини) се широко распространети во растителниот свет. Најчесто се јавува пентагалоил-гликоза и нејзините димерни или тримерни форми. Изолирана во чиста форма доаѓа под назив танинска киселина. Елагните танини поретко се среќаваат во растенијата. По хидролиза, хексахидроксидифенската киселина спонтано кондензира во елагна киселина, од каде доаѓа и името на оваа група танини. Во поголемо количество се присутни во кората од калинка (*Punica granatum* L.).

Олигомерни хидролизирачки танини. Интермолекуларното врзување на мономерни форми на елагни и на гални танини со C-C или C-O-C врски доведува до создавање на олигомерни хидролизирачки танини, распространети генерално во дикотиледони растенија. Поседуваат голем структурен диверзитет, а познати се околу 150 различни структури. Според некои автори можна е класификација на овие соединенија врз база на типот на врската и хемиската природа на остатокот што се врзуваат на мономерните единици при формирање олигомери. Ако со G се означи остаток од гална киселина, а со D остаток од хексакидроксидифенска киселина, можни се 5 различни типови соединенија што скратено можат да се означат како: GOG; DOG, GOD, D(OG)₂ и олигомерни C-гликозиди на елагни танини (на пр., робурини во кората од даб) (при што O = кислород). Во литературата се опишани олигомерни хидролизирачки танини само од групата на елагни

танини, и веројатно само овој тип олигомерни хидролизирачки танини и егзистира во природата. На слика 117 е прикажан карактеристичен димерен елаготанин агримонин, изолиран од растението петопрст (*Potentilla erecta* (L.) Raeusch.), познат и под името *Potentillin*-димер.



Слика 117. Хемиска структура на олигомерен хидролизирачки танини агримонин (*Potentillin*-димер)

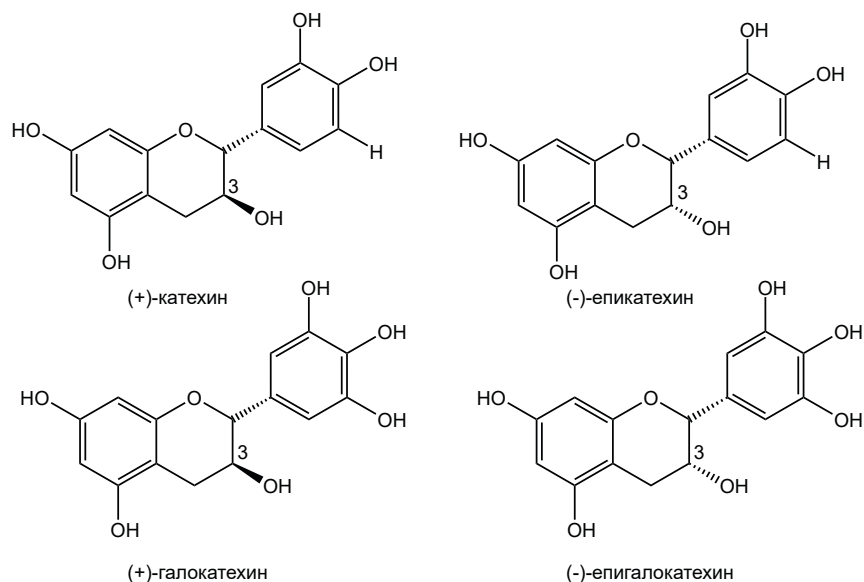
8.8.2. Кондензирани танини

Кондензираните танини се создаваат со кондензирање на две или на повеќе молекули на флаван-3-оли (катехини и епикатехини) или флаван-3,4-диоли (леукоантоцијанидини). Присуството на асиметрични центри на позициите C-2 и C-3 на мономерните единици резултираа со четири изомери (+)-катехин, (-)-епикатехин, (+)-галокатехин и (-)-епигалокатехин (слика 118).

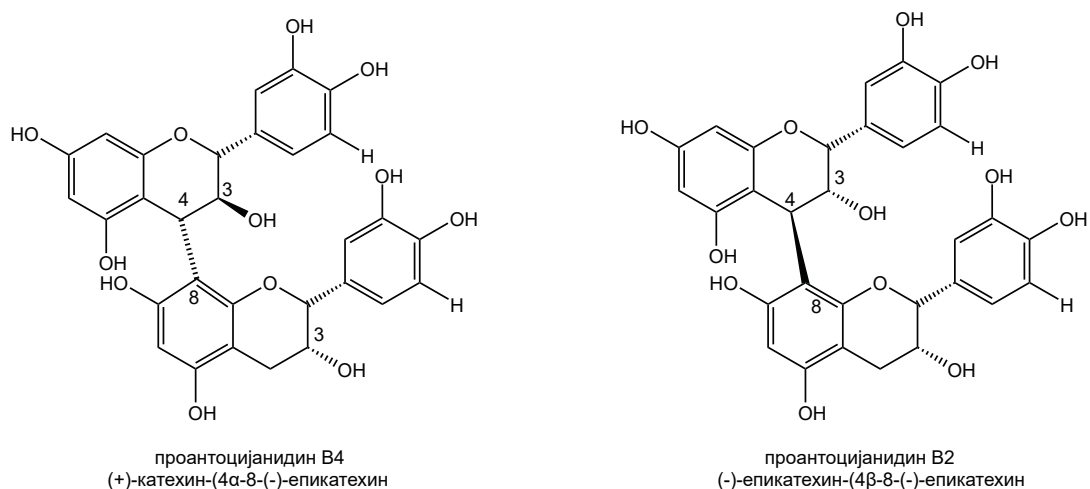
Кондензацијата настанува во позициите C4-C8 или C4-C6. Најчести прекурсори на кондензирани танини се димери, познати како проантоцијанидини. Се јавуваат во два основни типа:

- проантоцијанидини од тип В, во кои спаѓаат наједноставните димери познати како проантоцијанидини: В-1, В-2, В-3 и В-4. Кај нив доаѓа до поврзување на молекул од катехин со молекул од епикатехин, или меѓусебно поврзување на две молекули катехин или на епикатехин, со C4-C8 поврзување, со различна конфигурација на врската. Се јавуваат во слободна форма и во растителниот свет се многу чести (слика 119). Могли се други комбинации на флаван-3-оли (кетехин и/или епикатехин и/или катехин).
- проантоцијанидини од тип А, димери кај кои се јавува двојно внатрешно поврзување (C4-C8 и C2-O-C7). Најпознати танини од оваа група се ескулотанини (слика 120). Се означуваат како проантоцијанидини А-1 и А-2, и сл.

Во двете групи врзувањето може да биде и C4-C6 (се јавува кај проантоцијанидин В-5). Процијанидините можат да се јават и како *O*-или како *C*-гликозиди, како димери, димерни форми со халкони и друг тип соединенија.



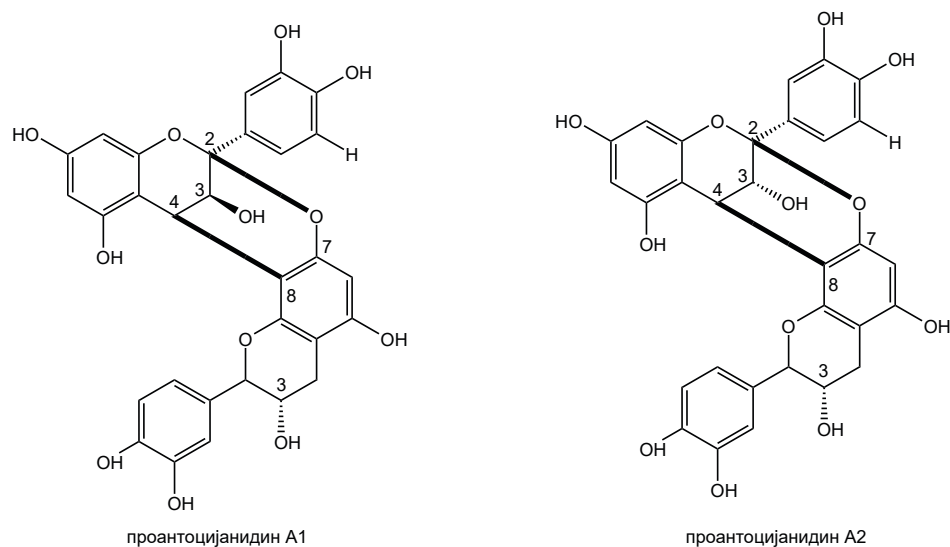
Слика 118. Најзначајните флаван-3-оли што влегуваат во градба на кондензирани танини



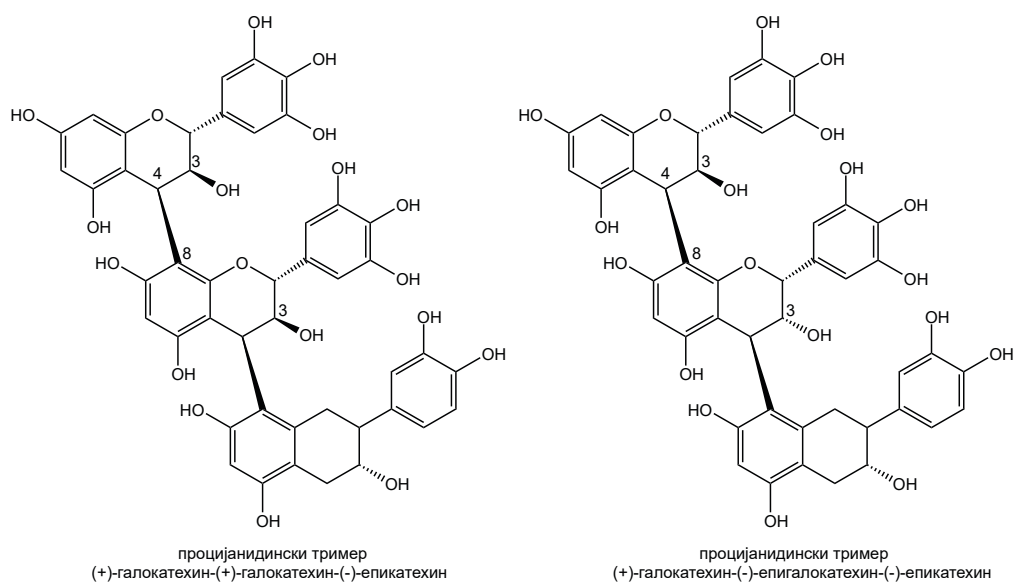
Слика 119. Димерни проантоцијанидини од тип В

Проантоцијанидините покажуваат танинско однесување. Некои автори ги сметаат за танини, а некои за прекурсори на сложени кондензирани танини.

Морските алги содржат посебна група танини што се означени како флоротанини. Претставуваат деривати на флороглуцинол и најчесто се определени олигомери што ги создаваат кафеавите алги, а кои имаат танинска активност. Некои флоротанини се присутни во јадливите кафеави алги од родот *Ecklonia*. Овие соединенија покажале биолошка активност како антиплазмин инхибитори, антиалергиски активни агенси и традиционални лекови за третман на гинеколошки проблеми.

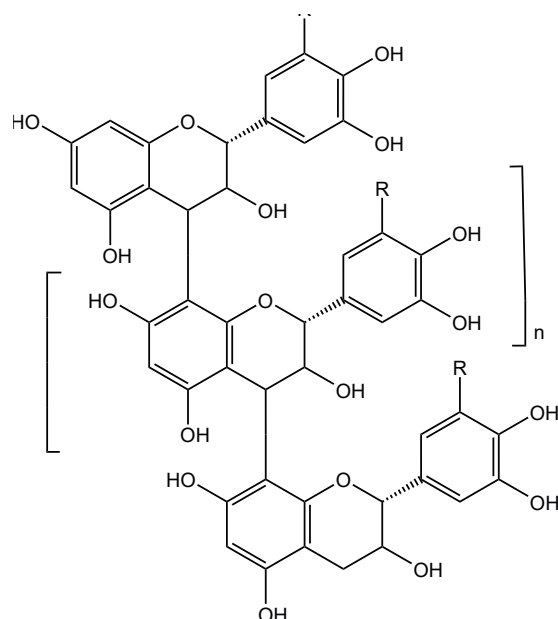


Слика 120. Димерен проантоцијанидин од тип А



Слика 121. Структура на некои процијанидински тримери

Олигомерни форми на кондензирани танини. Настануваат со постепено врзување на флавански единици. На пример, C-1 тример се состои од две молекули епикатехин и една молекула катехин, врзани во низа со C4-C8 врзување, а C-2 тример се состои од три молекули катехин врзани со C4-C8 врски, но можни се и други комбинации (слика 121). Доколку се случи полимеризација (врските да се повторуваат n -пати) се создава кондензиран танин (слика 122).



Слика 122. Структура на процијанидински полимер – кондензиран танин

Кондензираните танини се распространети во листови и во кора на дрвенести растенија на фамилиите Rosaceae (вишна, слива, круша и др.), Hamamelidaceae (хамамелис), Cupressaceae (смрека, чемпрес) и Pinaceae (бор, ела, ариш). Во некои растенија се среќаваат танини од двете групи (кора од даб). Според некои автори, вакви смеси од двете групи танини се означуваат како мешани танини.

Физичко-хемиски својства на танините. Танините се раствораат во вода и градат колоидни раствори. Растворливи се и во разблажени алкалии, алкохол и ацетон, а послабо во некои органски растворувачи. Растворливоста и стабилноста на водените раствори зависи од градбата на танинот (степенот на полимеризацијата), а главно се краткотрајно стабилни. Од водените раствори танините се таложат со соли на тешки метали, алкалоиди и протеини.

Двете групи танини имаат реактивни ОН-групи, преку кои формираат комплекси со протеини. Природата на интеракцијата помеѓу танините и протеините зависи од повеќе фактори: големина на танините и на протеините (мора да имаат поголема молекуларна тежина), стереохемијата, природата и градбата на протеинот (присуство на аминокиселината пролин) и соодветноста на медиумот за интеракција (јонска јачина и pH). Општо земено, овие интеракции може да се појават преку 4 можни врски: ковалентни или јонски врски, преку хидрофобна интеракција или преку водородна врска. Врските помеѓу танините и протеините се нестабилни. Тие се формираат од фенолни групи на танини и карбонилни групи на пептиди. Стабилноста на танин-протеинскиот комплекс зависи од бројот на врзани танини и бројот на повторени секвенци на аминокиселини во протеинот. Самите интеракции се динамични и зависат од времето. Дополнително, конформационската флексибилност и на танинот и на протеинот е од витално значење за посилна интеракција. Зголемувањето на бројот на полифенолни галоил групи позитивно влијае на ефикасноста на врзувањето со протеините. Со ковалентни врски се создаваат многу стабилни, иреверзибилни комплекси, додека со јонски или со водородни врски нестабилни и реверзибилни комплекси.

Хидролизирачките и кондензираните танини се разликуваат и според нивното однесување во кисел медиум, на повисока температура. Хидролизирачките танини се естри на гликоза и при ензимска или кисела хидролиза даваат шеќер, гална и/или хексахидродифенска киселина, што брзо и спонтано преоѓа во елагна киселина. Олигомерните танини со хидролиза даваат компоненти изградени од три или четири ароматски прстена, а структурата на овие компоненти зависи од при-

родата на воспоставените врски помеѓу мономерите. Во присуство на киселини и на ензими кондензираните танини не хидролизираат, туку доаѓа до дополнителни кондензации и создавање полимери што содржат преку 50 мономерни флавани. Овие соединенија во процесот на полимеризација се оксидираат под дејство на ензими пероксидази и градат флобафени (флобафенски или танински црвенила). Флобафените се одговорни за црвената боја на растителните органи (кори, корења, ризоми, листови). Немаат атстрингентни својства и не ги даваат карактеристичните реакции за танините.

Двете групи танини се разликуваат и според производите од нивната сува дестилација, при која хидролизирачките танини даваат флороглуцинол, а кондензираните катехол.

Биолошко-фармаколошко дејство на танините. Едно од најзначајните дејства на танините е атстрингентното дејство што се должи на реакција со протеините и на создавањето на нерастворливи комплекси. Нанесени на кожа или на слузници се врзуваат за протеините од површинските слоеви, предизвикуваат собирање на ткивото и овозможуваат зараснување на помали рани на кожа и на слузници. Хидролизирачките танини се поактивни, се врзуваат за аминокиселините со водородни врски и создаваат реверзибилни комплекси, додека катехинските танини во кисело рН спонтано се оксидираат до хинони, реагираат со нуклеофилните групи на протеините и со ковалентни врски создаваат иреверзибилни комплекси. На овој начин танините реагираат и со ензимите во гастроинтестиналниот тракт, но и со протеините на микроорганизмите (бактерии, габи и некои вируси) на што се должи антимикробното дејство. Танините ги смируваат и воспалителните процеси и рани на кожата и на слузниците (антиинфламаторно дејство). Различни испитувања потврдиле дека танините дејствуваат антивирусно врз вирусот на херпес тип 1 и 2, вирусот на грип тип А, HIV-вирусот, вирусот на хепатитис А, цитромегало-вирусот и др. Танините дејствуваат и кардиопротективно, некои се значајни како антидијабетични агенси, како средства за намалување на згоеност и како агенси со потенцијал за цитотоксична активност.

Значење и употреба на танините. Едно од најзначајните дејства на танините е атстрингентното дејство што се должи на реакцијата со протеини и на создавање на нерастворливи комплекси. Човекот секојдневно е изложен на дејството на танини пред сè преку храната. Храна богата со танини се смета за храна со ниска нутритивна вредност. Голем извор на танини е грозјето, зелениот и црниот чај. Количеството на танините во грозјето е критично важно при производството на вино, бидејќи танините се одговорни за балансот на винската палета и одржување на комплексноста. Танините се многу важни и за одржување на стабилноста на боја и помагаат во стареење на виното. Епидемиолошките студии покажаа дека редовна консумација на умерено количество црвено вино на ден овозможува заштита на срцето и на кардиоваскуларниот систем од срцев удар и други нарушувања и болести. Здравствените придобивки од овој карактер се должат на полифенолните компоненти на виното, проантоцијанидините, танините и слободните катехини. Се смета дека т.н. „Француски парадокс“ се должи токму на антиоксидативната активност на процијанидините од црвеното вино, бидејќи е утврдено дека во некои региони од Франција, умерена и редовна консумација на црвено вино довела до намален број случаи на кардиоваскуларни (КВС) заболувања и покрај тоа што исхраната изобилувала со масни материи. Антиоксидативните компоненти на црвеното вино го намалуваат LDL-холестеролот на сметка на HDL-холестерол и влијаат протективно во однос на процесот на атеросклероза со што го намалуваат ризикот од срцев удар и од други КВС-заболувања. Чајот, особено зелениот чај, содржи високо количество на танини кои се носители на антиоксидативната активност. Тие го балансираат ослободувањето на азот-моноксид (NO), бидејќи неговото експресивно присуство доведува до инфламација и оштетување на ткивата. За танините од зелениот чај се врзува и потентна антиканцер активност, а освен оние во чајот, танините што се присутни во друг вид храна (на пр. овошни екстракти, бобичести плодови), исто така, покажуваат изразена антиоксидативна активност. Танините од овошјето и зеленчукот и нивните преработки го намалуваат варењето на скробот преку формирање на комплекс со човечка α -амилаза и нејзино блокирање. Потенцијалот за инхибирањето на овој ензим се проучува и како можен механизам на функционална храна во третманот на дијабетес. Испитувањата покажаа дека

танините го попречуваат варењето на јаглехидратите, ослободувањето на гликозата и нејзината апсорпција. Дополнително, танините комуницираат со масното ткиво, инхибираат адипогенеза и директно ја подобруваат активноста на инсулин. Овие наоди ја прошируваат можната апликација на танините како антидијабетни лекови. Од друга страна, гуми за цвакање што содржат полифеноли од чај дејствуваат против вирусот на инфлуенца (грип) и го спречуваат неговото ширење. Процијанидинските мономерни и олигомери на какао и екстракти од какао дејствуваат антиинфламаторно и се покажаа корисни за лица со астматични состојби или со вирусни инфекции или со ризик од вирусни инфекции. Во некои европски земји (Велика Британија) какао во прав во форма на напиток се препорачува за смирување на кашлицата.

Танините имаат и голема комерцијална употреба. Во прехранбената индустрија се користат како адитиви и конзерванси на храната. Во согласност со европските регулативи, танинската киселина (пентагалоил-гликоза) е средство што се користи за подобрување на вкусот на храната. Иако бобинките се најбогатиот диететски извор на танини, вкупната содржина на танини во храната се движи од 1 mg/kg кај капината до 2 g/kg кај костените. Атстрингентноста на танините е нивното најпроучено својство и познато е дека има важни ефекти врз квалитетот на храната на различни начини. Откриено е дека различни преработени прехранбени производи содржат танини, вклучително и застарени вина и алкохолни пијалаци, на кои танините им се додадени за да се подобри нивната антиоксидантна активност. Танините се додаваат и во други прехранбени производи, како што се преработките од месо и од риба.

Различни растителни екстракти што содржат проантоцијанидини и/или танини се користат во производство на додатоци на исхраната кои се промовираат како моќни антиоксиданти и антиканцер производи. Во оваа група особено се важни, заради нивното масовно присуство на пазарот, додатоци на исхраната што содржат екстракт од семе од црно грозје, екстракт од калинка, екстракт од плод од глог, екстракт од кора од приморски бор познат под името Пикногенол или производи што содржат чиста танинска киселина. Денес се актуелни и екстрактот од зелено кафе без кофеин кој се користи во производи за редукција на зголемена телесна тежина, екстракт од кора од шведска бреза што се користи како антиоксидант и антигабичен производ и екстракт од брусница која е во употреба како антибактериски агенс при инфекции на долниот уринарен тракт. Медицинските растенија што содржат танини се користат екстерно за третман на инфламаторни процеси во уста и грло, за третман на помали оштетувања на кожа и на слузници, особено за третман на помали површински крвавења и изгореници. Процијанидините дејствуваат протективно врз сидот на крвни садови, ги зајакнуваат и ја намалуваат нивната кртост и пропустливост. Наоѓаат примена во третманот на поткожни капиларни крвавења, на отпуштени вени и на хемороиди. Ако се користат интерно, пер ос, најзначајна е употребата во третманот на дијареја (антидијароични средства) и за третман на инфективни, воспалителни процеси на лигавицата на органите од дигестивниот тракт. Создавањето нерастворливи комплекси со тешките метали и со алкалоидите овозможува употреба на танини како антитоти при труења со овие агенсии.

Танините се користат во индустријата за штавење на кожата. Кожа обработена со танини (штавена кожа) во допир со вода не се стврднува, не пропушта вода, а ја задржува мекоста и еластичноста. И покрај низа други атстрингентни средства на пазарот, танините како природните штавни суровини, сè уште имаат голема употреба во оваа намена.

8.8.3. Екстракција и испитување на танините

Екстракција, изолација и пречистување. Општо земено, екстракцијата на танини од растителен материјал се врши со помош на растворувачи како што се етанол, метанол, ацетон или водени мешавини на овие растворувачи, најчесто со мацерација или со подготовка на декокот. Пред да се започне со екстракција, растителниот материјал се третира со петролетер или со дихлорметан за да се отстранат липофилните компоненти. Проантоцијанидините со низок степен на полимеризација и едноставни пирогални танини може лесно да се екстрахираат со етил ацетат. Раздвојувањето на суровиот екстракт се врши на колона со Sephadex LH-20 и со RP (реверзно-фазен) материјал, со алкохол-водени-мешавини или ацетон-водени-мешавини. Притоа неопходно е да се работи во услови заштитени од светлина, за да не дојде до оксидација на процијанидините односно хидролиза на пирогалите танини. Екстракцијата по Сокслет е подобар метод во споредба со ладна мацерација. Ефективноста на оваа екстракција главно се заснова на температурата на испарување и индексот на поларитет на растворувачот. Соодветната температура на екстракција ја подобрува дифузијата на танините во растворувачот и циркулацијата на растворувачот. Како погоден растворувач се покажал 50 % етанол, но успешно може да се користи и вода и смеси на вода со етанол. Од посовремените техники на екстракција се користат:

- Екстракција со помош на микробранови (MAE), со која се скратува потребното време и се постигнуа поголема ефикасност на процесот во споредба со класичната екстракција со рефлукс. Понатамошното пречистување и фракционирање на екстрактите се врши со помош на хроматографски техники, најчесто на колони од силикагел, а детекција и идентификација на компонентите од интерес се прави со примена на различни техники.
- Екстракција со вода под притисок (Pressurized water extraction, PWE). Температурата на екстракција може да се движи од 60 до 100 °C, а растворувач е главно вода (супкритична вода, прегреана вода, вода под притисок и забрзана екстракција со вода или со друг растворувач). PWE може да биде статична и динамична. Времето на динамичката екстракција е пократко отколку при статичната и танините се помалку деградирани, од каде што ефикасноста на екстракција и разградувањето на танините зависат од времето на екстракција. Односот на дистрибуција на танините во водата игра важна улога во ефикасноста на процесот. Динамичната екстракција со вода под притисок е поскапа за изведување. Температурата на екстракција се движи од атмосферската точка на вриење на водата (100 °C) до критичната точка на водата (374 °C).
- Метод на мацерација со помош на ултразвук вообичаено се користи за екстракција на танини од растенија, микроалги и алги. Факторите кои силно влијаат на приносот на екстракција на танини се: ултразвучната моќност, температурата, времето на третманот со ултразвук и фреквенцијата на звучните бранови. Екстракцијата со помош на ултразвук е евтина технологија, со мала инвестиција, но со висока ефикасност за екстракција на танини, со намалување на времето и потрошувачката на растворувачи во споредба со класичните методи како што е мацерацијата. Овој метод е еколошки прифатлив, носи помал ризик од загадување на средината и има помало влијание врз оригиналните молекуларни структури на танините.
- Метод на јонски раствори за екстракција со помош на микробранови (ILMAE) е високо ефикасен комбиниран метод за екстракција на танини од растенија. Соодносот на јонски течен раствор : материјал е 20 : 1. Во моментот, постојат бројни јонски течности (на пример, [Emim]Br, [Bmim]Br, [Hmim]Br, [Omim]Br и др., каде Emim е 1-етил-3-метилимидазолиум; Bmim е 1-бутил-3-метилимидазолиум; Hmim е 1-хексил-3-метилимидазолиум; Omim е 1-октил-3-метилимидазолиум итн.). Материјалот за екстракција се натупува во јонска течност 3 часа пред екстракција, а потоа се поставува во микробранова печка во која екстракцијата трае само 10

минути, при микробранова моќност од 230 W. Како растворувачи може да се користат 1,25 M раствор на натриум хлорид и 80 % етанол.

- Екстракцијата со помош на инфрацрвени зраци (IRAE) е мацерација со помош на инфрацрвена ламба за снабдување на топлината, чија пенетрација во материјалот е поголема во споредба со другите методи. Во конвенционалните методи, растворувачот се загрева пред да се загрее материјалот, додека во IRAE-материјалот директно се загрева без загревање на растворувачот. Ефективноста на IRAE зависи од карактеристиките на апсорпција на растворувачот за екстракција, брановата должина на инфрацрвениот грејач и растојанието помеѓу IR-ламбата и материјалот. IRAE покажува поголем принос на екстракција од екстракцијата со помош на микробранова печка и екстракцијата со ултразвук, има ниска цена, ефикасноста на екстракција на танини од растителен материјал е висока, а времето е околу 30 минути.
- Суперкритична екстракција (SFE) е модерен и еколошки метод, кој ги одржува хемиските и биолошките карактеристики на танините. Се користат суперкритичните растворувачи: јаглерод диоксид, хексан, пентан, бутан, азотен оксид, сулфур хексафлуорид и флуорирани јаглерод-водороди. Суперкритичниот јаглерод диоксид се покажа дека има слаба селективност поради што се користат модификатори (корастворувачи) на CO₂, а најважни се водата и смесите етанол-вода, особено доколку се екстрахираат помалку поларните соединенија и хидролизирачките танини.
- Екстракцијата со помош на ензими (EAE) е еден од еколошките методи која користи ензими за разградување на материјалната структура на клетките (клеточниот сид) и ослободување на внатрешноста на клетките. Овој метод често се комбинира со различни други методи, но високата температура не се користи за екстракција на танини бидејќи протеините од ензимите се таложат на висока температура. Времето на екстракција или времето на ензимска обработка не треба да биде долго за да не дојде до ослободување на танините и формирање на протеинско-танински комплекси. Познато е дека танин-протеинските комплекси се формираат само кога протеините и танините имаат висока молекуларна тежина, отворена флексибилна структура и кога се присутни хидрофобни протеини со висока содржина на пролин. За да се зголеми ефикасноста на екстракцијата, третманот на клетките со ензимскиот комплекс треба да се прави пред екстракцијата на танините. Ензимскиот преттретман доведува до намалување на времето на екстракција и потрошувачката на енергија.
- Екстракција со помош на гама-зрачење (Gamma-assisted extraction - GAE) е нов метод кој користи гама-зрачење на кобалт (Co-60) за екстракција на танини. Екстракцијата со гама-зрачење од Co-60 била користена за екстракција на танините од еден вид *Anacardium*. Методот сè уште нема поширока апликативност со оглед на низа прашања што ги повлекува, меѓу кои и некои правни прашања. Она што е познато е дека за екстракцијата на танини растителните материјали може директно да се зрачат со гама-зрачење, а потоа да се натопуваат во специфичен растворувач или може директно да се озрачува мешавината на материјали и растворувачи.

Изолирање на танините најчесто се прави од водени, етанолни, ацетонски или од етил ацетатни екстракти. Најдобри резултати се постигнуваат ако се користи свеж материјал или лиофилизирано ткиво. За сепарација и за пречистување најдобро е да се користи гел филтрација. За утврдување на структурата се препорачува утврдување на спектрални карактеристики, а како една од најсигурните се смета NMR-спектралната анализа.

Идентификација и квантификација. Класичните методи за идентификација на танини се состојат во таложење на танините од воден екстракт со раствор од протеини, од алкалоиди или од соли на тешки метали. Може да се користи бромна вода со која хидролизирачките танини создаваат талог, за разлика од кондензираните што не се таложат. Овие реакции се означени како та-

ложни реакции на танини. Боени реакции вклучуваат реакција со Fe^{3+} -јони во која танините градат обоени производи, хидролизирачките танини сини, а кондензирачките зелени. Значајни боени реакции се: создавање розово обоен продукт помеѓу галотанините и калиум јодатот, розово обоен продукт што се менува во пурпурен, а потоа во син продукт, во реакција помеѓу елагните танини и азотна киселина, црвено обоен производ во реакцијата помеѓу кондензирачките танини и ванилин-HCl-реагенс и други. Во растителните екстракти танините се испитуваат со конвенционални техники: со TLC (атсорбенс целулоза или силикагел, визуализација со горенаведените реагенси) или со HPLC (реверзнофазна колона, елуент закиселен алкохол).

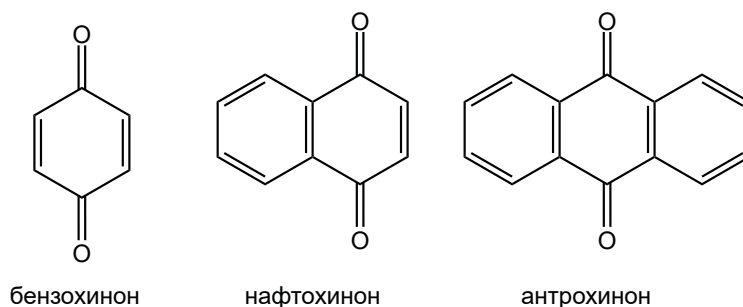
Квантитативни анализи на танини се деликатни за изведување. Основниот проблем се јавува при екстракцијата, поради неможноста со сигурност да се екстрахираат целокупните танини. Од друга страна, реагенсите што се користат за квантитативни определувања вообичаено реагираат со фенолни групи, имаат слаба селективност и реагираат и со други феноли присутни во екстрактите. За определување на содржината на танините главно се користат гравиметриски и спектрофотометриски методи. Гравиметриските методи се базираат на реакцијата со тешки метали или со протеини и создавањето на нерастворливите талози (на пример со Zn-ацетат или со некој протеин). Спектрофотометриските методи се базираат на создавањето обоени комплекси и мерењето на интензитетот на бојата (на пример, реакција помеѓу галната киселина и калиум јодатот, помеѓу елагна и азотна киселина или помеѓу проантоцијанидини и *p*-диметилбензалдехид во кисела средина). Наведените методи не се соодветни за анализа на сите видови танини, особено не за високополимеризираниите компоненти. Методот со реагенсот Фолин-Чиколто (Folin-Ciocalteu) е популарен, но не е специфичен само за танините туку дава позитивен резултат и со други полифеноли. Реагенсот Folin-Ciocalteu се користи за да се процени вкупната содржина на феноли општо, при што вкупните полифеноли во примерокот се определуваат спектрофотометриски, со мерење на апсорпцијата на мешавината од екстрактот на примерокот, реагенсот Folin-Ciocalteu и растворот на $\text{NaOH-Na}_2\text{CO}_3$. За да се определи содржината на танините, по првото мерење на вкупни полифеноли, оригиналниот примерок (мостра) се меша со казеин (протеин) кој со танините ќе создаде нерастворливи комплекси. По филтрирање, во добиениот филтрат ќе се определи повторно содржината на вкупни полифеноли со истиот метод. Разликата од двете мерења ќе ја даде вредноста за содржината само на танините. Добиените резултати се изразуваат во грам еквиваленти на гална киселина на 100 g сува тежина на примерокот (g GAE/100 g).

Анализата на високополимеризираниите танини е тешка за изведување со постоечките методи. Во случај на хидролизирачки танини со висока молекуларна тежина често се применува киселинска хидролиза, а потоа се определуваат соодветните производи како што се галната и елагната киселина. Развиени се различни техники за квантитативна и квалитативна анализа на танини со мала молекуларна тежина, како што се проантоцијанидините, но најголема примена имаат нормално-фазната и реверзно-фазната HPLC. Анализата базирана на NMR е важна за *in situ* карактеризација на танините. Спектрите на танини (^{13}C -NMR спектри) имаат точно определени пикови што овозможуваат сигурна спектроскопска идентификација. Дополнително, користејќи NMR, може да се квантификува степенот на екстракција, што овозможува потврда на податоците што се добиени со конвенционалните гравиметриски техники.

8.9. Хинони

Хиноните и хионските хетерозиди се растителни пигменти, одговорни за жолта, портокалова, црвена и пурпурна боја на растителните органи. Претставуваат секундарни метаболити, но има и такви што се делови од примарниот метаболизам, односно се неопходни за нормално одвивање на определени биохемиски процеси и се универзално присутни во растителните клетки. Тука спаѓаат бензохиноните убихинон и пластохинон и токоферилхинони, значајни за процесите на клеточното дишење и процесот на фотосинтезата.

Во растенијата се јавуваат три групи хионски соединенија: бензохинони - C_6 , нафтохинони - C_{10} и антрахинони - C_{14} соединенија (слика 123). Растителните хинони се јавуваат најчесто во хетерозиден облик, а распространети се во голем број медицински и други растенија. Со нафтохинони е богат листот и зелениот плод од орев, а во мали количества антрахиноните се наоѓаат во зеленчукот (зелена салата, грав и грашок). Значајни медицински растенија со нафтохинони се дросера, а со антрахинони алое, рабарбара, крушина и сена. Во хербата од жолтиот кантарион присутни се антронски деривати познати под името нафтодиантрони.



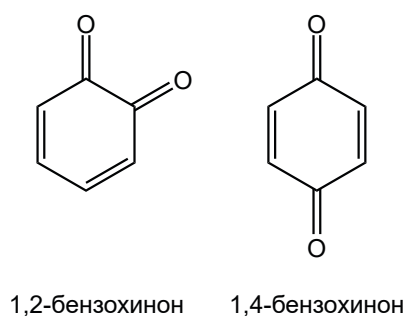
Слика 123. Основни структури на хионски соединенија

8.9.1. Растителни бензохинони

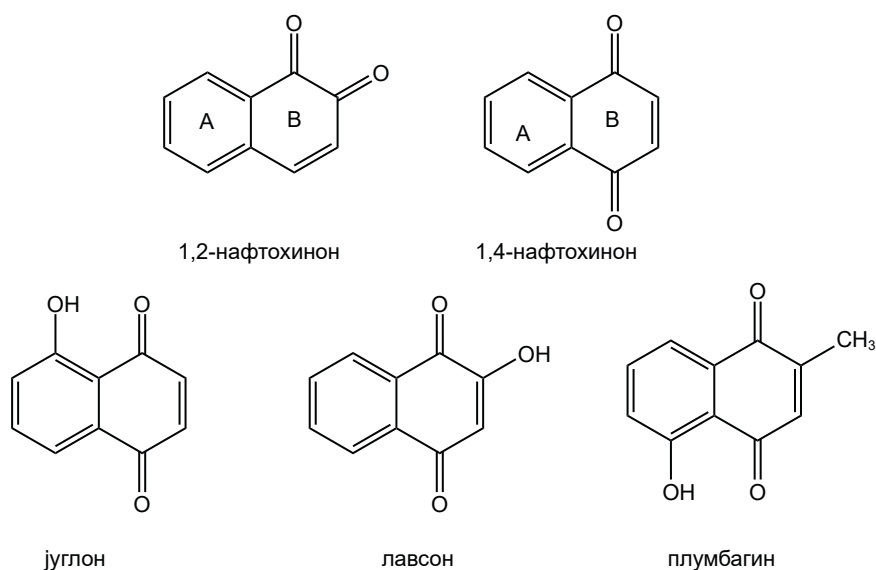
Слободните бензохинони се цврсти, липофилни соединенија, со определена боја и мирис, главно растворливи во неполярни органски растворувачи (хексан, бензен, етер, петролетер и др.). Познати се два изомери: 1,2 и 1,4-бензохинони (*o*- и *p*- изомери) (слика 124). Чист 1,2-бензохинон е цврста супстанција со црвена боја што се раствора во вода, а не се раствора во етер, додека 1,4-бензохинон е цврста кристална супстанција со жолта боја и задушлив мирис, што потсеќа на хлор, растворлива во алкохол, етер и алкални раствори.

Бензохиноните се класа на природни хинони што се наоѓаат во речиси сите живи организми, во: виши растенија, габи, бактерии и животински организми. Вклучени се во важни биолошки функции како што се биоенергетскиот транспорт, оксидативната фосфорилација и процесите на транспорт на електрони. Во последниве години станува сè појасно дека некои од нив поседуваат моќна антиоксидативна, антиинфламаторна и антиканцер активност. Една од важните предности што ги нудат овие соединенија е леснотијата со која тие можат да се синтетизираат и хемиски

да се манипулираат. Со ова се отвораат големи можности за понатамошни истражувања во развојот на некои потенцијално корисни молекули на лекови. 1,2-бензохинон е природен прекурсор на пигментот меланин. 1,4-Бензохинон е клучниот структурен дел на бројни биолошки активни синтетички и природни соединенија, со голем терапевтски потенцијал во зависност од различните супституции на бензенскиот прстен. Во праксата 1,4-бензохинон се користи како фунгицид. Со редукција бензохиноните преминуваат во соодветни хидрохинони кои покажуваат значајни биолошко-фармаколошки дејства. Комерцијалното значење на 1,4-бензохинонот е големо како реагенс во фотографијата, појдовен материјал за производство на бои и за производство на други хемикалии. Во индустријата на боите значајно е што бензохиноните покажуваат поголема стабилност на боја, подобро боење и поголема издржливост на осветлување, во споредба со други природни бои како што се антоцијаните и каротеноидите. Во споредба со синтетските бои, бензохинонските бои се подобрата опција со оглед на значајно помалата штета што ја прават врз животната средина.



Слика 124. Структури на 1,2 и 1,4-бензохинони

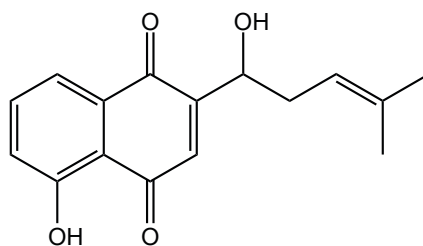


Слика 125. Основни структури на 1,2- и 1,4-нафтохинони и структури на најраспространети соединенија од оваа група (југлон, лавсон и плумбагин)

8.9.2. Растителни нафтохинони

Нафтохиноните се класа на органски соединенија што се структурно поврзани со нафтален. Тие се производи на секундарниот метаболизам на бактерии, на габи и на виши растенија. Два изомери се вообичаени: 1,2-нафтохинони и 1,4-нафтохинон (слика 125). 1,4-Нафтохиноните се најраспространети нафтохинонски соединенија. Тие се редокс активни компоненти што се состојат од бензенски прстен (прстен А) кој е линеарно споен со целосно конјугиран цикличен дикетон (прстен В), во кој карбонилните групи се подредени во пара положба (слика 125). Во живите организми се присутни различни деривати со една или со повеќе метил, хидроксил и/или метокси групи. Позначајни соединенија од оваа група се: југлон (зелен плод и лист од орев), лавсон (лист од лавсониа или кана) и плумбагин (херба од дросера), кои се воедно и најраспространетите 1,4-нафтохинони (слика 125). Во некои структури е присутна странична низа поради која тие нафтохинони се растворливи во липиди (на пр. алканин, слика 126).

Во природата нафтохиноните се јавуваат во хетерозиден облик, како *O*-хетерозиди. Де факто, во растенијата се застапени *O*-хетерозиди на соодветни хидрохинони. Нестабилни се и под дејство на ензими лесно се хидролизираат и со оксидација создаваат соодветни нафтохинони. Така, југлонот настанува од α -хидројуглон кој се добива по хидролиза на соодветниот гликозид (слика 127), а плумбагинот од гликозидот плумбазид А. До разложување на хетерозидите може да дојде и ако растителниот материјал се изложува на повисока температура, на дејство на киселина (2 - 5 % раствор на сулфурна и на хлороводородна киселина на температури помеѓу 80 и 100 °C) или на дејство на алкалија. Овие аспекти мора да се имаат предвид во случај на екстракција и изолација на нафтохинони од растителен материјал.

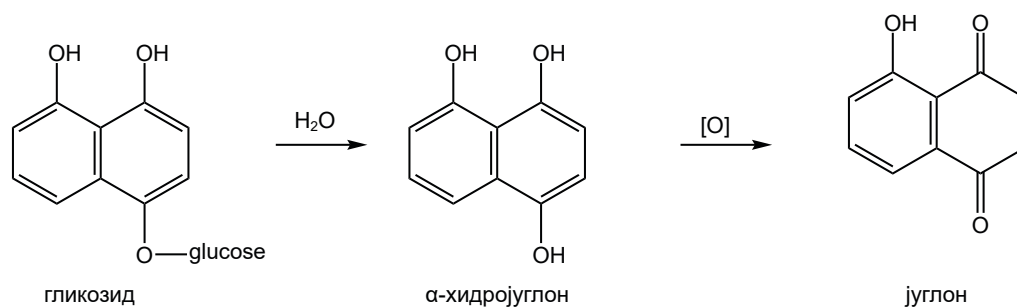


алканин

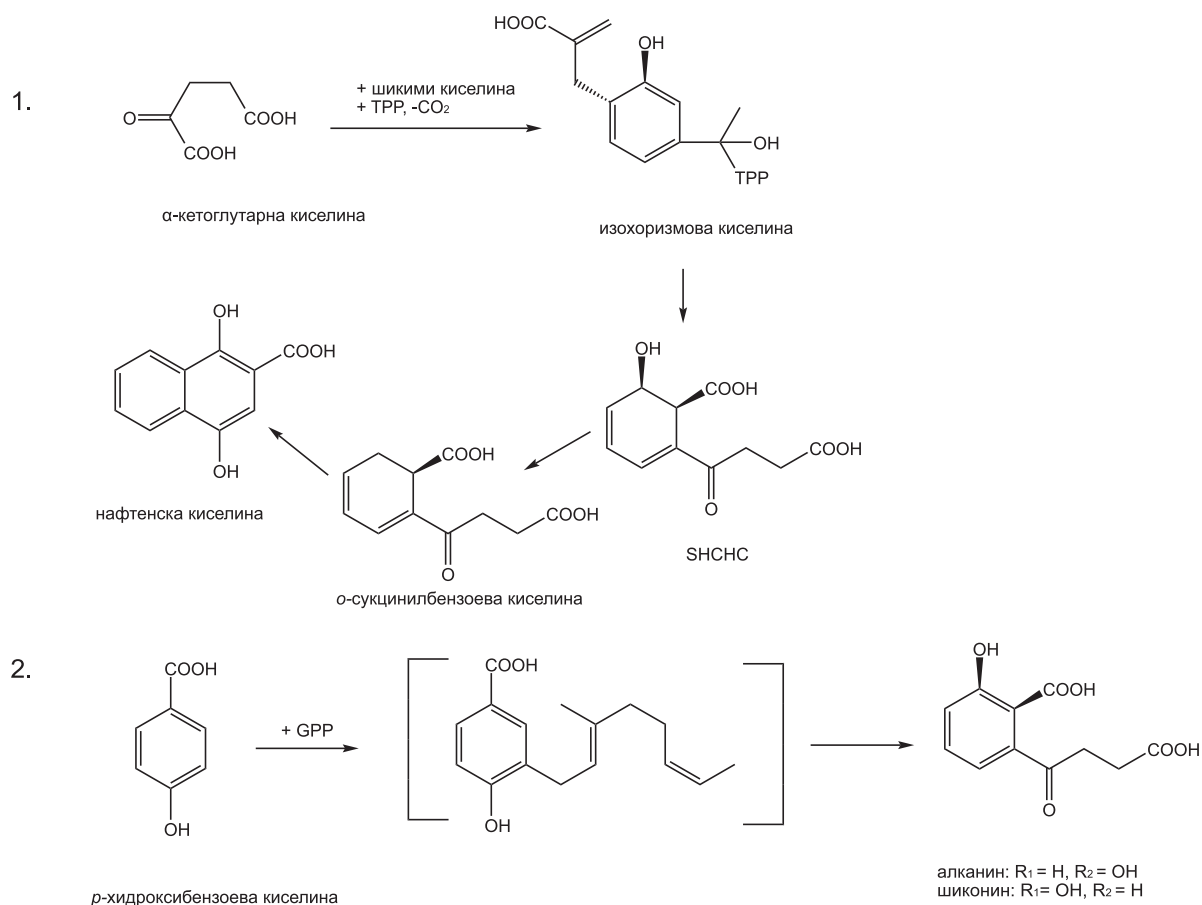
Слика 126. Липофилен 1,4-нафтохинон

Биолошката улога на 1,4-нафтохиноните за растенијата е повеќекратна. Тие се клучни секундарни метаболити со витални биолошки функции, како што се оксидативна фосфорилација и пренос на електрони во процесите на фотосинтеза и дишење во растителниот систем. Овие соединенија често дејствуваат како посредници помеѓу растението и неговата околина и се одговорни за мирис, вкус, одбрана, сигнализација, боја и трансдукција на енергија. Оттука, имаат голема еколошка вредност во интеракциите: растение - растение (алелопатија), растение - инсект и растение - микроорганизми. Бројни растенија кои произведуваат 1,4-нафтохинони се значајни за човекот поради биолошко-фармаколошката активност на нафтохиноните и потенцијалот за користење во терапевтски цели. Некои медицински растенија што содржат 1,4-нафтохинони се користат како

традиционални хербални лекови стотици години наназад, но денес се актуелни и како извори на 1,4-нафтохинони што претставуваат основа за развој на нови лекови.



Слика 127. Хидролиза на хидројуглон гликозид до југлон



Слика 128. Биосинтеза на нафтохинони: 1. преку o-сукцинилбензоева киселина (SHCHC = хидроксисукцинилциклохексадиен карбоксилат, TPP = тетрафенилпорфирин), 2. преку p-хидроксibenзоева киселина со GPP

Биосинтеза на нафтохинони. Растенијата создаваат голем број различни нафтохинони, со вклучување на различни биосинтетски патишта. 1,4-Нафтохинони југлон и лавсон се создаваат со вклучување на патот на *o*-сукцинилбензоат (дел од патот на шикими киселината), додека преку патот на *p*-хидроксibenзоева киселина со учество на геранил пиродифосфат (GPP), се создаваат алканин и шиконин, 1,4-нафтохиноните со долга странична низа, присутни во растенијата алкана (к'на) и литоспермум (слика 128).

Некои 1,4-нафтохинони (плумбагин) се создаваат преку ацетат-полималонат, класичниот пат на поликетидидите, а некои со вклучување на патот на хомогентизат-мевалонска киселина. Имено, хомогентизат е разграден продукт на хомогентизичната киселина, која е посредник во катаболизмот на фенилаланин и на тирозин. Со разградување на тирозинот во присуство на определени ензими се добива хомогентизат кој во реакција со мевалонска киселина создава едноставни 1,4-нафтохинони. Ваквата биосинтеза е широко распространета, но сепак врзана за растителни видови од само на неколку фамилии, како што е фамилијата Ericaceae.

Сите наведени биосинтези (освен ацетат-малонатниот пат) се меѓусебно поврзани со оглед дека во заднина сепак стои патот на шикими киселина, кој е значаен за создавање на ароматичниот прстен (прстен А), во случај на биосинтезата преку *o*-сукцинилбензоат и преку *p*-хидроксibenзоева киселина. Во оваа смисла патот преку хомогентизат-мевалонска киселина се разликува бидејќи во случајот на оваа биосинтеза, преку тирозинот (хомогентизатот), шикими киселина е одговорна за создавање на хионскиот дел (прстенот В), а прстенот А се создава со посредство на мевалонската киселина.

Биолошко-фармаколошко дејство и употреба на нафтохинони. Нафтохиноните покажуваат многу значајни фармаколошки својства. Тие се цитотоксични, значителни антибактериски, антифунгални, антивирусни, инсектицидни, антиинфламаторни и антипиретични средства. Докажани се фармаколошките ефекти врз кардиоваскуларниот и врз репродуктивниот систем. Механизмот на нивното дејство е многу сложен. Се врзуваат за ДНК и ги инхибираат процесите на репликација, комуницираат со бројни протеини (ензими) и ги нарушуваат клеточните и митохондријалните мембрани и интерферираат со електроните на респираторниот синџир на митохондријалните мембрани. Растенијата што содржат нафтохинони се долго наназад познати како лековити и широко се во употреба во Кина и во земјите од Јужна Америка, каде меѓу другото, се користат за лекување на малигнии и на паразитарни заболувања. Сепак, најголем интерес побудува антимикуробното дејство на нафтохиноните. Развојот на отпорноста на бактериите во однос на антибактериските лекови претставува сериозна закана за човековото здравје низ светот и стана многу сериозен клинички проблем за многу класи на антибиотици. Постои постојана и итна потреба за откривање и развој на нови ефикасни антибактериски агенси за да се спречи појавата на резистентни бактерии. Растителните сировини што содржат хидрокси деривати на 1,4-нафтохинони се користат за производство на екстракти/производи со антимикуробна активност. Дополнително, врз основа на структурата на југлон, плумбагин, лавсон и други хидрокси нафтохинони, се прават обиди за синтеза на аналогни молекули со подобрена антимикуробна активност.

Некои природни нафтохинони (на пр. плумбагин) се ефикасни против протозои што се предизвикувачи на лишманија, маларија, Чагова болест и др. Покажуваат ефикасност на ниво на синтетски лекови и предизвикуваат голем интерес во изнаоѓање аналогни структури со подобра активност. Треба да се нагласи дека некои нафтохинони се силни алергени, предизвикуваат контактен дерматитис, а во некои случаи и посериозни форми на системска алергиска реакција. Познати се алергиите што ги предизвикуваат некои хортикултурни растенија (видови јаглика од родот *Primula*) и некои тропски растенија.

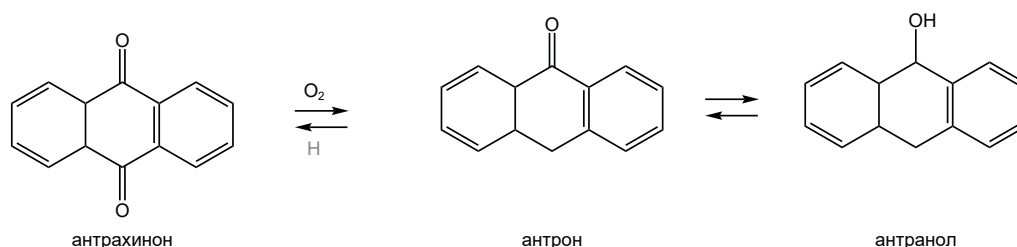
Комерцијално, нафтохиноните се користат како природни бои. Алканин од херба на алкана и шиконин, изолиран од хербата на литоспермум. Наоѓаат примена за боење на козметички препарати.

Екстракција и испитување на нафтохинони. Екстракција. Во литература може да се најдат податоци што се однесуваат на постапки на екстракција со цел подготовка на материјалот (примерокот) за анализа. Протокол за екстракција на вкупни полифеноли се применува и за екстракција на нафтохиноните. Екстракцијата протекува со 80 % метанол, соодносот примерок : растворувач 1 : 20 (w/v), вортексирање и потоа сонификација во ледено ладна вода во траење од 60 минути, центрифугирање и филтрирање на екстрактот низ полиамиден филтер. Типична метода за екстракција на југлон од листови, лушпи и плод од орев е мацерација во органски растворувач што е проследена со испарување на растворувачот под вакуум. Како најдобри растворувачи за екстракција на југлон од свежи плодови се покажаа петролетер и хексан, а од листови и лушпи хлороформ. Приносот од екстракција зависи обратнопропорционално од температурата (колку е повисока температурата, толку е помал приносот). За екстракција на плумбагин од корен на растението плумбаго се користеле вода, 50 % етанол и 95 % етанол. Биле користени статичка мацерација, динамична мацерација, екстракција со помош на ултразвучни бранови и екстракција во Соклет апаратура. Како најефикасна техника се покажала Соклет-екстракцијата, иако продолженото време на загревање придонело до деградација на плумбагинот. Лавсонот од листови на кана бил екстрахиран со помош на ултразвук на собна температура, со етанол, во траење од 45 минути.

Идентификација и квантификација на нафтохиноните. Различни методи се користат во анализата на нафтохиноните, како на пр. HPTLC со дензитометрија, на тенок слој од силика гел 60 F254, мобилна фаза составена од хлороформ : метанол (8 : 2, v/v) и детекција на бранова должина од 249 nm. Ефикасна техника за анализа на нафтохинони е HPLC со UV-Vis детекција, со раздвојување на C18 колона, изократски метод на елуирање со мобилна фаза од 95 % метанол и 0,5 % хлороформ и детекција на 254 nm. Може да се користи и RP-12 колона и мобилна фаза составена од вода и ацетонитрил. Во поново време се прават LC-MS-анализи, во позитивен и негативен режим на јонизација со електроспреј јонизација, со што се обезбедуваат висока чистота и идентитет на нафтохинонските компоненти во различни растителни материјали. Покрај течната хроматографија, за определување на нафтохинони може да се користи и GC-MS. Оваа техника била користена за определување на југлон во производи на база на листови и лушпи од орев и за анализа на деривати на 1,4-нафтохинон во мешавини од нивни изомери.

8.9.3. Растителни антрони, антраноли и антрахинони

Антроните и антрахиноните се хинонски соединенија со основна градба на антрацен. Во зависност од степенот на оксидацијата, се јавуваат во различни форми што можат да преминуваат едни во други. Главната структура е антрон, кој може да се оксидира до антрахинон или да се редуцира до антранол (слика 129).



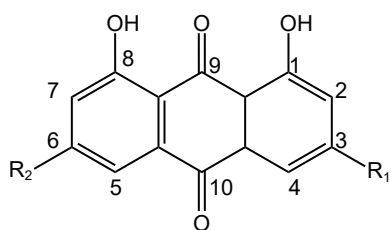
Слика 129. Оксидирани и редуцирани форми на антрон

Антрон е планарен трицикличен ароматичен кетон. Во основниот скелет на антронот, двата ароматични прстени се поврзани со кето група и метиленска група на таков начин што формираат шестчлен цикличен кетон во средината на кондензираниот тричлен систем. Во природата егзистираат слободни или конјугирани со шеќери како хетерозиди. Во зависност од градбата на агликонот се делат во три групи:

1. Производи на хризацин (1,8-дихидроксиантрахинони),
2. Производи на ализарин (1,2 и 1,3-дихидроксиантрахинони) и
3. Кондензирани производи на антрони (нафтодиантрони).

1. Антрахинон производи на хризацин. Антрахинонските агликони од оваа група се секогаш хидроксилирани во положбите C_1 и C_8 (1,8-дихидроксиантрахинони). На C_3 можат да имаат метилна, хидроксиметил или карбоксилна група, а на C_6 хидроксилна или метокси-група. Досега се идентификувани следни антрахинонски агликони (слика 130):

- хризифанол (хризифанска киселина),
- алое-емодин,
- реин,
- емодин (франгула- или реум-емодин),
- фисцион (реохризидин или метил-емодин).



хризифанол: $R_1 = CH_3$, $R_2 = H$

ало-е-емодин: $R_1 = CH_2OH$, $R_2 = H$

реин: $R_1 = COOH$, $R_2 = H$

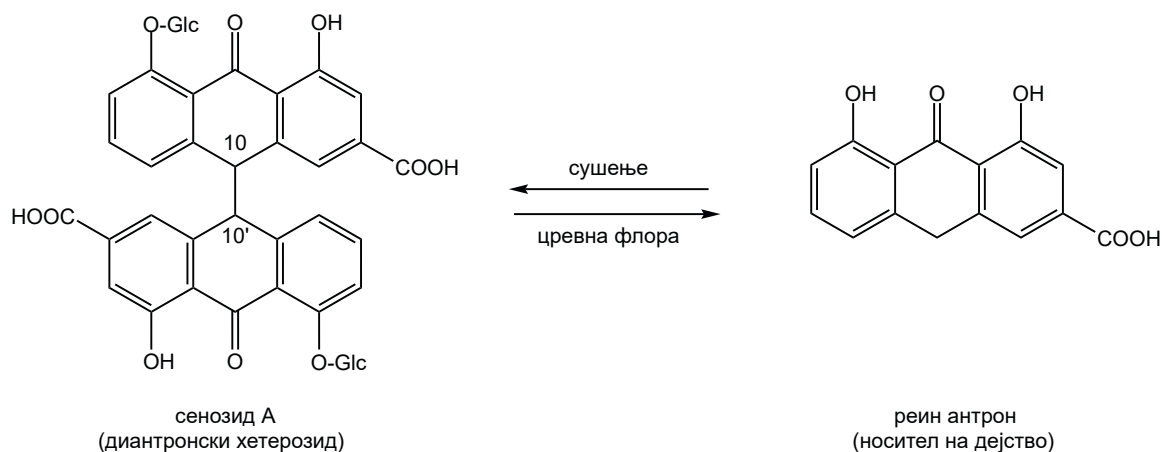
емодин: $R_1 = CH_3$, $R_2 = OH$

фисцион: $R_1 = CH_3$, $R_2 = OCH_3$

Слика 130. Структури на 1,8-дихидрокси антрахинони

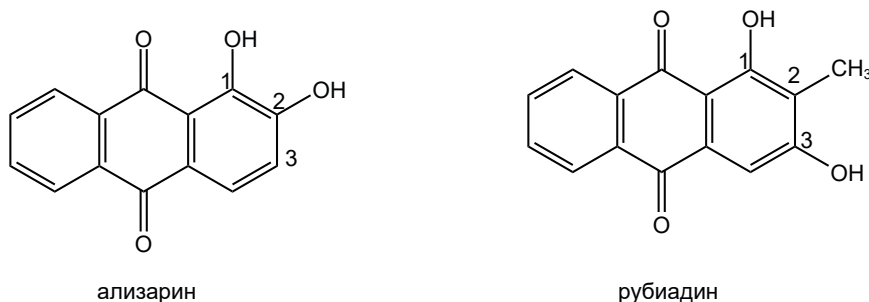
Во живите растителни ткива, особено во младите ткива каде што се одвива биосинтезата, прво се создаваат антронските и диантронските хетерозиди. Овие примарни производи на биосинтезата, во постарите ткива се разложуваат (диантроните преминуваат во моноантрони) и се оксидираат до антрахинонски хетерозиди. Антрахинонските хетерозиди со време се разложуваат давајќи слободни антрахинонски агликони. Стабилноста на антронските хетерозиди е различна во различни растенија. Тие се најстабилни во листовите и во плодовите на сена бидејќи се создаваат во процесот на сушењето на листот (слика 131), додека во некои други брзо се разложуваат во мономерни антрони, а потоа брзо се оксидираат во антрахинони, како што е случај со рабарбара (реум).

Во растителните суровини што стојат подолго време, поради разложувањето на хетерозидите се јавуваат помалку или повеќе слободни антрахинонски деривати. Антрахинонските растителните суровини нормално содржат комплексна смеса од различни деривати: антронски и антрахинонски хетерозиди и слободни антрони, антраноли и антрахинони. Диантронските хетерозиди можат да бидат составени од два исти (изодиантрони) или од два различни антронски деривати (хетеродиантрони). Антрахинонските хетерозиди настануваат со поврзување на шеќерите (гликоза, рамноза и поретко други шеќери) со ОН-групите на положбите C_6 и C_8 .



Слика 131. Создавање на диантроните во процесот на сушењето на лист од сена

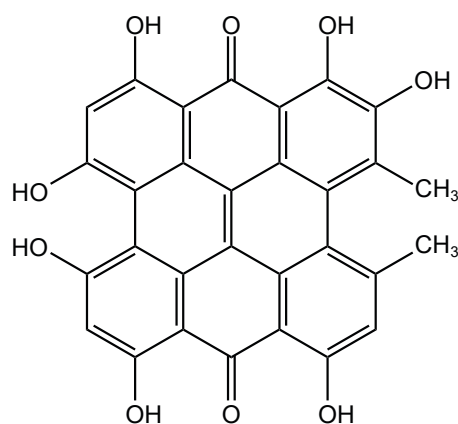
2. Антрахинони производи на ализарин. Дериватите од групата на ализарин се 1,2-или 1,3-дихидроксиантрахинони со супституенти на C_3 и C_4 , а поретко на C_6 , C_7 и C_8 . Во растителниот свет најчесто се среќаваат ализаринот и рубиадинот, со црвена боја (слика 132). Се користат како природна боја за боење на ткаенина, кожа и друго. Ализаринот се користел како црвена боја во сликарството.



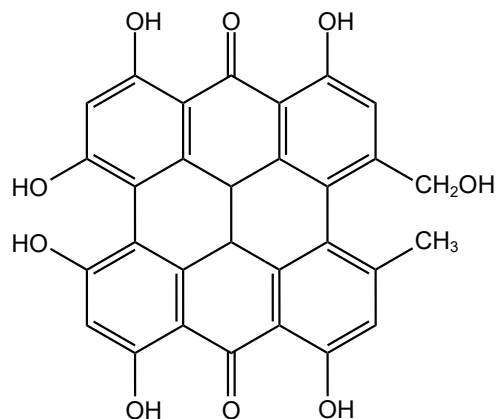
Слика 132. Деривати на ализарин

3. Кондензирани производи на антрони (нафтодиантрони). Најзначајни нафтодиантрони се хиперицин и псевдохиперицин (слика 133) што се јавуваат во растението жолт кантарион (*Hypericum perforatum* L.).

Биосинтеза. Биосинтезата на антроните сè уште не е точно утврдена, но се претпоставува дека се одвива преку ацетат-полималонатен пат или патот на поликетидите. На слика 134 прикажана е биосинтезата на едно поликетидно соединение, антрон ендокроцин, со чијашто декарбоксилација се добива антрахинон емодин. За голем број антрахинони е показано дека малонската киселина има важна улога во оваа ароматска синтеза, односно ланецот од кој се добива молекулата на антрахинонот настанува со поврзување единици од малонската киселина што терминално се врзуваат за ацетил CoA. Оттука, оваа биосинтеза се означува и како полиацетат-малонатен пат за синтеза на емодин тип на антрахинони. Во најголем број случаи се одвива токму ваква биосинтеза, но сепак за значителен број антрахинони биосинтетските механизми сè уште не се потполно разјаснети.



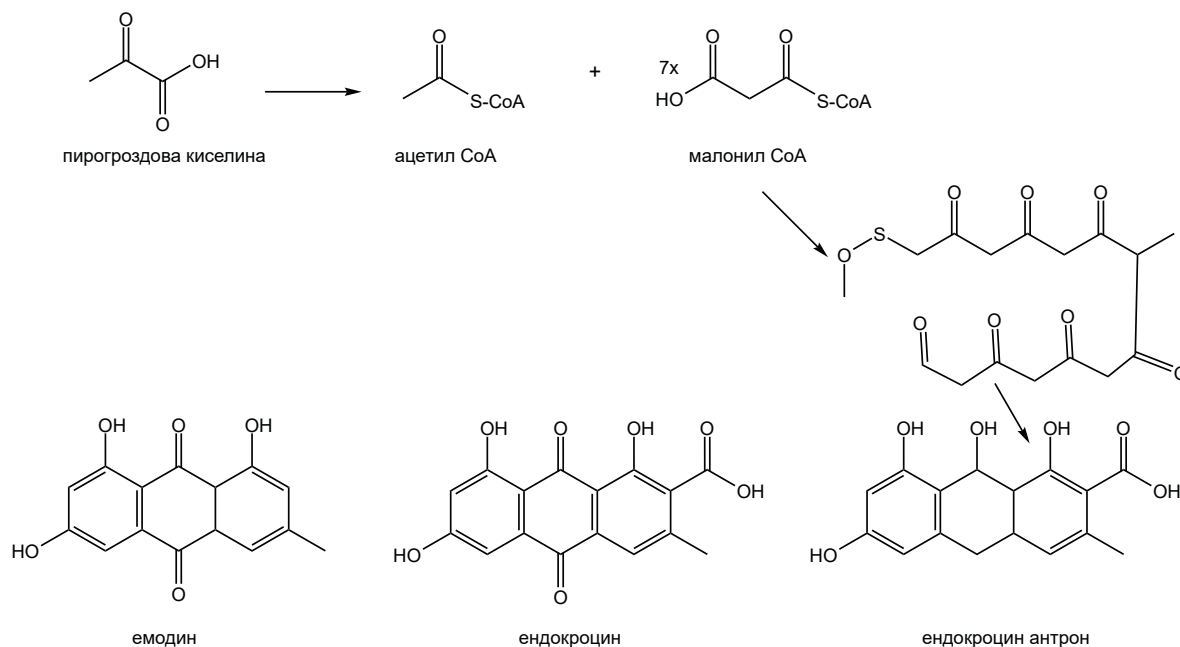
хиперицин



псевдохиперицин

Слика 133. Структури на кондензирани производи на антрони (нафтодиантрони)

Распространетост и локализација. Антроните во голема мера се распространети меѓу видовите од родот *Aloe*. Најчестите компоненти алоин А и Б, алоинозид А и Б и др., се пронајдени во околу 36 видови на алое. Антрахиноните и нивните хетерозиди се широко распространети во растителниот свет, а освен во вишите растенија, се среќаваат и во некои мусли и во лишаи. Локализирани се во различни растителни органи, во корени, во ризоми, во листови, во плодови и во кори. Нивната застапеност во растенијата се движи 3-5 %. Нафтодиантроните хиперицин и псевдохиперицин се застапени во жолтиот кантарион и во други видови од родот *Hypericum*, но некои инсекти и протозои, исто така, можат да го синтетизираат.



Слика 134. Поликетидна биосинтеза на антрахинон ендокроцин односно емодин

Особини. Антрахиноните се жолти (некогаш портокалови, црвени, кафено-црвени или виолетови) супстанции, а антранолите се безбојни или светложолти. Во форма на гликозиди се растворливи во: вода и етанол, а нерастворливи се во органски растворувачи. Агликоните се добро растворливи во етер, во хлороформ и во други органски растворувачи, а не се растворливи во вода. Карактеристично е дека можат да сублимираат, а по кондензација да образуваат портокалово обоени кристали. Растворите на антрахиноните се интензивно обоени. Во средина од амонијак даваат интензивно црвено обојување. Специфичните особини на антрахиноните се определени од карактерот и од бројот на радикалите врзани за антрахинонското јадро. Од групата на антрони те најзначајно соединение е барбалоин, С-гликозид на алоемодин антрон. Негова главна карактеристика е жолтата флуоресценција што посебно е видлива под UV-светлина.

Биолошко-фармаколошко дејство. Различните групи на антрони и на антрахинонски деривати пројавуваат различни биолошко-фармаколошки дејства. Антронот барбалоин има потенцијално инхибиторно дејство врз мастоцитите што резултира во контролата на ослободувањето на хистамин и има изразено антиинфламаторно дејство што е споредливо со некои лекови (индометацин). По перорален внес барбалоинот се разложува до алое емодин кој брзо се апсорбира во цревата, за разлика од барбалоинот кој не е ресорптивен, но двете соединенија се користат како многу значајни лаксативи. Барбалоинот покажува антиоксидативно, антиинфламаторно, антимикробно и антиканцерогено дејство. Фенолните антрони (како на пр. антралин = 1,8-дихидроксиантрон) покажуваат антипсоријазна и антиинфламаторна активност. Некои антрони дејствуваат: инсектицидно, имуностимулативно, антимикробно, антиоксидативно, фотодинамички, антитуморно, антивирусно, антиметастатски и лаксативно, модулираат апоптоза и поволно дејствуваат на зараснување на рани на кожа.

Антрахинони што се производи на хризацин (1,8-дихидроксиантрахинони) дејствуваат лаксативно. Дејството се должи на редуцираните форми, односно на слободни агликони и диантрони што во дебелото црево настануваат од соодветните хетерозиди под дејство на ензими или со редукција на слободни антрахинони под дејство на цревните бактерии. Имено, во организмот, главно се внесуваат оксидирани форми, слободни и хетерозидни облици, што делумно се ресорбираат во желудникот, а делумно во тенките црева (само агликоните). На нивото на дебело црево, хетерозидните облици се хидролизираат и сите агликони се редуцираат до антрони, што се одговорни за лаксативното дејство. Антрахинонските растителни суровини имаат и антисептично дејство.

Нафтодиантронските деривати на жолтиот кантарион дејствуваат стимулативно и антидепресивно врз ЦНС. Изолирани во чиста состојба или во состав на екстракти се користат за производство на препарати со антидепресивно дејство. Дополнително, хиперицинот дејствува антибактериски, антивирусно и инхибиторно врз некои ензими (киназа и допамин β -хидроксилаза).

Значење и употреба на антроните/антрахиноните. Растителните суровини што содржат антрони и антрахинони со лаксативно дејство се користат за производство на хербални лекови со лаксативно дејство што се користат за третман на констипацијата. Ваквите екстракти се користат и за производство на додатоци на исхраната, едно- или мултикомпонентни, што се наменети за намалување на зголемена телесна тежина, а кои дејствуваат преку зголемување на елиминацијата од организмот. На пазарот се присутни и додатоци на исхраната што се промовираат за олеснување на проблемите со дефекацијата, како лаксативи. Антрахинонските растителни суровини имаат и антисептично дејство. Се користат во дерматологијата за лекување на некои кожни заболувања. Нафтодиантронските деривати на жолтиот кантарион дејствуваат стимулативно и антидепресивно врз ЦНС. Изолирани во чиста состојба или во состав на екстракти се користат за производство на хербални лекови со антидепресивно дејство. Антрахинонските растителни суровини се користат како средства за боење, особено коренот од растението броќ (*Rubia tinctorum* L.), што содржи ализарин (1,2-дихидрокси-антрахинон).

Несакани ефекти на антроните/антрахиноните. Внесени во поголеми дози, антрахинонските соединенија силно ја активираат мазната мускулатура на цревата и предизвикуваат послаби или

појаки грчеви. Тие го зголемуваат дотурот на крвта во мазната мускулатура, при што можат да ги зголемат менструалните крвавења, а во поголеми дози можат да дејствуваат абортивно. Преоѓаат во мајчиното млеко и не се дозволени за употреба кај бремени жени и кај доилки. Имаат способност да предизвикаат дисбаланс на електролити, особено дефицит на калиум. Како последица може да се јават нарушувања во функцијата на срцето, слабост на миокардот (особено ако паралелно се користат кардиотоници, диуретици или кортикостероиди). Долготрајна употреба може да доведе до губење на природниот рефлекс за дефекација и појава на т.н. „мрзливи црева“. Наведените несаканите ефекти може да се јават и при користење на додатоци на исхраната базирани на антрахинонски растителни суровини, особено ако се користат подолго време. Додатоците на исхраната што содржат екстракт од жолт кантарион може да дадат несакани ефекти доколку се пројави преосетливост на активните компоненти и ако се користат во големи дози, а дополнително телото се изложува на дејство на UV-зраци. Во такви случаи, иако ретко, може да дојде до развој на алергиска реакција на кожа позната како хиперицизам.

Екстракција и испитување на антрони/антрахинони. Екстракцијата на антрахиноните може да се врши со класични методи (мацерација, рефлукс екстракција на повисока температура, Сосклет екстракција и др.) и со современи т.н. еколошки-прифатливи или „зелени“ екстрактивни постапки (USE, MAE, PLE и SFE). Во сите постапки во кои е користен растворувач, најдобри резултати биле добиени со етанол. Во класичните постапки за екстракција на антрахинони соодносот цврст материјал : растворувач треба да биде 1 : 20. Претходна кисела хидролиза може значително да го зголеми приносот на слободните антрахинони. Меѓу методите на екстракција, се покажа дека екстракцијата со рефлукс во траење од 45 минути е поефикасна од повеќето други постапки. Нов, „зелен“ и селективен метод на екстракција, без растворувачи, е сублимацијата, која се покажа ефикасна за екстракција на 1,8-дихидроксиантрахинони. За екстракцијата на антроните (барбалоин) како посоодветна може да се користи UAE, со метанол. Хиперицинот (нафтодиантрони) може успешно да се екстрахира со Сосклет екстракција, со етанол како најефикасен растворувач, но во траење од најмалку 16 часа. Од современите методи погодна е MAE-методата, со 55 % етанол или со изопропанол, во микробранова печка со фреквенција на микробранови од 2.450 MHz во траење од 60 s. Методот се покажал 10 пати поефикасен од класичните методи на екстракција, со значајно намалување на потребното време на екстракцијата.

Идентификација на антрахинонски агликони може да се направи со класичните методи:

- Микросублимација на антрахинонски растителни суровини што се изведува на 210 °C, при што се добиваат жолти капки или иглести кристали од 1,8-дихидроксиантрахинони што понатаму со додавање алкалија (етанолен раствор на KOH) се бојат црвено.
- Борнтрегерова реакција што се базира на создавањето на црвено обоени фенолати на 1,8-дихидроксиантрахинони со амонијак што се додава во бензенски екстракт од растителниот материјал. При мешање на двете фази, амонијачниот слој се бои црвено од создадените фенолати. Вака изведена реакција е позитивна само доколку се присутни слободни антрахинонски агликони. За докажување на антрахинонски хетерозиди реакцијата вклучува кисела хидролиза (со HCl). Антроните и антранолите не ја даваат оваа реакција бидејќи во алкална средина не создаваат растворливи фенолати.
- Хроматографски техники, од кои како попогодна се смета TLC, а детекцијата на раздвоените антрахинони се изведува со етанолен раствор на KOH, со кој антрахиноните даваат црвени петна што флуоресцираат виолетово.

Квантитативна анализа на антрахинонските соединенија се врши со колориметриски и спектрофотометриски методи, врз база на Борнтрегеровата реакција. За да се определи содржината на вкупните антрахинони, најпрвин се врши хидролиза на хетерозидите со разредени минерални киселини, а потоа се екстрахираат вкупните антрахинонски агликони со етер или со некој друг ор-

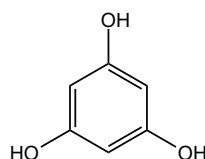
гански растворувач. Добиениот екстракт е жолто обоен, а по додавање калиумова база се добива интензивно црвено обојување од создадените фенолати. Интензитетот на обојувањето се определува колориметриски или спектрофотометриски, по одредено време кое е потребно за смирување на реакцијата. Овој метод не ги опфаќа редуцираните форми (антроните и антранолите), поради што етерскиот екстракт се обработува со водород пероксид за редуцираните форми да се оксидираат до антрахинони. За квантитативно определување се користи и карактеристичната боја што антрахиноните ја даваат со магнезиум ацетат. Денес сè повеќе се користи HPLC со DAD, и за квалитативна и за квантитативна анализа. Современите инструментални техники денес, наоѓаат сè поголема примена во анализата на антрахиноните, имено диантроните може да се анализираат со UHPLC-QQQ-MS/MS.

За анализа на нафтодиантроните (хиперицин и слични состојки) развиени се различни методи, вклучувајќи: UV-Vis-спектроскопија, анализа на проток-инјекција со детекција со хемилуминисценција (Flow-Injection Analysis with Chemiluminescence Detection = CL-FIA), TLC и HPLC. Во случај на UV-VIS-спектроскопија постојат определени тешкотии заради карактеристиките на хиперицинот и сличните соединенија и неможнoста да се применат рутинските критериуми за чистота, поради што коефициентот на моларната екстинција тешко се утврдува. Во вакви случаи неопходно е користење на референтни стандарди на хиперицин и на другите компоненти. Методот CL-FIA за детекција користи промена во интензитетот на хемилуминисценција, кој се зголемува заради сензибилизирачкото дејство на хиперицинот (хемилуминисценција е емисија на светлина како резултат на определена хемиска реакција). Сензитивноста на овој метод е речиси идентична со UV-VIS- спектроскопскиот метод, но има предности во однос на поголем линеарен опсег, поголема чувствителност и поголема брзина на анализа. Во TLC-дензитометрија за анализа на хиперицин може да се користи детекција со флуоресценција (појава на електромагнетно зрачење со поголема бранова должина што го емитира супстанцијата кога е изложена на електромагнетно зрачење што е со помала бранова должина од она што го емитира). Методот е исплатлив поради краткото време за анализа и малата потрошувачка на растворувачи. Точноста и репродуктивноста на TLC-дензитометријата се споредливи со вредностите што се добиваат со HPLC-DAD, но сепак, HPLC-DAD обезбедува многу повеќе информации од TLC- дензитометријата.

8.10. Флороглуциноли и КАНАБИНОИДИ

8.10.1. Флороглуциноли

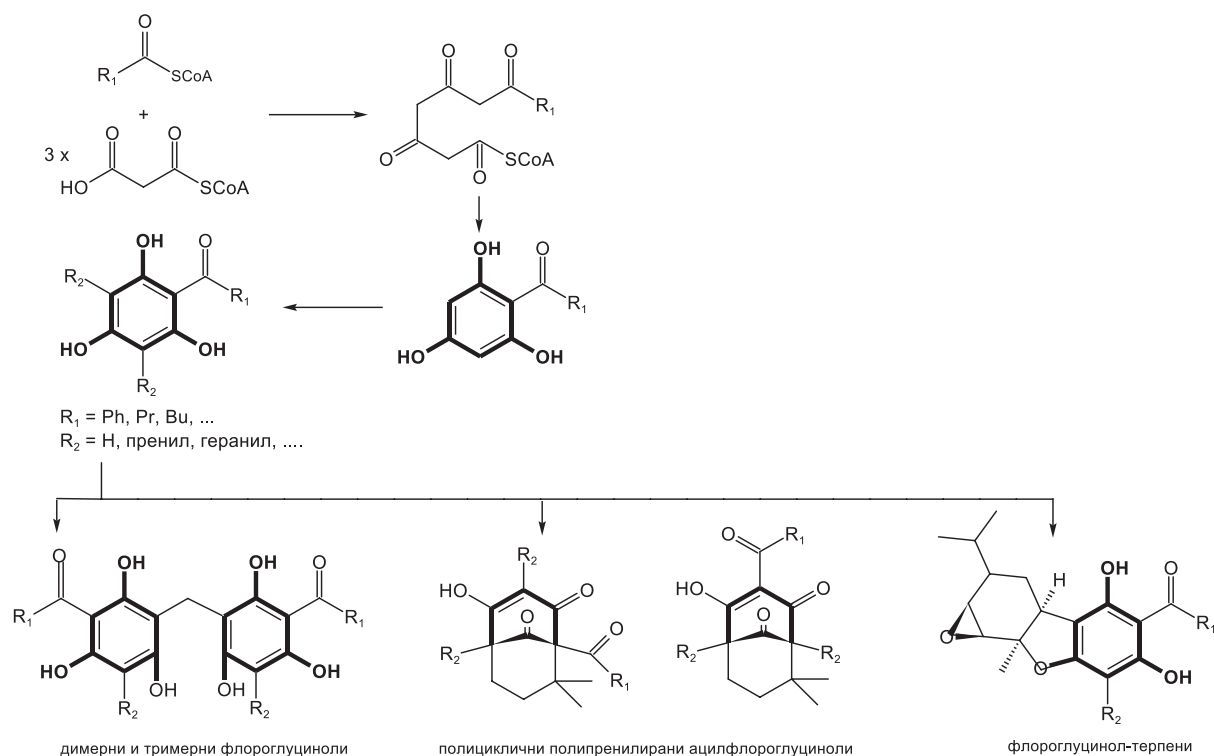
Флороглуцинол е едноставен фенол, со три фенолни функционални групи во метаположби (слика 135). Со супституција на слободните положби на бензолот и интеракцијата на фенолните групи со други соединенија се создаваат различни деривати на флороглуцинол. Претставуваат многу голема класа секундарни метаболити што се јавуваат во вишите растенија, особено во претставниците од фамилиите Myrtaceae, Euphorbiaceae, Asteraceae, Rutaceae, Cannabinaceae и др., како и во некои морски организми. Микроорганизмите, исто така, имаат способност да ги синтетизираат. Денес се познати околу 700 различни природни флороглуцинолни деривати.



Слика 135. Основна структура на флороглуцинол

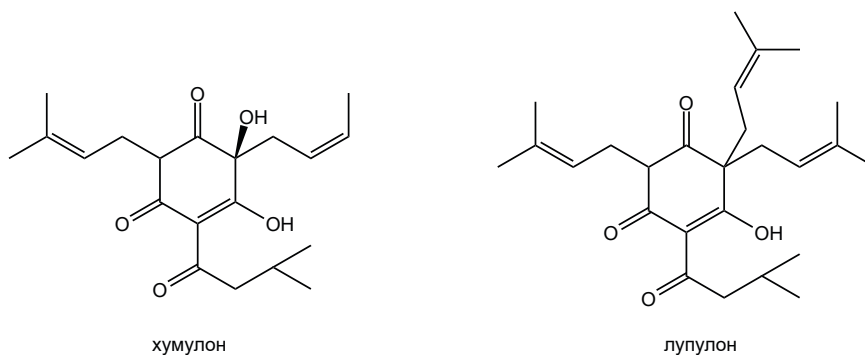
Биосинтеза. Дериватите на флороглуцинол се карактеризираат со големи разлики во хемиската градба. Биосинтезата на некои флороглуциноли, како што се ацил-дериватите, е релативно добро разјаснета. Чистиот флороглуцинол *in vivo* се создава од ацетил CoA во реакција со 3 молекули од малонил CoA, катализирано со флороглуцинол синтеза (слика 136). Ако во реакцијата учествува ацил CoA, се создаваат ацилфлороглуциноли од кои понатаму се создаваат други класи флороглуцинолни деривати.

Класификација и најзначајни претставници. Дериватите на флороглуцинол (флоро-глуциноли) може да се класификуваат на мономерни, димерни, тримерни и повисоки флороглуциноли и флоротанини. Мономерните флороглуциноли се главно акрилни деривати кои може да бидат флороглуцинол-терпени, флороглуцинол гликозиди, халогенирани флоро-глуциноли, пренилирани флороглуциноли и посебна група циклични поликетиди. Најголема група меѓу наведените се ацил-флороглуцинолите, кои вбројуваат преку 100 различни структури, со многу разновидна палета на биолошки активности. Флороглуцинол-терпени се изолирани од различни видови на еукалиптус, а флороглуцинол гликозиди се околу 50 структури, застапени во различни природни материјали. Халогенираните флороглуциноли се главно монохалогени деривати, околу 15 познати, кои главно содржат хлор или бром, додека пренилираните деривати опфаќаат моно-, ди- и поли-пренилирани/геранилирани флороглуциноли. Познати се повеќе од 50 вакви структури што се изолирани од природни извори.



Слика 136. Биосинтеза на некои класи флороглуциноли

Примери за мономерни флороглуцинолни деривати се соединенијата хумулон и луполон од хмељ и хиперфорините на жолтиот кантарион. Хумулоните и луполоните се главните состојки на женските цветови на хмељ (*Humulus lupulus*) кои се користат во производството на пиво. Тие се горчливи состојки кои на пивото му даваат посакуван горчлив вкус и специфична арома. Спаѓаат во групата пренилирани флороглуциноли со 3 изопреноидни странични низи кај лупулонот и два изопреноидни остатоци и една изовалерил група кај хумулонот (слика 137).

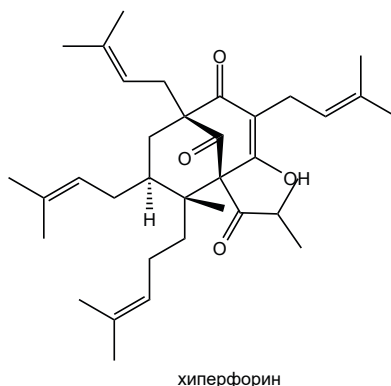


Слика 137. Структури на пренилирани флороглуциноли во цветот на хмељ

Познати се преку 32 соединенија што спаѓаат во хумулони, некои се природно присутни во цветот од хмељ, а некои се создаваат во процесот на производство на пивото, во текот на фермента-

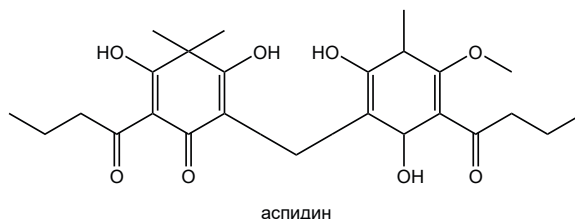
цијата. Хумулонот е производ на деградација на α -смоли што се присутни во цветот од хмељ и се нарекува α -киселина, додека лупулонот е производ на разградување на β -смоли и се означува како β -киселина. Овие состојки на пивото се носители и на некои биолошки дејства со кои се поткрепува употребата на пивото во народната медицина како диуретик и стомахик.

Хиперфорин е пренилиран дериват на флороглуцинол и припаѓа во групата полипрени-лирани ацилфлороглуциноли, познати како фамилија PPAP (PolyPrenylated AcylPhloroglu-cinols). Хиперфорин е уникатен PPAP бидејќи во структурата вклучува C-8 кватернарен стереоцентар (слика 138). Застапен е во надземните делови на жолтиот кантарион, *Hypericum perforatum* и другите видови од родот *Hypericum*. Се смета за одговорна компонента за антидепресивното и другите биолошко-фармаколошки дејства на кантарионот. Нестабилан е во присуство на светлина и на кислород.



Слика 138. Структура на полипренилиран ацилфлороглуцинол од растението жолт кантарион

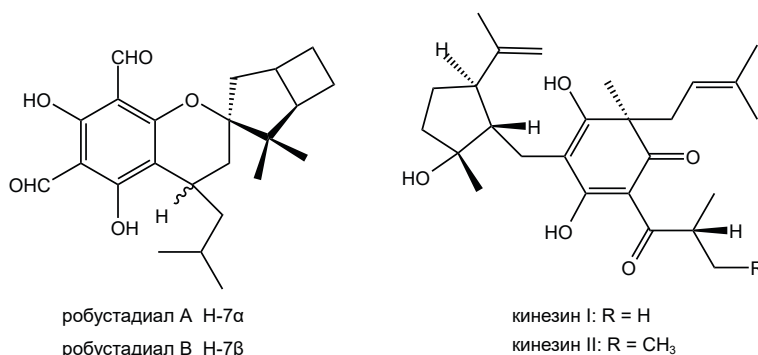
Во однос на димерните флороглуциноли, класата се карактеризира со тоа што две флороглуцинолни единици се поврзани со метиленски мост (како на пр. кај аспидин, изолиран од некои видови папрат, слика 139) или со хроман прстен. Голем број вакви соединенија се успешно изолирани, а повеќето од нив се и синтетизирани. Тримерните и тетрамерните флороглуциноли може да се синтетизираат со користење на аналогни пристапи на оние што се користат во синтезата на димерните соединенија.



Слика 139. Структура на димерен флороглуцинол со метиленска група како врска помеѓу мономерите

Класата на флоротанините опфаќа соединенија со најголема молекуларна тежина и сложена структура, но нивната биолошка активност е малку проучувана и интересот за синтезата или за други аспекти на овие соединенија денес е многу мал.

Биолошко-фармаколошка активност. Флороглуцинолите се користат во медицината, козметологијата, во индустријата на пестицидите, боите, цементите и во др. полиња. Покажуваат многу широка палета на биолошко-фармаколошки дејства. Флороглуцинол-терпени (робустадијал А и В, слика 140), поседуваат *in vivo* антималярична активност против предизвикувачот на маларијата, *Plasmodium berghei*. Некои флороглуциноли дејствуваат интензивно антибактериски и ензим-инхибиторно, а некои (кинезините I и II, слика 140) покажуваат силна антивирусна активност против вирусите на херпес симплекс и везикуларен стоматитис. Пренилираните флороглуциноли се особено активни. Хумулонот и лупулонот од хмељ дејствуваат диуретично, стомахично, антиинфламаторно и значајно антибактериски врз повеќето грам-негативни и грам-позитивни бактерии. Утврдено е и нивното антимикотично дејство и потенцијал за антиканцер активност. Хиперфоринот на жолтиот кантарион е значајна природна состојка со антидепресивно дејство, но и со антибактериска, антиинфламаторна и антивулнерабилна активност (лекување рани на кожа).



Слика 140. Биолошки активни флороглуцинол-терпени

Димерните флороглуциноли со метиленска врска имаат широк спектар на биолошки активности, од антиалергиска, антиинфламаторна, антифунгална, антималярична, ензим-инхибиторна до цитотоксична активност. Поголем број димерни и тримерни флороглуциноли покажуваат силно изразено антихелминтично дејство (против цревни паразити). Некои тримерни флороглуциноли се сметаат за многу силни антибактериски агенси, а некои дејствуваат инхибиторно врз тирозиназа, покажуваат антиоксидантна активност и инхибиторни ефекти врз гликацијата и R-амилазата, кои се вклучени во дијабетичните компликации. Овие соединенија покажуваат и бактерицидни и алгицидни активности. Сепак, треба да се напомене дека иако многу од флороглуцинолите се структурно објаснети, тие како група во однос на нивниот биолошки потенцијал не се целосно истражени.

Значење и употреба. Растителните екстракти што содржат флороглуциноли се користат како традиционални лекови во Кина, во Јужна Африка и во Јужна Америка. Благодарение на биолошката активност, чистиот флороглуцинол е инкорпориран во многу лекови, во козметика, пестициди, во бои и др. производи. Механизмот на антиспазмодично дејство на флороглуцинолот е инхибицијата на ензимот катехол-О-метилтрансфераза во мазните мускулни клетки. Се користи при ренални колики и во случај на синдром на нервозни црева. Комбинацијата флороглуцинол-триметоксибензен се користи како антиспазмодично средство во урологијата за третман на литијаза (камен и песок во уринарниот тракт), а флороглуцинол триметил етер во лекувањето на билијарните и на цревните болести. Во експериментални модели *in vivo* и *in vitro* утврдена е антиоксидативната активност, како и потенцијал за намалување на оксидативниот стрес предизвикан од γ -зраци.

Екстракција и испитување на флороглуциноли. Флороглуцинолните деривати имаат многу широка структурна палета, од многу мали до многу големи молекули, со големи разлики во молекуларната тежина и во физичко-хемиските карактеристики. За нивна екстракција се користат различни методи, со разлики во ефикасноста, во зависност од нивната градба. Подобра ефикасност и поголем принос на екстракција се добива со новите техники: SFE, цврсто-течна екстракција, MAE, разни други течност-течни екстрактивни постапки, UAE, како и семипрепаративна реверзнофазна HPLC. За одвојување на потфракции и нивно прочистување може да се користи препаративната TLC. Денес за оваа цел е актуелна техниката на адсорпција на колона од смола (макropорозната адсорпциона смола DM130 или Sephadex LH-20). Како и кај другите природни производи, екстракцијата на флороглуцинолите зависи од повеќе фактори: поларитет на растворувач, време на екстракција, температура, односот растителен материјал/растворувач и големина на честички. Погодни растворувачи се: петролетер, етил ацетат, хексан, дихлорометан и мешавини вода-етанол или вода-метанол.

Идентификација на флороглуциноли во растителен материјал (екстракт) може да се изведе со низа боени реакции со различни реагенси: воден раствор на железо хлорид и калиум ферицијанид, ванилин во мешавина од девет волумени 95 % етанол и еден волумен концентрирана HCl, анисалдеhid во мешавина од девет волумени 95 % етанол и еден волумен концентрирана H₂SO₄ и др. Поновите визуализирачки реагенси за флоро-глуциноли се бромокрезол зелено и неутрал-црвено (Bromocresol green - BCG и Neutral red – NR). Присуството на флороглуцинол/и може да се утврди со помош на спектро-скопски техники (NMR, MS и др.).

Определување содржина на флороглуциноли во растителен материјал и во други примероци може да се изведе со колориметриски метод со циметалдеhid-HCl, кој во реакција со флороглуциноли дава розово обоен производ. Апсорпцијата се мери на 550 nm, а за квантификација е неопходна калибрациона крива од референтна супстанција. Вкупните флороглуциноли, особено од групата флоротанини, може да се определуваат со методот по Folin-Ciocalteu. Треба да се има предвид дека вредностите на вкупните флороглуциноли определени со овој метод се преценети, поради слабата селективност на методот и реагирање на реагенсот и со другите феноли во примерокот. Од други методи за раздвојување и определување на флороглуциноли се користат: флуориметрија, TLC, HPLC-UV/DAD, GC-MS и детекција со хемилуминисценција (CL). Методот со хемилуминисценцијата се карактеризира со висока чувствителност и широк работен опсег. Најчесто се комбинира со HPLC, но таква комбинација има свои ограничувања бидејќи раздвојувањето се врши со обична C18 силика-базирана колона. Познато е дека перформансите на ваквата колона се задоволителни само во опсегот на pH од 2-8, додека за системите на хемилуминисценција е потребно базно pH. Користењето на пуфер Na₂CO₃/NaHCO₃, овозможува флороглуцинолот да покаже силно подобрување на хемилуминисценцијата на pH 9,4. Високоефикасни техники како што е LC-MS се користат во поново време.

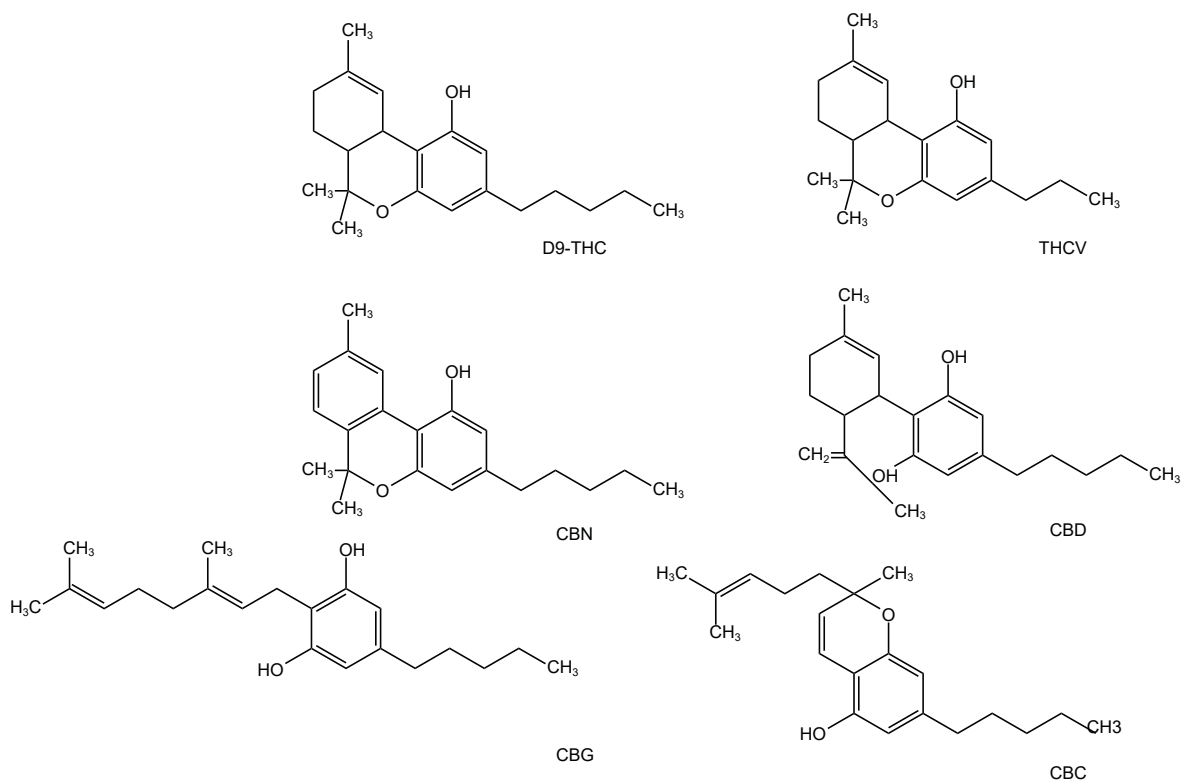
8.10.2. (Фито)канабиноиди

(Фито)канабиноидите се пренилирани поликетиди кои се ексклузивно врзани за претставниците од родот *Cannabis* L. (*C. sativa* ssp. *sativa*, *C. sativa* ssp. *indica* и *C. sativa* ssp. *ruderalis*). Се јавуваат и во неколку други растенија (*Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia*, *Acmella oleracea*, *Helichrysum umbraculigerum* и *Radula marginata*). Хемиски претставуваат терпенофеноли со 22 C-атоми (или со 21 C-атом кај неутралните форми). Идентификувани се околу 180 природни канабиноиди што конвенционално се класификуваат во 11 супкласи, согласно нивната хемиска структура:

1. канабигерол (CBG), канабигеролна киселина (CBGA),
2. (-)-Δ⁹-*trans*-тетрахидроканабинол (Δ⁹-THC),

3. канабидиол (CBD),
4. канабихромен (CBC),
5. канабинол (CBN),
6. (-)- Δ^8 -*trans*-тетрахидроканабинол,
7. канабициклол (CBL),
8. канабинодиол (CBND), канабидиолна киселина (CBDA),
9. канабиелсоин,
10. канабитриол и
11. мешани типови на канабиноиди.

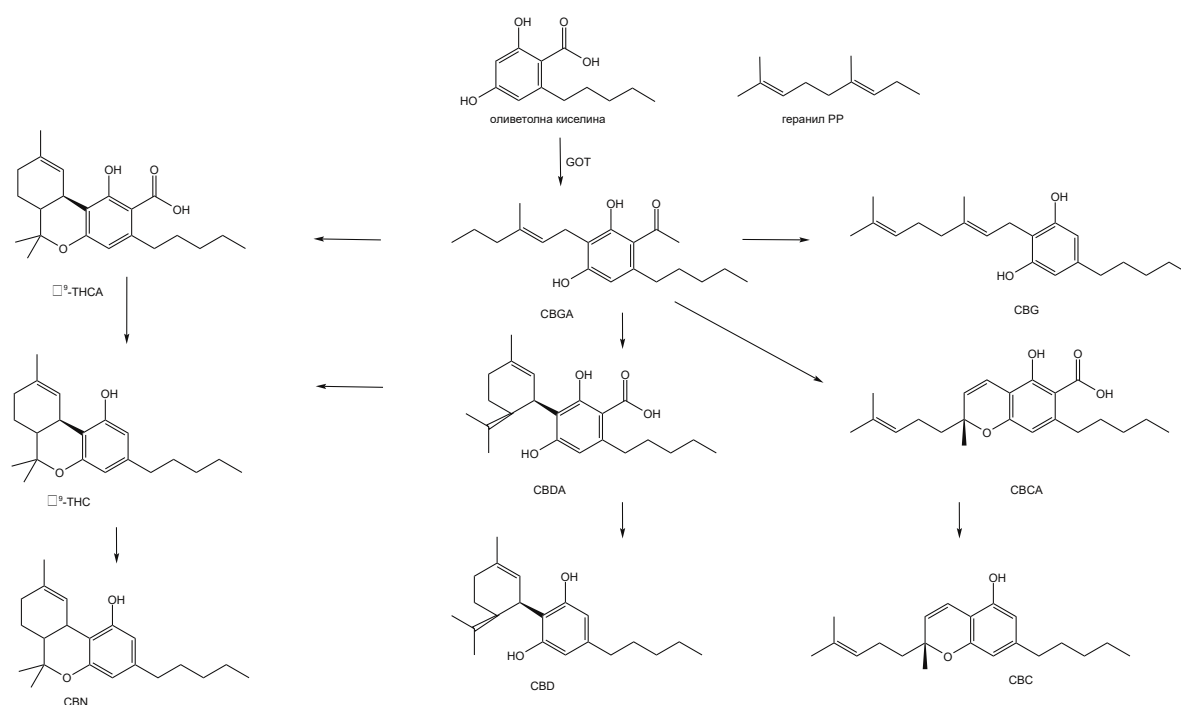
Класите канабигерол, тетраhydroканабинол, канабидиол, канабихромен и нивни соодветни киселини се природни канабиноиди, кои растението канабис природно ги создава (слика 141). Останатите класи канабиноиди настануваат како резултат на декомпозиција на растението или како резултат на лоши услови при берба и сушење, па се сметаат за производи (артефакти) на природните канабиноиди. Сите супкласи генерално потекнуваат од CBG-тип (канабидиол) и имаат сличности во однос на хемиската структура. Видовите канабис во однос на содржината на фито-канабиноидите, главно Δ^9 -THC, се класификуваат во вид со ниско ниво на THC (*C. sativa* L.), со високо ниво на Δ^9 -THC (*C. indica* Lam.) и со средно ниво на Δ^9 -THC (*C. ruderalis* Janisch). Сепак, трите вида многу лесно се вкрстуваат и многу од постоечките сорти канабис се хибриди, од каде класификацијата на хемотипови наместо на видови станува многу подобра и покорисна.



Слика 141. Позначајни канабиноиди (THC = Δ^9 -*trans*-тетрахидроканабинол, THCV = Δ^9 -тетрахидроканабиварин, CBN = канабинол, CBD = канабидиол, CBG = канабигерол, CBC = канабихромен)

Биосинтеза. Создавањето на канабиноидите во канабисот е проучувано од голем број автори и, иако многу работи се чинат познати, сепак има уште нејаснотии што дополнително треба да се разрешат. Во најголема мера се создаваат во жлездените трихоми (vlakна) на листовите од женските единки, поточно во трихомите на лисните пупки. Според едни автори, главен прекурсор за создавање на канабиноидите е оливетолна киселина, особено за C_{21} структурите. Според други значаен прекурсор е и диваринската киселина. Оливетолната киселина е производ настанат по патот на кетидите, од хексаноил-КоА со три молекули на малонил-КоА. Генерално, канабиноидите се создаваат веројатно од C_{21} прекурсорот (канабигеролна киселина, CBGA) или од C_{19} аналогот (канабигероваринска киселина, CBGVA), кои настануваат во реакцијата на геранил пирофосфат со оливетолна односно со диваринска киселина, соодветно (слика 142). Понатаму, ензимската конверзија на канабигеролната и канабидиваринската киселина произведува широк спектар на C_{21} терпенофеноли, вклучувајќи Δ^9 -THC, канабигерол (CBG), канабихромен (CBC), канабициклол (CBL), канабидиол (CBD), канабинодиол (CBND), канабинол (CBN) и нивни C_1 хомолози како Δ^9 -тетрахидро-канабиварин (Δ^9 -THCV), канабиварин (CBV) и канабидиварин (CBDV).

Во растението *Cannabis sativa*, најголемиот дел од канабиноидите првично се формираат како карбоксилни киселини (пр. Δ^9 -THCA, CBDA, CBGA, и Δ^9 -THCVA) кои се декарбоксилуваат до нивни неутрални форми, како резултат на сушење, загревање, согорување и стареење. Постојат и различни изомери на фитоканабиноиди кои се резултат на варијации и изомеризации на позицијата на двојната врска во алицикличниот јаглороден прстен.



Слика 142. Биосинтеза на канабиноиди

CBN – канабинол, CBC – канабихромен, CBD – канабидиол,
 CBG – канабигерол, CBDA - канабидиолна киселина, CBGA - канабигеролна киселина, CBGA -
 канабихроменска киселина,
 GOT - оливетолил геранилтрансфераза,
 Δ^9 -THCA - Δ^9 -тетрахидроканабинолна киселина,
 Δ^9 -THC - Δ^9 -тетрахидроканабинол

Биолошко-фармаколошко дејство. Двата најтемелно проучени фитоканабиноиди се Δ^9 -THC и CBD. Овие соединенија интензивно се проучуваат заради нивниот капацитет во лекувањето на хронична и акутна болка, епилепсија, анксиозност и модулирање на апетитот, како и заради нивните потенцијални токсичности и несакани ефекти. Се смета дека ефектите на фитоканабиноидите во човековото тело се посредувани од многу различни рецептори вклучувајќи ги канабиноидните рецептори тип 1 и тип 2 (CB1R и CB2R), како и други рецептори како што се рецепторите за серотонин (5HT), орфан GPCRs-рецепторите кои се поврзани со Г-протеините и лиганд-контролираните јонски канали. Канабиноидот Δ^9 -THC делумно ги стимулира канабиноидните рецептори CB1R и CB2R, додека CBD е негативен модулатор на CB1R и антагонист на CB2R (ги блокира рецепторите).

Имено, сè до 1980-тите, се сметаше дека канабиноидите ги даваат физиолошките и бихевиоралните ефекти преку неспецифична интеракција со клеточните мембрани, наместо интеракција со специфични рецептори поврзани со мембраната. Откривањето на првите канабиноидни рецептори во 1980-тите помогна да се разбере механизмот на дејството на канабиноидите. Внатрешниот, ендоканабиноидниот систем (ECS), регулира многу важни функции на човековото тело, поврзани со функциите на нервниот систем, вклучувајќи ја контролата на движењето и моторната координација, учењето и меморијата, емоциите и мотивацијата, однесувањето слично на зависност и модулацијата на болка. Битно е да се напомене дека CB1-рецепторите се наоѓаат првенствено во мозокот (во базалните ганглии и во лимбичкиот систем), во малиот мозок и во машкиот и женскиот репродуктивен систем. За разлика од нив, CB2-рецепторите претежно се наоѓаат во имунолошкиот систем или во клетките добиени од имунолошкиот систем и се одговорни за имуномодулаторните и веројатно, за другите терапевтски ефекти на канабиноидите. Оттука, може полесно да се разбере психостимулативното дејство на Δ^9 -THC и Δ^8 -THC, со оглед на нивното врзување за CB1-рецепторите и стимулација на истите. Од друга страна, канабидиолот (CBD) има мал афинитет за CB1 и CB2-рецепторите, а дополнително дејствува и како индиректен антагонист (блокатор) на канабиноидните агонисти (стимулатори). Постојат определени докази дека CBD има антипсихотичен ефект, но потребни се дополнителни истражувањата во оваа област за сигурна потврда. Она што со сигурност е познато е дека канабидиол дејствува како стимулатор 5-HT_{1A}-рецепторот (вид на серотонински рецептор), што може да придонесе во промовирањето на спиењето и потиснувањето на возбудата.

Растението канабис, сув материјал (цвет) и соодветните преработки од него, влијае на речиси секој систем во човековото тело, на начин кој претставува комбинација на дејствата што ги даваат алкохолот, средствата за смирување, опијатите и халуциногените агенсии. Обезбедува анксиолитично, седативно, аналгетично, психоделично, апетитстимулирачко и низа други системски ефекти. Генерално тие се разгледуваат како психолошки и како системски ефекти. Психолошките ефекти се однесуваат врз расположението, врз перцепцијата, врз когнитивните и психомоторните перформанси и врз вештините за возење и управување со машини. Системските ефекти се ефектите врз кардиоваскуларниот и врз респираторниот систем. Канабисот поседува определени имуносупресивни и ендокрини ефекти, и предизвикува аналгезија што е индуцирана од канабиноиди. Хроничната употреба на канабис носи определени ризици врз репродуктивниот тракт (за мајката за време на бременоста и породувањето, за фетусот и за новороденчето).

Значење и употреба. Најраните податоци за медицинска употреба на канабис датираат од 3000 год. пр. н. е. од страна на Асирците. Податоците од 2700 год. пр. н. е. се од Кина, каде *C. sativa* се користела како лек за менструални проблеми, ревматизам, маларија, констипација и други состојби. Античките цивилизации - Египќаните (околу 1700 год. пр. н. е.), Индијците (околу 1600 год. пр. н. е.), Персијците (околу 750 год. пр. н. е.), Грците и Римјаните (околу 450 год. пр. н. е.) го користеле канабисот во медицински цели. Историски гледано, канабисот се користел за третман на различни заболувања, меѓу кои: глауком, анални пукнатини, дијареја, во акушерството, за олеснување на анксиозноста и др. Канабисот е воведен во современата западна медицина на почетокот на 19 век, главно за третман на болка, глауком, гадење, депресија и невралгија. Денес,

медицинската употреба на *C. sativa* вклучува повеќе индикации поддржани со сигурни клинички докази. Такви се третманот на хронична болка, мултиплекс склероза, резистентна епилепсија и гадење и повраќање поврзани со хемотерапија, како и губење на апетитот и тежината што се поврзани со ХИВ/СИДА, Туретов синдром, анксиозни нарушувања, нарушувања на спиењето, посттравматско стресно нарушување и шизофренија. Дополнителни здравствени придобивки од екстрактите на *C. sativa* се однесуваат на: намалување на холестеролот и триглицеридите во крвта и намалување на крвниот притисок, на антиоксидантната и на антимикробната активност. *C. sativa* и неговите екстракти се користат и во третман на дерматитис и дегенеративни имунолошки заболувања. Сувиот цвет, екстрактот и другите преработки од канабис се користат како додатоци на исхраната и како традиционални хербални лекови. Најчести фармацевтски дозирани форми во кои се користи канабисот се: масло од канабис, орални раствори, концентрати слични на масло и тинктури кои се користат орално и сублингвално, лосиони, мелеми, креми, соли за бањање, гелови, фластери и други локални производи, како и ректални и вагинални лекови (супозитории, таблети).

Терапевтската употреба на чисти канабиноиди (природни и синтетски добиени аналози) се однесува на третман на болка, на антиеметичното дејство во случај на антиканцер терапија, стимулација на апетит, третман на епилепсија, глауком, бронхијална астма, нарушувања на расположението, како и определени психијатриски состојби. Дополнително, агонистите на канабиноидните рецептори имаат потенцијал за невропротективна активност, може да се користат за управување со акутна шизофренија и за подобрување на когнитивните и мемориските дисфункции поврзани со нарушувања како што е Алцхајмерова болест.

Освен медицинската, конопот има и значајна комерцијална употреба. Се користи во производство на храна и пијалаци, бидејќи има голема хранлива вредност: висока содржина на протеини, која содржи девет есенцијални аминокиселини, диететски влакна и идеален сооднос на ω -6 : ω -3 масни киселини (3 : 1). Истото важи и за брашното и за маслото од коноп, кои имаат висока содржина на протеини, нерастворливи влакна и полинезаситени масни киселини. „Јадливите производи од канабис“ (cannabis edibles) се најновиот вид производи базирани на канабис кои неодамна станаа популарни: гуми за цваќање, лижалчиња, тврди бонбони од карамела, пастили, џемови и др. За одбележување е дека овие производи може да содржат определено количество Δ^9 -ТНС и/или CBD. Индустрискиот коноп се одгледува за производство на влакна од кои се изработуваат јажиња, вреќи, простирки и друго.

Екстракција и испитување на канабиноиди. Канабиноидите се нестабилни природни производи и методите за нивна екстракција зависат од поставената цел. Различни пристапи се користат кога е потребна подготовка на екстракт во кој ќе се определува содржина на некои канабиноиди (главно оние што се сметаат значајни за дејството) или екстракцијата е со цел да се определи канабиноидниот профил во примерокот. Постарите методи на екстракција на канабиноиди се базираат на потопување на растителниот материјал во растворувач и мацерација во определен временски рок. Може да се врши загревање на растворувачот блиску до точката на вриење и одржување на температурата во определено време, по што, во двата случаи следува филтрирање и понатамошна обработка на добиениот филтрат. Вообичаено, температурните услови речиси секогаш се услови на собна температура, поретко екстракцијата се изведува на ниска температура (на пример, на 4 °C) со цел да се избегне конверзија на фитоканабиноидите од растителен материјал (најчеста промена е декарбоксилација на канабиноидните киселини). Доколку е потребно дополнително загревање, се применува екстракција по Соклет. Екстракцијата на канабиноидите од растителен материјал од канабис може да се изведе и со други постапки и техники:

- Со примена на некоја од т.н. зелени методи на екстракција: со помош на ултразвук (UAE), со помош на микробранови (MAE), со суперкритичната екстракција (SFE), со динамична мацерација (Dynamic maceration = DM), забрзана екстракција со растворувач (ASE), и др. Се

покажа дека наведените методи на екстракција се побрзи и користат помалку растворувачи во споредба со „класичната“ мацерација.

- Течната екстракција под притисок (PLE) во случај на канабис се изведува со *n*-хексан, на температура 100 °C и притисок 40 bar, за време од 15 мин. Се покажа дека *n*-хексанот е ефикасен за екстракција на Δ^9 -THC и CBN, но не и за Δ^9 -THCA, бидејќи киселината е помалку растворлива во *n*-хексан. PLE со загреана вода, т.е. екстракција со топла вода под притисок (PHWE) се користи за да се добијат екстракти богати со CBD додека се потиснува содржината на THC и CBN.
- Центрифугална партициона хроматографија (Centrifugal partition chromatography = CPC) е течно-течна партициона техника во која стационарната фаза е имобилизирана со сила на центрифугирање, додека мобилната фаза се пумпа со високи стапки на проток. Соединенијата се одвојуваат врз основа на разликите во партиционите коефициенти. CPC овозможува ефикасна екстракција на фитоканабиноиди од хербален материјал на канабис: Δ^9 -THC, CBD, CBN, CBG, Δ^9 -THCA, CBGA и CBDA, со висока ефикасност (> 90 %), во случај кога се користи двофазен систем составен од: *n*-хексан /MeOH/H₂O со мравја киселина и хексан/ацетон/ацетонитрил.
- За екстракција на Δ^9 -THC од смола на канабис може да се користи CPE-екстракција која вклучува употреба на нејонски сурфактант, сол Na₂SO₄ и дејонизирана вода, загревање на 40 – 90 °C и центрифугирање. И покрај ниската ефикасност на екстракција (до 60 %), CPE нуди многу предности, како што се можноста за екстракција и претконцентрација на аналитите во еден чекор без растворувачи и избегнување на губење на аналитот за време на испарување на растворувачот.

За идентификација и квантификација на фитоканабиноиди во растителен материјал од канабис или во различни канабис-базирани производи главно се користат методи што се базирани на гасната и на течната хроматографија. Пристапот најчесто вклучува развој на аналитички платформи за профилирање на фитоканабиноиди во различни материјали. Досегашните сознанија покажуваат дека метод од избор е GC-MS, кој е најточниот и најробустен аналитички метод за профилирање на фитоканабиноиди, и во истражувачки и во мониторинг цели.

- *GC-хроматографија*. GC-FID/MS овозможува профилирање и определување на доминантни фитоканабиноиди (Δ^9 -THC, CBD и CBN), вкупна содржина на THC (Δ^9 -THC и Δ^9 -THCA) и квантификација на односот Δ^9 -THC/CBD. Важно е да се напомене дека во случај кога се определува вкупната содржина на фитоканабиноиди во примерокот, таа е збир и на киселите и на неутралните компоненти, бидејќи GC ја бара високи температури на колоната, при што киселите канабиноиди се декарбоксилуваат во текот на транзитот низ колоната. За да се спречи нивното разградување и за да се постигне профилирање на природно присутните компоненти во материјалот од канабис, треба да се изврши реакција на дериватизација пред анализата на GC. Најчесто се применува силирање (силилација) која вклучува супституција на H-атом кој е поврзан со хетероатом (на пр., кај -OH, -COOH, -NH₂, =NH и -SH) со силил група, т.е. триметлсилил (TMS) или tert-бутилдиметилсилил група (TB-DMS). Добиените деривати на TMS/TBDMS имаат помал поларитет и зголемена термичка и каталитичка стабилност и податливост на GC. За дериватизација се користат различни реагенси. Треба да се има предвид дека и TMS/TBDMS-дериватите можат термички да се разградат во портата на инјекторот и/или во системот на колона.
- Дводимензионална гасна хроматографија (GC × GC). Искуствата покажаа дека едодимензионалната GC не обезбедува задоволително анализирање на сложени канабиноидни мешавини. Дводимензионалната гасна хроматографија (GC × GC) овозможува поуспешна анализа на екстрактите од канабис, со тоа што овозможува откривање на повеќе компоненти во приме-

рокот. Дополнително, GC × GC произведува две групи на податоци за задржување на компонентите што може во голема мера да помогне во нивната идентификација. Сепак, техниката има свои позитивни и негативни страни. Во многу студии е докажано дека азотот има најдобра ефикасност, но одзема многу време. Од друга страна, ако се користи хелиум, процесот е брз и ефикасен, но цената е висока. Почетните и крајните температури, типот на колоните и другите недостатоци се речиси исти како и кај GC-MS.

- *LC-хроматографија*. Методите базирани на течната хроматографија во поново време стануваат методи на избор за квалитативно и квантитативно профилирање на фитоканабиноиди. Поедноставената подготовка на примерокот и ниските температури, високиот притисок и високите стапки на проток што се користат за време на TLC, HPTLC, HPLC и UHPLC, како и неодамна појавената SFC овозможуваат зачувување на примерокот без декарбоксилација и распаѓање, сигурно раздвојување на неутралните и на киселите фитоканабиноиди и, на тој начин, директна идентификација и квантификација на неутралните и на киселите форми на фитоканабиноиди во испитуваните примероци. Поедноставените методи за подготовка на примерокот и избегнувањето на загубата на аналитите, го фаворизираат LC пред GC во профилирањето на канабиноидите.
- TLC е погоден метод за прелиминарен полуквантитативен скрининг на содржината на канабиноиди во рутински анализи. Претставува метод на избор за идентификација на цвет на канабис, вметнат во монографиите за оваа растителна сировина во повеќето фармакопеи (германска, швајцарска, американска хербална и европска фармакопеја). Развојот на HPTLC понуди сигурна техника што може да се користи за профилирање на канабис, со можност за паралелно анализирање на повеќе примероци истовремено. Добрата страна на HPTLC се пониски трошоци за работа и помало времетраење на анализата. Автоматизацијата на апликацијата на примерокот за анализа во HPTLC ги елиминира или ги минимизира систематските грешки, обезбедува подобра резолуција и генерира извештаи што се погодни за креирање на потребната документација.
- HPLC-методите за определување и профилирање на фитоканабиноидите покажаа добра чувствителност и репродукцибилност и висока резолуција во случај на квантификација на Δ^9 -THC, CBD и CBN, споредлива со GC/FID. За профилирање на фитоканабиноиди, (U)HPLC аналитичките платформи се спојуваат со UV, DAD, PAD или MS. Најчесто се користат колони со C18 стационарни фази и метанол со 0,1 % мравја киселина или вода со 0,1 % мравја киселина како мобилни фази. Иако многу студии користат UV/DAD за раздвојување на главните фитоканабиноиди (CBDA, CBD, CBN, Δ^9 -THC и Δ^9 -THCA), повеќето не ја земаат предвид интерференцијата од „малите“ фитоканабиноиди (на пример, CBNA). Таквото мешање е од посебно значење при профилирањето на концентрираните екстракти и другите производи во кои количеството на малите фитоканабиноиди може да биде зголемено до забележливи нивоа. Дополнително, некои терпени апсорбираат UV-светлина со иста бранова должина како и фитоканабиноидите. Овие проблеми ја намалуваат чувствителноста, специфичноста и селективноста на UV/DAD-методите, а истите лесно се надминуваат со примена на детекција на MS. Во литературата се објавени голем број методи за определување на фитоканабиноидите каде што течната хроматографија се комбинира со масена детекција или истовремено и со други детектори (HPLC-UV/DAD/MS; HPLC-ESI-qTOF/MS; HPLC-MS/MS; LC-MS/MS and APCI; UPLC-qTOF и др.
- *Методи на вибрациона спектроскопија*. Во изминатава деценија, техниките на вибрациона спектроскопија (IR, NIR, MIR, FTIR и Raman) се појавија како процесна аналитичка алатка во фармацевтската индустрија за следење на различни параметри и карактеристики. Нивната способност за high-throughput скрининг на примерок за краток временски период може да обезбеди брз, разновиден и неинвазивен пристап во квалитативно и квантитативно профилирање на растението (во различни фази од развојот) и на екстрактите од канабис.

- *Други аналитички техники.* За профилирање на фитоканабиноидите, иако ретко, може да се користи метод на СЕ или комбинацијата на HPLC со СЕ, како и СЕС. Во литературата се објавени податоци за раздвојување на седум фитоканабиноиди (CBG, CBD, CBN, Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, CBC, Δ^9 -THCA) со СЕС, на C18 колона и мобилна фаза од ацетонитрил/фосфатен пуфер (75 : 25, v/v) во екстракти од растителен материјал од канабис. Друга алтернатива на GC и HPLC е NMR. NMR е точен и репродуцибилен метод, и за разлика од GC и HPLC, не е чувствителен на нечистотии, како што се хлорофил и липиди, присутни во примерокот. Во литературата е објавен метод за квантификација на фитоканабиноидите што се базира на ^1H -NMR и кој не бара хроматографско прочистување, а финалната анализа трае 5 минути. Со методот била извршена квантификација на CBDA, THCA, CBG и CBGA. Една од главните предности на оваа техника е што не се потребни референтни стандарди и што може да се квантифицираат фитоканабиноидите за кои не се достапни комерцијални референтни супстанции. Поради недостаток на референтни супстанции тие фитоканабиноиди не може да се определуваат со други техники. NMR-техниката сè уште не се користи во рутинските анализи поради основниот недостаток, а тоа е високата цена на чинење на NMR-инструментите со висока резолуција.

ТЕРПЕНИ И ТЕРПЕНОИДИ

Терпеноидите претставуваат бројна и многу разновидна група на секундарни метаболити. Широко се распространети во растителните организми, а поновите истражувања покажуваат дека се синтетизираат и во некои морски организми. Името, „терпен“, е изведено од зборот терпентин, што претставува производ на олеоресините од иглолисните растенија (каде преобладава компонентата α -пинен). Претставуваат ароматични компоненти одговорни за вкус и мирис.

Карактеристики на терпените.

Физички карактеристики

- Повеќето терпени се безбојни течности со пријатен мирис, кои се полесни од вода (исклучок е камфорот кој е цврста супстанција).
- Растворливи се во органски растворувачи додека во вода не се раствораат.
- Испарливи компоненти.
- Точката на вриење е во опсег од 150 °C до 180 °C. Оксигенираните деривати имаат слични точки на вриење но повисоки од тие на терпените 200 – 230 °C.

Хемиски карактеристики

- Терпеноидите се со отворен ланец или циклични незаситени компоненти со една или со повеќе двојни врски.
- Подлежат на реакции на адиција со реагенси како водород, халоген, халогенска киселина за да формираат адициони производи.
- Подлежат на реакции на полимеризација и на дехидрогенација.
- Лесно се оксидираат со сите оксидирачки агенси поради присуство на олефински врски.
- Терпеноидите произведуваат изопрен како еден од продуктите на термална декомпозиција.

Фитохемиски карактеристики

Терпеноидите реагираат со

- хлороформ и со сулфурна киселина давајќи црвено-кафено обојување (реакција по Салковски).
- додека со раствор од бакар ацетат даваат смарагдно зелена боја.

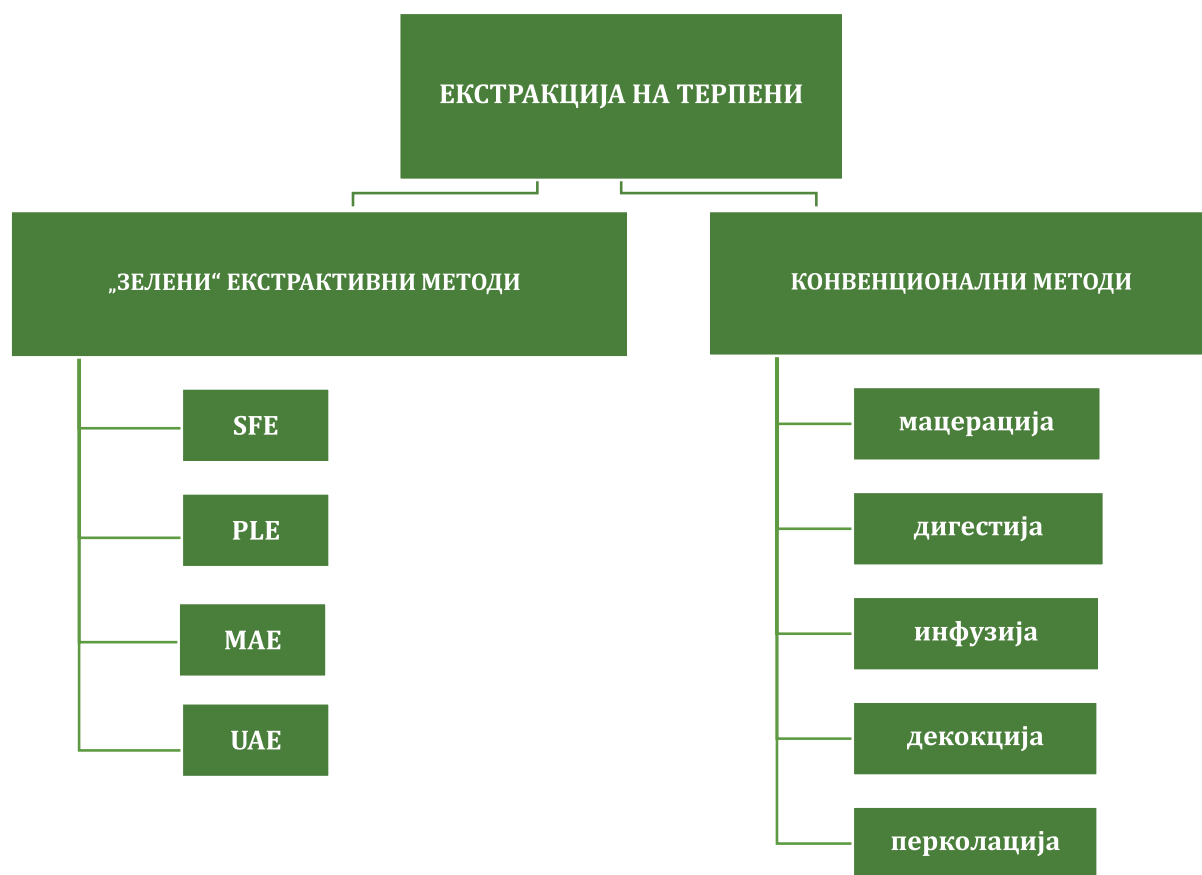
Фармаколошки карактеристики

Оваа група на секундарни метаболити поседуваат различни фармаколошки активности како антивирусни, антибактериски, антималариски, антиинфламаторни, антиканцер, хипогликемични, антиоксидативни, антидијабетични и други својства.

Општи методи за екстракција на терпените.

Генерално, аналитичкиот метод кој се занимава со анализа на различни компоненти од растенија се состои од два главни чекори: екстракција и хроматографска анализа. Вообичаено вториот сегмент трае неколку минути, додека чекорот на екстракција е често досаден и може да потрае со часови (пример традиционални техники како хидродестилација, Сокслет, дестилација со пареа итн.). Дополнително повеќето од овие методи бараат употреба на високи температури на екстракција што може да доведат до загуба на аналитот и топлински разградувања. Ова води кон развој на нови аналитички методи кои овозможуваат брзо, сензитивно и истовремено определување на широк спектар на испарливи соединенија. Во овој контекст, брзи и еколошки техники кои користат поблаги услови на екстракција се од голем интерес во различни истражувачки полиња кои се занимаваат со изолација на испарливи соединенија и други терпенски соединенија.

Екстракцијата е првиот чекор за одвојување на целните терпенски соединенија од различни природни производи. Процесот на екстракција вклучува одвојување на активните состојки (терпени) од растителните сировини со употреба на соодветни растворувачи. Целта на стандардизираните процедури за екстракција е да се добијат терапевтски активни соединенија преку елиминирање



Слика 143. Општи екстрактивни постапки за терпенски соединенија

на инертните материјали при третман со селективни растворувачи односно менструми. Различните методи кои се користат за екстракција на растителни суровини кои содржат терпенски компоненти вклучуваат мацерација, инфузија, дигестија, декокција, перколација, топла континуирана екстракција (Сокслет екстракција), водена или алкохолна екстракција, зелени екстрактивни методи како што е екстракција со SFE, PLE и MAE како и UAE итн. (слика 143). Најчесто монографиите од различни фармакопеи ги вклучуваат мацерацијата и перколацијата за екстракција на активните принципи од суровината.

Општи методи за сепарација, изолација и структурна елуцидација на терпените.

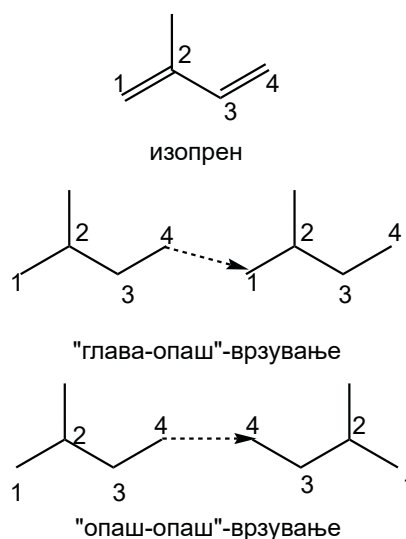
Постои развој на различни стратегии за структурно определување на терпените, методите што се засноваат на хемиска деградација и анализа на спектроскопски податоци. Хроматографските методи како што се TLC, HPTLC, HPLC, GLC, CC итн. се применуваат за сепарација и изолација на различни видови терпеноиди (ациклични, моноциклични, бициклични) од природни извори. За идентификација, проценка и структурно разјаснување на терпените се користат различни спектрални методи, вклучувајќи UV, FT-IR, NMR, LC-MS, кристалографија со рендген, флуориметрија, елементарна анализа (C : H : N : O) итн.

Биосинтеза (општи принципи на сите групи терпеноиди).

Со биохемиски истражувања е потврдено дека биосинтетските патишта на бројни, структурно различни типови терпенски соединенија се тесно поврзани и се одвиваат по сличен механизам. Првите сознанија за биосинтезата датираат од 1887 година кога Валах ја постави хипотезата дека терпеноидите настануваат со поврзување структурни единици што се состојат од 5 C-атоми. Овој основен градивен елемент се нарекува изопрен (C_5H_8), а хемиски претставува 2-метил-1,3-бутадиен (слика 144). Терпеноидите настануваат со поврзување на 2, 3, 4, 6 или n-број изопренски единици. Подоцна, дури во 1953 год. Ружичка го постави биогенетско изопренско правило, со кое се објаснува поврзувањето помеѓу изопренските единици и се потврдуваат претходно поставените хипотези за создавањето на терпеноидите (изопреноидите). Според Ружичка, структурите на сите изопреноиди, од мономери до највисоки полимери, можат да бидат изведени според правилото „глава-опаш“ поврзување на изопренските C_5 единици или (1 - 4) поврзување (слика 144). Со ваков начин на поврзување (асиметрично поврзување) настануваат монотерпени, сесквитерпени и дитерпени.

Посложените терпенски соединенија, тритерпени и тетратерпени, настануваат со димеризација на монотерпените, сесквитерпените и дитерпените, а нивното меѓусебно поврзување настанува со (4 - 4) тип на поврзување или т.н. „опаш-опаш“ поврзување (симетричното поврзување) (слика 144).

Денес е утврдено дека според биогенетското изопренско правило на Ружичка се создаваат само неколку основни структури т.н. прекурсори на посебните класи терпеноиди, а со реакции на циклизација, со воведувањето различни функционални групи и со реорганизацијата на основните молекули доаѓа, всушност до синтетизирање на огромниот број соединенија од групата на терпеноиди. Според бројот на



Слика 144. Типови на врзување на изопренските единици во биосинтезата на терпеноидите

изопренските единици, терпените се делат на хеми (C_5), моно (C_{10}), сескви (C_{15}), ди (C_{20}), сес (C_{25}), три (C_{30}), тетра (C_{40}), и поли ($> C_{40}$) терпени (табела 2).

Табела 2. Класификација на терпените

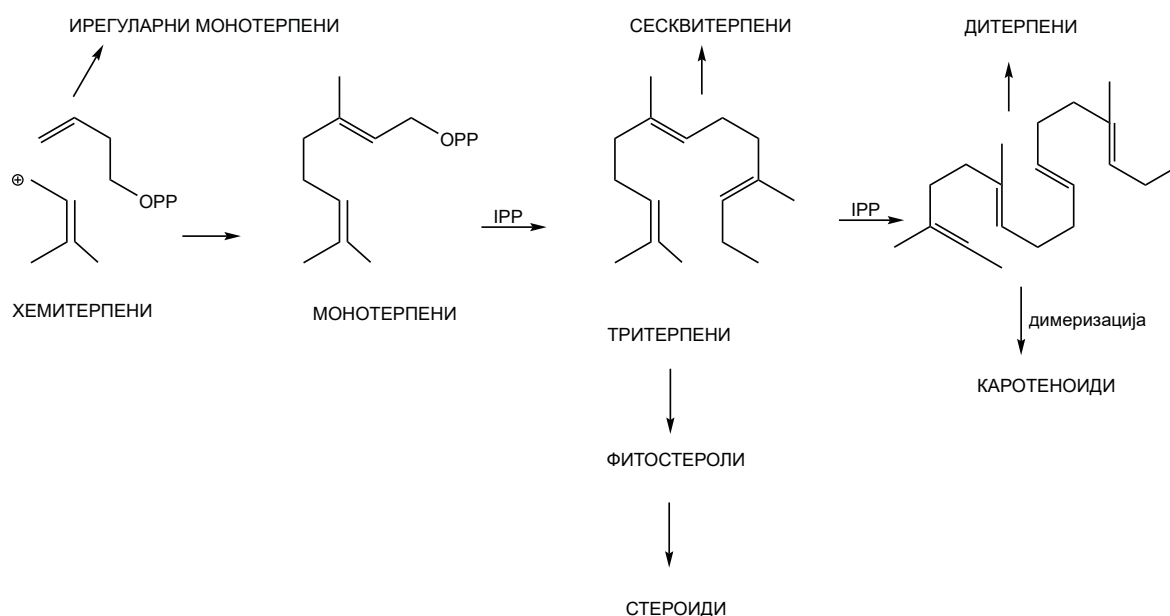
Име	Број на изопренски единици	Број на јаглеродни атоми	Молекуларна формула		Пример
Хемитерпени	1	5	C_5H_8	се јавуваат ретко и немаат посебно биолошко значење. Се јавуваат како лактони, испарливи јаглеводороди, алкохоли	изовалеријанска киселина
Монотерпени	2	10	$C_{10}H_{16}$	се делат во повеќе подгрупи во однос на цикличниот јаглероден скелет. Тука припаѓаат испарливи монотерпени, лактони и трополони	гераниол
Сесквитерпени	3	15	$C_{15}H_{24}$	испарливи деривати и лактони	артемисин
Дитерпени	4	20	$C_{20}H_{32}$	слабо испарливи	тахол
Сестерпени	5	25	$C_{25}H_{40}$	/	маноалид
Тритерпени	6	30	$C_{30}H_{42}$	неиспарливи сапогенини, стероли и стероиди	сквален
Тетратерпени	7	40	$C_{40}H_{64}$	каротеноиди	ликопен
Полутерпени	>8	>40	$(C_5H_8)_n$	/	природна гума

Формирањето на прекурсорите на наведените групи (класи) соединенија се изведува со поврзувањето на изопренските единици. Изопренот во растителните клетки се јавува само во активирани, фосфорилирана форма. Ацикличен прекурсор во неговата биосинтеза е **мевалонската киселина (MVA)**, чија биосинтеза започнува од оцетна киселина (ацетил-CoA) преку формирање на интермедиер (хидрокси-метилглутарил-CoA или HMG-CoA). Со редукција на една од карбоксилните групи настанува MVA. Настанатата MVA двојно се фосфорилира, прво на примарната, а потоа и на терцијарната OH-група, при што настанува пирогенерат на мевалонска киселина. Настанатиот пирогенерат се декарбоксира и со отцепување на еден пирогенератен остаток создава активна форма на изопрен = **изопентенилпирогенерат (IPP)** и негов таутомер **диметилаллилпирогенерат (DMAPP)**. Во биосинтезата на терпеноидите DMAPP претставува почетна едини-

ца на која се на додава IPP. Со „глава-опаш“ поврзување настануваат фосфорилираните алкохоли, прекурсори на следните класи терпени:

- геранилпирофосфат (GPP), прекурсор на монотерпените (C_{10})
- фарнезилпирофосфат (FPP), прекурсор на сесквитерпените (C_{15}).
- геранилгеранилпирофосфат (GGPP), прекурсор на дитерпените (C_{20}).

Формирањето на скелетот на тритерпените, стеролите и тетратерпените се одвива на друг начин. Тритерпените и стероидите настануваат преку формирањето на сквален, соединение што настанува со поврзување на две молекули на FPP ($2 \times C_{15}$). Тетратерпените настануваат од фитоените што настануваат со поврзување на две GGPP-единици ($2 \times C_{20}$), а со поврзување на голем број C_5 единици настануваат политерпените (слика 145).



Слика 145. Биогенеза на различни класи терпеноиди

Во растенијата може да се јави и самостојна C_5 -единица во форма на лактони, испарливи јаглеродороди, алкохоли и сл. Овие соединенија се означени како хемитерпени. Активирана C_5 -единица (DMAPP) е силен алкилирачки агенс и како активен метаболит често влегува во биосинтезата на некои други соединенија (пр. кај фурано или пиранокумарини, нафтохинони, некои алкалоиди и сл.). Во одредени случаи покрај регуларни терпенски соединенија, се создаваат и ирегуларни терпеноиди (пиретрини и цинерини).

Од друга страна врз основа на број на прстени присутни во нивната структура, терпеноидите понатаму се категоризираат во различни подгрупи како што се ациклична (присуство на структура со отворен синцир), моноциклична (присуство на еден прстен), бициклична (присуство на два прстени), трициклична (присуство на три прстени) и тетрациклични (присуство на четири прстени). Општата молекуларна формула на родителскиот јаглеродород на заситениот терпеноиден јаглеродород е претставена во табела 3.

Табела 3. Општа молекуларна формула на родителскиот заситен јагледоводород

Тип на терпеноид	Општа формула	примери
Ациклични	$C_n H_{2n+2}$	Мирцен, фарнесол, фитол
Моноциклични	$C_n H_{2n}$	Ментол, цинеол,
Бициклични	$C_n H_{2n-2}$	Камфор, β -сантол, склареол
Трициклични	$C_n H_{2n-4}$	Абиетичка киселина
Тетрациклични	$C_n H_{2n-6}$	Стевиол

Хемитерпени (C_5). Наједноставна група од сите терпени со една изопренска единица и формула C_5H_8 . Се создаваат со модификации во DMAPP и во IPP. Наједноставниот од оваа класа, изопренот е ослободен од листовите на многу дрвја и растенија. Тигличната и ангелика киселина се претставници и формираат естри со голем број природни производи. Бројот на хемитерпенски англикони е под 100. Оваа класа на соединенија се корисни за заштита на растенијата од различни хербивори.

Монотерпени (C_{10}). Монотерпените се наједноставните соединенија од групата на терпеноидите, кои во изобилство се наоѓаат во различни билки, зачини, цитрусни растенија, четинари, и првенствено придонесуваат за органолептичките својства на растенијата. Поради големата застапеност тие сочинуваат до 90 % од етеричните масла (ЕО). Имаат 10 C-атоми и настануваат со поврзување на две изопренски единици. Монотерпените се изградени само од јаглерод и водород, додека монотерпеноидите, претставуваат модифицирани терпени кои содржат и различни функционални групи како алкохоли, карбоциклични киселини, кетони, алдехиди и феноли.

Монотерпените генерално можат да бидат:

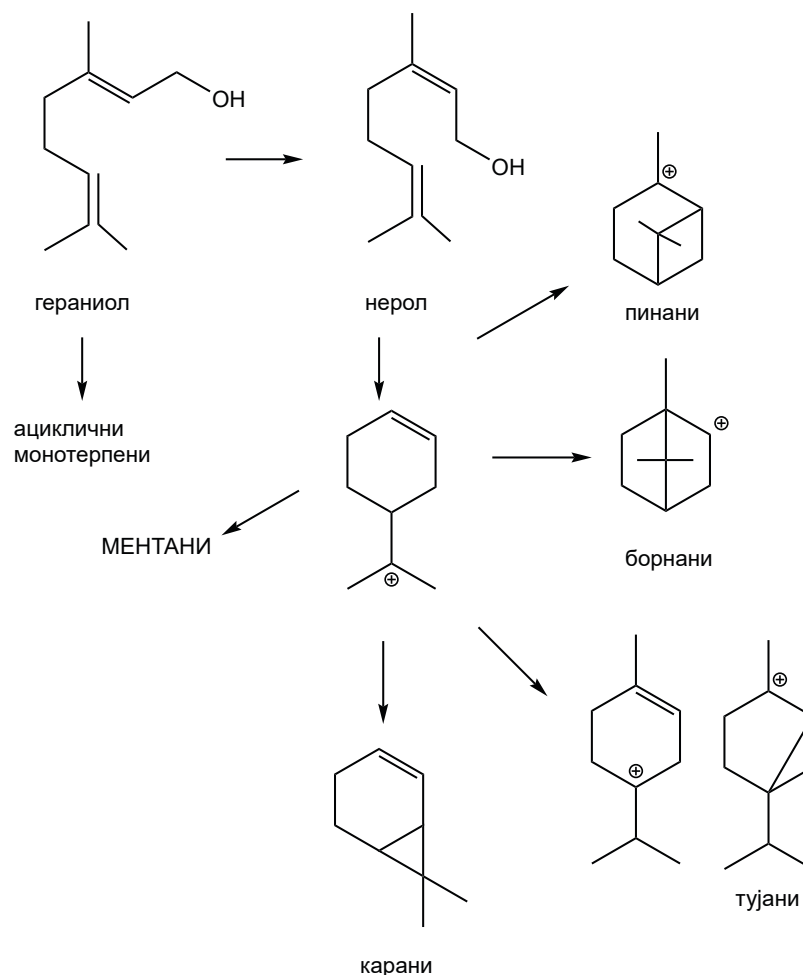
- испарливи регуларни монотерпени,
- неиспарливи регуларни монотерпени (иридоиди),
- ирегуларни монотерпени.

Испарливите монотерпени со регуларна градба се составни компоненти на етерични масла. Можат да бидат со многу различна структура: ациклични (линеарни) соединенија, циклични (моноциклични или бициклични), алифатични и ароматични структури. Можат да бидат јагледовороди или окси-деривати: алкохоли, алдехиди, кетони, киселини, естри, феноли, етери, оксиди, пероксиди, епоксиди и сл. Поретко, може да се јават како слободни форми но само како гликозиди/хетерозиди.

Цикличните монотерпени настануваат со циклизација на нерол (*cis*-изомер на гераниол), при што се создава моноцикличен интермедиер (моноцикличен карбокатјон) од кој преку катјонски активен центар, со реакции на интерна адиција, хибридни поместувања, оксидација и други промени се создаваат циклични монотерпенски соединенија (слика 146). Цикличните монотерпени се делат на: ментани, пинани, борнани, тујани и карани.

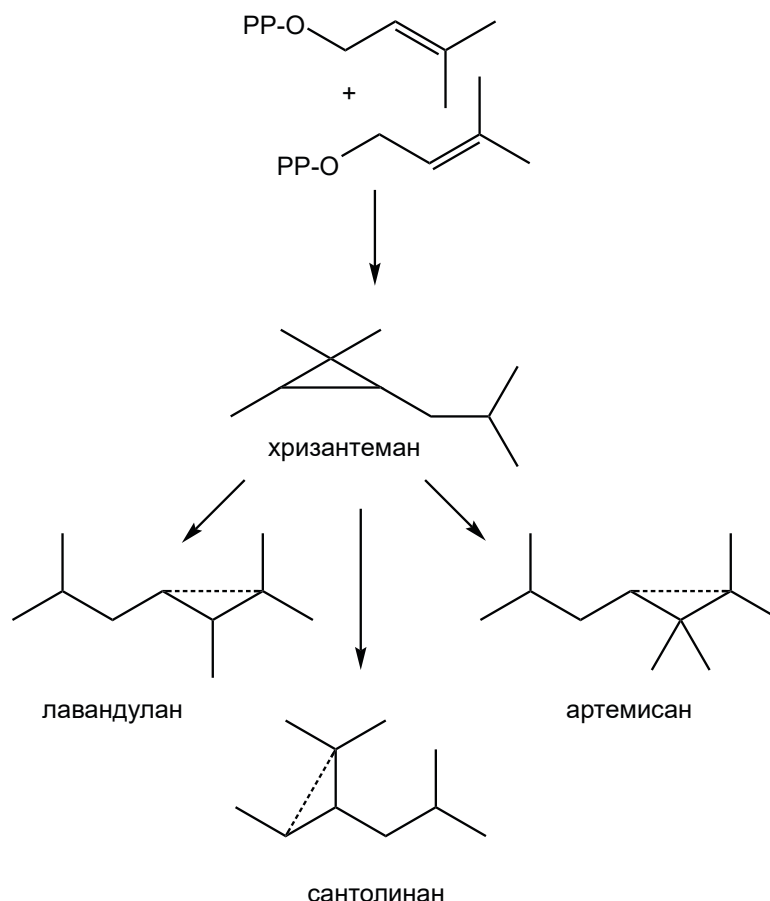
Неиспарливите регуларни монотерпени се иридоиди. Можат да бидат слободни или врзани како хетерозиди. Слободните иридоиди се јавуваат во форма на естри (т.н. валепотријати) во растението маче трева односно валеријана (*Valeriana officinalis*). Се смета дека токму овие соединенија се носители на седативното дејство на ова медицинско растение. Иридоидните хетерозиди се горч-

ливи и претставуваат значајни состојки на претставници од горчливи растителни суровини како што се линцура (генцијана), црвен кантарион и др.



Слика 146. Создавање посебни класи на циклични монотерпени

Ирегуларните монотерпени се создаваат со специфично поврзување на две молекули DMAPP, при што настанува хризантеман, а од него три класи ирегуларни монотерпени: сантолинан, артемисан и лавандулан (слика 147). Значајни соединенија од сантолинанската група се хризантемум киселини што градат естри со циклични кето-алкохоли и формираат соединенија од групите пиретрини, цинерини и јасмолини. Овие состојки се наоѓаат во растението боливач (*Piretrum cinerarifolium*), а екстрактот од растението се користи како моќен инсектицид.

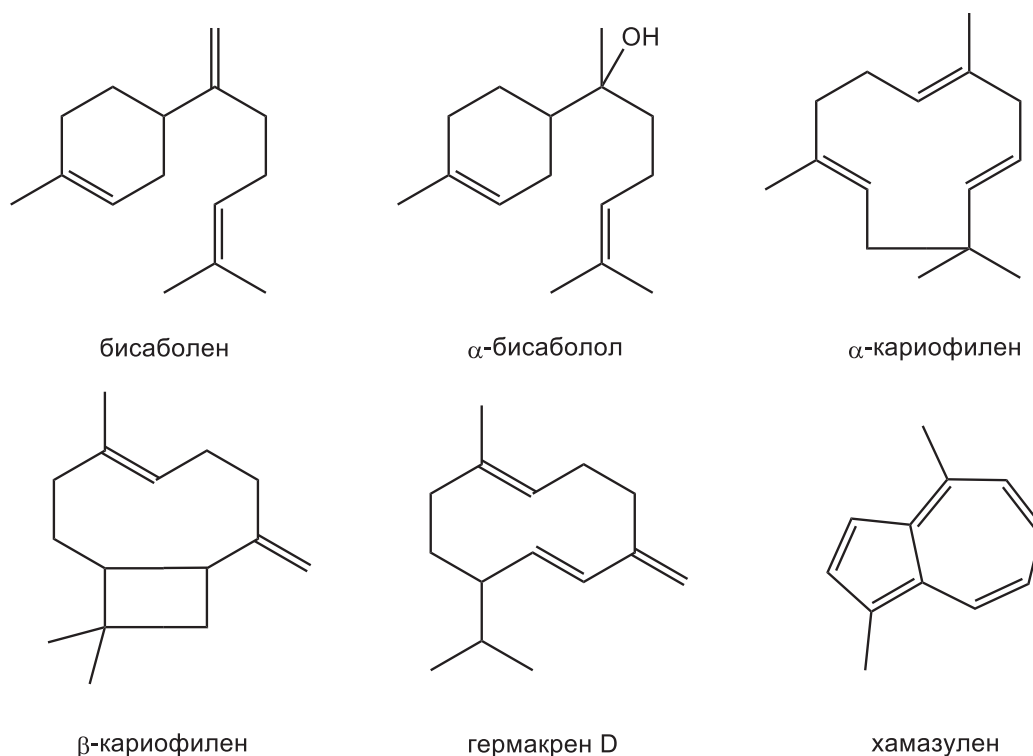


Слика 147. Класи на ирегуларни монотерпени

Сесквитерпени (C_{15}). Сесквитерпените се изградени од 15 C-атоми и покажуваат карактеристики слични со монотерпените. Поседуваат поголем потенцијал за стереохемиска разновидност, како и посилен мирис. Се сметаат како значајни хемиски протектори за организмите кои ги произведуваат бидејќи компонентите од оваа класа покажуваат антимикуробни, антиинсектицидни и антиинфламаторни карактеристики. Прекурсор во биосинтезата на сесквитерпените е FPP, од кој со реакции на оксидација, реорганизација и интрамолекуларна циклизација, настануваат различни сесквитерпенски соединенија. Циклизацијата на FPP или неролидил пирофосфат (NPP) води кон создавање хумулен или кариофилен, што претставуваат најшироко распространети сесквитерпенски јаглеводороди во ароматичните растенија. Можно е и создавање на гермакранденил катјон од кој настануваат соединенија со бициклична структура од групата на гермакрен D. Со формирање шесточлени прстени се создаваат соединенија од редот на бисаболан. Кај некои сесквитерпени се создаваат седмочлени прстени, при што настануваат соединенија од редот на азулени (слика 148).

Најголемиот број сесквитерпенски соединенија се јавуваат како конститутивни елементи на етеричните масла, заедно со регуларните испарливи монотерпени. Често, токму сесквитерпените се носители на одредени фармаколошки ефекти на овие масла. Во природата слободните сесквитерпени ретко се среќаваат. Во оваа смисла значаен е госипол, реактивна супстанција со биснафталенска структура, изолирана од семето на растението памук. Фармаколошка активност поседува левогирниот изомер. Во поголеми дози предизвикува токсични ефекти: олигоспермија, појава на абнормални сперматозоиди и стерилитет. Значајни сесексквитерпени што покажуваат интересен фармаколошки профил се изолирани од некои морски организми. Некои микотоксини имаат се-

сквитерпенска градба. Неиспарливите сесквитерпени се јавуваат во форма на сесквитерпенски лактони, а распространети се главно во фамилијата на главоцветни растенија (*Asteraceae*), во која спаѓаат камилицата, ајдучката трева, артичока, сончоглед и др. видови.



Слика 148. Структури на некои сесквитерпенски соединенија

Биолошката функција на сесквитерпените не е сосема разјаснета. За растителните организми се значајни во регулирањето на односите помеѓу растенијата и инсектите (некои ги привлекуваат, а некои ги одбиваат), дејствуваат како регулатори на растот, имаат антимикробна активност (фитоалексини) и др. Во поглед на фармаколошката активност се смета дека сесквитерпенските соединенија придонесуваат во дејството на голем број етерични масла, а како особено значајни се сметаат сесквитерпените од етеричното мало на камилицата (бисабололи).

9.1. ЕТЕРИЧНИ МАСЛА (ЕО)

Постојат околу 3 000 познати ЕО, од кои само 300 се комерцијално важни за фармацевтската, агрономската, прехранбената, козметичката и парфимериската индустрија. Испарливи масла се сложени смеси од органски испарливи состојки. Согласно со Европската фармакопеја етеричните масла претставуваат производи со мирис, обично со сложен состав, добиени од ботанички дефинирана растителна сировина со дестилација со пара, сува дестилација или соодветен механички процес без загревање. Во растенијата се излучуваат од специјални секреторни структури. Се раствораат во неполярни растворувачи (етер, бензен, петролетер, етанол), имаат карактеристичен мирис, а на кожата предизвикуваат црвенило. Растенијата што ги содржат се нарекуваат арома-

тични растенија и соодветно, суровините што ги содржат се означени како ароматични суровини. Традиционално, етеричните масла се добиваат со дестилација со водена пареа, што е најстариот и сè уште најприменуваниот начин за екстракција. Добиени на овој начин претставуваат лесно подвижни течности, се карактеризираат со определени биолошки и фармаколошки активности и во најголем број случаи имаат терапевтско значење. Покрај нив, од ароматичните суровини се добиваат и други ароматични производи што наоѓаат примена во козметичкото и во парфимериското производство, во прехранбената, алкохолната, тутунската и во другите индустрии. Овие производи се означени со поимите:

- Конкре, екстракт што се добива од суров растителен материјал со екстракција со органски растворувач,
- Помада, цврста или полумцврста маса што се добива со дифузија на етерични масла во масна подлога (ладна анфлераж постапка) или со дигестија на свежо собран материјал во растопена масна подлога (топла анфлераж постапка),
- Резиноид, екстракт добиен од исушен природен материјал со органски растворувач,
- Апсолут, производ што се добива со алкохолна екстракција од конкретот, помадата или резиноидот.

Во промет се наоѓаат и обработени етерични масла, од коишто се издвоени некои фракции за да се добијат производи со подобрени карактеристики или со поголема ефикасност. Постојат рактикувани масла, детерпенизирани масла кај коишто се отстранети лесно испарливи терпенски јаглеводороди, или масла ослободени од тешко испарливи сесквитерпенски компоненти.

Распространетост и локализација. Етеричните масла се среќаваат во голем број растенија, во фамилиите на усноцветни растенија (жалфија, рузмарин, лаванда и др., *Lamiaceae*), главоцветни растенија (камилица, артичока и др., *Asteraceae*), штитоцветни растенија (ким, анасон, целер, пашканат, морков и др., *Apiaceae*), растенија од видот на ловор (*Laugaceae*), бор, ела и др. иглолисни растенија (*Pinaceae*), цитрусни растенија (*Rutaceae*) и др. Од нижите растенија најдени се во некои лишаи. Содржината во растенијата им варира од минимални количества или траги до преку 20 %. Се локализираат во различни органи (листови, плодови, цветови, кори, корени и др.).

Етеричните масла што се наоѓаат во различни органи на едно исто растение вообичаено имаат ист состав, но може да биде и различен. На пример, етеричното мало од кората на зрелите портокали по својот состав се разликува од маслото што се добива од цветовите или од листовите на растението портокал.

Според тоа каде е локализирано, етеричното масло може да биде:

- сместено егзогено во жлезди и во жлездести влакна на површината на епидермот, како што е случај со фам. *Lamiaceae* и *Asteraceae*.
- ендогено, во посебни повеќеклеточни жлезди, сместени во паренхимот на ткивата, што можат да бидат:
 - шизогени жлезди што настануваат со делба на една особена клетка, така што настанатите клетки се одделуваат и настануваат интерцелуларни шуплини што се исполнуваат со етерично масло (штитоцветни растенија од *Apiaceae*).
 - лизигени жлезди, што настануваат со разложување (лизирање) на клеточните мембрани на соседните клетки при што се формира интерцелуларна шуплина исполнета со етерично масло (претставници од фамилија на иглолисни растенија од *Pinaceae*).
 - шизо-лизигени шуплини настануваат по комбиниран пат, а претставуваат големи шуплини богати со етерично масло (претставници од цитруси и други видови од *Rutaceae*).

- ходници и канали што настануваат по сложен биолошко-физиолошки пат и претставуваат поголеми резервоари со етерични масла или со балсами (претставници од фамилија на иглолисни растенија од Pinaceae).

Во некои растенија етеричното масло не е слободно туку е врзано во форма на гликозиди (цијаногени и сулфурни гликозиди), од коишто се ослободува по хидролиза. Денес се познати и гликозиди на поедини испарливи агликони, најчесто монотерпени (линалол, терпинеол, ментол, тимол), фенилпропаноиди (еугенол, ванилин), алифатични алкохоли (хексеноли, октаноли) и други компоненти. Досега се идентификувани над 200 вакви соединенија. Често се присутни во ароматичните растенија.

Особини. Етеричните масла се бистри, лесно подвижни, безбојни особено кога се свежо добиени или обоени (жолто - мандарина, портокалова – благ портокал, зелено - бергамот, сино - камилица, црвено-кафеаво) течности. Имаат својствен и најчесто пријатен мирис и ароматичен вкус, а некои во устата ладат, горчат, лутат и слично.

На собна температура (до 20 °C) се во течна состојба, а на температури под 18 °C некои зацврстуваат. Во такви случаи се одвојува цврстата состојка стеароптен (камфор, ментол, анетол, тимол) од течниот дел олеоптен. Етеричните масла не се раствораат во вода (неколку капки во 1 L), а се раствараат во органски растворувачи и во масни масла.

Ароматичните води се добиваат како споредни производи при дестилацијата на етеричните масла со водена пареа или кога неколку капки етерично масло се раствораат со мешање во вода какви што се ароматичните води од нане, роза и др. (*Aqua Menthae*, *Aqua Rosae*).

Релативна густина на етеричните масла се движи од 0,8 до 1,07, потешки се од масните масла. Температурата на вриење се движи од 150 до 300 °C, а индексот на рефракцијата од 1.450 до 1.600. Свежо добиените етерични масла имаат неутрална до слабо кисела реакција. Со стоење киселоста им се зголемува поради ослободувањето на киселините од естерските компоненти.

Хемиските особини на етерични масла зависат од нивниот хемиски состав.

Етеричните масла треба да се чуваат во мали и во темни шишиња, добро затворени, на температура околу 20 °C, на темно. Со подолго стоење се оксидират, бојата им потемнува и се усмолуваат.

Хемиски состав. Етеричните масла се сложени смеси од различни органски соединенија. Нивниот број може да биде од неколку до преку 100-тина компоненти. Досега се идентификувани над илјада различни соединенија што влегуваат во составот на различни етерични масла. Најголемиот дел го сочинуваат терпенските соединенија (околу 90 %), а покрај нив можат да се најдат и други компоненти, што на такви етерични масла им ги определуваат особините, а често и нивното дејство. Во составот на етеричните масла можат да се најдат следните компоненти:

1. Терпени:
 - монотерпени,
 - сесквитерпени.
2. Ароматични соединенија:
 - фенилпропаноиди.
3. Соединенија од различно биосинтетско потекло:
 - разградни продукти на масни киселини,
 - разградни продукти на терпени,
 - соединенија што содржат азот,
 - соединенија што содржат сулфур.

9.1.1. Монотерпени

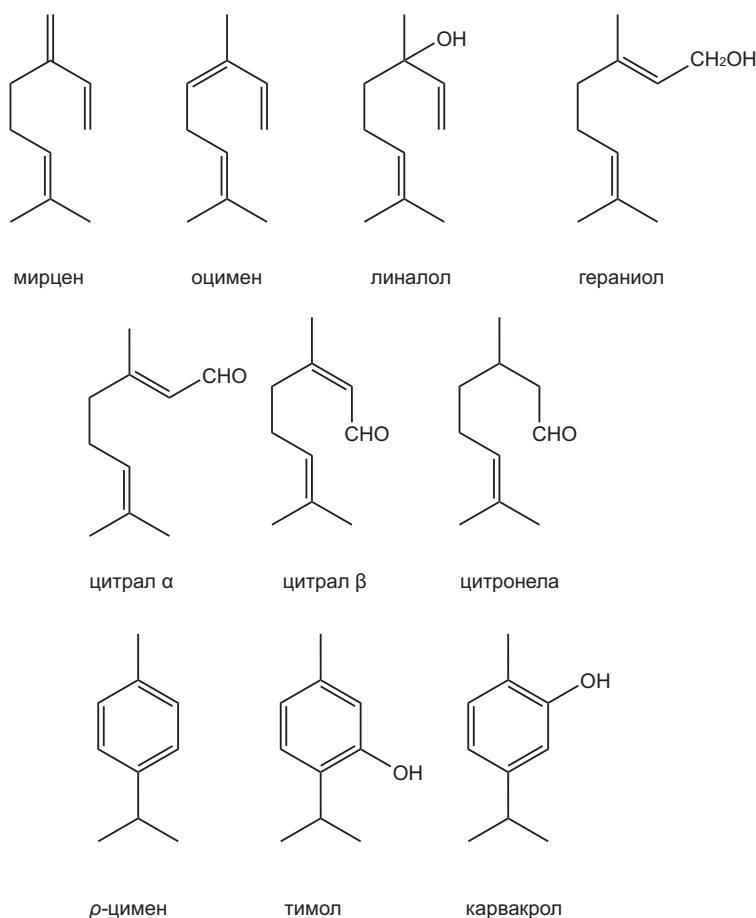
Монотерпените се најчести состојки на етерични масла, во голем број случаи тие го чинат најголемиот дел од маслото. Нивна општа карактеристика е малата молекулска маса што ги прави лесно испарливи, претставуваат мошне мирисливи компоненти поради што често наоѓаат примена во парфимериското производство. Монотерпените можат да бидат:

- ациклични,
- моноциклични,
- бициклични.

Ацикличните монотерпени можат да бидат:

- јаглеводороди (мирцен, оцимен и др.),
- алкохоли (цитронелол, линалол, гераниол и др.),
- алдехиди (цитрал што се јавува во две изомерни форми како цитрал а (гераниал) и цитрал б (нерал), цитронелал и др.).

Претставници се дадени на слика 149.

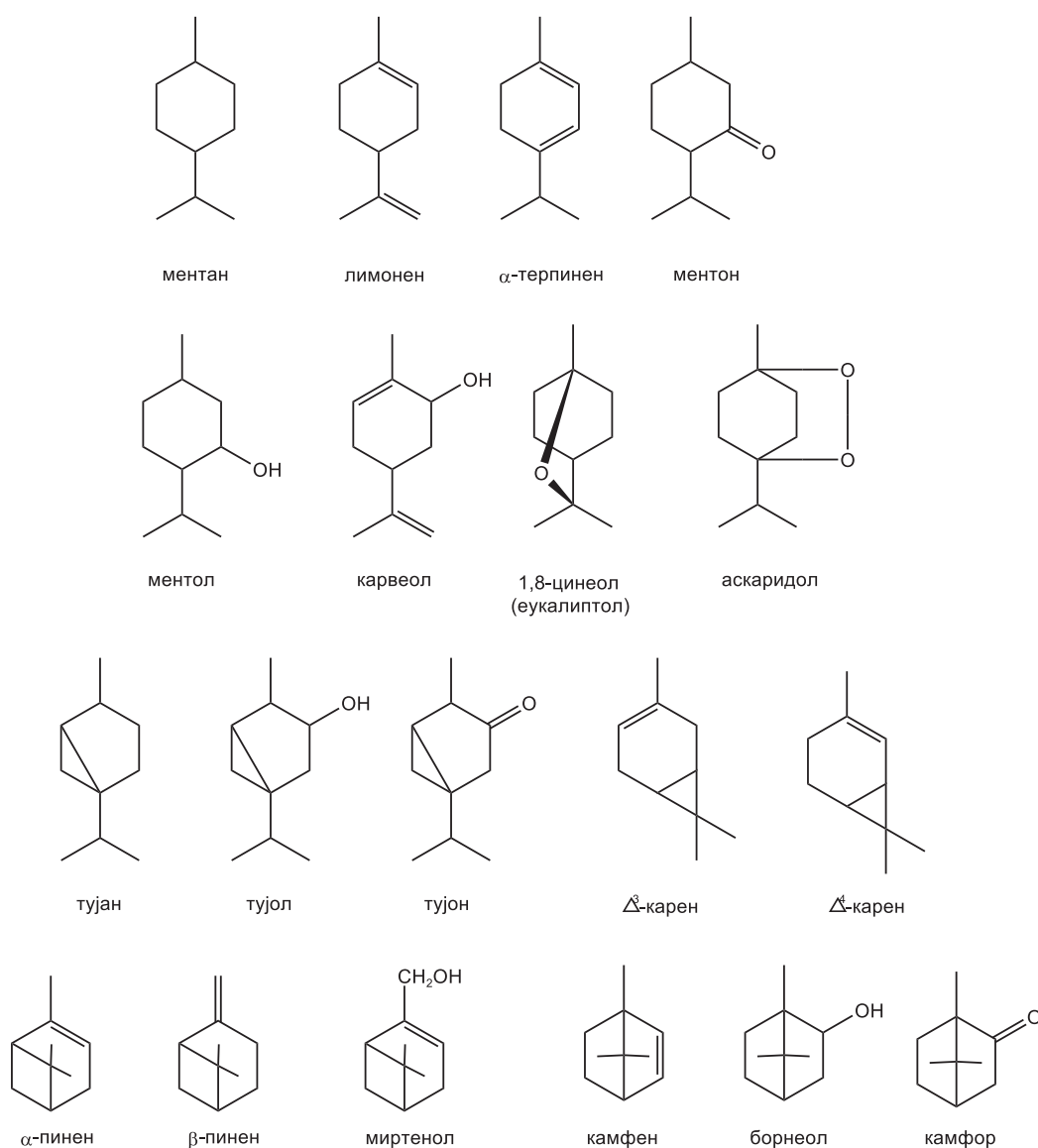


Слика 149. Алифатични и ароматични монотерпени што се јавуваат во етерични масла

Моноцикличните монотерпени се различни видови деривати од ментанска класа, меѓу кои најзначајни се следните:

- јаглеводородите: лимонен, терпинен и феландрен,
- алкохолите: ментол, терпинеол и карвеол,
- кетоните: ментон, пиперитон, пулегон, карвон и др.,
- оксидите и пероксидите: цинеол (може да се разгледува и како етер) и аскаридол,
- фенолите: тимол и карвакрол, главни состојки во етеричните масла од тимјан, мајчина душичка, оригано и др.

Претставници се дадени на слика 150.



Слика 150. Најзначајни циклични монотерпенски соединенија што се јавуваат како компоненти во етеричните масла

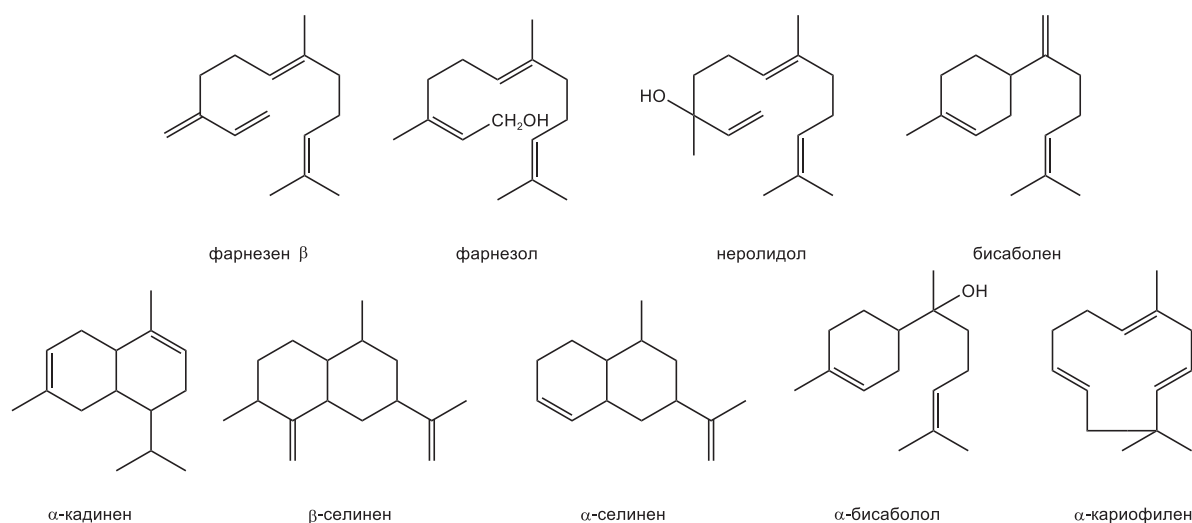
Молекулите на терпенските соединенија се оптички активни, а присуството и односот на оптичките изомери во етеричните масла во најголема мера зависи од карактеристиките на растителниот вид. Некои етерични масла содржат само еден енантиомер, а други масла друг. На пр. (+)-*S*-линалол е главен конститuent на етерично масло од кориандер, а (-)-*R*-линалол е доминантна компонента во маслото од лаванда.

Бицикличните монотерпени се изградени од два кондензирани неароматични прстени, а во зависност од структурата на јагледородниот скелет можат да се поделат во неколку групи од коишто најзначајни се прозводите на: тујан, каран, пинан и камфан.

- Тујанска група: чист тујан во растенијата досега не е идентификуван. Од неговите деривати најзначајни се јагледородот сабинен, од кислородните деривати алкохолите сабинол и тујол, а од кетоните тујон.
- Каранска група: овие состојки се составени од еден 6-член и еден 3-член прстен. Во етерично масло на некои тропски растенија идентификувани се Δ^3 -каран и Δ^4 -каран.
- Пинанска група: опфаќа соединенија каде што е присутен дополнителен 4-член прстен во чие градење учествува изопропилната група од ментанот. Производите на пинанот се широко распространети во природата, а во поголемо количество се присутни во терпентинското масло. Најбитни пинени се α -пинен и β -пинен, потоа миртенол, вербенол и др.
- Камфанска група: опфаќа соединенија што содржат дополнително 5-член прстен што настанува со поврзување на изопропилната група со C_1 . Во природата чист камфан не е најден. Познати се неговите деривати камфен, борнел (кој е најзначаен), изоборнел, камфор и др.

9.1.2. Сесквитерпени

Во зависност од структурата се делат на ациклични, моноциклични, бициклични и трициклични сесквитерпени. Најзначајните претставници се дадени на слика 151.

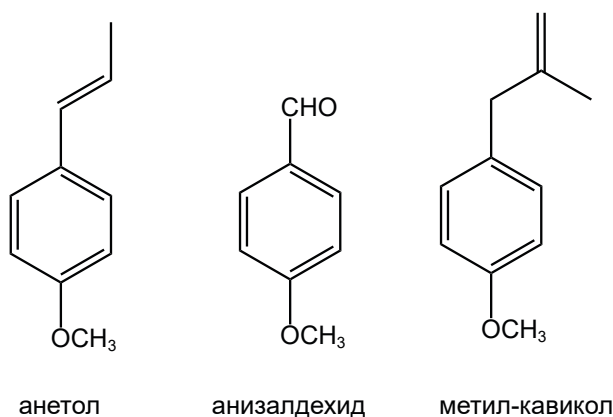


Слика 151. Најзначајните сесквитерпени што се јавуваат како компоненти во етерични масла

- Алифатичните (ациклични) сесквитерпени претставуваат долги јаглеводородни низи или кислородни деривати алкохоли, алдехиди и др. Најзначајни се јаглеводорот фарнезен и алкохолите фарнезол (мирисот на липата) и неролидол (момина солза).
- Моноциклични сесквитерпени, меѓу кои според распространувањето се најзначајни бисаболен, α -бисаболел, зингиберен, α -кариофилен и др.
- Бицикличните сесквитерпени се кондензирани неаромати. Во природата се најраспространети прозводи на кадинен, селинен, азулен и др.

9.1.3. Ароматични соединенија

Фенилпропаноидните компоненти (C_6-C_3) се поретко застапени како конститутивни елементи на етеричните масла. Позначајни соединенија од оваа група се: апиол, анетол, анизалдехид, естрагол и др. застапени во претставници од штитоцветни растенија (ким, анасон, целер, магнонос и др.), или еугенол, сафрол, цимет алдехид и др. присутни во етерични масла од лавор и мирта (слика 152). Во групата ароматични соединенија спаѓаат и C_6-C_1 соединенијата како што се: ванилин, метил антранилат и др.

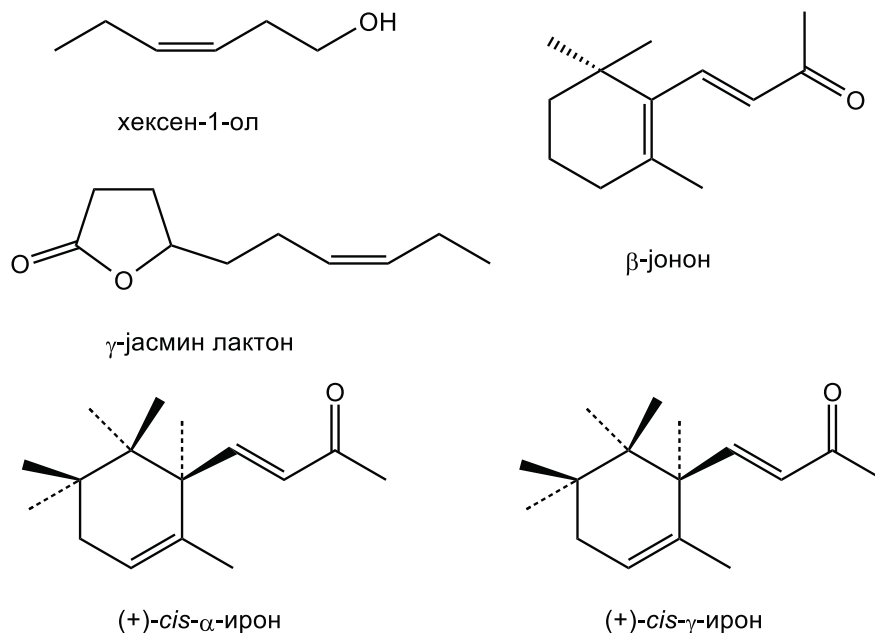


Слика 152. Ароматични конституенти на етерични масла

9.1.4. Други компоненти

Со разградување на виши масни киселини се создаваат нискомолекуларни алкохоли, алдехиди и естери: хексанол, хексенал, октанал, деканал, хексенилацетат и др. Масните киселини се прекурзори на јасминска киселина и јасмин лактон, компоненти најдени во цветови од јасмин. Со автооксидација на тетратерпенските соединенија (каротени) се создаваат јонони (C_{13} -нор изопреноиди), чести компоненти во етеричните масла од цветови и плодови од овошни растенија. Друга група соединенија се ироните, компоненти во етеричното масло од перуника (*Iris* sp.). Претставници се дадени на слика 153.

Соединенијата со азот или со сулфур се многу поретки компоненти во етерични масла. Тука спаѓаат некои пиридински соединенија, изосулфоцијанатни компоненти најдени во етерично масло од синап или деривати на цистеин и метионин во маслото од лук.



Слика 153. Ароматични соединенија и други компоненти што можат да се јават како конституенти на етерични масла

9.1.5. Екстрактивни техники за добивање и испитување на етерични масла

Светското производство и потрошувачка на ЕО и парфеми се зголемуваат многу брзо. Технологијата на производство на ЕО е суштински елемент за подобрување на нивниот вкупен принос. Тие се добиваат од сировина со неколку техники на екстракција како што се дестилација со водена пареа, ASE, PLE, MAE, SFE или SCWE. Најдобриот метод на екстракција зависи од испарливоста, како и од хидрофилноста или хидрофобноста (поларитетот) на целните компоненти. Постојат повеќе начини за добивање етерични масла. Начинот на добивањето влијае на квалитетот.

Конвенционални методи за екстракција.

1. Дестилација со водена пареа е најстар и најрентабилен начин што се применува за добивање етерични масла што се термостабилни. Вообичаено се применува за растителни сировини што содржат поголемо количество етерично масло. Индустриската постројка за дестилација се состои од казан во кој се става ароматична сировина со вода и се загрева до вриење или систем во кој водената пареа проаѓа низ дрогата, ги повлекува со себе испарливите компоненти до ладило во кој се кондензира и се слива во прифатен сад од типот на флоретинско шише. Овој сад има два отпуста, еден горе за етерични масла полесни од водата и еден долу за етерични масла потешки од водата.

Методот на дестилација со водена пареа се базира на Далтоновиот закон, според кој две течности што не се мешаат ќе провријат кога збирот на нивните парцијални притисоци ќе се изедначи со атмосферскиот. Во случај на етерични масла, кои течности што не се мешаат со вода, при загревање ќе провријат на температура пониска од 100 °C (температурите на вриење на етеричните масла се повисоки од 150 °C).

Класичниот метод на дестилација со водена пареа денес се модификува на различни начини и се користи за индустриско производство на етерични масла, при што модификациите се прават со цел подобро да се искористи растителната суровина, на поедноставен, поевтин и посигурен начин, а добиените етерични масла да го имаат бараниот квалитет. Во случаи кога етеричните масла се осетливи на повисока температура, дестилацијата може да се изведува под намален притисок, за да се добие пониска температура на вриење. Вака се добива етерично масло од каранфилче.

За некои растителни суровини се користи метод на хидродифузија што се состои во пропуштање водена пареа низ дрога поставена на решетка. Времето на оваа екстракција е пократко, секундарните реакции на хидролиза на компонентите од маслото се намалени, а приносите се поголеми. Со хидродифузијата се добиваат етерични масла што се лесно испарливи, како што се маслото од лаванда и лавандин.

Треба да се напомена дека една иста ароматична суровина може да даде етерично масло со различен квалитет ако се применат различни постапки за неговото добивање. Ова треба да се има предвид при производството на етеричните масла.

2. Цедење е постапка за добивање етерични масла од плодовите на цитрус (лимон, портокал, бергамот и др.). Кај плодови на различни видови агруми, етеричното масло е сместено во перикарпот, во шизо-лизигените шуплини под епидермот, а под притисок лесно излегува на површината. Цедењето може да се изведува рачно, а истиснатото масло може да се фаќа со сунѓери (спugna процес) или механички со хидраулични преси, при што се добива мешавина од масло, вода и делови од перикарпот. Со центрифугирање се отстрануваат механичките нечистотии и водата. Заостанати делови од ткиво и вода се отстрануваат со ферментација.

3. Екстракција со органски растворувач се користи за ароматични суровини со помал процент етерични масла што се термолабилни и при дестилацијата се менуваат.

Екстракцијата се изведува со петролетер или со друг погоден органски растворувач (хексан, пропан, течен бутан, хлорни деривати на метан и етан, етанол), во посебни екстрактори за континуирана екстракција.

По добивањето на екстрактот, растворувачот се отпарува, а остатокот што се добива претставува „конкре“. Составен е од восок, масно масло и етерично масло. Со концентриран етанол од конкретот се извлекува етеричното масло, а со ладење восокот се зацврстува и се отстранува со декантирање или со цедење. Понатаму, од етанолниот раствор етеричното масло се издвојува со дестилација и на соодветен начин се пречистува.

4. Методот анфлераж (*enfleurage*) се користи за добивање скапоцени етерични масла што се користат во парфимериското производство, како што се маслата од мимозата, јасминот, розата и др. Постапката се состои во тоа што свежо собрани цветови се поставуваат преку стаклени рамки премачкани со некоја индиферентна масна подлога (ланолин, парафин или др.) во која дифундира етеричното масло од суровината (ладна анфлераж постапка). Рамките со дрогата и масната подлога се редат на посебни сталажи и се оставаат неколку дена. Потоа се заменуваат цветовите со ново количество и постапката се повторува (40-50 пати), сè додека масната подлога не биде заситена со етерично масло. На овој начин се добива мирисна маст „помада“, од која етеричното масло се издвојува со етанол со што се добива „апсолут“. Со топла анфлераж постапка маслата преминуваат во подлогата по пат на дигестија.

Пречистување. Изолираните етерични масла мора да се прочистуваат. Сушењето од вода се изведува со безводен натриум сулфат. Со стојење подолго време се таложат механичките нечистотии

и се испаруваат лесно испарливите соединенија што преминале во маслото при дестилацијата, а што не се природни компоненти на етеричните масла (разни алкани, алкени, ацетилени и др.). Некои етерични масла мора да претрпат посериозни третмани на обезбојување, неутрализација и рактификација. Со фракциона дестилација можат да се издвојат одделни фракции од интерес.

Пречистените масла се пакуваат во стаклени, во алуминиумски или во садови од друг индиферентен материјал, добро се затвораат и се чуваат на темни, суви и ладни места.

Иновативни (неконвенционални) екстрактивни постапки.

1. Суперкритична CO₂ екстракција (SFE)

Современ начин за добивање етерични масла што наоѓа практична примена најмногу во производство на адитиви за прехранбена индустрија (екстракт од ѓумбир, пиперка, целер и др.). Иако во екстракцијата теоретски можат да се користат и други флуиди, практична примена има само CO₂, поради низа предности: претставува природен производ, хемиски е инертен, незапалив, нетоксичен, лесен за елиминација, селективен, лесно достапен и евтин. Критичните услови за работа при кои CO₂ преоѓа во течна состојба се притисок над $P = 73,8$ бари и температура над $T = 31$ °C. Постојат можности со многу мали поместувања во однос на критичните услови за работа да се постигне саканата селективност и да се добијат точно определени екстракти со барани физичко-хемиски карактеристики. Можностите се многу големи, а добиените екстракти или етерични масла се многу почисти во споредба со сите други методи за добивање на етерични масла. Екстракцијата со суперкритичен CO₂ има низа предности и денес станува сè пошироко применуван метод на изолација и покрај значително високата цена на индустриските постројки за суперкритичната екстракција.

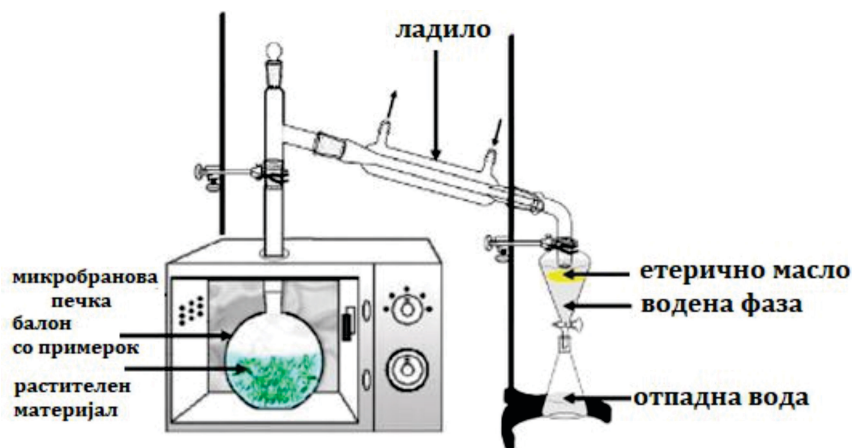
2. Суперкритична екстракција потпомогната со ладно цедење (SFEAP)

Нова екстрактивна техника развиена неодамна од Донер и соработниците, каде се интегрирани методот на екстракција со ладно цедење и SFE-техниката. Цврстиот сиров материјал се става во екстрактивниот сад, додека клипот под притисок врши ладно пресување на екстрактивниот материјал. Најпогодни услови за најдобар принос и побрза екстракција се добива на 333 K и 40 MPa. Предностите на оваа техника вклучуваат и зголемување на времето на екстракција и потрошувачка на растворувач. Оваа техника е искористена за извлекување на етерични масла од сладок анасон (*Foeniculum vulgare*) и каранфилче.

3. Микробрановата екстракција без растворувачи (Solvent free microwave extraction - SFME)

Предложена како „зелена“ екстрактивна техника на етерични масла кои се користат во исхраната од свеж растителен материјал, а се изведува при атмосферски притисок без додавање вода или органски растворувач. SFME-апаратот е комбинација на микробранова печка и сува дестилација при атмосферски притисок. Принципот е релативно едноставен, и вклучува ставање на растителен материјал во микробрановиот реактор, без додавање на растворувач или вода. Внатрешното загревање на *in situ* водата во свежиот материјал предизвикува бабрење на растителните клетки заради зголемен внатрешен притисок и доведува до пукање на жлездите и маслените садови. На овој начин се ослободува ЕО кое се испарува со *in situ* водата од растителниот материјал. Системот за ладење локализиран надвор од микробрановата печка континуирано го кондензира дестилатот. Вишокот на вода се враќа во садот за екстракција со цел да се врати *in situ* водата во растителниот материјал. Финално, ЕО се отстранува од водениот екстракт со едноставна декантација. SFME, може да се смета како постапка за сува дестилација, со вода што потекнува од свежиот растителен материјал.

Како предности, на оваа екстрактивна постапка се зголемениот принос на ЕО, подобрениот состав на ЕО, го елиминира отпадот при третман со вода, придонесува да се намали екстрактивното време како и потрошувачката на енергија (слика 154).



Слика 154. Екстракција со помош на микробранови за добивање на ЕО

4. Headspace екстракција (HS-екстракција)

HS-екстракцијата претставува директен метод на екстракција што може да се изврши на динамичен или статичен начин, како за цврсти така и за течни примероци. Кај статичкиот систем, шприцот зема фиксен волумен од празниот простор на вијалата и директно го инјектира во гасениот хроматограф. Од друга страна кај динамичкиот систем, фиксен волумен на инертен гас поминува низ HS од вијалата и целните аналити се собираат на влакното додека термички не се десорбираат во GC. Сепак, оваа техника на екстракција често се изведува во комбинација со други техники кои овозможуваат поголема прекоцентрација на аналитите од интерес како што се SPME и микроекстракција со една капка итн.

Фактори што влијаат на квалитетот на етеричните масла. Квалитетот на етеричните масла може да биде различен во зависност од низа фактори, меѓу кои пред сè се значајни генетските карактеристики на видот (генотип). Биосинтезата на етеричните масла е генетски условен процес и до определени граници е под влијание на ендегени и на егзогени фактори. Познато е дека во рамките на една иста популација единките од истиот вид продуцираат исти етерични масла, но можат да продуцираат и етерични масла со различен хемиски состав. Кај ароматичните видови е карактеристична појавата на хемиски типови (хемотипови) на етерични масла, особено присутна кај тимјан, оригано, чубрика и др.

Дефинирањето на техничка зрелост на растенијата (фаза во која се врши собирање на растителниот материјал) е многу значаен фактор, бидејќи количеството и составот на етеричните масла се многу варијабилни во различните фази од онтогенетскиот развој на единката, т.н. сезонски варијации. Еколошките фактори, во кои спаѓаат температурата, карактеристиките на земјиштето, надморска височина, инсолацијата, влажноста во воздухот и струења на воздухот и низа други услови на надворешната средина можат да придонесат до варијации во содржината и во хемискиот состав на етеричните масла. Така, единки од еден ист вид можат да продуцираат различни етерични масла во различни услови на надворешна средина, поради што, при проценката на квалитетот секогаш е битно да се нагласи географското потекло на суровината од која е добиено маслото.

Во однос на етерични масла што се добиваат од култивирани растенија, со проучување на влијанието што надворешните фактори го имаат, можат да се дефинираат условите на одгледување под кои ќе се добие задоволителен принос на растителна суровина и соодветна содржина и квалитет на етерично масло.

Постапките на сушење, ситнење и други манипулации со суровината секогаш условуваат делумно губење на маслото, а можни се и промени во хемискиот состав, поради хидролиза, оксидација и други реакции.

На квалитетот на етеричните масла, како што е веќе напред спомнато големо влијание има начинот на добивањето на етеричното масло.

Дејство на етерични масла. Етеричните масла и ароматичните суровини што ги содржат се користат како ароматични средства, мириси и ароми. Голем број ароматични растенија се користат како зачини кои овозможуваат постигнување на определен вкус и мирис на храната кој е многу значаен за производителите на храната и за консументите. Освен мирисот и аромата, етеричните масла имаат и антибактериско и многу често и антиоксидативно дејство, со што употребата на изолираните масла и на зачинските растенија во производство и во подготовка на храна има големо значење во превенција од расипување и во продолжување на рокот на употребата.

Етеричните масла и ароматичните суровини се користат и во медицински цели. Во оваа смисла се исползуваат низа биолошко-фармаколошки дејства на етерични масла од кои поважни се:

- антисептично и дезинфициентно дејство, карактеристично за етерични масла што содржат поголемо количество фенолни состојки (тимјанот, мајчината душица), некои терпенски етери (еукалиптус) и други компоненти (анасон, лаванда, маточина, лимон),
- рубифициентно дејство имаат етерични масла што содржат камфор, борнеол, цинеол, пинени и др. Овие масла најчесто се аплицираат во форма на разни масти, креми, линименти, а се користат за лекување ревматизам, невралгии, настинки и др. Внатрешно се користат за надгледување на слузниците на дигестивниот тракт со што делуваат дигестивно и стомахино. На овој начин дејствуваат етерични масла што се внесуваат во форма на зачини – цимет, нане, каранфилче и др.,
- диуретично дејство (смрека, магнонос и др.),
- експекторантно дејство (анасон, еукалиптус, бор и др.),
- холагогно и холеретично (нане и рузмарин),
- антихелминтично дејство имаат етерични масла што содржат тујон (видови пелин и др.),
- антиинфламаторно дејство (камилица, ајдучка трева и др.),
- седативно дејство (валеријана, маточина, лавандула, рузмарин и др.).

Токсичност на етерични масла. Неодамна е утврдено дека некои етерични масла поседуваат изразена токсичност. Употребата на етеричните масла и на различни производи што ги содржат во ароматерапијата ја зголемува можноста од интоксикација со етерични масла, особено ако некои производи несоодветно се користат или се злоупотребуваат со прекумерно користење. Хроничната токсичност на етеричните масла е малку проучена. Во последно време со поголем интензитет се проучуваат мутагените, тератогените и канцерогените дејства на етеричните масла и на одделни компоненти на маслата. Вредна за одбележување е токсичноста што ја манифестираат врз кожата. По дефиниција етеричните масла се иритативни средства и предизвикуваат црвенило. Би-дејќи во голема мера се користат во производство на парфеми, во козметички средства за миене и нега на кожа на тело, лице и коса, постои сериозна потреба од строга регулација на нивните концентрации во средствата во кои се користат.

Употреба на етеричните масла и суровините што ги содржат.

Етеричните масла се користат во фармацијата, во парфимериското и во козметичкото производство, во прехранбената индустрија, во алкохолната, во тутунската и во другите индустрии. Во фармацијата се користат во фармацевтска технологија за производство на дерматолошки препарати со антисептично и рубифациентно дејство. Некои етерични масла се користат за инхалација на органите од горниот респираторен тракт. Во голема мера се користат за ароматизација на препарати за перорална употреба. Специфичен вид терапија што вклучува и интерна и екстрена примена на етеричните масла и препаратите што ги содржат, се нарекува ароматерапија. Во последно време е сè поактуелна. Во прехранбената индустрија етеричните масла се користат како адитиви за мирис и вкус и како конзерванси, со антибактериско и со антиоксидативно дејство. Голем број растителни суровини што содржат етерично масло се користат во производство на хербални додатоци на исхраната со различна намена.

Испитување на етерични масла.

Квалитетот на етерични масла претставува збир на особини, физичко-хемиски карактеристики и определен хемиски состав. Во практика етеричните масла често доаѓаат непрочистени или фалсификувани. Скапите етерични масла се мешаат со поевтини со што им се намалува квалитетот. Стандардизационите документи и фармакопеите пропишуваат постапки што се применуваат во испитувањето и контролата на квалитетот на етеричните масла, начин на идентификација, тестови за определување на чистотата, физичко-хемиски константи и други испитувања со што се проценува квалитетот.

Најчесто се врши испитување на следните параметри:

- органолептички својства, мирис, вкус, боја и др.,
- физички константи: агол на свртување, релативна густина, индекс на рефракција, точка на замрзнување, растворливост во етанол и др.,
- хемиски константи: киселински број, естерски број пред и по ацетирање.

Етеричното масло што содржи алкохол при мешање со вода образува млечно бела емулзија. Примеси од масно масло се докажуваат преку масни траги што заостануваат по 24 часа од накапување на етерично масло на филтерна хартија. Во некои масла се испитува присуство на некои специфични компоненти што ќе докажат присуство на евентуални фалсификати.

Анализа на хемискиот состав на етеричните масла.

Како што потрошувачката на ЕО расте годишно, светското производство за задоволување на побарувачката на пазарот се зголемува секоја година. Контролата на квалитетот на произведените етерични масла е неопходна за да се обезбеди оригиналноста на производот, рокот на траење и начинот односно условите на складирање. Составот на ЕО може да се фалсификува со додавање поевтини масла. Анализата на ЕО опфаќа: квалитативен состав, квантитативен состав (главни и/или останати компоненти), како и откривање на адултерации на вистинските етерични масла. Во однос на квалитетниот аспект на ЕО, идентитетот и чистотата секогаш се истражуваат. Нивните физички својства најчесто се проценуваат според специфичната тежина, релативната густина, оптичката ротација, индексот на прекршување итн. Повеќето од методите применети во анализата на ЕО се потпираат на хроматографски процедури, кои овозможуваат раздвојување и идентификација на компонентите. Тие вклучуваат: TLC (повеќе во рутинските анализи), GC и HPLC. Метод од избор е GC, со која релативно едноставно се определува и квалитативниот и квантитативниот состав. Денес се користат готови пакувани капиларни колони што овозможуваат подобро сепарирање на компонентите, подобра резолуција за пократко време и попрецизни времиња

на задржување. Во фармакопеите (Ph.Eur.) може да се најде т.н. хроматографски профил на етерични масла во кои се дадени граници во кои треба да се движат оние компоненти што се битни за квалитетот, аромата или дејството, или претставуваат многу карактеристични компоненти за идентификација на маслото. Етеричното масло, покрај други карактеристики, мора да има состав што се вклопува во назначениот хроматографски профил за тоа масло. GC-анализата може да се спроведе користејќи комбинации на гасен хроматограф со различни типови спектрометри (FTIR, MS или NMR). Комбинацијата GC-MS е најексплоатираниот метод за испитување етерични масла, користејќи 25-30 m долги капиларни колони со умерено неполярна стационарна фаза од вкрстено врзан 5 % фенил метил силоксан најчесто во слој со дебелина од 0,25 μm (HP5, DB5, BP5 итн.) и температурна програма која вообичаено започнува близу 80 $^{\circ}\text{C}$, а потоа продолжува со зголемување во опсег од 3 до 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ до 160 $^{\circ}\text{C}$, по што следува побрзо зголемување од 10 до 25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ до 240 $^{\circ}\text{C}$, со цел да се елуираат сите компоненти. Мобилната фаза (гас носач) најчесто е хелиум. Идентификацијата на непозната компонента од маслото се прави врз база на споредувањето на масениот спектар на компонентата со определен масен спектар од библиотеката на спектрите, а дополнително треба да се совпаднаат и ретенционите индекси (Ковачеви индекси) на компонентите со референтни соединенија во споредливи оперативни услови на хроматографирање. Детекцијата се врши со FID-детектор поради едноставноста, широкиот линеарен опсег, робусноста и пониските трошоци. Освен тоа, линеарниот опсег на FID овозможува квантифицирање на широк опсег на различни содржини на терпени во еден ран. Содржината на компонентите се определува преку површините на пиковите, со метод на нормализација.

За определување на хемиската структура на непозната компонента се користи комбинација на GC-NMR. Различни мултидимензионални техники, како што е дводимензионалната GC, повеќе се користат во научни студии, и тоа за испитување хирални компоненти во етерични масла. Една од најсофистицираните техники која може да се применува во анализата на етеричните масла е GC во комбинација со изотопска масена спектроскопија (GC-IRMS, Isotope ratio mass spectrometry), со која се определува односот на изотопите $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ и се утврдува автентичноста на етеричното масло.

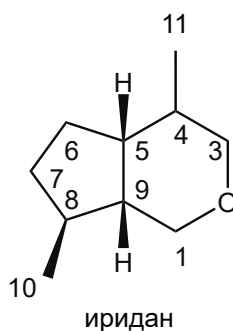
Содржината на етерични масла во растителни сировини. Најчесто се определува со дестилација со водена пареа во апарат по Клевецер. Во монографиите на дрогите во фармакопеите се наоѓаат условите при кои треба да се изврши дестилацијата (однос дрога: вода, степен на уситнетост, времетраење на дестилација, брзина на дестилација, употреба на органски растворувач и други услови).

9.2. Иридоиди

Иридоидите се монотерпенски соединенија со специфична хемиска градба која вклучува кондензиран циклопентански и α -пирански прстен (6-член прстен со кислород) односно циклопентан(с) пираноид. Бицикличната структура на иридоидите е позната уште како **иридан** структура (слика 155). Некои автори овие соединенија ги дефинираат како метилциклопентани. Името иридоид е генеричко име добиено од неколку соединенија изолирани од родот на мравки *Iridomyrmex*. Како пример, иридомирмецин е инсектицид, феромон на мравката *Iridomyrmex humilis*. Денес се познати околу 500 иридоидни деривати од кои најголем дел претставуваат иридоид гликозиди (> 300, аукибин и харпагозид). Потоа помалку се застапени секоиридоиди (> 100, гентиопикрозид), па негликозидни иридоидни форми или едноставни иридоиди (> 100, логанин), како и бисиридоиди кои настануваат со димеризација на иридоиди и секоиридоиди.

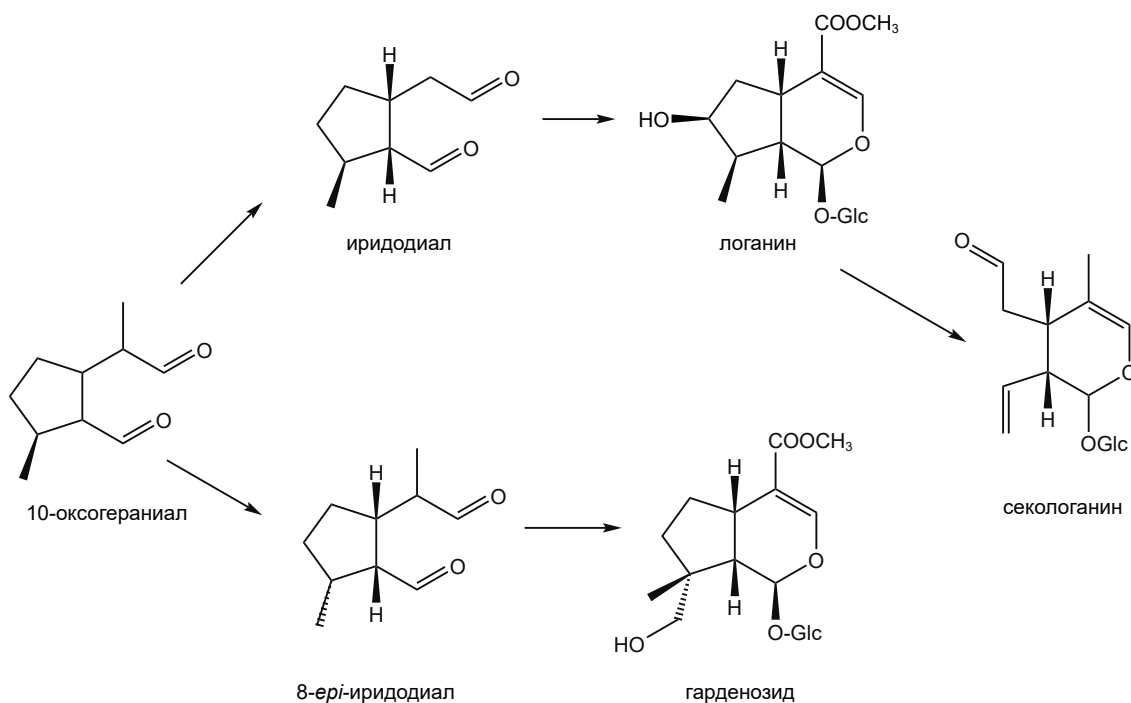
Биосинтеза. Во поглед на биосинтезата иридоидите претставуваат хомогена група соединенија. Се создаваат од геранилпирофосфат, според „изопренското биосинтетско правило“. Поставени се

повеќе хипотези за текот на биосинтезата, но како најверојатна се смета претпоставката дека од оксидирани деривати на гераниол во една насока се создава клучна компонента иридодиал, од која со гликозидација и оксидација настанува логанин, прекурсор на најголем број иридоиди. Со отворање на петочлениот прстен помеѓу C_7 и C_8 се создава секологанин, прекурсор на секоиридоидите.



Слика 155. Бициклична структура на иридоите

Во другата насока од оксигераниол се создава 8-*eri*-иридодиал, прекурсор на аукубинска група иридоиди, во која спаѓаат аукубин и гарденозид (слика 156). Од секологанонот се создаваат и монотерпенските индолни алкалоиди.



Слика 156. Биосинтеза на иридоиди: создавање на прекурсорите на посебните групи иридоиди

Хемиска градба и класификација. Во растителните организми иридоидите се наоѓаат во форма на хетерозиди или естри, многу поретко се слободни (како што е непеталактонот). Шеќерниот

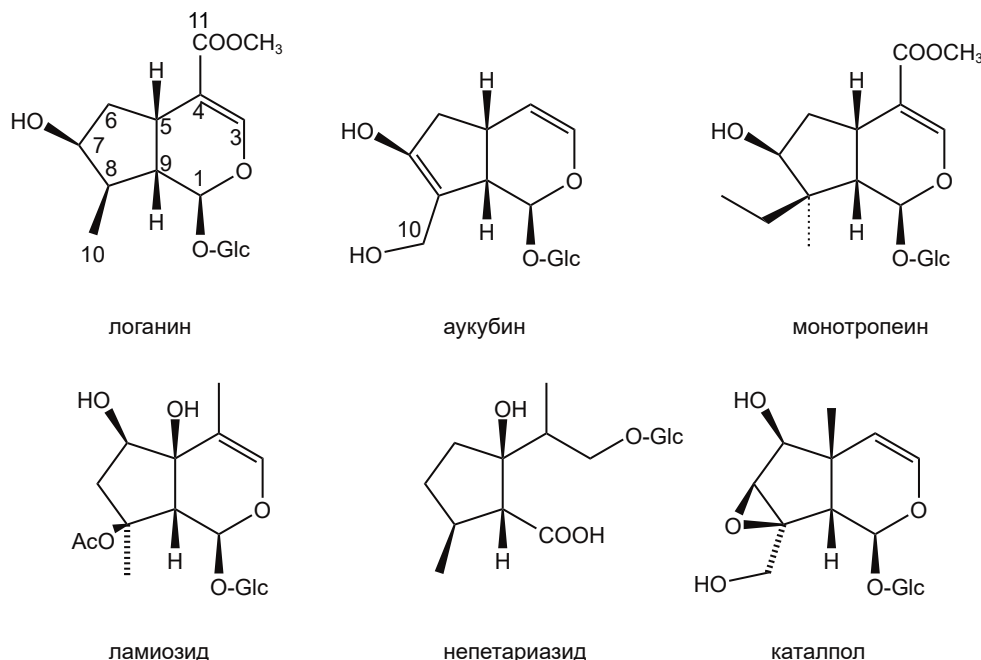
дел најчесто се состои од β -D-гликоза врзана за OH-групата на C₁. Поретко можат да бидат врзани посложени шеќери (олигосахаридни молекули). Во агликонскиот дел на иридоидните хетерозиди можни се поголем број варијации во структурата, поради што се понудени неколку различни класификации. Една од нив ги дели иридоидите на четири главни групи соединенија:

- иридоиди (правилни или основни иридоиди),
- валепотријати,
- секоиридоиди,
- комплексни иридоид-алкалоиди.

Распространување. Правилните иридоиди се идентификувани само во дикотиледоните растенија во фамилиите на усноцветни растенија, поретко во други претставници. Секоиридоидите се поретки во природата и се среќаваат главно во линцура и во црвениот кантарион и во други растенија од истата фамилија. Во лист од маслинка се среќава посебна група секоиридоидни соединенија познати како олеуропеини. Валепотријатите се карактеристични за растението маче трева (валеријана), а комплексните иридоид-алкалоиди се со сиромашен биолошко-фармаколошки профил и имаат помало значење.

9.2.1. Вистински / правилни иридоиди

Вистинските (правилните) иридоиди имаат ириданска структура со зачуван циклопентански прстен. Некои автори ги означуваат како карбоциклични иридоиди. Најчесто се среќаваат во форма на гликозиди, а шеќерот се врзува на C₁. Иако се изградени од 10 C-атома, во некои структури постои и 11-C-атом, кој е дел од карбометокси (-COOCH₃) или од карбоксилна група (-COOH), поретко од хидроксиметил група (-CH₂OH), алдехидна (-CHO) или од метил група (-CH₃). Многу ретко пиранскиот прстен може да биде отворен.

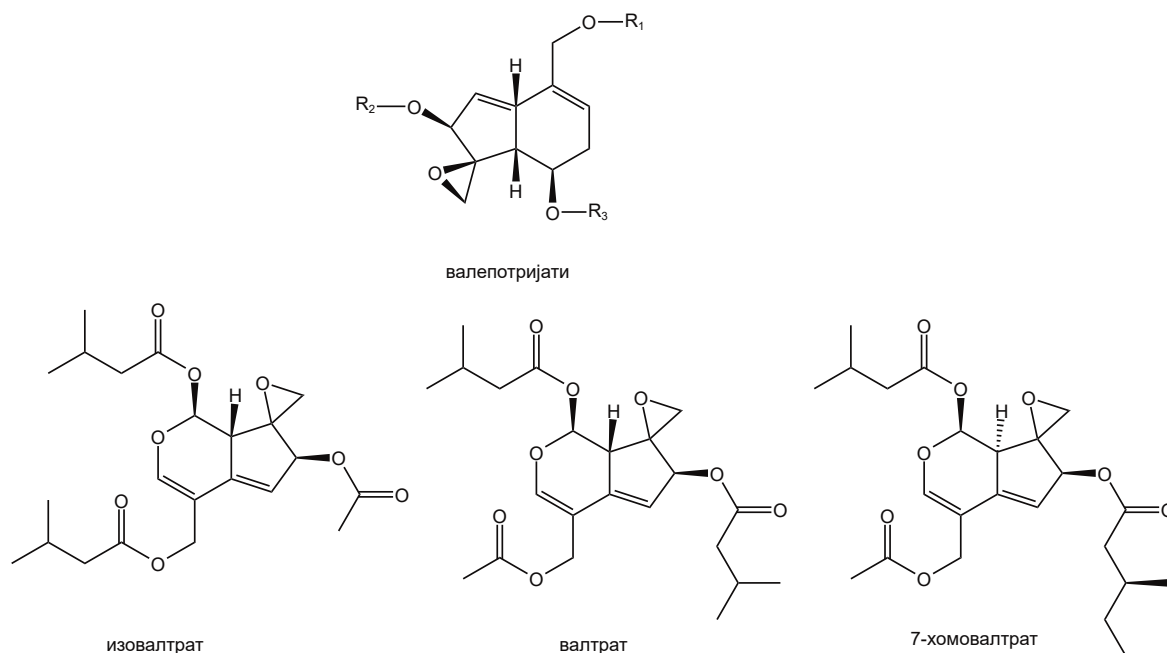


Слика 157. Различни структури на примарни иридоиди

Најбројната група на овие состојки е групата на аукубин, за која е карактеристично присуство на ОН-група на C_{10} . Останатите ОН-групи се наоѓаат на C_6 и на C_5 , а има и такви со ОН-групи на C_7 и на C_8 , кои најчесто формираат епоксид (цикличен етер) (слика 157). Во оваа група соединенија спаѓаат и димерни структури (на пр. центаурин во црвениот кантарион).

9.2.2. Валепотријати

Валепотријатите се посебна група иридоиди, многу блиски до правилните иридоиди, што содржат 5 или 6 ОН-групи, од кои две од нив образуваат епоксид (цикличен етер), а останатите се естерификуваат. За прв пат се изолирани од растението маче трева (валеријана) (*Valeriana officinalis*), од каде им потекнува името, т.е. „валепотријат“ што претставува сложен збор создаден со поврзување на првите слогови од зборовите **валеријана-епокси-три**естер. Најзначајни меѓу нив се: валтрат, ацевалтрат и дихидровалтрат (слика 158). Валепотријатите дејствуваат седативно.



Слика 158. Општа градба на валепотријати и некои валепотријати на маче трева

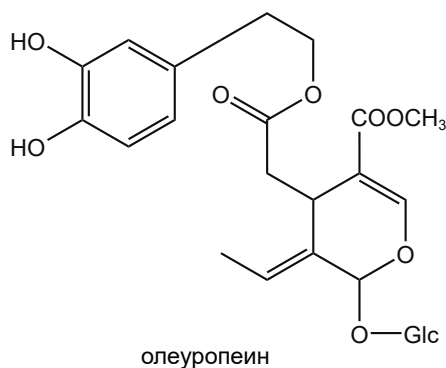
9.2.3. Секоиридоиди

Секоиридоидите се карактеризираат со прекината врска во циклопентанскиот прстен помеѓу C_7 и C_8 . Претставник на простите секоиридоиди е секологанин. Од него понатаму со промените на алдехидната група на C_7 се формираат други структури.

Секоиридоидите се делат во три основни групи:

1. Прости секоиридоиди од типот на секологанин, што имаат винил група на C_9 . Тие немаат терапевтско значење.

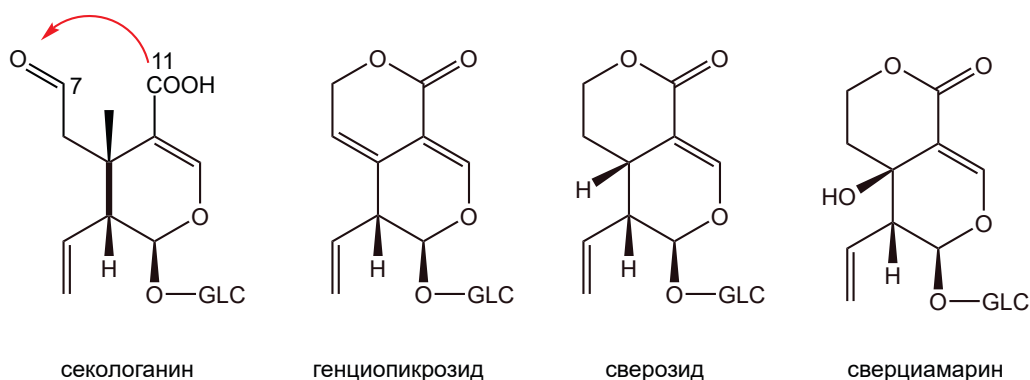
2. Секоиридоиди од типот на олеуропеин, што имаат етиленска и хидроксиетиленска група на C_9 . Карбоксилната група може да биде естерифицирана. Оваа група иридоиди е значајна, но опфаќа релативно мал број соединенија што по својата структура се многу слични на секологанин, со двојна врска помеѓу C_8 и C_9 . Идентификувани се само во лист од маслинка и во слични растенија од истата фамилија. Биолошка активност покажува гликозидот олеуропеин, што има хипотензивно дејство (слика 159).



Слика 159. Секоиридоид на лист од маслинка

3. Секоиридоиди од типот на генциопикрозид што имаат винилна група на C_9 . Биосинтетски настануваат од секологанинот, кај кој доаѓа до лактонизација помеѓу алдехидната група на C_7 и карбокси-радикал на C_{11} . Генциопикрозидите се среќаваат главно во форма на хетерозиди, најчесто со гликоза што се врзува за C_1 . Најзначајни генциопикрозиди се сверозид, сверциамарин и генциопикрозид (слика 160). Нивни деривати се сложени секоиридоиди амарогентин, амаросверин и др., кај кои ОН-групата на $C-2'$ кај гликозата е естерски поврзана со фолна киселина. Генциопикрозидите се познати како **горчливи хетерозиди**. Силно изразениот горчлив вкус го имаат само кога се во хетерозиден облик.

Растителните сировини што ги содржат спаѓаат во група *Amara pura* или *Tonica*. Се користат како аперитиви (за подобрување на апетитот) и средства за регулирање на стомачната функција (за подобрена дигестија на храната).



Слика 160. Најзначајни генциопикрозиди

Дејство и употреба. Иридоидите имаат широк спектар на дејства врз човечкиот организам. Показуваат антимикробна активност (аукубин, непеталактон, генипова киселина, а особено плумерин). Валепотријатите дејствуваат седативно. Секоиридоидите се најзначајна група амара соединенија што се користат како аперитиви и стимулатори на желудочна секреција. Олеуропеините имаат хипотензивна активност. Аукубин, каталпол, вербеналин и други правилни иридоиди покажуваат антиинфламаторна активност. Голем број растителни сировини што содржат иридоиди се користат за производство на додатоци на исхраната со антиинфламаторно или со тонично, аперитивно, антихипертензивно или друго дејство.

Екстракција и испитување на иридоиди. Иридоидните хетерозиди можат да се екстрахираат од растителен материјал со поларни растворувачи, најчесто со алкохол, со различна концентрација, по што се фракционираат со хроматографија низ јаглен или олово ацетат (при што постои ризик за иреверзибилна адсорпција) или на порозни полимери. Сепарација и изолација на одделни компоненти се изведува со хроматографски техники, а најдобро со RP-HPLC. Иридоидните и секоиридоидните глукозиди се подвојуваат со течна хроматографија со RP-8 и/или RP-18 колони при соодветни аналитички услови со користење на детектори со променлива бранова должина. Со цел да се испита хомогеноста на пиковите, се користи десорпциона масена спектрометрија и фотоосетлив детектор изграден од серија фотодиоди. Пречистување на изолираните компоненти се изведува со класични процедури (TLC, HPLC). Треба да се напомене дека иридоидните хетерозиди претставуваат извонредно нестабилни компоненти, при ензимско или кисело развојување на гликозидниот дел при што брзо се разложуваат на агликонски и на шеќерен дел, а агликоните се дополнително нестабилни поради присуство на лактонски прстен и брзо се разложуваат до темно обоени продукти. Нестабилноста на иридоидите во голема мера ја отежнува екстракцијата на овие состојки од растителен материјал. Познато е, исто така, дека темната боја на дрогите што содржат иридоидни хетерозиди потекнува од разградните продукти на иридоидите, а истовремено укажува на несоодветен третман на дрогата при собирање, сушење или ситнење, лош квалитет или старост на дрогата.

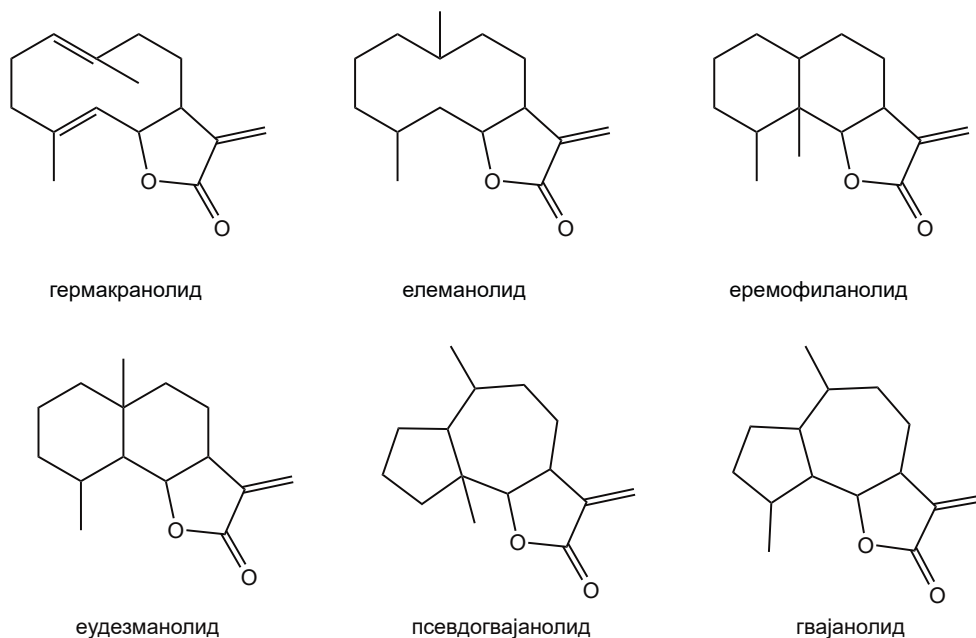
Идентификација на иридоидни хетерозиди во дроги се изведува со разблажен раствор на CuSO_4 во HCl (познат како Trim и Hill боен реагенс). За визуализација при TLC-анализа се користи неспецифичен реагенс ванилин-сулфурна киселина. Во двата случаи се добиваат црвено обоени производи.

9.3. СЕСКВИТЕРПЕНСКИ ЛАКТони (STL)

Посебна група сесквитерпенски соединенија што се карактеризираат со присуство на γ -лактонски прстен во молекулата се сесквитерпенските лактони. Претставуваат значително голема група природни производи, што денес брои преку 6 000 изолирани и идентификувани компоненти. Во последно време интензивно се проучуваат поради широкиот спектар на биолошко-фармаколошки дејства, а особено поради антитуморното и антилеукемичното дејство на некои од нив. Освен како биолошки активни и значајни состојки, сесквитерпенските лактони денес се проучуваат и од хемотаксономски аспект, како генетски маркери. Тие се речиси исклучиво изолирани кај претставници од Asteraceae.

Номенклатура. Имињата на сесквитерпенските лактони се изведуваат од името на јагледородот што ја дава основната структура на лактонското соединение, додавајќи ја наставката „олид“ (на пр. од гермакран се изведува гермакранолид). Во употреба се и голем број тривијални имиња.

Биосинтеза и хемиска градба. Сесквитерпенските лактони настануваат од FPP, кој е прекурсор на сите сесквитерпенски соединенија. Со циклизација на 2E,6E-FPP се создава активен циклодекадиенски катјон од кој настанува гермакрадиен, прекурсорот на герамакранолидот. Од него понатаму се создаваат другите класи сесквитерпенски лактони (слика 161).



Слика 161. Структури на посебни групи сесквитерпенски лактони

Основни хемиски карактеристики на сесквитерпенските лактони се:

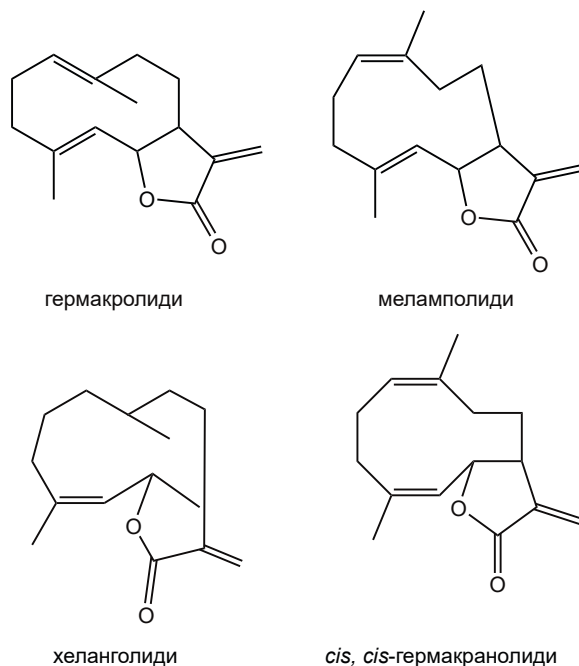
- присуство на α -метилен- γ -лактонски прстен,
- α -конфигурација на Н-атомот на C_7 ,
- *cis*-6,7, *cis*-7,8, *trans*-6,7 и најчесто *trans*-7,8 конфигурација на лактонот,
- присуство на CH_3 -групи кои можат да бидат преведени во алкохолни, карбоксилни или други функционални групи,

- присуство на епоксиди и хидроксилни групи, а во случаи кога се присутни ОН-групи, најчесто се естерифицирани,
- редуциран број на двојни врски.

9.3.1. Класификација на STL согласно со карбоцикличниот скелет

Гермакранолиди

Сите имаат циклодекадиенски прстен, и претставуваат главна група на STL, но освен конфигурациските карактеристики на двојните врски на $C_1=C_{10}$ и $C_4=C_5$, се делат на четири поттипови на гермакранолиди: гермакролиди (*trans, trans*-гермакранолиди), мелаμποлиди (*cis, trans*-гермакранолиди), хеланголиди (*trans, cis*-гермакранолиди) и *cis, cis*-гермакранолиди (слика 162).

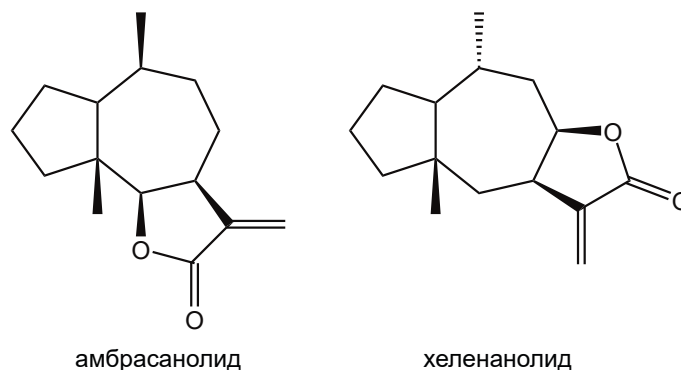


Слика 162. Поттипови на гермакранолиди според конфигурацијата на двојните врски на $C_1=C_{10}$ и $C_4=C_5$.

Псевдоівајанолиди

Претставуваат 5-7 бициклични соединенија со CH_3 -група на C_5 -прстенестиот спој. Тие можат да се лактонизираат кон C_6 или C_8 . Другата метил групата е присутна на C_{10} и според стереохемијата на CH_3 -групата се делат на:

- Амбросанолиди, со β -метил група на C_{10} (слика 163)
- Хеленанолиди, со α -метил група на C_{10} (слика 163)



Слика 163. Структури на амбросанолид и на хеленанолид

Гвајанолиди

Претставуваат, STL базирани на скелетот на гуаиан. Заедно со нивните 4, 5-*seco* деривати, познати како ксантаноледи, овие се една од најголемите групи на сесквитерпенски лактони.

Еудезманолиди

Ова се 6-6 бициклични соединенија, засновани на скелетот на еудесман. Членови на оваа група може да се лактонизираат кон 6, 7 или 7, 8. Повеќето соединенија имаат 6, 7-*trans*-лактонизирана дел со надворешна CH_3 -група помеѓу C_{11} и C_{13} . Од друга страна, 7, 8-лактонизираниите соединенија може да се јават како *cis*- или *trans*- γ -лактони. Повеќето претставници имаат двојни врски на $\text{C}_3=\text{C}_4$, $\text{C}_4=\text{C}_5$ или $\text{C}_5=\text{C}_{15}$ или пак имаат епоксидни групи на овие позиции. Хидроксил и/или кетонските групи се јавуваат на C_1 , C_3 и C_8 .

*Други класи на сесквитерпенски лактони***Еремофилааноиди**

Добиени од еудесманолиди и лактонизирани на C_8 , а се формирани со миграција на метил групата од C_{10} на C_5 .

Елеманолиди

Добиени со трансформација на гермакраноледи.

Бисаболенолиди

Поседуваат бисаболански скелет.

Тутинанолиди (пикротоксини)

Изолирани се од родовите на фамилијата Orchidaceae. Тие вообичаено се високооксидирани и често содржат азот во структурата.

Кадинанолиди

Базирани на кадинански скелет. Артемизининот е класифициран во оваа група на соединенија.

Распространување. Сесквитерпенските лактони се распространети во претставниците од главоцветни растенија (Asteraceae), а помалку во штитоцветни (Ariaceae) и во фамилијата на лаворот (Laugaceae). Поретко ги има во претставниците од некои други фамилии. Во растенијата вообичаено се присутни повеќе структури, а квалитативниот и квантитативниот состав зависат

од низа фактори. Во различни делови од растението можат да се локализираат различни сесквитерпенски лактони. Нивната содржина значително варира во зависност од вегетациониот период и од еколошките услови во кои расте растението.

Дејство и употреба. Биолошката и фармаколошката активност на сесквитерпенските лактони е поврзана со присуство на γ -лактонскиот прстен во молекулата. Активниот дел всушност е α -метилен- γ -лактон што ги врзува тиолните и аминокислотните групи на протеините, предизвикувајќи ирверзибилни промени на ензимите (трајна алкилација). Поради оваа специфична реакција, растителните сировини што содржат сесквитерпенски лактони пројавуваат низа активности. Експериментално се потврдени следните дејства:

- антимикробно, посебно врз грам-(+)-бактерии,
- антифунгално,
- антхелминтично (сантонин),
- антипаразитарно (артемисинин е антималярично средство),
- стомахично, холагогно и хиполипемично,
- вулнеративно и антиулкусно,
- цитостатично и антитуморно.

Изолираните сесквитерпенски лактони како чисти супстанции, не се користат во терапевтски цели, освен артемисин дериватите што се користат во терапија на маларијата, а врз кои се направени повеќе клинички испитувања со кои е потврдена нивната ефикасност. Растенијата што содржат сесквитерпенски лактони многу ретко наоѓаат примена поради активноста што се должи само на овие соединенија, а многу почесто дејството е резултат од активноста на голем број различни структури, како на пример кај артичока, ајдучка трева, камилица, глуварче и ред други дроги кои потекнуваат од Asteraceae. Интересен е податокот дека сесквитерпенските лактони вернолепин, еупаториопикрин и тинулин *in vitro* покажуваат изразена цитостатска активност, меѓутоа ниту една од овие супстанции не е клинички испитувана поради екстремно голема токсичност. Екстрактите од растенијата што содржат сесквитерпенски лактони наоѓаат примена и во производство на додатоци на исхраната.

Токсичност. Сесквитерпенските лактони се силни алергени супстанции, од кои потекнуваат токсичноста и најголем број несакани ефекти од употреба на сировините и екстрактите што ги содржат. Реактивниот дел од молекулата е α -метилен- γ -лактон, а механизмот на предизвикување на алергиските реакции се совпаѓа со механизмот на кој се должи и лековитоста на овие компоненти (трајното алкилирање на ензимите со блокирање на тиолните и на аминските групи на ензимите). Алергиските реакции се од типот на контактен дерматитис, а најпознати и во литературата најчесто опишани се оние што ги предизвикуваат претставниците од Asteraceae и од ловорот. Алергиски реакции може да бидат предизвикани од производи што содржат сесквитерпенски лактони, било да се хербални лекови, додатоци на исхраната или вообичаени зачини.

9.3.2. Екстракција и испитување на сесквитерпенски лактони

Во изминативе години стотици нови сесквитерпенски лактони се изолирани, со користење најчесто на класичните методи за екстракција и изолација. Сесквитерпенските лактони се секундарни метаболити присутни главно во листовите и цветните делови на растенијата, а понекогаш се присутни и во корените. Содржината на овие компоненти во растенијата се движи од 0,01 % до 8 % изразени на сува дрога. Тие генерално се наоѓаат во слободна форма, а ретко како гликозиди. Претставуваат безбојни кристали, гуми или масни соединенија, кои имаат горчлив вкус. Многу од нив се термолабилни. Поради нивниот липофилен карактер, тие се растворливи во неполяр-

ни растворувачи, а се нерастворливи во вода. Најчесто користени растворувачи се хлороформ, дихлорметан, етил ацетат, диетил етер и толуен. Ацетон, метанол и етанол, како и алкохолни мешавини се користат многу поретко. Мацерацијата на собна температура е екстрактивна техника од избор. Денес се користи и суперкритичната екстракција како еколошки подобна техника за екстрахирање. Прочистувањето и сепарирањето на сесквитерпенските лактони присутни во суровите екстракти може се прави со СС или со флеш колонска хроматографија на силика гел или алуминиум оксид, при што за елуирање се користат мешавини од растворувачи како хексан : етил ацетат, хексан : ацетон или дихлорметан : етил ацетат. Препаративната HPLC со реверзна фаза исто така се користи за изолирање и прочистување. Тука се користат C8, C18 или фенилхексил колони, додека детекторите или се со рефрактивен индекс или со UV-детекција на 220 nm, при што како мобилна фаза се користи мешавина од метанол : вода.

Неколку хроматографски методи како TLC со користење на селективни реагенси за детекција (реагенси за визуализација како јод, разблажен раствор на KMnO_4 , ванилин-HCl или кобалт хлорид во разблажен раствор од сулфурна киселина), како и HPLC-MS (со реверзна-фаза) се најчесто користени за анализа, детекција и квантификација на овие соединенија од суровите екстракти. Кај LC доколку се користи UV-DAD-детектор се јавува проблем поради ниската ултравиолетова апсорпција на сесквитерпенските лактони. Затоа се применети методите на дериватизација со цел да се зголеми сензитивноста и да се овозможи детекција на овие соединенијата на повисоки бранови должини (пример. квантификација на партенолид).

GC во спрега со MS исто така може да биде корисна алатка за раздвојување и идентификација на сесквитерпенските лактони. Сепак, овој метод има ограничена примена бидејќи некои соединенија се термолабилни или не се доволно испарливи, за што треба истите да се дериватизираат или трансформираат. Кај GC се користат најчесто неполярни капиларни колони, а температурата на печката се движи во опсег од 180 до 300 °C. Примероците се раствораат во дихлорметан (~25 µl/mg смеса). Процентите се изразуваат како средна вредност од најмалку три мерења ($n = 3$), а се пресметани од вкупниот јонски хроматограм (TIC – total ion chromatogram).

9.4. ДИТЕРПЕНИ И ДИТЕРПЕНОИДИ

Дитерпените се терпенски соединенија што содржат 20 C-атоми. Формално се дефинирани како јагледородороди и не содржат хетероатоми. Функционализираните структури се нарекуваат дитерпеноиди, иако во научната литература двата термина (дитерпени и дитерпеноиди) често се користат за означување на двете групи состојки. Иако постои широк опсег на дитерпенски структури, само неколку од нив се биолошки значајни. Во растенијата најчесто се јавуваат како составни компоненти на смоли или на млечен сок, и одговорни се за нивното иритативно и инфламаторно дејство. Од оние кои имаат поголема биолошка улога и дејствуваат како примарни метаболити, значајни се гиберелини, група на дитерпени кои играат важна улога во физиологијата на растенијата, поттикнувајќи го општиот метаболизам, 'ртењето, растот и развојот на растенијата. Поради овие свои функции се означуваат како фитохормони. Дитерпеноидите, општо, опфаќаат разновидна група секундарни метаболити, соединенија добиени од изопрен (C5) кои се состојат од четири единици споени со глава-опаш или со опаш-глава врска, со голем број можности за различни типови на структури.

Распространување. Дитерпените се многу широко распространети во растителниот свет. Особено се присутни во фамилиите на усноцветни, главоцветни и штитоцветни растенија (Lamiaceae, Asteraceae и Apiaceae). Се наоѓаат и во кафеавите алги, морските безрбетници, сунѓерите, во некои габи, мовови и инсекти, како што се термитите.

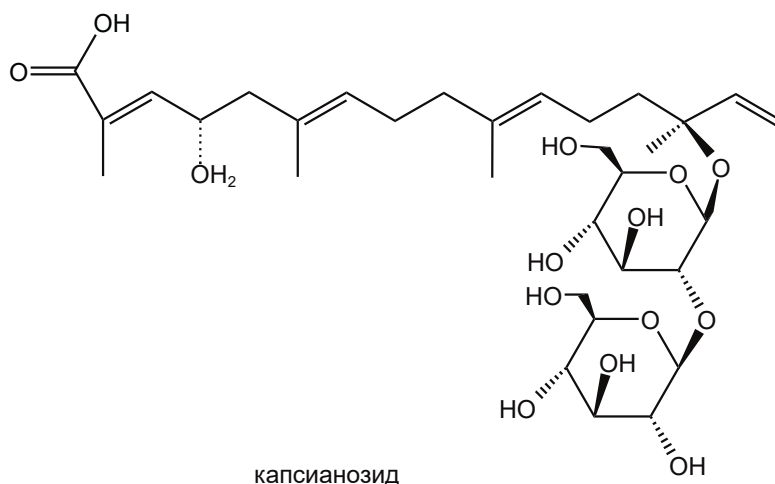
Биосинтеза и хемиска градба. Биосинтетски се создаваат од GGPP, преку биосинтетскиот пат на MVA. Познато е дека првиот чекор на генерирање на терпен започнува со формирање на IPP или DMAPP. Формирањето на дитерпените започнува со кондензација три C5 единици и формирање на FPP, C15 единица, која се врзува со IPP за да се добие геранилгеранил пирофосфат. Од GGPP може да се добие огромен опсег на различни дитерпенски структури со реакции на циклизација и понатамошна функционализација.

Дитерпените се класифицираат главно според нивната хемиска структура, според бројот на прстенот што го содржат:

- ациклични (фитан структури) и
- циклични дитерпени, во кои спаѓаат:
 - моноциклични (ретинол-витамин А-структури),
 - бициклични (лабдан, халиман, клеродан структури),
 - трициклични (абиетан, пимаран, касан, розан, подокарпан, кинан, вуакапан структури),
 - тетрациклични (кауран, трахилобан, афидиколан, стемодан, стемаран, бејеран, атизан, скопадулан, гиберелан структури) и
 - макроциклични (полициклични - цембрани, таксани, тиглијане, дафнанецулани структури).

9.4.1. Ациклични дитерпени

Не претставуваат типични дитерпенски структури и поретко се јавуваат во растителниот свет. Имаат линеарна градба (на пр. капсианозид, слика 164), а можни се и структури што вклучуваат лактонски и пирански прстен.

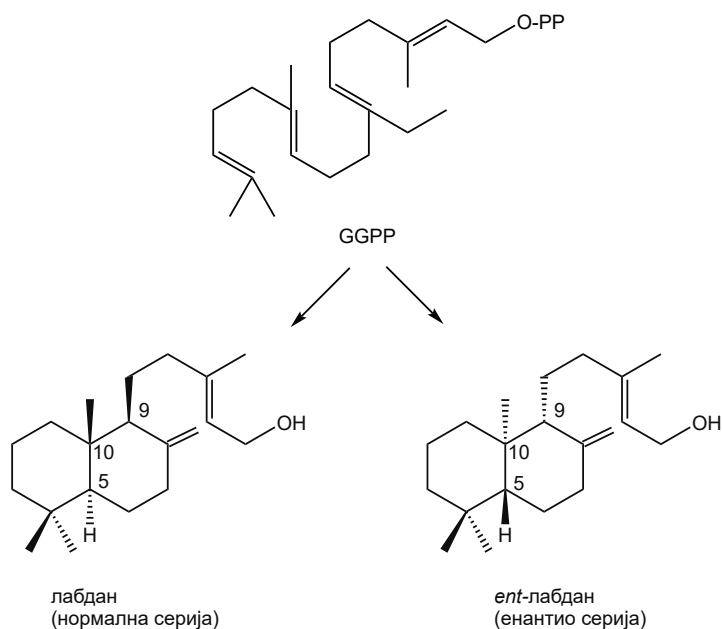


Слика 164. Структура на ацикличен дитерпен

Сепак, една специфична структура е многу честа во растителното царство, алкохол фитол. Бидејќи е компонента на хлорофилот, фитолот е најраспространетиот ацикличен дитерпен кој се наоѓа во природата и може да биде произведен од практично сите фотосинтетски активни организми, како што се растенијата, алгите и бактериите (цијанобактерии). Некои линеарни дитерпени (геранилгераниол, тетрахидрогеранилгераниол и дихидрогеранил-гераниол) се линеарни дитерпени што се наоѓаат во неполярната фракција на маслиновото масло.

9.4.2. Циклични дитерпени

Можат да бидат со 1, 2, 3, 4 и повеќе прстени. Моноцикличните дитерпени се релативно ретки во природата. Неодамна се изолирани и структурно идентификувани два нови моноциклични дитерпеноиди, тагетон А и тагетон Б, од *Tagetes minuta* L. (Asteraceae). Некои автори дитерпените од групата цембрани ги класификуваат како моноциклични дитерпени, додека други сметаат дека претставуваат макроциклични дитерпенски соединенија.

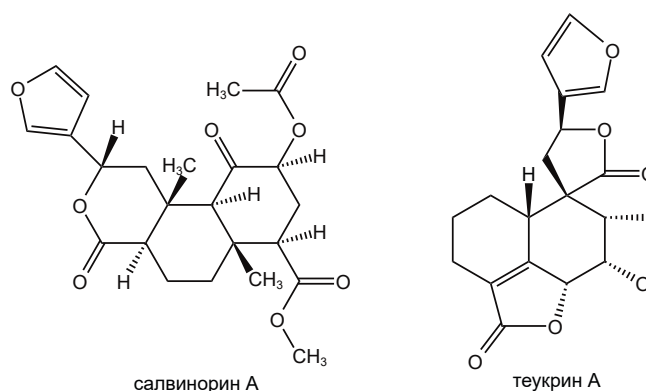


Слика 165. Циклизација на GGPP во лабдан и *ent*-лабдан

Бицикличните дитерпени се голема група соединенија кои вклучуваат неколку подгрупи. Овие структури се создаваат преку хипотетичниот незаситен карбокатјон, од кој се создаваат две серии на енантиомерни соединенија со спротивни конфигурации во позициите C₅, C₉ и C₁₀. Серијата во која прстените А и В се поврзани на ист начин, како што е тоа случај кај природните стероидни соединенија се означува како нормална серија (A/B *trans*, 5H – α), а енантиомерните структури од спротивната серија добиваат во називот префикс *ent* (A/B *cis*, 5H – β). Типичен пример се сериите лабдан и *ent*-лабдан (слика 165), кауран и *ent*-кауран и др. Покрај нормалната и *ent* серија, бицикличните дитерпени се јавуваат уште и како *syn* и *syn-ent* структури. Лабданите се широко распространети бициклични дитерпени меѓу растенијата, а се јавуваат и во мов, црн дроб, алги и др. Имаат широк спектар на биолошки активности, како што се антибактериска, антифунгална, антимулагена, цитотоксична и цитостатичка активност, а дејствуваат и антиинфламаторно. Истражу-

вањата фокусирани на традиционалната употреба на растенијата што содржат лабдан дитерпени сугерираат дека овие ефекти се поврзани со соединенијата андрографолид, форсколин, склареол и (+)-полиалтинска киселина, кои се претставници на оваа класа на соединенија.

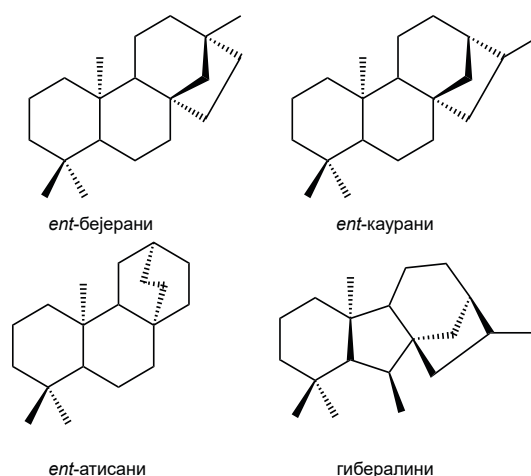
Од други групи бициклични дитерпени поголемо значење имаат халимани и клеродани. Халиманите се ограничено застапени во природата, главно во поголем број растенија од Asteraceae, Lamiaceae и Euphorbiaceae. Некои хелимански деривати се користат како биомаркери за утврдување на туберкулоза. Клероданите се присутни во габи, бактерии и морски сунѓери. Имаат значајни дејства. Соединението салвинорин А (*Salvia divinorum*) е моќен и селективен агонист за каппа-опиоидните рецептори, и дејствува како несеротонински халуциноген. Овие карактеристики овозможуваат молекулата на салвино-рин А да биде искористена како појдовна структура за синтеза на антагонисти, кои имаат потенцијал да се користат за третман на зависности од злоупотреба на лекови, третман на констипација предизвикана од опиоиди, третман на згоеност и на депресија. Клеродани се изолирани и од родот *Teucrium*, Lamiaceae, и тоа посложени структури со неоклероданска градба (теукрин А, изотеуфидин и др.) (слика 166).



Слика 166. Структури на бициклични дитерпени

Од трицикличните дитерпеноиди поголемо значење имаат абиетаните, кои се во поголема мера застапени во четинарски смоли. Абиетинска и дехидроабиетинска киселина се главните состојки на боровата смола добиена од *Pinus sp.* Колофонијум е смола која заостанува по дестилација на боровиот терпентин и добивањето на терпентинското масло. Претставува главен извор на абиетаните, а освен смолата од борот, абиетаните се присутни во смолите и на другите четинари (од фамилиите Cupressaceae, Phyllocladaceae, Pinaceae). Присутни се и во претставниците од Asteraceae и Lamiaceae. Абиетанските дитерпеноиди покажуваат различни биолошки активности. Покрај антимикробните, антивирусните, антималяриските, антиулкусните и антиоксидантните активности, пријавено е и антитуморното дејство и дејство против лајшманија. Некои абиетани инхибираат репродукција на вируси како што е вирусот на херпес симплекс тип 1 (HSV-1), цитомегаловирус (CM), вирус на варицела зостер (VZV) и Epstein-Barr вирус. Познато е дека ароматичните абиетани се најголемата група абиетани и претежно се познати како одбранбени агенси. Пимаранските трициклични дитерпени генерално се создаваат во растенија и габи, поретко во бактерии, инсекти и морски организми. Касани се исто така трициклични дитерпени, кои во структурата фурански прстен или дел од α , β -бутенолид прикачен на трицикличниот дитерпенски скелет. Главно се дистрибуирани во видовите од Fabaceae. Покажуваат низа активности: антивирусна, антиканцерогена, антиинфламаторна, антималяриска и антипролиферативна активност.

Од тетрацикличните дитерпени (бејерани, каурани, атисани и гиберелини) (слика 167) поголемо значење имаат гиберелините кои во природа се јавиваат со *ent*-скелетна структура, а може да имаат C20 или да изгубат еден C атом и да се јавуваат како C19 структура. За растенијата се важни како фитохормони. Естерите на форбол се друга група на тетрациклични дитерпени, кои се општо познати по нивната канцерогена активност и токсичност, а се јавуваат во растенијата од Euphorbiaceae и Thymeliaceae. Имаат полициклична структура со две хидроксилни групи на соседните јаглеродни атоми, кои се естерификувани со масни киселини. Значајни се како појдовни молекули во развојот на нови лекови. *ent*-Каурански гликозиди (стевиолбиозид, дулкозид А, ребаудиозид А-Ф и други, означени како стевија гликозиди) што се изолирани од *Stevia rebaudiana* комерцијално се користат како засладувачи и замена за обичниот шеќер.



Слика 167. Структури на некои бициклични, трициклични и тетрациклични дитерпени

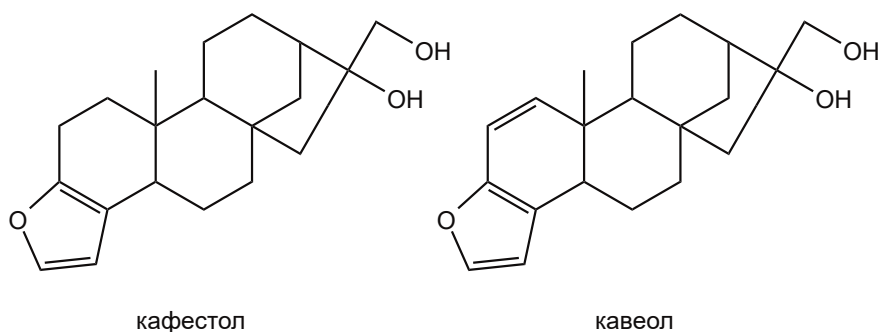
Макроциклични дитерпеноиди се карактеристични за видовите *Euphorbia*. Имаат сложена полициклична структура, а покажуваат: антитуморна, цитотоксична, антивирусна и антиинфламаторна активност. Позначајни се цембраните, кои се наоѓаат во смолести растителни производи, во морски безрбетници и во инсекти. Смолата темјан што се добива од растението босвелија, покрај фармаколошки активните тритерпени, содржи и цембрани, кои се особено проучувани во однос на нивното антивирусно (против ХИВ-вирусот), антиканцерогено и антиинфламаторно дејство. Покрај цембраните, денес поголемо внимание е свртено кон групата фомактини, дитерпеноидни габични метаболити, кои покажуваат способност за потиснување на тумори по терапија со гама-зрачење или со хемотерапија, а дејствуваат и како инхибитори на тромбоцитен активирачки фактор.

Биолошка улога на дитерпените во растенијата. Главната улога на дитерпените во живите организми е одбрана во однос на различни неповолни надворешни фактори. Некои дитерпени ги одвраќаат животните да се хранат со растенијата или со алгите што ги содржат, смолестите киселини (абиетански и пимарански дитерпени), од олеоресини на четинари, имаат инсектицидно својство, а дитерпените од типот на клеродан од некои видови од Euphorbiaceae имаат акарицидна активност против крлежи.

Биолошко-фармаколошко дејство на дитерпените. Дитерпените поседуваат богата фармакологија и вклучуваат важни соединенија како што се ретинол, фитол и многу други. Ретинол влегува во состав на витаминот А, а фитолот е составен дел од хлорофилот. Некои дитерпени пројавуваат антихипертензивно, бронходилататорно, антиинфламаторно и аналгезично дејство. Инте-

ресни дитерпенски соединенија се изолирани од некои морски организми. Гинколиди се дитерпени од растението гинко (*Ginkgo biloba*), што заедно со флавоноидите придонесуваат за дејството на гинко-екстрактите врз коронарната и церебралната циркулација. Екстрактите од гинко денес многу широко се користат во производство на хербални лекови и на додатоци на исхраната за подобрување на меморијата и микроциркулацијата во мозокот. Од особено големо значење се трицикличниот дитерпен таксол, изолиран од растението тиса (*Taxus baccata*), и неговите деривати, кои поседуваат цитостатска активност. Таксолот е интензивно клинички испитуван и денес се користи како цитостатски лек, во лекување на малигни заболувања, под името Паклитаксел. Најзначаен дериват на таксолот е доцетаксел, кој исто така се користи како цитостатик.

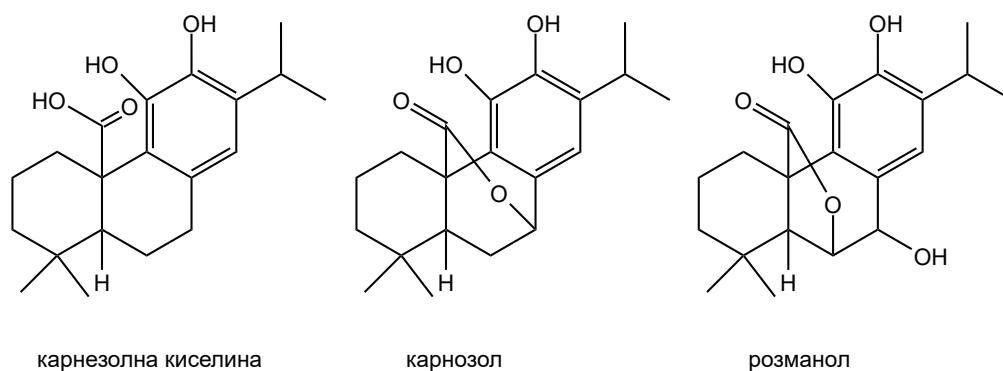
Значење и употреба на дитерпените. Голем број дитерпени се присутни во храната, во зеленчукот, во овошјето и во напите подготвени од кафе и од чај. Разновидноста на дитерпенските соединенија е многу голема и присутни се: абиетани, цембрани, клеродани, цијатани, долабелани, фузикокани, каурани, лабдани, пимарани, таксани, трахилобани и нивните сродни соединенија. Притоа, дистрибуцијата на дитерпените во: зеленчукот, овошјето, пијалациите и во преработената храна, е многу различна, различни се метаболичките патишта, како и ефектите врз човекот и врз здравјето. Во последно време големо внимание е свртено врз дитерпените на кафето (кафестол и кавеол) кои се присутни во сите подготовки од кафе, особено во домашното кафе. Овие соединенија генино се присутни во зеленото (непеченото) семе од кафе, но голем дел останува непроменет и присутен и во печеното кафе. Должината на печењето и температурата може значајно да влијае на нивната содржина. Кафестол и кавеол (слика 168) покажуваат позитивни ефекти во спречување на ангиогенезата и развојот на малигни тумори, но од друга страна може да го зголемат нивото на холестеролот во циркулацијата и да го зголемат ризикот од развојот на кардиоваскуларни заболувања.



Слика 168. Дитерпени во семето од кафе

Изолиран кавеол покажува антиноцицептивни ефекти (ја намалува периферно лоцираната болка). Врз основа на неколкуте извештаи што постојат во литературата во врска со механизмите вклучени во дејството индуцирано од кавеол, може да се заклучи дека еден од механизмите вклучува активација на CB_1 -канабиноидни рецептори што резултира со намалување на болката. Испитувањата на други можни механизми се во тек, како и проценката на придобивките што кавеолот може да го има врз здравјето, а се испитува и безбедноста од неговата употреба. Различни дитерпени се присутни во некои зачински растенија, особено во оние што доаѓаат од фамилијата *Lamiaceae*: рузмарин, жалфија, оригано, тимјан, чубрика и др. Големо значење има листот од рузмарин што во најголема мера се користи како зачин за месо, додека неговиот екстракт е во употреба во прехранбената индустрија како антиоксидант и конзерванс. Покрај етеричното масло, флавоноидите и другите компоненти, листот од рузмарин содржи посебни дитерпени што имаат

фенолна група, која дополнително им ја зголемува активноста. Најзначајни компоненти се карнозол, карнозолна киселина и розманол (слика 169).



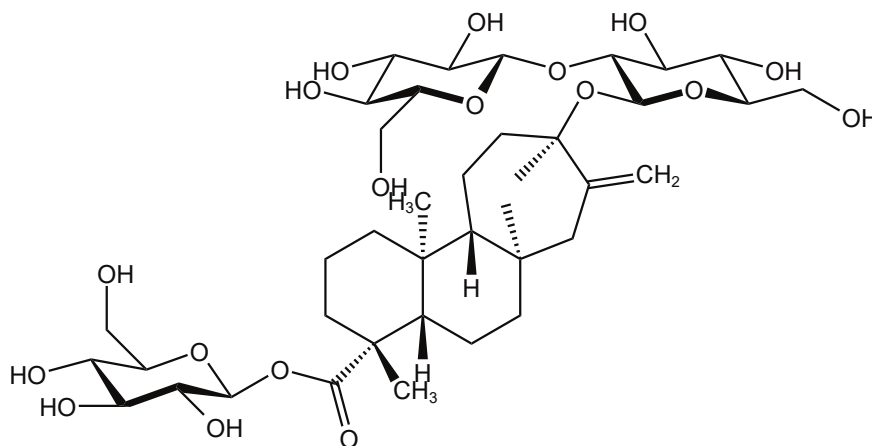
Слика 169. Најзначајни фенолни дитерпени на рузмарин и жалфија

Зголемената употреба на обичниот шеќер во секојдневната исхрана е еден од поважните фактори за развој на метаболички синдром, дијабетес, згоеност, кардиоваскуларни заболувања и др. Денес се промовира употребата на различни видови засладувачи, како природни така и синтетски, кои имаат нула калории и нивна употреба како замена за обичниот шеќер може да даде значајни здравствени придобивки за човекот. Сепак, за некои вештачки (синтетски) засладувачи е утврдено дека имаат определени недостатоци и дека може да бидат опасни по здравјето, како што е тоа случај со сахаринот, со аспартамот и др. Често даваат метален вкус, а претставуваат и потенцијален ризик од појава на рак на мочниот меур, со прекумерна употреба на сахарин, и контраиндирани се кај лица кои страдаат од метаболичко заболување фенилкетонурија, кои поради тоа не треба да користат аспартам. Оттука, станува многу знајно познавањето на слатките и на нискокалоричните природни засладувачи како што се: тауматин, глициризин, ксилитол, филодулцин, могозид и стевиозид. Последниот, стевиозидот, се изолира од листовите на *Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteraceae). Интензивните проучувања на листовите на ова растение, кое со векови се користи како традиционален засладувач за билни чаеви и за други пијалаци, покажаа дека станува збор за дитерпенски гликозиди со *ent*-кауренски скелет, кои се означени како стевиол гликозиди, а комерцијално се познати како стевија засладувач. Денес, овој природен засладувач масовно се користи како замена за обичниот шеќер во производство на пијалаци, на засладувачи во форма на минитаблети, на преработена храна, на гуми за џвакање и на хигиенски производи, особено во Јапонија и низ цела Азија. Стевија засладувач содржи стевиол гликозиди кои се главни состојки на многу комерцијални засладувачи на пазарот што се регистрирани под генеричкото име стивија, или се користат како прекурсори во производство на аналогни синтетски и полусинтетски засладувачи. Стевиол гликозиди (слика 170) опфаќаат дестина дитерпенски состојки од кои се најдоминантни две соединенија: стевиозид и ребаудиозид А.

Стевиозид покажува определени биолошко-фармаколошки својства: антидијабетично, антиинфламаторно, антиканцерогено и антихипертензивно.

Токсичност на дитерпени. Некои растителни видови се екстремно токсични токму поради содржината на дитерпенските соединенија. Во оваа смисла главно се мисли на комплексни смеси од естерски компоненти што се деривати на тиглиан, на дафнан или на ингенан. Досега овие соединенија се регистрирани само во претставници од две фамилии (Euphorbiaceae и Thymelaceae). Семе од кротон, на пр., содржи масло со смеса од 25 токсични форбол-естри. Значајно е што форбол естрите предизвикуваат инфламаторни процеси на кожата и на мукозните мембрани, а

дејствуваат и канцерогено. Еден од најпознатите е тетрадеканоилфорбол ацетат или супстанција што се означува со кратенката ТРА, која се користи во експерименталните истражувања, за индукција на инфламации и кожни тумори кај лабораториските глумци и стаорци.



Слика 170. Стевиол гликозид стевиозид

9.4.3. Екстракција и испитување на дитерпени

Дитерпенските соединенија вклучуваат голем број подгрупи и големата дивергенција во структурите може да влијае врз приносот на екстракцијата и изолацијата на целните соединенија. За изолација на лабдан дитерпените, на пр., потребна е првична екстракција со: хексан, етанол, метанол, бутанол, етил ацетат или дихлорометан, за добивање на сурови екстракти, кои потоа се сепарираат со хроматографски техники (CC на силика гел, HPLC на RP18, препаративна TLC и др.), директно или по фракционирање. Овие постапки можат да доведат до изолирање на чисти соединенија, а разјаснувањето на хемиските структури се прави со употреба на различни спектроскопски техники, вклучувајќи IR, UV, MS, еднодимензионална NMR и дводимензионална NMR и др. техники. Општо земено, може да се примени екстракцијата чекор-по-чекор постапка, која се состои од голем број процеси (на пр., преттретман, одвојување, прочистување и рафинирање) за да се извлечат целните соединенија. Екстракција со помош на ензими, третман со топла вода, екстракција со алкохол, SFE, PLE, WPLE, MAE се дадени како главни техники за екстракција, изолација и прочистување на дитерпените, на пр., на стевиол гликозидите на *Stevia*.

За анализите на дитерпените, хроматографските техники генерално се поврзани со масена спектрометрија и тандемска масена спектрометрија, како моќни и ефикасни техники во анализата на дитерпенските соединенија, како што е LC-MS или LC-MS/MS и UHPLC-MS/MS. Дитерпенските состојки на кафеото, кавеол и кафеостол, може да се анализираат со HPLC-DAD.

9.5. СЕСТЕРПЕНОИДИ

Сестертерпеноидите се мала класа на природни производи кои се присутни во морските животни (како сунѓерите), копнени животни и растенија како инсекти, виши растенија, лишаи и габи. Сунѓерите се еден од главните извори на овие терпеноидни соединенија со 25 C-атоми, со 5 изопренски единици и молекуларна формула $C_{25}H_{40}$.

Скаларанската класа се највообичаените сестертерпеноиди, присутни само во сунѓерите. Првото изолирано соединение од оваа група е скаларин кој е пронајден во морскиот сунѓер *Cacospongia scalaris*.

Распространување. Покрај сунѓерите, дистрибуцијата на оваа класа на терпени, кај копнените растенијата е екстензивна, вклучувајќи дикотиледони, монокотиледони, папрати и лишаи. Кај васкуларните растенија, C 25 терпеноидите се посебна карактеристика на родот *Salvia* (од фамилијата Lamiaceae) со околу 60 претставници изолирани од десет различни видови на *Salvia*.

Сестерпеноидите се најдени и во храна од растително потекло што е особено користена кај човекот и тоа во пченицата (*Triticum aestivum*) и во компирот (*Solanum tuberosum*).

Биосинтеза и хемиска градба. Биосинтетски се создаваат од геранил-фарнезил пирофосфат (GFDP). GFDP-синтазата (GFDPS), ја посредува оваа реакција како дел од семејството на изоприлил-PP синтазите (IDS). Овие ензими досега се претставени во неколку прокариоти. Од друга страна, биосинтезата во растенијата сè уште не е добро позната. Досега има ограничени информации за GFDP како прекурсор во фамилијата Brassicaceae. Се претпоставува дека гените кои ја кодираат биосинтезата на сестертерпеноидите потекнуваат од гени на поголемите и еволутивно постари класи на терпеноиди (дистерпеноиди, C 20) преку процеси на генска неофункционализација (стекнување на нова ензимска функција), дивергенција (акумулација на мутации што водат кон нови специфичности) и генско дуплирање (удвојување на постоечки гени што овозможува еволутивна варијабилност). Покрај тоа, можно е дел од овие гени да се стекнати и преку хоризонтален трансфер на гени од микроорганизми, што би можело да објасни присуството на сестертерпеноидна биосинтеза кај различни таксономски групи кои не се еволутивно блиски. Структурата на сестерпеноидите всушност ги претставува двата главни начини на циклизација на изопреноидите, односно јаглеродниот скелет кој потекнува од киселински катализирани полиенски циклизации што ги сочинуваат повисоките терпеноиди и оние кои се базираат на интрамолекуларна алкилација на терминалниот-PP. Вториот пат води до создавање на средни и големи прстени кои често се подложни на понатамошни реакции на циклизацијата, кои во определени случаи водат и до структури што претставуваат пренилирани аналози на дистерпенскиот прстенест систем. Класифицирани се како ациклични, моноциклични и полициклични (бициклични) сестерпени.

Дејство и употреба. Познати се околу 140 сестерпенски соединенија, но нивните функции се непознати бидејќи само мал број се прочистени и изолирани од природни извори. Се смета дека се биолошки активни соединенија со антиинфламаторни, антиканцерогени, антимикробни и антифунгални активности.

9.5.1. Екстракција и испитување на сестерпени

Природните извори на сестерпени, како растенија или сунѓери, содржат голем број на компоненти кои се изолираат со различни методи на екстракција и сепарација. Мацерацијата е најчесто користениот метод за екстрахирање на овие соединенија. Дополнително и Сокслет екстракцијата била

користена за екстрахирање на сестерпени (за листови од *Caesalpinia crista* со метанол), кои потоа биле преземени со дихлорометан. Фракционирањето со LLE редовно се користи за да се добијат фракции богати со терпени, а дихлорометанските или етил ацетатните фракции водат до изолација на сестерпени. Многу од сестерпените се изолирани и прочистени со користење на СС. Иако сестерпените, како и другите класи на терпенски соединенија, имаат опсег на поларитети во зависност од нивните структури, сепак нормално фазната HPLC е најчесто користен метод за нивно изолирање од сунѓерите и од растенијата. Дополнително, флеш хроматографијата како и реверзно-фазната HPLC се користени техники за изолација и прочистување на сестерпените. Структурната елуидација е интригирачка заради сложениот јаглероден скелет, но NMR, а особено димензионалните NMR-методи се од избор кај оваа класа на соединенија.

9.6. ТРИТЕРПЕНИ И СТЕРОИДИ

Тритерпените (C_{30}) и стероидите (C_{27}) се соединенија што настануваат со циклизација на јаглеводородот скавален или кислородниот дериват епокси-дихидросквален. Досега се познати околу 4000 тритерпенски соединенија, со околу 40 различни структури на јадрото. Генерално, во најголем број случаи имаат ОН-група на C_3 и тетра или пентацикличен скелет. Се јавуваат како слободни липофилни соединенија, како сапогенини или како составни компоненти на смоли. Стероидите покажуваат поголема структурна хомогеност, а се јавуваат како фитостероли, сапогенини, стероидни алкалоиди или агликони на кардиотонични хетерозиди.

Биосинтеза (општи принципи за двете групи соединенија)

Двете групи, тритерпени и стероиди, во основа хемиски не се разликуваат, бидејќи стероидите можат да се разгледуваат како трициклични тритерпени што во биосинтезата изгубиле 3 C-атома. Поделбата на двете групи, тритерпени и стероиди, е направена врз база на разликите во нивната понатамошна биосинтеза. Компонентата **циклоартанол** (C_{30}) која може да се разгледува како 4,4-диметилстерол, претставува прекурсор во биосинтезата на стреоидите, додека **дамаран** (со C_{30} атоми) е тетрацикличен тритерпен и претставува прекурсор во биосинтезата на другите тритерпени.

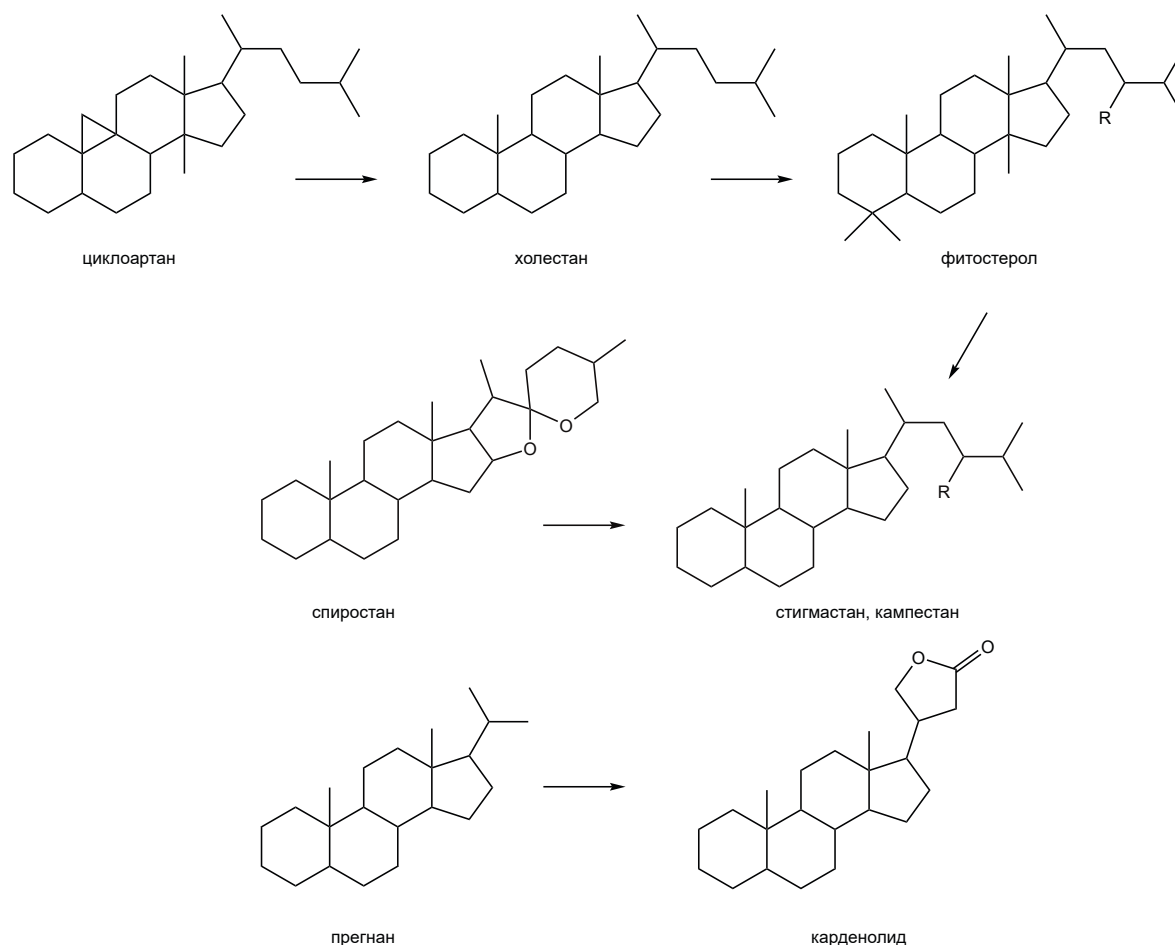
Во сите организми способни за фотосинтеза, стероидите (стеролите) настануваат со постепена деметилација на циклоартанол и отворање на циклопропанскиот прстен. Истовремено, овие организми се способни да го циклизираат епокси-скваленот во конформација која директно води до создавање на тетрациклични или до пентациклични тритерпени (сапогенини). Биосинтетската ориентација во правецот на стероидите или во правецот на тритерпените зависи од иницијалната конформација на епокси-скваленот. Иницијалната циклизација на ова соединение настанува со отворање на епоксидниот прстен со што се стимулира циклизирање. Хидроксилната група на C_3 потекнува токму од О-атом од епоксидниот мост, на кој се врзува протон од соседниот C-атом. Во случаи кога скваленот има столица-каде-столица конформација се создаваат циклоартани и кукурбитани. Ако конформацијата е столица-столица-столица, тогаш се создава дамаран, а од него понатаму тетрациклични и пентациклични тритерпени (слика 171).

Во одредени случаи се создаваат некои атипични структури, како што се тритерпени што немаат ОН-група на C_3 (ако се синтетизираат директно од сквален), соединенија со C_{31} атом (*Iris* алдехиди) и др. слични структури.

Формирање на стероидни соединенија. Растителните стероиди се создаваат од циклоартанол како прекурсор на стероидни соединенија. Во животинските организми оваа уло-

га ја има ланостеролот. Конверзијата на циклоартанолот (C_{30}) во стероидно јадро (C_{27}) оди преку деметилација во две позиции: C_4 и C_{14} , при што се случува постепена оксидација во насока $CH_3 \rightarrow CH_2OH \rightarrow CHO \rightarrow COOH$, а со декарбоксилација се отстранува еден C-атомот.

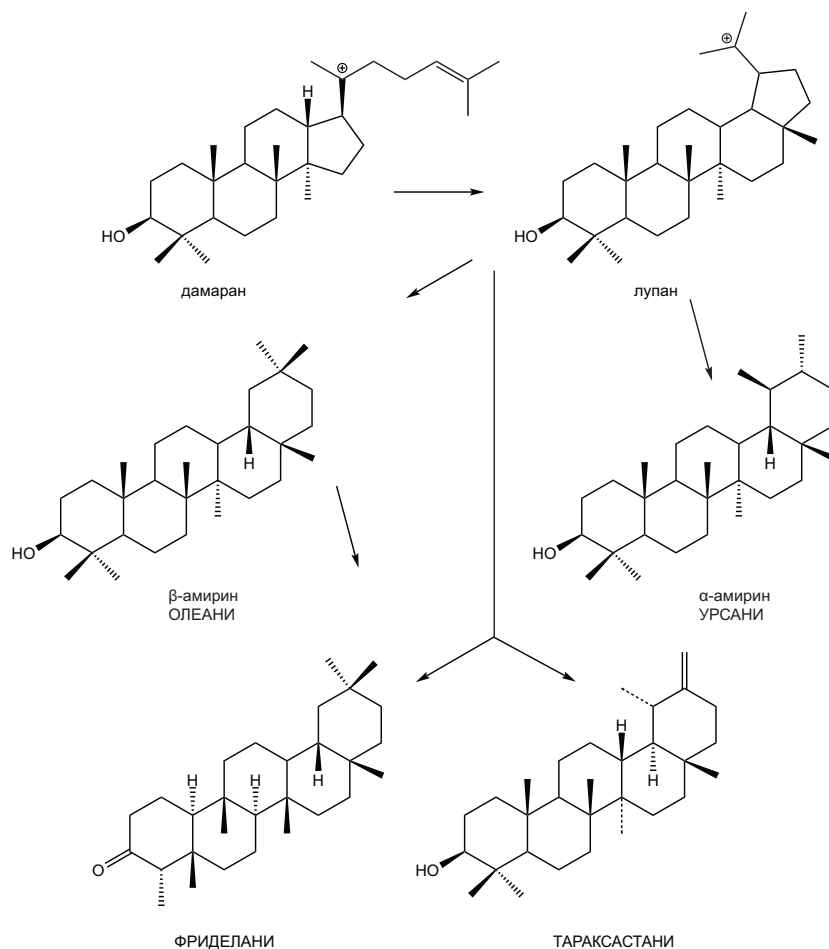
Страничниот ланец може да претрпи различни промени: циклизација (спирокетали и алкамини), скратување на ланецот (прегнани) или воведување на функционална група (карденолиди). Можно е и воведување на метил или на етил група на C_{24} , со што настануваат C_{28} и C_{29} фитостероли, што се најдени во некои алги и габи како и во некои морски организми (слика 172).



Слика 172. Формирање на стероидни соединенија

Формирање на тритерпенски соединенија. Како што е веќе напред спомнато, тритерпените настануваат од дамаранот, при што секундарните модификации во основната структура се сведуваат на хидроксилација, дехидрогенација, функционализација на аугуларните CH_3 -групи и лактонизација. Исклучок од ова правило се случува во претставници од некои фамилии, каде што иницијалниот тетрацикличен скелет претрпува посериозни промени: отворање на прстенот, оксидација, елиминација на страничниот ланец и др.

Биосинтезата на посебни класи тритерпенски соединенија започнува од дамаранскиот карбо-катјон, од кој се создаваат лупани, а од нив останати класи тритерпени: олеани, фриделани, тараксастани и урсани (слика 173).



Слика 173. Формирање различни класи на тритерпени

9.6.1. Сапоници

Сапонините се растителни хетерозиди што разматени во вода даваат стабилна пена, го намалуваат површинскиот напон на течностите и емулгираат масла во вода. Најголем број сапоници покажуваат хемолитична активност. Токсични се за животните со ладна крв, особено за рибите. Со хидролиза даваат агликон што се нарекува сапогенини (сапогеноли) и гликон, шеќерен дел, кој може да биде моносахарид или сложена структура од повеќе шеќери и/или од уронски киселини.

Сапонините се кристални или аморфни супстанции, растворливи во метанол и во разблажен етанол. Некои се растворливи во вода, а некои стануваат растворливи по алкализирање. Не се раствораат во етер, во хлороформ, во ацетон и во други органски растворувачи. Водените раствори на сапоници се колоидни.

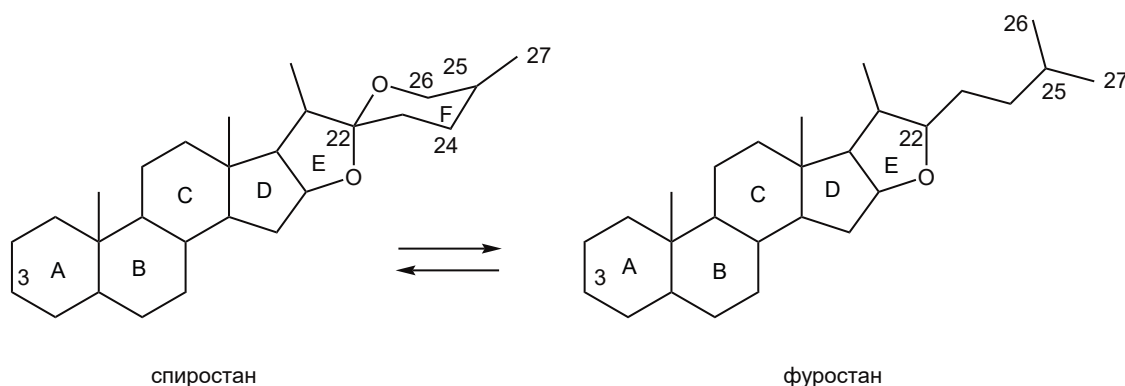
Во зависност од структурата на агликоните, сапонините се делат во две основни групи:

1. Стероидни и
2. Тритерпенски.

9.6.1.1. Стероидни сапонини

Стероидните сапонини се среќаваат главно во претставниците од монокотиледоните растенија во фамилиите на лукот, диоскореата, агавата и др. Во дикотиледоните, се среќаваат во мешункастите растенија (најпознати се оние во растението со име грчко семе (*Trigonella foenum-graceum*)), и во други растенија меѓу кои се значајни сапонините на растението бабин заб (*Tribulus terrestris*). Локализирани се најмногу во семките, во корените и во луковците, многу послабо во листовите и во другите делови.

Структура на агликони. Стероидните сапогенини спаѓаат во групата C_{27} -соединенија. Во структурата вклучуваат 6 прстени означени со A, B, C, D, E и F. Прстенот E е фурански, а прстенот F е пирански. Поради спиро карактерот на C_{22} -атомот, структури што го содржат пиранскиот прстен се нарекуваат **спиростани** (слика 174).



Слика 174. Основни структури на стероидни сапогенини

Во растенијата ОН-групата на C_{26} најчесто гликозидно се поврзува со шеќер, поради што пиранскиот прстен останува отворен, а пентацикличната структура што егзистира само во форма на хетерозиди се нарекува фуростан. Со хидролиза на фуростани спонтано настанува циклизација и нивно преоѓање во спиростани.

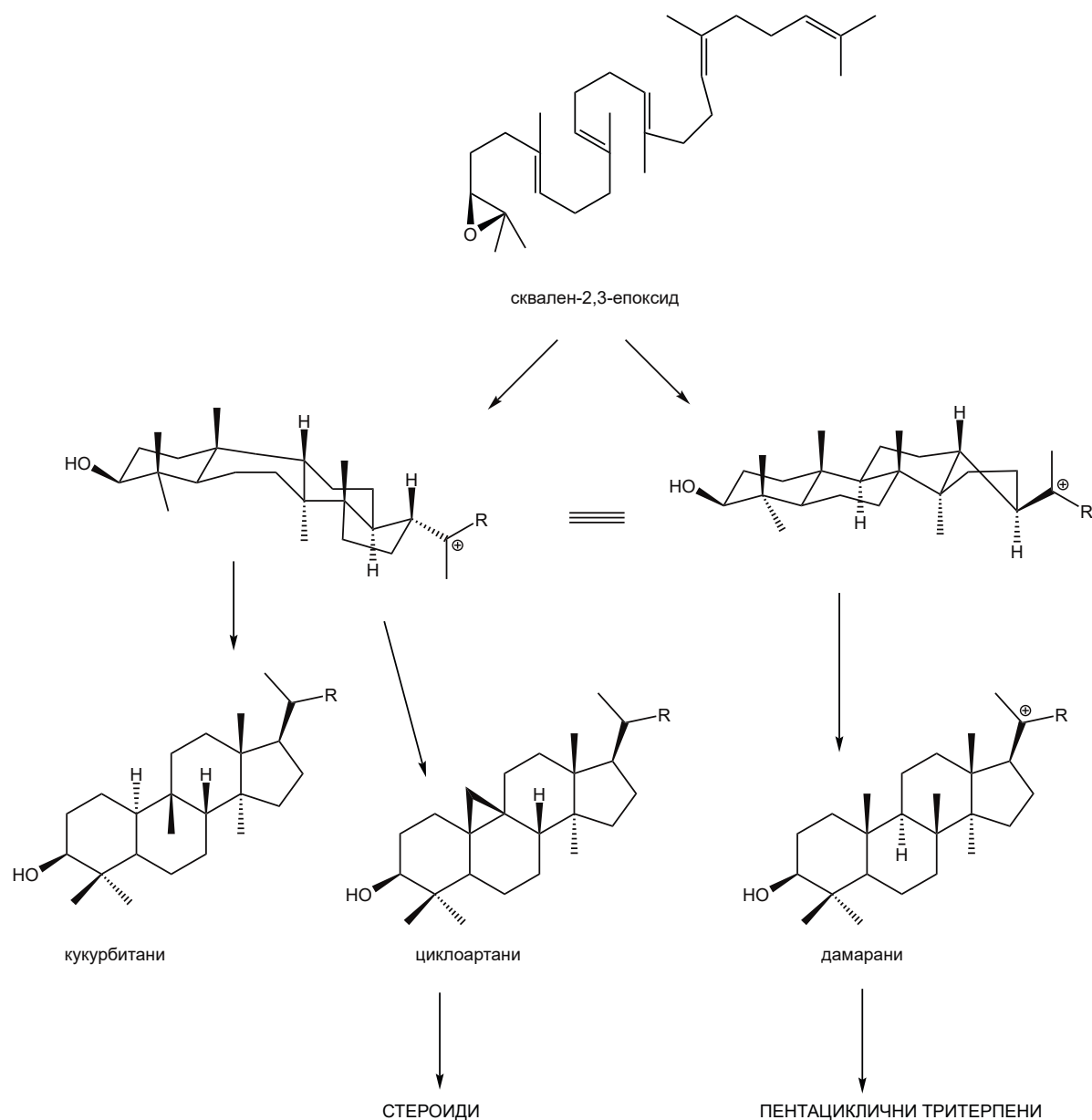
Оттука, стероидните агликони се поделени во две групи:

- деривати на фуростанол и
- деривати на спиростанол.

Спиростанолните сапогенини претставуваат голема и разнообразна група сапонински агликони. Се карактеризираат со следните особини:

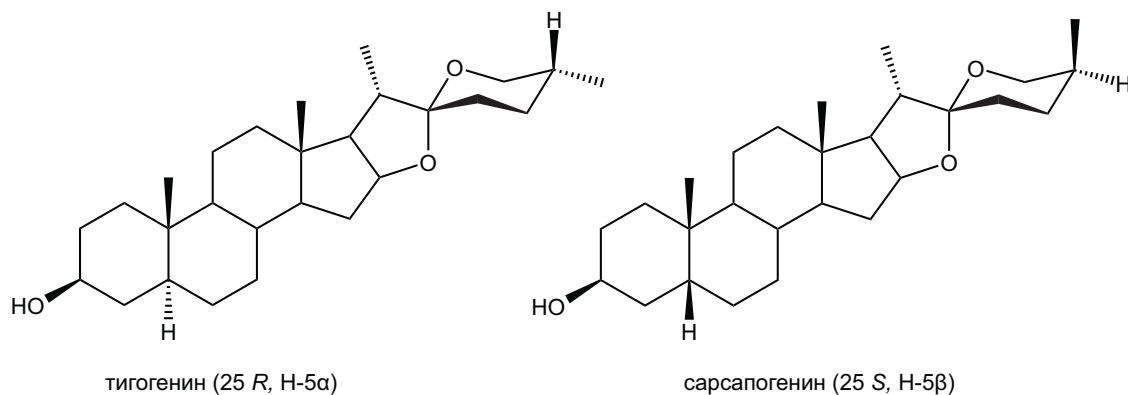
- се среќаваат во две серии изомери, во зависност од конфигурацијата на метилната група на C_{25} : $25R$ или изосапогенини со екваторијална метил група (α -конфигурација) и $25S$ или неосапогенини, со аксијална метил група (β -конфигурација). Поголема стабилност покажуваат изосапогенините.
- прстените B/C и C/D се во *trans* конфигурација,
- конфигурацијата на C_{20} е α , а на C_{22} секогаш β , кога се во прашање природните сапогенини,

- задолжително е присуството на ОН-групата на C_3 , а можат да се јават дополнителни ОН-групи на положбите 1, 2, 5 и 6, поретко на положбите 17 и 24, а кај некои претставници и на положбата 1,
- двојната врска се јавува во положбата C_5 , а може да биде присутна и на C_9 и на C_{25} . Ако двојната врска на C_5 се засити и ако производот има 5α -H атом, прстените А и В ќе бидат во *trans* положба (на пример: дигитогенин), и обратно, во случај на 5β -H конфигурација прстените А и В ќе бидат во *cis* положба (на пример: смилагенин).
- при дехидрогенирањето на стероидните сапонини со селен, Diels-ва деградација, како производ се добива карактеристичен јагледород метилциклопентаноперхидрофенантрен.



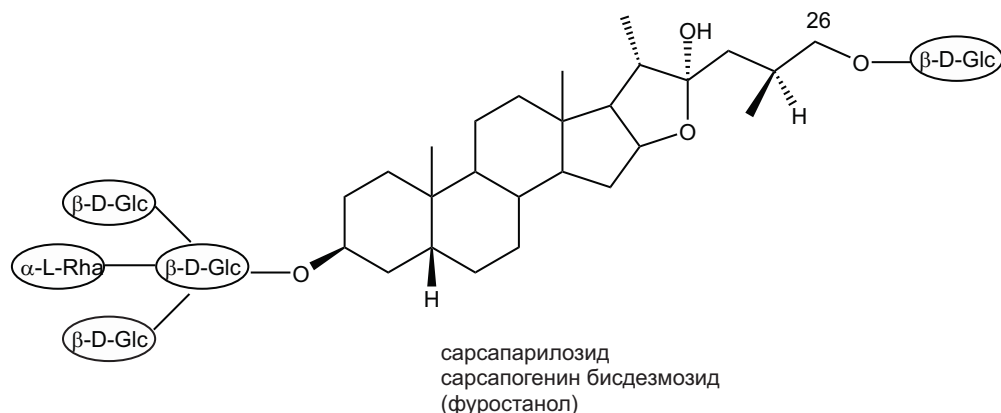
Слика 171. Биосинтеза на прекурсорите на класите: стероиди и тритерпеноиди

Претставници на спиростанските сапонини се дадени на слика 175.



Слика 175. Структури на некои спиростански сапогенини

Структура на хетерозиди. Кај стероидните сапонини шеќерот се врзува за ОН-групата на C_3 , а сапонините кај што шеќерот се врзува само за една позиција се означени како монодезмозиди. Во случај кога има два шеќерни остатоци врзани за две места во структурата, се нарекуваат бисдезмозиди. Бисдезмозидите се јавуваат почесто кај фураностанолните сапонини кај што освен задолжителното врзување на C_{26} , шеќерот се врзува и за ОН-групата на C_3 (сарсапарилозид) (слика 176).



Слика 176. Структура на фураностанол бисдезмозид

Дејство и употреба. Стероидните сапонини поседуваат богат биолошко-фармаколошки профил. Експериментално се потврдени следниве дејства:

- антибактериско, поради што некои автори ги нарекуваат антибиотици на вишите растенија,
- антивирусно, главно на вирусите на грипот и на херпесот.
- фунгицидно,
- хипохолестеринемично, го нормализираат нивото на холестеролот во крвта,
- антиинфламаторно, главно на воспалителните процеси на венските крвни садови,
- цитостатско, одложуваат развојот на туморни клетки. Ефектот расте со зголемување на бројот на шеќерните молекули во низата,

— а се смета дека поседуваат и афродизијачко дејство.

Фуруостанолните сапонини не реагираат со холестерол и хемолитички се неактивни. Немаат антибактериска активност, за разлика од спироостанолните сапонини кои имаат изразен антибактериски ефект.

Стероидните сапонини влегуваат во состав на препарати за профилакса и лекување на артериосклероза (сапонини од диоскореа), флебитис (сапонини од шимширика), импотенција (сапонини од бабин заб) и др. Најголемо значење и употреба имаат како појдовни супстанции во полусинтетското производство на полови хормони, кортикостероиди, контрацептивни средства и др. стероидни лекови. Најмногу користен сапогенин во оваа смисла е диосгенинот, изолиран од диоскореја.

Екстракти од растителни сировини што содржат стероидни сапонини се користат во голема мера за производство на додатоци на исхраната. Денес најексплоатираниот екстракт во оваа смисла е трибестен, екстракт од бабин заб (*Tribulus terrestris*), а додатоци на исхраната кои го содржат се препорачуваат за одржување на здравјето и подобрување на функцијата на машкиот репродуктивен систем.

Екстракција и испитување. Екстракцијата и изолацијата на сапонините претставува предизвик за истражувачите поради структурната разновидност што произлегува од различни супституенти, во агликонскиот дел, како и од бројот, распоредот и ориентацијата на шеќерните единици. Во принцип, сапонините имаат висок поларитет, хемиски и термички се лабилни, неиспарливи се и обично се наоѓаат во ниски концентрации во растенијата. Екстракцијата на сапонини, може да се прави со примена на конвенционални методи (мацерација, Сокслет и рефлукс екстракција) како и со зелени екстрактивни техники (USE, MAE, ASE), при што USE како техника дава најголем принос и најчесто се користи кај студиите за квантификација. За идентификација на стероидните сапонини се користат нивни заеднички особини, како што се формирање на пена, хемолиза и карактеристично обојување по додавање на некои реагенси. Врз база на карактеристичната боја која сапонините и сапогенините ја даваат со концентрирана сулфурна киселина, ванил-сулфурна киселина, антимон (III) хлорид, *p*-диметиламинобензалдехид и други реагенси, разработени се хроматографски методи за квалитативни анализи и низа спектрофотометриски, дензитометриски и други методи за квантитативно определување.

Стероидните сапонини и сапогенини можат да се идентификуваат и со карактеристичните реакции за докажување стероли. Со реагенс по Ерлих (етанолен раствор на *p*-диметиламино-бензалдехид) реагираат само фуруостанолни сапонини и на тој начин можат да се идентификуваат и во присуство на спироостанолните сапонини. HPLC и UPLC како хроматографски методи се најчесто користени техники за идентификација и квантификација на специфични сапонински компоненти. Меѓутоа, отсуството на хромофори кај повеќето сапонини го попречува нивното откривање под UV и дозволува само неспецифична детекција на 200-210 nm бранова должина, регион каде може да се апсорбираат и други компоненти покрај сапонините со што се отежнува нивното определување. Со примена на испарувачки детектор со принцип на расејување на светлината (ELSD) проблемот е надминат што овозможува детекција при што се мери расеаната светлина генерирана од неиспарливите честички на аналитите произведени при небулизирање во капки од елуентот.

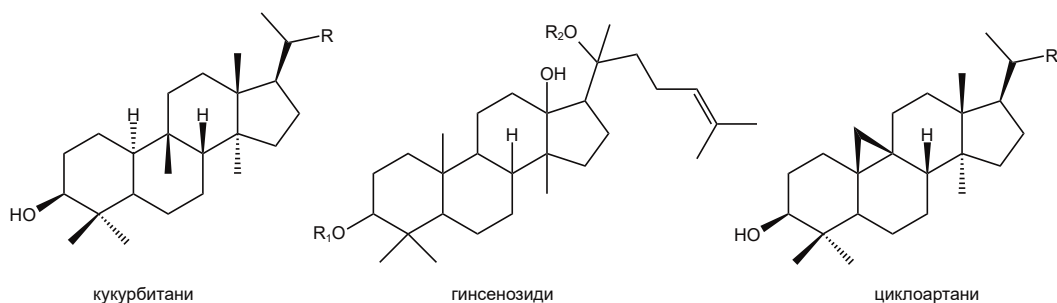
9.6.1.2. Тритерпјенски сапонини

Тритерпенските сапонини се побројни и повеќе распространети во природата во споредба со стероидните сапонини. Локализирани се главно во подземните органи, а поретко во други делови од растението.

Хемиска градба на агликон. Тритерпенските сапогенини имаат C_{30} -јаглеводореден скелет. Претставуваат голема и разнообразна група компоненти, со трициклична, тетрациклична и пентациклична структура. Од поголемо значење се тетрацикличните и пентацикличните тритерпенски сапогенини.

Тетрацикличните сапогенини опфаќаат различни структури од коишто се најзначајни дериватите на дамаран. Хемиски, дамаранските сапогенини се многу слични со стероидните, но се различно супституирани. Во оваа група спаѓаат сапонините на женшен (*Panax ginseng*) што се нарекуваат гинсенозиди (слика 174). Со сродна структура се сапонините кукурбитани коишто се јавуваат во претставниците од семејството на тиква (*Cucurbitaceae*) од каде е извлечено и името (слика 174). Гинсенозидите и екстрактите од женшенот се користат за производство на хербални лекови и додатоци на исхраната.

Интересни за разгледување се сапонинските хетерозиди на циклоартан (слика 177), изграден од основен стероиден скелет, бочен ланец на C_{17} и еден циклопропански прстен образуван со поврзување помеѓу C_9 и C_{19} . Денес се познати повеќе од 160 циклоартански сапонини во различни претставници од неколку фамилии. Поголемо значење имаат циклоартански сапонини изолирани од *Astragalus* видови што поседуваат хипохолестеринемично, хипотензивно, кардиотонично и диуретично дејство. Денес на пазарот се застапени додатоци на исхраната што содржат екстракт од астрагалус.



Слика 177. Тетрациклични тритерпенски сапогенини

Пентацикличните сапогенини имаат основен скелет составен од пет прстена во чија градба влегуваат 22 C-атоми (или 21 кај лупанов вид) и 8-9 C-атоми распоредени во вид на CH_3 -групи. Структурни елементи карактеристични за овие соединенија се следните:

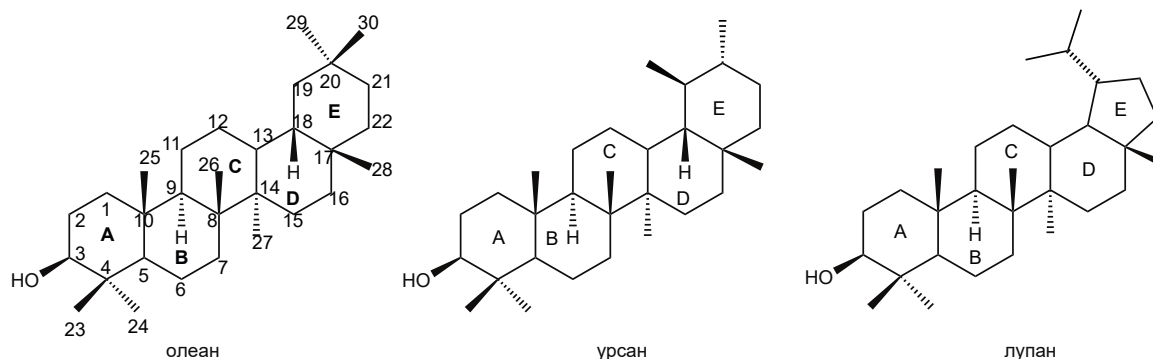
- двојна врска на C_{12} (во голем број случаи),
- оксидација на C_{23} и C_{28} , често и на C_{30} (појава на хидроксиметилна, алдехидна или карбоксилна група),

- можна оксидација во голем број други позиции во прстенот, на: 2, 7, 11, 15, 16, 21 или 22. Создавањето на кето групи во која било од овие позиции особено на C₁₁ или функционализација на која било од позициите може да доведе до интрамолекуларна естерификација или лактонизација и формирање дополнителни прстени.
- кај некои агликони е присутна парцијална естерификација, најчесто со нискомолекуларни алифатични киселини. Типичен пример е есцин, изолиран од семето на дивниот костен.

Пентацикличните тритерпенски сапонини се делат во три групи:

- деривати на олеан (β-амирин),
- деривати на урсан (α-амирин),
- деривати на лупан.

Олеанската група се карактеризира со присуство на две метилни групи на C₂₀ (слика 178). Во оваа група спаѓаат најзначајните тритерпенски сапонини што се користат во терапевтски цели. Најчесто се деривати на β-амирин. Урсанскиот тип сапонини (најчесто производи на α-амирин) се карактеризира со две метил групи на позициите C₂₀ и C₁₉ (слика 178). Ретко се застапени во растенијата. Сапонини деривати на лупан се карактеризираат со 5-член прстен E. Производи на лупан се лупеол и бетулинол коишто се наоѓаат во листовите од растението бреза (слика 178).



Слика 178. Пентациклични тритерпенски сапонини

Хетерозидни форми. Шеќерната компонента (гликон) може да биде врзана на неколку места и во зависност од тоа разликуваме: монодезмозиди, бисдезмозиди и тридезмозиди. Во природата се најраспространети бисдезмозиди од олеански тип. Шеќерниот дел се врзува за ОН-групите на позициите C-3, C-22, C-28 или C-29. Може да биде изграден од 1 до 10 моносахаридни остатоци. Во некои сапонини е разгранет.

Тритерпенските сапонини се аморфни супстанции, поретко кристални, со неутрален или со кисел карактер, слабо растворливи во вода, а растворливоста им расте со зголемување на бројот на моносахаридните единици. Со металите градат соли, со белковини, липиди, стероли и танини градат нерастворливи комплекси. Нивна општа карактеристика е да хемолизираат крв, да го намалуваат површинскиот напон на течностите и разматени во вода да пенат.

Дејство и употреба. Биолошко-фармаколошка активност покажуваат монодезмозидни тритерпенски сапонини, додека бисдезмозидите се неактивни или активноста им е многу ниска. Ос-

новното дејство на тритерпенските сапонини е експекторантно, а се смета дека механизмот на дејството се должи на дразбата врз желудечната слузница која по рефлексен пат ги надразнува бронхиите и ја зголемува секрецијата на бронхијалните жлезди, овозможувајќи одвојување на слузта од бронхијалната лигавица. Овој ефект е поврзан со дозата што се внесува, што треба биде приспособена да овозможи поголемо ослободување и разводнување на бронхијалниот секрет и негово полесно исфрлање (искашлување). Поголемите дози дејствуваат еметично. Медицински растенија што се користат за производство на хербални лекови за искашлување (најчесто сирупи) се јаглика, сенега, бршлен, сладок корен и др. Некои растенија со тритерпенски сапонини дејствуваат диуретично (ситница или попатница), а некои се користат како антиинфламаторни и антиедематозни средства при оштетувања на слузниците или при нарушувања во венската циркулација (див костени др.). Некои тритерпенски сапонини се користат во терапија на гастритис и пептичен улкус. Во оваа смисла особено е значаен глициризин, тритерпенски сапонин од олеански тип кој се изолира од слаткиот корен (*Glycyrrhiza glabra*). Екстракти кои содржат глицирозин се користат за производство на додатоци на исхраната наменети за одржување на здравје на дигестивниот тракт и како помошна терапија при гастритис и пептичен улкус. И другите медицински растенија наведени погоре се искористуваат за производство на додатоци на исхраната кои се препорачуваат како помош при настинки, бронхит и кашлица (јаглика, бршлен) и за одржување на здравјето на респираторниот тракт.

Тритерпенските сапонини дејствуваат иритативно врз желудечно-цревната слузница и го зголемуваат лачењето на соковите, а со тоа ја подобруваат ресорпцијата на хранливите состојки. Експериментално е утврдено дека подобруваат и ресорпција на некои лекови (во некои случаи и до 50 пати).

Тритерпенските сапонини како површински активни материи, наоѓаат голема примена во комерцијални цели, во прехранбената индустрија како емулгатори, во производство на детергенти, во металургијата како средство за флотација на руди, во производство на средства за гасење пожари и слично. Овие сапонини се користат и за перење ткаенини по боење.

Екстракција и испитување на тритерпенски сапонини

Фармакопејските прописи за дроги што содржат тритерпенски сапонини пропишуваат определување на два параметра преку кои се врши процена за активноста на дрогата:

- индекс на пена (IP) – претставува степен на разредување на воден екстракт добиен од 1 g дрога, кој при одредени услови дава трајна пена од 1 cm. Определувањето на овој индекс денес многу ретко се користи.
- хемолитичен индекс (HI) – покажува најголемо разредување на воден екстракт од 1 g дрога кое хемолитизира одредено количество еритроцити. Денес универзално се користи за испитување сапонински дроги.

Сапонините се амфифилни по природа, поради хидрофилните делови од шеќерот и липофилниот тритерпеноид агликон. Поради оваа причина, екстракцијата и квалитативната и квантитативната анализа на сапонини може да биде предизвик од сложени примероци матрици како што се растенијата и мора да се оптимизираат пред да се продолжи квалитативна и квантитативна анализа. Ова често вклучува избор на соодветен состав на растворувачи во зависност од физичко-хемиските својства на истражуваните сапонини. Тритерпеноидните сапонини се состојат од тритерпен агликон со една или со повеќе шеќерни делови прикачени на него. Сепак, поради сличните физичко-хемиски својства, изолацијата и идентификацијата на тритерпенските сапонини остануваат предизвик.

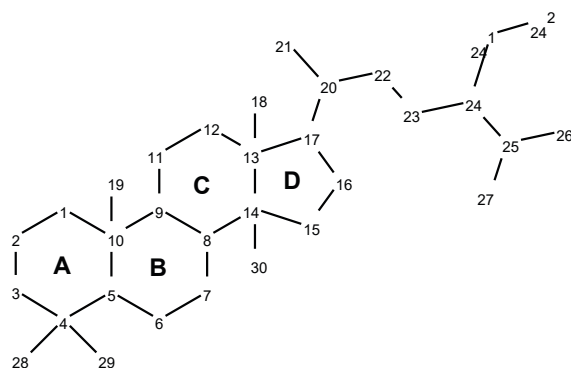
За квалитативно и квантитативно испитување на тритерпенските сапонини се користат боени реакции со концентрирана сулфурна киселина и антимон (III) хлорид. Врз база на овие реакции се поставени спектрофотометриски и хроматографски методи за определување на нивната содржина во дроги или во екстракти. Иако TLC и спектрофотометријата (дензитометрија) се со помала сензитивност, резолуција и специфичност, тие сè уште се широко користени поради нивниот висок пропусен капацитет, едноставност и брзина за изведба. Развојот на HPLC и MS, особено комбинацијата на HPLC во спрега со MS, го олесни сеопфатното испитување на тритерпенските сапонини во матрицата, со што се овозможува идентификување и истовремено определување како на компоненти во трагови, но и на оние присутни во поголема концентрација.

Екстракција и изолација на сапонини од растителен материјал е сложен процес, отежнат поради нестабилноста на хетерозидните форми. Вообичаено се користат растворувачи како што се метанол, етанол и *n*-бутанол за да се добие екстракт од тритерпенски сапонини. Тритерпенските сапонини кои се богати со хидроксилни групи, вода, *n*-бутанол и мешавина од вода со алкохол како на пр. 50 %, 70 % и 80 %, покажале добра екстрактивна ефикасност. Сепак, за некои тритерпенски киселини и естри, хлороформ и дихлорометан даваат поголем екстрактивен принос на целните компоненти. Екстракцијата со топлина како и USE се типични најчесто користени методи за екстракција на овие соединенија. Топлата екстракција вклучува апаратура како Сокслет екстрактор или рефлукс екстракција на 50-80 °C.

Раздвојувањето на компонентите од сапонинскиот комплекс главно се прави со препаративни хроматографски техники. Определувањето на структурата на сапонините е доста сложено и се изведува со масена и со NMR-спектроскопија.

9.6.2. Растителни стероли (фитостероли и нивни естри)

Фитостеролите опфаќаат растителни стероли и станоли, соединенија структурно слични со холестеролот кој се наоѓа во животински организми. Станолите се заситени стероли коишто не содржат двојни врски во структурата на стеролскиот прстен. Досега се идентификувани околу 200 стероли и слични структури. Слободни стероли (фитостероли) се наоѓаат во растителните масла, во кои лесно се раствораат. Растворливи се и во алкохол и во неополарни растворувачи заради изразени липофилни својства. На слика 179 прикажана е структурата на стероидното јадро кај фитостеролите со ознаките на сите позиции, според усвоената номенклатура.



Слика 179. Номенклатура на стероидното јадро

Промените во определените позиции во основната структура овозможува биосинтеза на поединечни фитостеролски соединенија:

- Отстранување на јаглородот на позиција 24^2 води кон создавање на кампестерол,
- Отстранување на јаглородите на 24^1 и 24^2 води кон создавање на холестерол,
- Отстранување на водород од C_{22} и C_{23} води кон создавање на стигмастерол,
- Хидрогенирање на двојната врска помеѓу C_5 и C_6 води кон создавање на β -ситостанол,
- Хидрогенирање на двојната врска помеѓу C_5 и C_6 и отстранување на јаглородот на позиција 24^2 води кон создавање на кампестанол,
- Отстранување на јаглородот на позиција 24^2 и водород од C_{22} и C_{23} и инвертирање на стереохемијата на C_{24} води кон создавање на брасикастерол итн.

Диететски фитостероли. Најголем извор на растителни стероли (диететски фитостероли) се растителните масла и производите што се добиваат од нив. Стеролиите може да бидат присутни како слободни стероли, како естри со масни киселини или како гликолипиди. Во текот на производството на растителните масла можно е во процесот на рафинирањето (пречистувањето) дел од стеролиите да се отстрани, но релативниот однос меѓу нив се задржува што е значајно за утврдување на автентичноста на растителните масла (секое масло има точно утврден состав на стероли во точно определен сооднос). Со хидрогенирање на растителните масла се добива маргаринот кој широко се користи во исхраната, а притоа претставува богат извор на фитостероли. Од други хранливи производи значајни се житариците, зеленчукот, овошјето и различните бобинки, со кои се внесуваат значителни количества од фитостеролиите. Дневниот внес на фитостероли се движи од 200 до 300 mg/ден зависно од прехранбените навики на поединецот. Најраспространети фитостероли во природата се β -ситостерол, кампестерол и стигмастерол, кои претставуваат 65 %, 30 % и 3 % од внесот на стеролиите преку храната, соодветно. Најзначајни фитостаноли во исхраната се ситостанол и кампестанол, кои заедно чинат 5 % од диететските фитостероли.

Европската агенција за безбедност на храна (EFSA) препорачува дневен внес на диететските фитостероли од 1,5 до 2,5 g (растителни стероли и станолите дневно). Испитувањата покажуваат дека внесени во оваа количина имаат способност да го намалат нивото на плазматскиот холестерол за 7 - 10,5 %. Ефектот се постигнува по 2 - 3 недели. Доколку ваков внес на фитостероли продолжи во период до 85 недели ефектот сè уште може да се одржува, поради што EFSA преку својот научен панел ја промовира следнава препорака: „растителните стероли го редуцираат нивото на плазматскиот холестерол. Намалувањето на нивото на плазматскиот холестерол може да го намали ризикот од коронарната срцева болест“. Американската администрација за храна и лекови (FDA) ги одобрува следниве здравствени тврдења за фитостеролиите:

- за растителните стероли (фитостероли): храна што содржи 0,65 g растителни стероли, земена два пати на ден преку оброци со кои се обезбедува вкупен внес од најмалку 1,3 g, при што храната треба да биде сиромашна со заситени масти и холестерол, може да редуцира ризик од срцеви заболувања.
- за растителните станолите (фитостаноли): храна што содржи најмалку 1,7 g станолите по оброк, земен два пати на ден со што се внесува најмалку 3,4 g станолите, со храна сиромашна со заситени масти и холестерол, може да редуцира ризик од срцеви заболувања.

Поради способноста да го редуцираат нивото на плазматскиот холестерол, некои производители на храна додаваат фитостероли и фитостаноли во храната. Фитостеролиите се познати како безбедни природни компоненти, заведени во категоријата „generally recognized as safe“ (GRAS). Се користат многу одамна, а во ЕУ официјално се адитиви од 2000 год. Досега нема објавени податоци за несакани ефекти поради нивниот внес.

Екстракција и испитување на фитостеролиите. Во храната, фитостеролиите може да се најдат како слободни стероли или како четири типа на конјугати во кои 3β -хидроксилната група е: есте-

рифицирана со (i) масна киселина, (ii) хидроксидинамична киселина (главно ферулична или р-кумарна киселина), (iii) гликолизирана со хексоза (обично гликоза) или гликолизирана со 6-масна ацил хексоза. Најчесто користените методи за екстракција на липиди се применуваат и за фитостеролите со што подготовката на примерокот вклучува остранување на загадувачите и концентрирање на анализите. Неполарните растворувачи како што е хексан (што најчесто се користи за да ги екстрахира најразличните видови на растителни масла) или петролетер може квантитативно да ги извлечат слободните фитостероли и фитостерил масните киселини во вид на естри. Исто може да се користи и комбинација на растворувачи со различна поларност пр. хлороформ-метанол. Техники како SFC, MAE или SPE се користат за подобра екстракција. Следува сапонификација со КОН на собна температура или со загревање. Како и директна сапонификација со или без кисела хидролиза со HCl за раскинување на гликозидните врски и ослободување на естификуваните фитостероли. Потоа следува екстракција на неосапунети материи, со одделителна инка со органски растворувач како диетил етер, петрол етер или хептан, или SPE со етер. За да се острнат интерференциите се применуваат техники на прочистување како TLC, SPE, SPME.

Слободните фитостероли, фитостерил масните киселини во вид на естри и фитостерил естрите од пченка биле екстрахирани за споредба со четири различни растворувачи (хексан, метилен хлорид, етанол и изопропанол) при што приносот со секој растворувач бил $> 90\%$. Стерилните гликозиди и масните ацилирани стерил гликозиди само делумно може да се извлечат со хексан, а со зголемување на поларноста на растворувачот се подобрила нивната екстракција. Најпозната и најприменувана постапка е Bligh и Dyer хлороформ : метанолната екстракција за сите класи на стероли.

PLE-екстракцијата овозможува висока ефикасност со искористување на мал волумен на растворувач (15 до 40 mL) за кусо екстрактивно време (15-20 минути). SFE со CO₂ се применувала за изолирање на фитостероли од пченка во три чекори, при што фракции биле собирани по секој чекор и анализирани со HPLC.

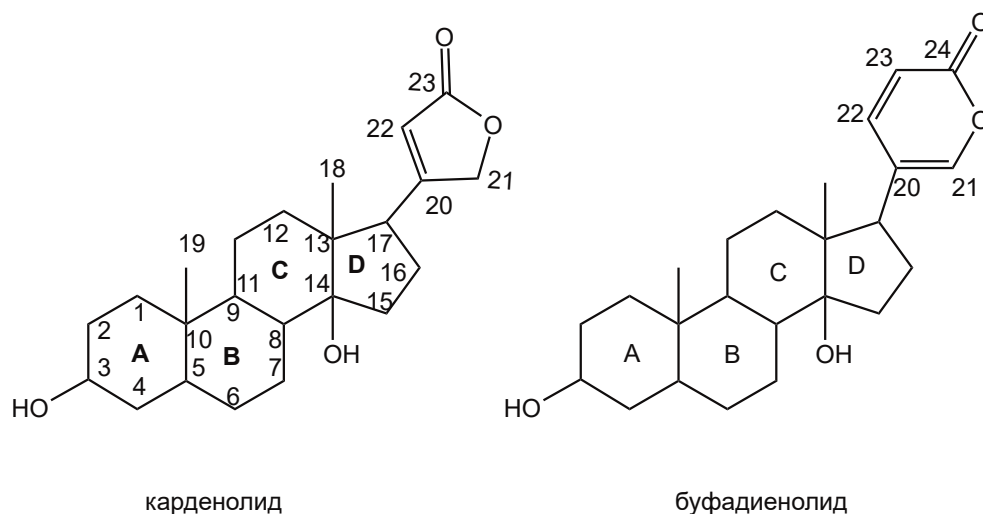
За испитување на фитостеролите долго време техника од избор била GC, но се користат и други техники како LC или TLC, соодветно адаптирани за определување на фитостероли во храна. Од поново време се користи и NMR со хеометриски пристап за определување.

9.6.3. Кардиотонични хетерозиди

Кардиотоничните хетерозиди претставуваат група соединенија што се широко распространети во природата, во различни видови растенија и во некои водоземци. Некои од нив се многу важни лекови што се користат во терапијата на остра и хронична срцева инсуфициенција. Медицински значајните кардиотонични хетерозиди сè уште немаат соодветна замена меѓу синтетските лекови.

Хемиска градба и класификација. Агликонот на кардиотоничните хетерозиди во основа е стероидно јадро (циклопентаноперхидрофенантрен). Сите агликони на положбите C₃ и C₁₄ имаат ОН-групи, на C₁₃ CH₃-група и различни супституенти на C₁₀. На C₁₇ е врзан незаситен лактонски прстен, а врз база на градбата на лактонот се делат на две групи (слика 180):

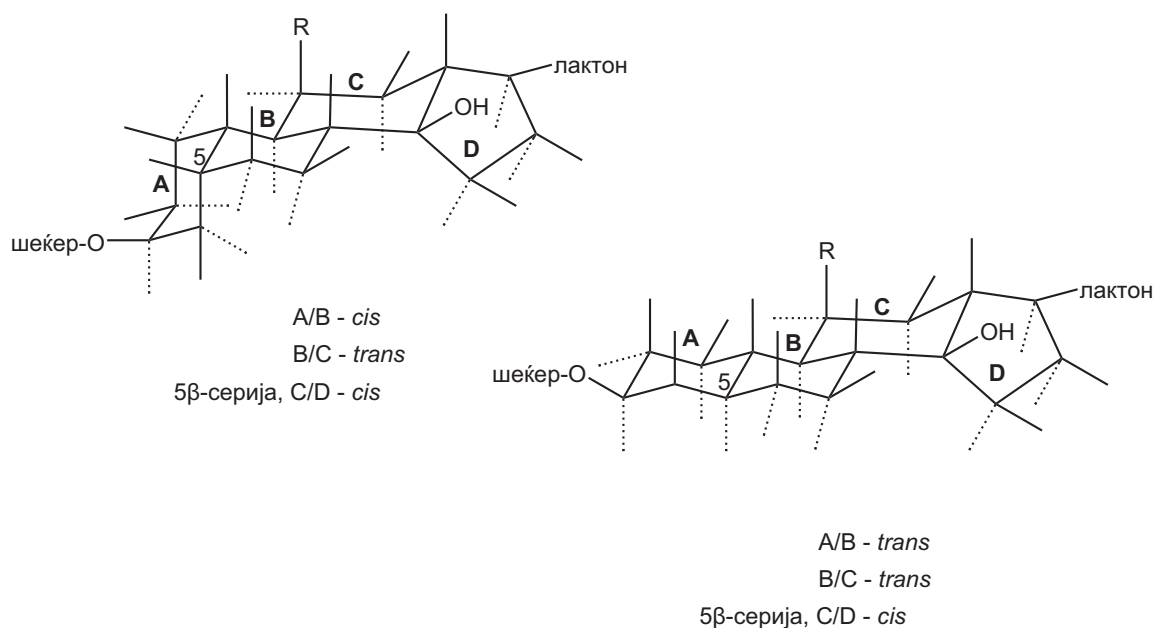
- карденолидни, со петчлен лактонски прстен и
- буфадиенолиди, со шестчлен лактонски прстен.



Слика 180. Основни структури на агликони на кардиотонични хетерозиди

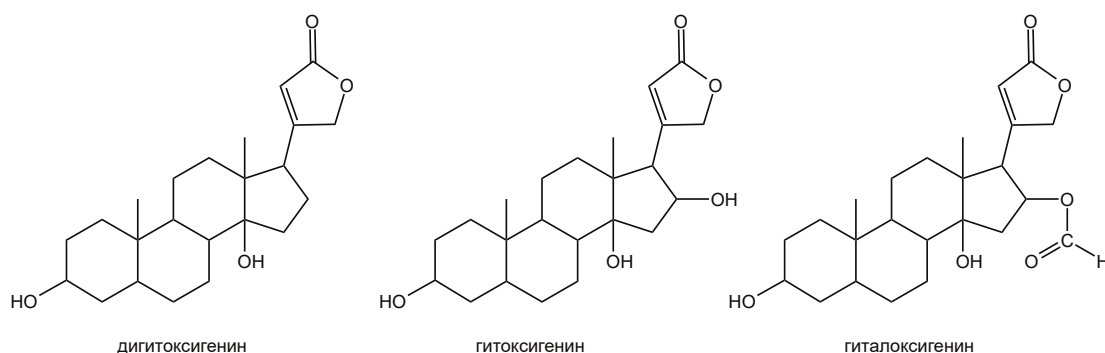
Карденолидните хетерозиди имаат 23 C-атоми, а буфадиенолидните 24 C-атоми. Разновидноста во структурата на кардиотоничните хетерозиди се должи на застапеност на различни супституенти односно нивниот број, вид, место на врзување и конфигурација, од каде:

- во зависност од супституентот на C₁₀ можат да бидат: хетерозиди со алдехидна група (CHO), со хидроксиметилна (CH₂OH) и хетерозиди со метилна група (CH₃).
- OH-групи се задолжително врзани за C₃ и C₁₄ и се β-ориентирани. Други OH-групи може да има на C₁, C₅, C₁₁, C₁₂ и C₁₆.
- во стероидното јадро може да има двојни врски, кетогрупи и епоксидни прстени.



Слика 181. Конформациони формули на карденолидите од 5α- и од 5β-серијата

- прстените А и В може да бидат во *cis* или во *trans* конфигурација, додека прстените С и D се секогаш во *cis* конфигурација (што е различно од другите стероиди).
- незаситениот γ - односно δ -лактонски прстен е битен за дејството на кардиотоничните хетерозиди. Сите промени што настануваат во него (кинење на прстенот, хидрирање на двојната врска, замена на О со N) доведуваат до намалување или до губење на дејството.
- особено значење за стереохемијата на овие соединенија има водородниот атом врзан на положбата C_5 . Водородниот атом врзан за овој С атом, во зависност од начинот на кондензацијата на прстените, може да биде α - или β -ориентиран, од каде постојат две серии кардиотонични агликонии означени со 5α - или 5β -серија. Структурата на природните карденолиди и буфадиенолиди може да се прикаже со конформационите формули, како што е прикажано на слика 181. Кардиотоничните хетерозиди од 5β - серија се фармаколошки активни соединенија, за разлика од хетерозидите од 5α -серија што се неактивни и за терапијата потполно небитни. Структури на некои карденолидни и буфадиенолидни хетерозиди се прикажани на слика 182.

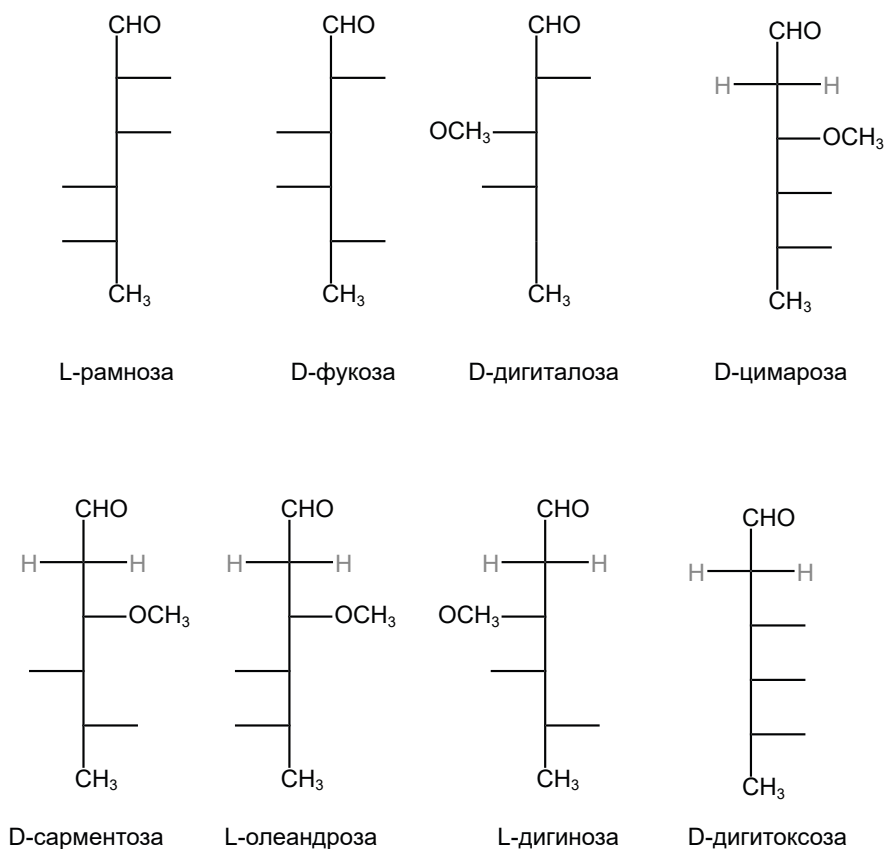


Слика 182. Некои позначајни агликонии на кардиотонични хетерозиди со дигиталис тип градба

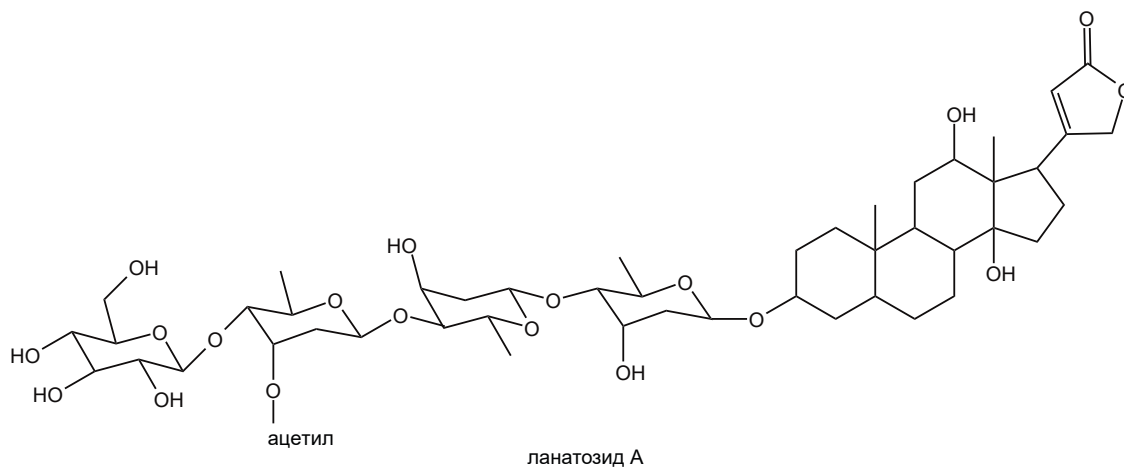
Шеќерната компонента (гликон) на кардиотоничните хетерозиди освен вообичаените шеќери како D-гликоза, D-фруктоза, D-ксилоза и L-рамноза, често содржи специфични 6-дезоксии и 2,6-бисдезоксии хексози како и некои 3-O-метириани или ацетириани шеќери: D-дигитоксоза, D-цимароза, L-олеандроза, дигиноза, сарментоза и др. Овие шеќери се карактеристични само за кардиотоничните хетерозиди (слика 183).

Врската помеѓу шеќерот и агликонот се остварува преку ОН-групата на C_3 . Вообичаено за агликонот директно се врзуваат дезоксишеќерите, а ако се присутни два до три во низа, се повторува истиот шеќер, за на крајот од низата да се врзе обичен шеќер, најчесто гликоза. Шеќерите се во пиранозна, ретко во фуранозна форма. Градбата на гликонскиот дел може да се види на примерот на ланатозид А, изолиран од растението волнест бутин (слика 184).

Од шеќерниот дел зависи растворливоста на хетерозидот во вода, фиксирањето за срцевиот мускул, брзината на дејството и кумулативните својства.



Слика 183. Шеќери што се јавуваат во гликонскиот дел на кардиотоничните хетерозиди



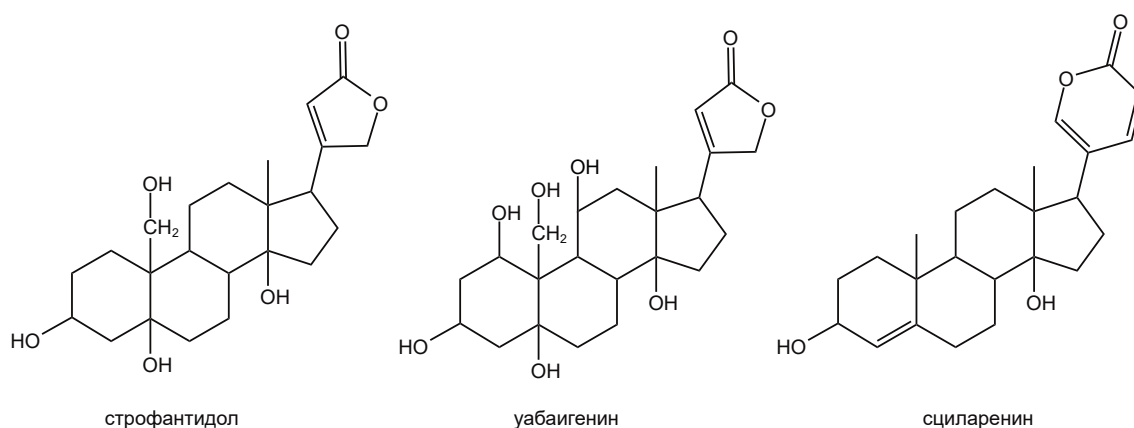
Слика 184. Структура на кардиотоничен хетерозид со гликонски дел кој се состои од три дигитоксози и терминално врзана гликоза

Распространетост и локализација. Кардиотонични хетерозиди што се медицински важни имаат ограничено распространување во претставници од родот *Digitalis* (пурпурен и волнест дигиталис или бутин), поретко во други растенија како што се момина солза, приморски лук, олеандер, строфантус и др. Локализирани се во различни делови на растенијата: семе, лист, кора, корен и

стебло. Содржината варира во зависност од внатрешните и од надворешните фактори (генетските фактори и услови на надворешната средина). Присуството на кардиотоничните хетерозиди во растенијата и во животните (некои видови жаби) ги прави токсични за грабливците и за човекот, од каде произлегува нивната заштитна улога за овие биолошки организми.

Особини. Изолирани во чиста состојба, кардиотоничните хетерозиди се кристални поретко аморфни супстанции, со горчлив вкус, растворливи во вода и во алкохол, тешко растворливи во ацетон и во етер. Многу се нестабилни и под дејство на хемиски агенси, на температура или на ензими, лесно се разложуваат. Во кисела средина лесно хидролизираат, така што прво се отцепува последниот шеќер во ланецот па потоа постепено и другите сè до одвојување на агликонот. Во алкална средина преоѓаат во физиолошки неактивни соединенија бидејќи, доаѓа до отворање на лактонскиот прстен.

Дејство и употреба. Најзначајни растителни суровини што содржат кардиотонични хетерозиди, а кои се користат во форма на традиционални лекови се: момина солза, гороцвет и приморски лук. Активните кардиотонични хетерозиди што се присутни во овие суровини се: конвалотоксол, конвалотоксин и конваламарин во херба од момина солза, адонитоксин во херба од гороцвет и сциларен и просциларен А во луковицата од приморски лук. Кардиотонични хетерозиди што се користат во изолирана форма, како чисти хемиски ентитети, и во форма на конвенционални лекови, се: ланатозид С, ацетил дигоксин и дигоксин што се изолираат од листовите на волнестиот бутин, дигитоксин што се изолира од листот на пурпурниот бутин (дигиталис тип структури) и строфатозид G (уабаин) што се изолира од семето на строфантус (недигиталис тип на кардиотонични хетерозиди, слика 185). Во последно време се користат полусинтетски кардиотонични хетерозиди, со зголемена липофилност и подобрена ресорпција. Аплицирани во терапевтски дози, кардиотоничните хетерозиди дејствуваат на сите функции на миокардот: ја зголемуваат силата и брзината на систолата, ја забавуваат дијастолата, го зголемуваат ударниот волумен на срцето, го забавуваат срцевиот ритам, ја зголемуваат контрактилноста на срцевиот мускул и го нормализираат работењето при срцева инсуфициенција. Покрај овие сакани, имаат и несакани ефекти: изразена токсичност, мала терапевтска ширина и способност да кумулираат. Кумулација е појава кога нова доза на лекот затекнува делови од старата доза, поради бавна елиминација на лекот, па доаѓа до негово натрупување или кумулирање. Освен кардиотонично овие дроги дејствуваат и диуретично.



Слика 185. Некои позначајни агликонии на кардиотонични хетерозиди со недигиталис тип на граѓа

Токсичност. Кардиотоничните хетерозиди имаат многу мала терапевтска ширина. При подолготрајна терапија, ако се применуваат поголеми дози, може да дојде до хронични труења. Во лите-

ратурата се забележани труења со растителни суровини што содржат кардиотонични хетерозиди, со смртен исход. Со поголема токсичност се карактеризираат лист од олеандер кој содржи токсичен олеандрин и ризом од црн кукурек што содржи хелебрин.

Екстракција и испитување на кардиотонични хетерозиди. Во растенијата кардиотоничните хетерозиди се наоѓаат во смеса со голем број други, слични компоненти што многу ја отежнува изолацијата и добивањето на чистите супстанции. Од друга страна, поради нивната нагласена нестабилност, условите на работа треба да бидат внимателно одбрани. Класичниот пат на екстракцијата и на изолацијата се состои во екстракцијата со смеса од хлороформ и алкохол. По упарување, сувиот остаток се раствора во вода и во воден раствор од олово ацетат, кој е потребен за таложење на баластните материи. Со филтрирање се добива пречистен раствор, од кој кардиотоничните хетерозиди се издвојуваат со хроматографски техники.

Присуството на кардиотоничните хетерозиди во растителен материјал се утврдува со хемиски и со биолошки методи. Хемиските методи за идентификација се базираат на боени реакции за докажување на:

- Стероиден прстен, со Либерман-Бучардова реакција што се изведува во хлороформски екстракт или во раствор од изолиран хетерозид, со анхидрид на оцетна киселина и концентрирана сулфурна киселина. Во зависност од структурата и концентрацијата на стероидното соединение се добива црвена, сина или зелена боја. Модификација на овој метод е направена од Салковски, а се состои во внимателно додавање ист волумен на концентрирана сулфурна киселина во определен волумен од хлороформски екстракт, при што хлороформскиот слој се бои црвено, а слојот од киселината флуоресцира зелено.
- Лактонски прстен, 5-член лактонски прстен се докажува со реакција по Легал (црвена боја со натриум нитропрусид во алкална средина), по Рејмонд (виолетова боја со *m*-динитробензол во алкална средина), по Кеде (виолетово-црвена боја со 3,5-динитробензоева киселина), по Балјет (портокалова боја со натриум пикрат). Шестчлен лактон се докажува со заситен раствор на антимоно (III) хлорид во хлороформ.
- Дезоксишеќери, се докажуваат со реакција на Келер-Килиани (сино обојување во средина од глацијална оцетна киселина со FeCl_3 и концентрирана H_2SO_4).

За анализа на кардиотонични хетерозиди денес широко се користат хроматографски методи: на колона (алуминиум оксид, силициум диоксид, силика гел), на тенок слој (силикагел, талк, алуминиум оксид целулоза) или на хартија. Идентификација на раздвоените компоненти се врши со некоја од горенаведените боени реакции (на пр., 2-дезоксишеќери се идентификуваат со *p*-диметиламинобензалдехид во фосфорна киселина или со алкохолен раствор на ванилин во фосфорна киселина при што се јавува сино обојување). Денес сè повеќе се користи HPLC-техниката. Изолирани кардиотонични хетерозиди се идентификуваат со спектроскопски методи (UV, IR, NMR и MS). Со UV-спектроскопија може да се утврди видот на лактонскиот прстен, при што апсорпција на 215-220 nm е карактеристична за петчлен, а на 300 nm за шестчлен лактон.

Квантитативна анализа на кардиотонични хетерозиди вклучува два типа методи, хемиски и биолошки. Хемиските методи се состојат во определување на количеството на хетерозидите во екстрактите или друг материјал што ги содржи, со некој од наведените методи:

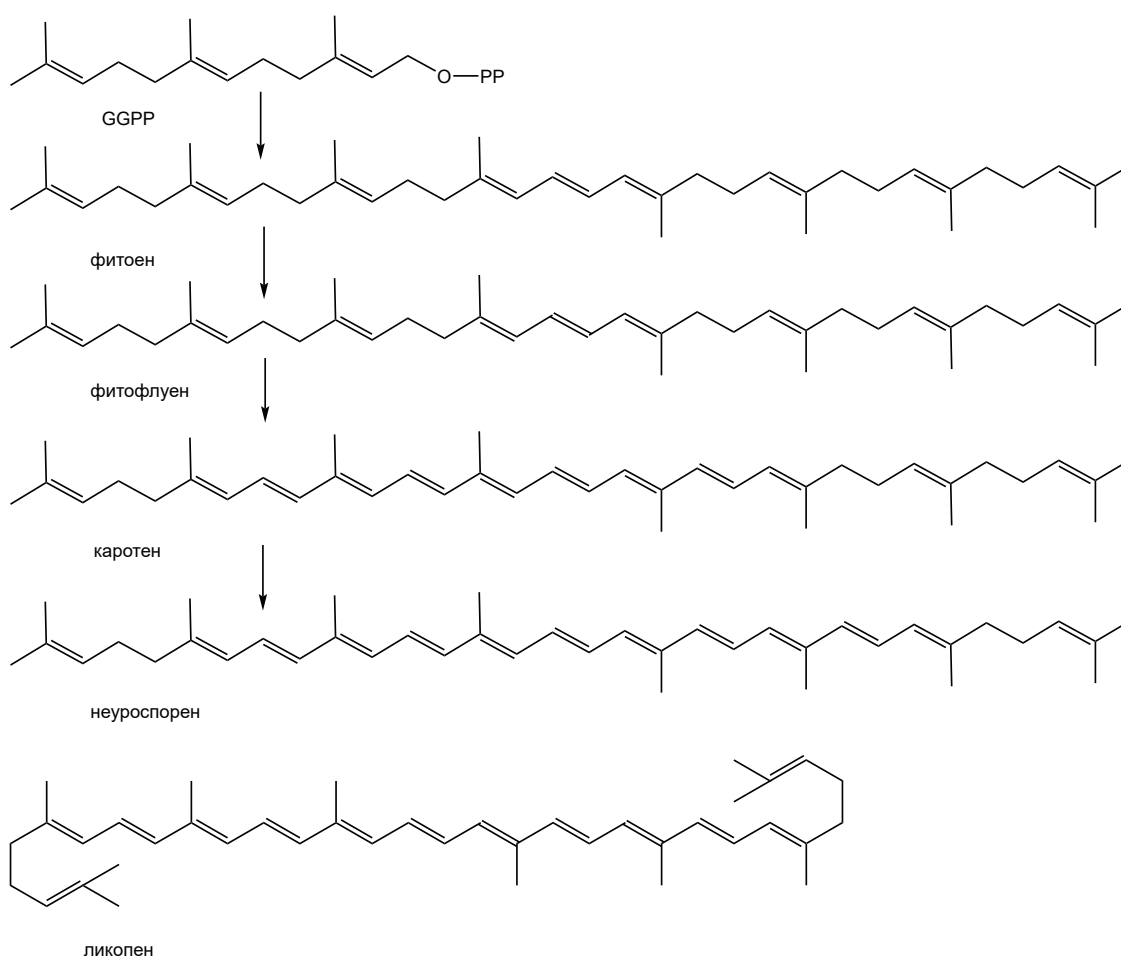
- титрација во безводна средина,
- спектрофотометриски,
- флуориметриски,
- поларографски,
- дензитометриски,
- со течна хроматографија (најчесто HPLC). Методите со HPLC-техниката даваат можности за многу прецизни определувања, што е особено значајно со оглед дека во практиката се при-

менуваат главно изолирани кардиотонични хетерозиди, вметнати во различни фармацевтски дозирани форми.

Биолошките методи овозможуваат утврдување на фармаколошката активност на растителните екстракти или на изолираните хетерозиди. Се изведуваат на лабораториски животни.

9.7. ТЕТРАТЕРПЕНИ - КАРОТЕНОИДИ

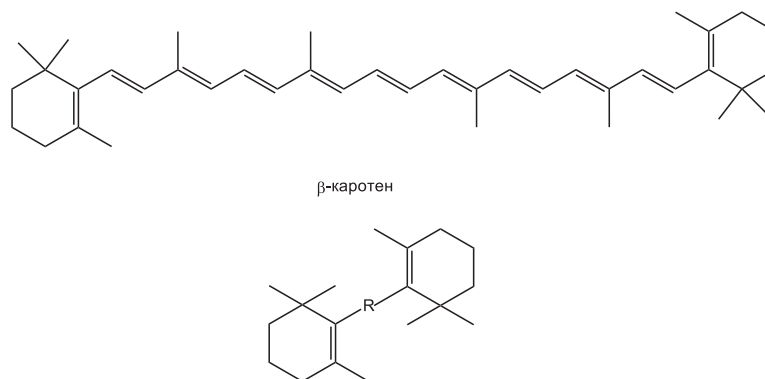
Тетратерпени се соединенија со C_{40} структура, изградени од 8 изопренски остатоци. Претставуваат голема група природни производи што опфаќа околу 600 различни соединенија. Во оваа група спаѓаат тетратерпенски јагледороди кои се означуваат како каротени и кислородни деривати кои се ксантофили, но двете групи се означени со заедничко име каротеноиди. Името им доаѓа од морковот, *Daucus carota*, од каде што за прв пат биле изолирани. Присуството на поголем број двојни врски во молекулите на каротеноидите, условува појава на голем број геометриски изомери. Во природата главно се јавуваат ациклични (ликопен) и циклични производи (со еден или два пента или хексачлени прстени).



Слика 186. Биосинтеза на каротеноиди

Биосинтетско потекло. Каротеноидите се формираат на сличен начин на кој се формира сквален (прекурсор на тритерпените), со „опаш-опаш“ врзување на две молекули од GGPP, при што се добива интермедиерното соединение префитоен пиродифосфат. Со губење на еден протон ова соединение се трансформира во фитоен, со реакции на каскадни десатурации (дехидрогенации) преминува во фитофлуен, а понатаму преку неколку интермедиери во каротеноид ликопен, од кој се добиваат останатите каротеноиди (слика 186). Како резултат на протонизацијата на терминалната двојна врска може да настане циклизација, а добиениот производ понатаму да се оксидира, да се епоксидира или парцијално да се деградира. Во последниот случај настануваат апокаротени и каротенски киселини.

Распространување и локализација. Каротеноидите (каротени и ксантофили) се акумулираат во хлоропластите на сите фотосинтетски активни ткива. Најзначајни меѓу нив се каротен, лутеин, виолаксантин и неоксантин. Се јавуваат во листовите, цветовите, плодовите, корените и семињата. Од каротените се значајни ликопен што се јавува во зрелите домати и во плодот од шипка и каротен, што претставува смеса од α -, β - и γ -изомери. Кај α - и β -каротенот на двата краја од ланецот настанува циклизација и се создаваат два јононски прстени, а кај γ -изомерот само еден. Во природата најраспространет е β -каротенот.



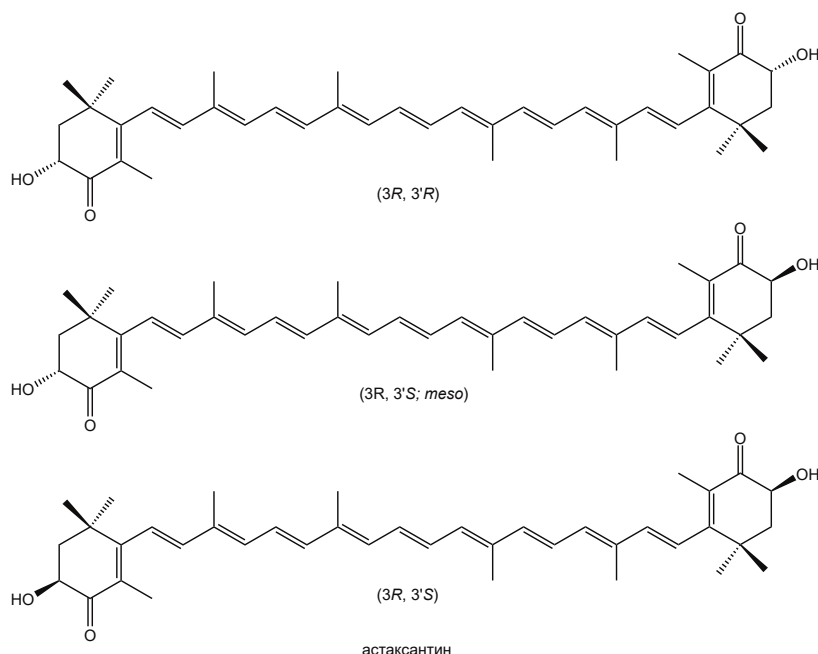
Слика 187. Најраспространетиот каротеноид во природата, во растенијата

Најзастапен каротеноид во растителниот свет е β -каротен (слика 187), а други каротеноиди кои се наоѓаат во растенијата се: α -каротен (морков), капсантин (црвени пиперки, пиперки), лутеин, зеаксантин, виолаксантин, неоксантин, β -криптоксантин. Каротеноидите можат да се најдат и во ткивата на риби од северните мориња, особено во лососот, поради присуството на астаксантин (слика 188), кој се создава со дигестија на делови од морски растенија со кои се храни лососот, а кои содржат каротеноиди. Некои каротеноиди, без оглед дали се во растенија или во животни, се врзани за протеини. Црвениот астаксантин кај ракови и јастози се претвора во сина боја кога е врзан за протеински комплекс. Кога се затоплува (при термичка подготовка) комплексот ја менува бојата од сина во црвена, поради денатурацијата на протеините.

Ксантофилите, кислородни деривати, се јавуваат како алкохоли (ксантофил и зеаксантин, присутни во жолти листови, во зрната од пченката), алдехиди (β -цитраурин, присутен во перикарпот на портокалот) и киселини (кроцетин, присутен во некои видови шафран, *Crocus*). Во вишите растенија, каротеноидите се наоѓаат во пластидите, особено хлоропластите на фотосинтетички активните ткива и хромопластите на овошјето и цвеќето. Кај микроалгите, некои каротеноиди како астаксантин, се застапени надвор од пластидите (екстрапластидијални).

Физичко-хемиски особини. Каротеноидите се растворливи во масла и во органски растворувачи. Се разликуваат по боја од жолта преку портокалова до црвена. Двете структурни групи, каро-

тени и ксантофили, се полинезаситени соединенија поради што се многу осетливи на оксидативни промени. Двојните врски на каротеноидите апсорбираат вишок енергија од други молекули што ги објаснува нивните антиоксидантни својства *in vivo*. Дополнително, терминалните групи на каротеноиди може да влијаат на нивниот поларитет, промовирајќи можна интеракција со биолошките мембрани. Може да се промени во зависност од фазата на развој или од условите на животната средина. Каротеноидите се јавуваат во слободна форма во листовите и како естерификувани во други ткива. Хидроксилираните ксантофили како зеаксантин, лутеин, β -криптоксантин, виолаксантин, зеиноксантин, α -криптоксантин и астаксантин може да бидат присутни во природата и во слободна форма и во ацилирана форма со масни киселини. Каротеноидните естери (ксантофили) се јавуваат како *trans*- и *cis*- (односно E и Z) изомери.



Слика 188. Изомерите на астаксантинот

Бидејќи каротеноидите лесно се оксидираат поради големиот број на конјугирани двојни врски, како производи на оксидацијата прво се формираат епоксиди и карбонили, а понатамошната оксидација создава моно- и диокси- компоненти со краток ланец, кои вклучуваат епокси- β -јон. Епоксидите главно се формираат од крајните прстени што води до губење на провитаминска активност. Оксидативната деградација на бета-каротен се зголемува во присуство на јони на сулфит и на метал. Ензимската активност, особено на липоксигеназата, ја забрзува оксидативната деградација на каротеноидите. Липоксигеназите прво ја катализираат оксидацијата на незаситените и на полинезаситените масни киселини во насока на создавање на пероксид, кој потоа реагира и ги обезбојува каротеноидите.

Значење и употреба. Каротеноидите се многу значајна група природни состојки, што се присутни во храната и што се внесуваат во организмот со исхрана богата со овошје и зеленчук. Некои каротеноиди се провитамини на витаминот А и внесени во гастроинтестиналниот тракт се разложуваат во насока на создавање на витамин А (ретинол). Молекулата на β -каротен во организмот се претвора во две молекули на витамин А. β -Каротен има два β -јононски прстени во својата структура, па затоа е најактивен како провитамин (слика 187). Другите каротеноиди, како што

се α -каротен, γ -каротен и криптоксантин, исто така се прекурсори на витамин А, но заради мали разлики во хемиската градба, од нив се формира само еден молекул на витамин А. Од провитаминската функција произлегува големото значење од внесување поголеми количества овошје и зеленчук во исхраната, бидејќи со тоа се овозможува снабдување на организмот со доволно количество на витамин А. Здравствените придобивки од храна богата со каротеноиди се: придонес кон одржување на здравјето, подобрување на работата на срцето, спречување на оксидацијата на LDL-холестерол и др. Се смета дека каротеноидите имаат значајна улога во спречувањето на дегенеративните процеси. Присуството на конјугираните двојни врски во молекулата ги прави многу моќни фаќачи на слободни кислородни радикали, што се формираат во текот на биохемиските процеси. Овие компоненти дејствуваат и како добри антиоксиданти. Каротеноидите спаѓаат во групата на егзогени антиоксиданти кои се внесуваат со храна. Тие имаат различни механизми на дејствување при врзување на слободните радикали и спречување на верижните реакции. Интерферираат и со фотооксидативните процеси и може да се користат во третманот на порфирија и дерматитис предизвикан од фототоксична реакција. Во прехранбената индустрија, се користат како евтени, нетоксични и ефикасни боени материи.

Природните производи со каротени главно се подготвуваат како екстракти. Се користат во различни дозирани форми (додатоци на исхраната). Чисти каротеноиди доаѓаат во форма на микрокристална суспензија во масло или како прашок диспергиран во вода (атомизирана масло/вода емулзија). Апсорпцијата на каротеноиди во телото се движи помеѓу 10 % и 30 % и значително се намалува со зголемениот внес. Најважниот фактор што промовира апсорпција се маснотиите, бидејќи каротеноидите се апсорбираат само во присуство на соли на жолчната киселина. Диететските влакна ја намалуваат или инхибираат апсорпцијата на каротеноидите.

Некои каротеноиди што може да се изолираат од морски организми имаат значајни фармацевтски апликации, во фармацевтска индустрија, а се користат и во козметичката и во прехранбената индустрија. Особено, важен извор на каротеноиди се микроалгите чија содржина на сува маса варира помеѓу 8 % и 14 %. Овие организми имаат забрзана стапка на раст и внатрешна способност да произведуваат биоактивни супстанции, како фотозащитни пигменти, кои имаат директна примена во фармацевтската и во козметичката индустрија. Во моментот практично се користат само зеаксантин, лутеин и астаксантин, кои се екстрахираат од микроалгите што се одгледуваат во комерцијални размери. Лутеинот и зеаксантинон ги заштитуваат клетките во окото од оштетување, како антиоксиданти. Зеаксантинон дејствува како отстранувач на реактивните кислородни радикали во мрежницата на окото, при што ја промовира густината на макуларниот пигмент и ја спречува макуларната дегенерација што е поврзана со возраста. Лутеинот се акумулира во мрежницата и ја заштитува од катаракта, макуларна дегенерација, ретинопатија и други оштетувања. Дополнително ја стимулира синтезата на хијалуронатот и промовира подобрување на вкупното здравје на човекот. На пазарот лутеинот е присутен во форма на додатоци на исхраната за перорална примена и во форма на различни креми и гелови, наменети за надворешна употреба. Главните цели на овие производи се антиоксидативен ефект, зајакнување на имунитетот, нега на кожата, навлажнување, антистареење и здравје на видот.

Друг каротеноид со голема практична примена денес е астаксантинон, црвениот пигмент на морските организми, чија антиоксидантна активност е 10-100 пати поголема од другите природни антиоксиданти. Речиси 100 пати е поефикасен од токоферолот, 54 пати од β -каротенот и 10 пати од другите каротеноиди како што се кантаксантин, зеаксантин и лутеин. Најновите патентни апликации на астаксантин вклучуваат превенција од бактериски инфекции, третман на имфламаторни заболувања, намалување на телесните масти и подобрувања во функцијата на мозокот. Ефектот против брчки и против стареењето (антиејџинг) што го обезбедува астаксантинон е клинички испитуван и потврден. Утврдено е дека астаксантинон ги заштитува колагенските влакна, обезбедува поголема еластичност и поголема содржина на влага што го намалува чувството на груба кожа и ги намалува брчките. Други клинички испитувања ги потврдија антиинфламаторното

дејство, заштитното дејство против оштетувањата на кожа што се предизвикани од UV-зрачење и високата системска антиоксидантна моќ.

Екстракција и испитување на каротеноиди. За екстракција и прочистување на каротеноидите се користат различни техники што се базираат на растворливоста на каротеноидите во органиски растворувачи како што се етил алкохол, диетил етер, хексан, ацетон, метанол, дихлорометан итн. Поради големите варијации во основната градба, методите на екстракција и прочистување често се предизвикувачки и се избираат според природата на растителниот материјал, растворувачот за екстракција (поларитет, цена, достапност, токсичност, одржливост на растворувачот за екстракција), количината и својствата на извлечените соединенија (растворливост, термостабилност) итн. Како и кај другите природни производи, и кај каротеноидите анализата и испитувањето вклучуваат 4 главни чекори: (1) лиза на растителните клетки; (2) екстракција со растворувач; (3) прочистување на целните компоненти и (4) употреба на соодветен метод на анализа. Иако екстрактивните методи може да варираат од случај до случај, растворувачот има клучна улога во повеќето од нив, поради хидрофобната природа на каротеноидите и нивната ограничена растворливост во вода. Според принципот на екстракција, може да се користат методите како што се дестилација, пресување и сублимација, потоа мацерацијата, перколацијата и рефлуксната екстракција, класични техники, чија ефикасност зависи од растворливоста на целните соединенија во одреден растворувач. Сите наведени техники имаат свои недостатоци во однос на потребното време и употребата на големи количества растворувачи, што негативно се одразува на цената и на еколошката прифатливост. Оттука, за екстракцијата на каротеноидите, како и за другите природни производи, се сè поактуелни определени зелени техники на екстракција. Интересно е што денес се користат и некои нови растворувачи како што е D-лимонен, кој е одлична замена за дихлорометан, а самиот е биоразградлив и нетоксичен. Зелените методи нудат предност за термолабилните каротеноиди, овозможувајќи да се контролира температурата за време на процесите и да се избегне деградацијата. Се препорачува користење на: SFE, PLE и MAE, дополнително PEF и EAE. Треба да се напомене дека главната грижа за време на екстракцијата е да се задржи интегритетот и чистотата на целните каротеноиди, кои може да бидат изложени на оксидација или на деградација. Со цел да се обезбеди поголема безбедност во текот на екстрактивниот процес во однос на заштитата на состојките од деградација, се применуваат: сапонификација, *trans*-естерификација проследена со молекуларна дестилација и понатамошно прочистување со адсорпциона хроматографија, користејќи синтетички смоли, силика гел и реверзно-фазен C18 силициум диоксид. Во сите наведени методи на екстракција, обично се добива комплексен екстракт кој бара дополнително раздвојување и прочистување. Методите на сепарација, исто така, вклучуваат дестилација, кристализација, дијализа и хроматографски техники.

Идентификација и квантификација на каротеноидите може релативно лесно да се направи со примена на UV-Vis и IR-спектроскопија. Системот на двојни врски дава опсег на апсорпција на светлина 400-500 nm, со тоа што зголемувањето на бројот на двојните врски ги зголемува брановите должини на апсорпција. Дополнително, поради присутната полиенска структура, каротеноидите можат да постојат во *cis* и *trans* изомерни форми што е поврзано со нивното физичко-хемиско однесување и со биолошката активност. *Cis*-изомерите се термодинамички помалку стабилни од нивните *trans* изомери, поради пониските точки на топење, што ја нарушува нивната кристализација. Со оглед на помалата термодинамичка стабилност генерално, гасната хроматографија како техника, не е погодна за анализа на каротеноидите. Се препорачува користење на HPLC-техника, со детекција на апсорпција на UV/Vis и/или со масена спектрометрија или комбинации од нив. Кај LC сепарацијата се должи на малите разлики во молекуларните структури, а самото раздвојување зависи од својствата на стационарната фаза. HPLC со детекција на UV-Vis-апсорпција е еден од најчесто користените методи за идентификација и квантификација на каротеноидите. Раздвојувањето на каротеноидите може да се изврши со користење и на нормална и на реверзна фаза, со напомена дека нормалната фаза не е погодна за сепарација на неполарните каротеноиди. RP-HPLC овозможува значително зголемување на интеракцијата помеѓу анализот и неполарна-

та стационарна фаза, што доведува до зголемена резолуција на каротеноидите. LC-MS, овозможува значајни предности како што се висока чувствителност и супериорна селективност на анализата на каротеноидите кои се клучни за идентификација и квантификација на овие состојки. HPLC поврзан со MALDI-TOF, може да биде моќна алатка за откривање на каротеноиди во примероци на храна.

Каротеноидите во природните материјали обично се јавуваат како повеќекомпонентни мешавини со екстремна сложеност кои покажаа дека еднодимензионалната LC вообичаено не е доволно моќна за нивна комплетна анализа и профилирање. Некои истражувачи објавија резултати од анализа на каротеноиди во два чекора, во кои сите соединенија што се елуираат од одвојувањето на првата димензија (1D) секвенцијално се пренесуваат во втората димензија (2D) за понатамошно раздвојување, во систем LCLC. Овој пристап сè уште се смета за експериментален, но може да биде добро решение за анализа на сложените смеси на каротеноиди. Квантификацијата на сепарираниите каротеноиди главно се врши со квантитативните спектроскопски методи кои третираат различни спектрални сигнали како IR, UV, видливи, расејување итн. Со оглед дека квантификацијата на каротеноидите често треба да се изврши во маслена фаза (на пр., масло од канола, маслени естракти богати со каротеноиди и сл.), тоа самото по себе претставува дополнителна тешкотија, бидејќи бара дериватизација или сапонификација на каротеноидите, што директно влијае врз успешноста на хроматографската сепарација. За надминување на ваков тип проблеми се препорачуваат тандем техники, најмногу LC-MS/MS.

АЛКАЛОИДИ

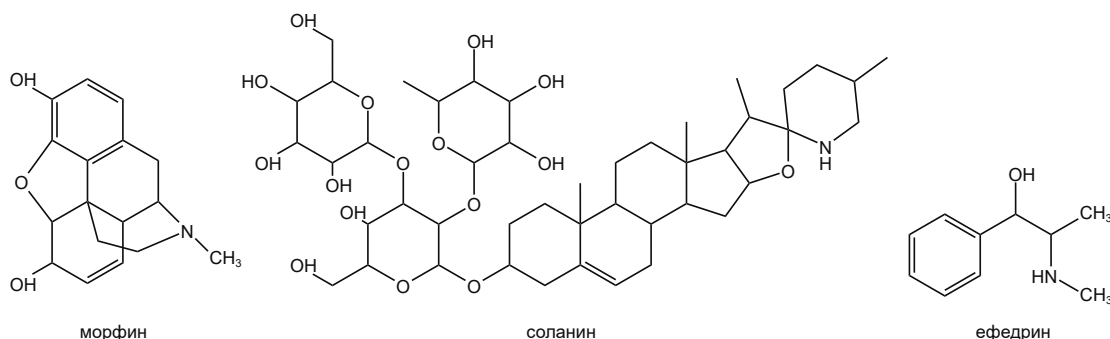
Поимот алкалоид означува природно соединение што реагира слично на база (алкалија), а за прв пат е воведен во почетокот од XIX век. Името е изведено од арапското *al kaly* = сода (база) и грчкото *eidos* = слично. Во растенијата се откриени голем број соединенија со својства слични на алкалија и со други специфични особини што се поинтензивно проучувани откако беа изолирани: морфинот во 1804 год., стрихнинот во 1818 год., хининот и кофеинот во 1820 год. и понатаму останатите познати алкалоиди. Основна карактеристика на овие соединенија е присуството на азот во молекулата што е носител на базните особини, а кој биосинтетски потекнува од аминокиселина. Познато е дека само некои аминокиселини се прекурсори во оваа биосинтеза, па оттука произлегува дека алкалоидите се сложени секундарни метаболити што во растенијата се создаваат како производи на метаболизмот на определени (дефинирани) аминокиселини. Дополнително, дефиницијата се проширува и дефинира со две групи алкалоидни соединенија:

- Вистински (правилни) алкалоиди што настануваат од дефинираните аминокиселини и кај кои азотот задолжително е дел од хетероцикличен прстен. Тоа се сложени соединенија што покажуваат значајни фармаколошки активности. Во растенијата се јавуваат најчесто како соли растворени во клеточниот сок. Пример за таков алкалоид е морфин (слика 189).
- Протоалкалоиди, кои настануваат од истите дефинирани аминокиселини, но хемиски претставуваат прости амини во кои атомот на азотот не е дел од хетероцикличниот прстен, туку се наоѓа во странична низа. Тука спаѓаат: серотонин, мескалин, ефедрин (слика 189) и други слични структури.

Според некои автори, покрај вистинските и протоалкалоидите, во растенијата се јавуваат определени соединенија со азот во хетероцикличен прстен и со алкалоидно однесување, а кои биосинтетски не потекнуваат од дефинираните аминокиселини. Овие соединенија се означени како псевдоалкалоиди, а досегашните сознанија укажуваат на фактот дека претставуваат деривати на изопрен односно терпен и се дефинирани како терпенски алкалоиди (на пр. аконитин, некои стероидни алкалоиди како што е соланин и сл.). Азотот кај овие соединенија потекнува исто така од некоја аминокиселина, но не од оние што се вообичаени прекурсори на вистинските алкалоиди. Во биосинтезата на псевдоалкалоидите азотот од овие аминокиселини се вклучува во подоцнежните фази од биосинтезата.

Иако разграничувањето помеѓу правилните алкалоиди, псевдо и протоалкалоиди изгледа јасно, сепак не секогаш е можна лесна класификација на одредени природни состојки со азот. Во прак-

тика е прифатено дека следните состојки што содржат азот не претставуваат алкалоиди: прости амини, пептиди, аминокиселини, порфирини, алкил амини, арилалкил амини и слични производи, додека сите останати компоненти со азот се сметаат за алкалоиди. Секако, тие состојки мора да покажат и „алкалоидно однесување“, односно да дадат позитивни реакции со определени реагенси за идентификација на алкалоидите.



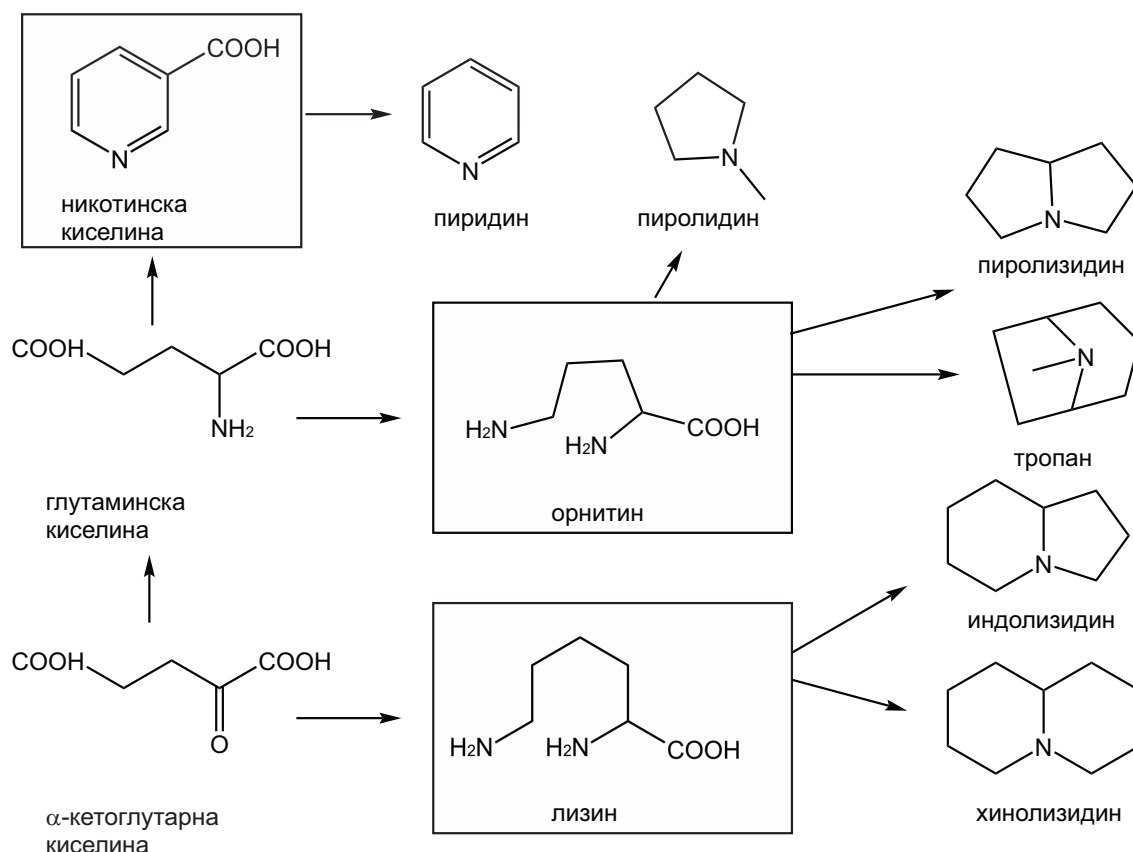
Слика 189. Примери на правилен алкалоид, псевдо и протоалкалоид

Распространување и локализација. Алкалоидите се соединенија на скриеносемени растенијата. Се смета дека 10-15 % од овие растенија создаваат алкалоиди. За некои фамилии може да се каже дека биосинтезата на алкалоиди е значајна карактеристика на сите нивни претставници, како што е тоа случај со фамилијата на афиони (Papaveraceae), додека кај другите фамилии има претставници што создаваат алкалоиди и но и такви кои не се карактеризираат со оваа биосинтеза (на пр. фамилија на компирот, пиперката, патлиџанот = Solanaceae, во која некои видови создаваат алкалоиди, а некои не). Во пониските растенија алкалоидите само инцидентно се јавуваат во некои бактерии, ретко во габи (псилоцин во одредени халуциногени габи, ерголини во ‘ржена гламна). Многу ретко се јавуваат во папрати или во голосемени растенија.

Количеството на алкалоидите во растителните органи варира во широки граници, од неколку ppm до 15 %. Многу ретко е присутен само еден алкалоид (хиосциамин во листови од помамница), многу почесто е присутна комплексна смеса во која еден алкалоид е доминантен. Генерално, алкалоидите на едно исто растение имаат исто биосинтетско потекло, иако нивните структури можат да бидат многу различни. Во едно исто растение количеството на алкалоидите е различно во различни делови од растението, а можно е некои органи воопшто да не содржат алкалоиди. Квалитативните варијации се, исто така, чести и можно е различни делови од едно исто растение да содржат различни алкалоиди. Во растенијата алкалоидите се јавуваат како соли (цитрати, малати, тартарати, монокати, изобутирати, бензоати) или како комплекси со танини. Најновите сознанија говорат дека се локализираат во периферните ткива, во надворешните слоеви од кора на стебло и гранки, во коренот или во семената обвивка. Во клетките се најчесто сместени во клеточниот сок. Се синтетизираат во специфични делови (корени што растат, хлоропласти), а се транспортираат и се депонираат во други ткива и органи.

Биолошка функција во растенијата. Како што е тоа случај и за многу други секундарни метаболити, така и за оваа група соединенија малку се знае за нивната биолошка улога во растенијата. Некои автори ги сметаат за крајни продукти на метаболизмот, а некои за активни метаболити што можат да бидат вклучени во одредени биосинтези во што играат улога на интермедиери. Претставуваат производи што се битни за еколошката адаптација на растението во различни услови на надворешна средина.

Физичко-хемиски особини. Алкалоиди се соединенија со мали молекулски маси што се движат од 100 до 900. Повеќето алкалоиди што не содржат кислород во структурата се во течна состојба, а оние што содржат кислород се бели кристални супстанции, ретко обоени (берберинот е жолт). Во најголем број случаи се оптички активни. Имаат остри точки на топење, пониски од 200 °C, без декомпензација.



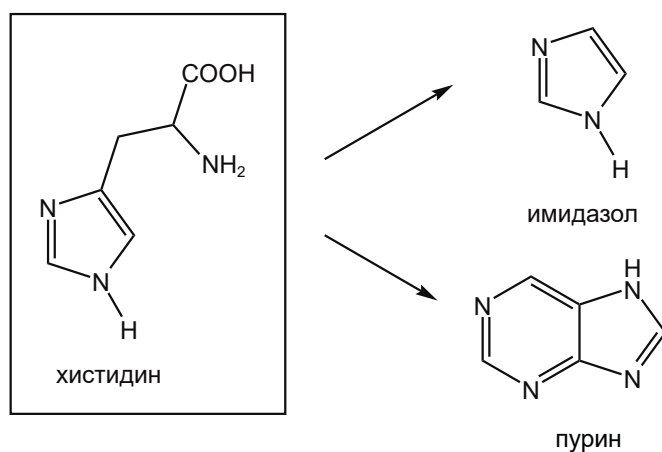
Слика 190. Хетероциклуси што се создаваат од аминокиселините орнитин и лизин

Чистите алкалоиди (алкалоид-бази) не се растворливи во вода, а се раствораат во неполарни или во слабо поларни растворувачи. Базните својства им варираат во широки граници и зависаат од расположливоста на неспарените електрони на азотниот атом. Електрон-акцепторски групи во непосредна близина на азот ја намалуваат базноста, додека електрон-донирачки групи ја зголемуваат. Така, алкалоидите колхицин и пиперин поради присуството на карбонилна група во амидот се практично неутрални компоненти, за разлика од хисциаминот, морфинот и други кои имаат метил радикал врзан за азотот кој им ги зголемува базните својства. Базичноста на хетероцикличните прстени со азот, исто така, варира. Во молекулата на пиридин, хинолин и изохинолин, постои неспарен електрон на азотот и базичноста е изразена. Кај индол и пирол неспарените електрони на азотот имаат своја улога во ароматскиот карактер на компонентите и поради тоа тие не покажуваат базни туку кисели својства. Од друга страна, пиролидин, кој е заситен прстен, има изразени базни својства. Базичноста зависи и од стерни пречки во молекулата. Базниот карактер на алкалоидите овозможува формирање соли со минерални киселини (хидро-хлориди, сулфати, нитрати) или органски киселини (тартарати, сулфамати, малеати). Алкалоид-соли се растворливи во вода и во разблажен етанол, а не се растворливи во органски растворувачи. Кристализираните

соли се стабилни и претставуваат вообичаена комерцијална форма за употреба на овие природни производи.

Биосинтеза на алкалоиди. Биосинтетското потекло на алкалоидите не може да се разгледува генерално, бидејќи за секоја група алкалоиди е различно. Прекурсор во биосинтезата на вистинските (правилните) алкалоиди и на протоалкалоидите е некоја од наведените (строго дефинирани) аминокиселини (слика 190, 191 и 192):

- орнитин и лизин, за создавање на петочлените и шесточлените хетероциклуси со азот,
- фенилаланин и тирозин, во најголема мера за создавање на изохинолински алкалоиди,
- триптофан, во најголема мера за создавање на индолни алкалоиди
- хистидин, за создавање на имидазолски алкалоиди
- антранилна киселина, за создавање на хинолински алкалоиди.



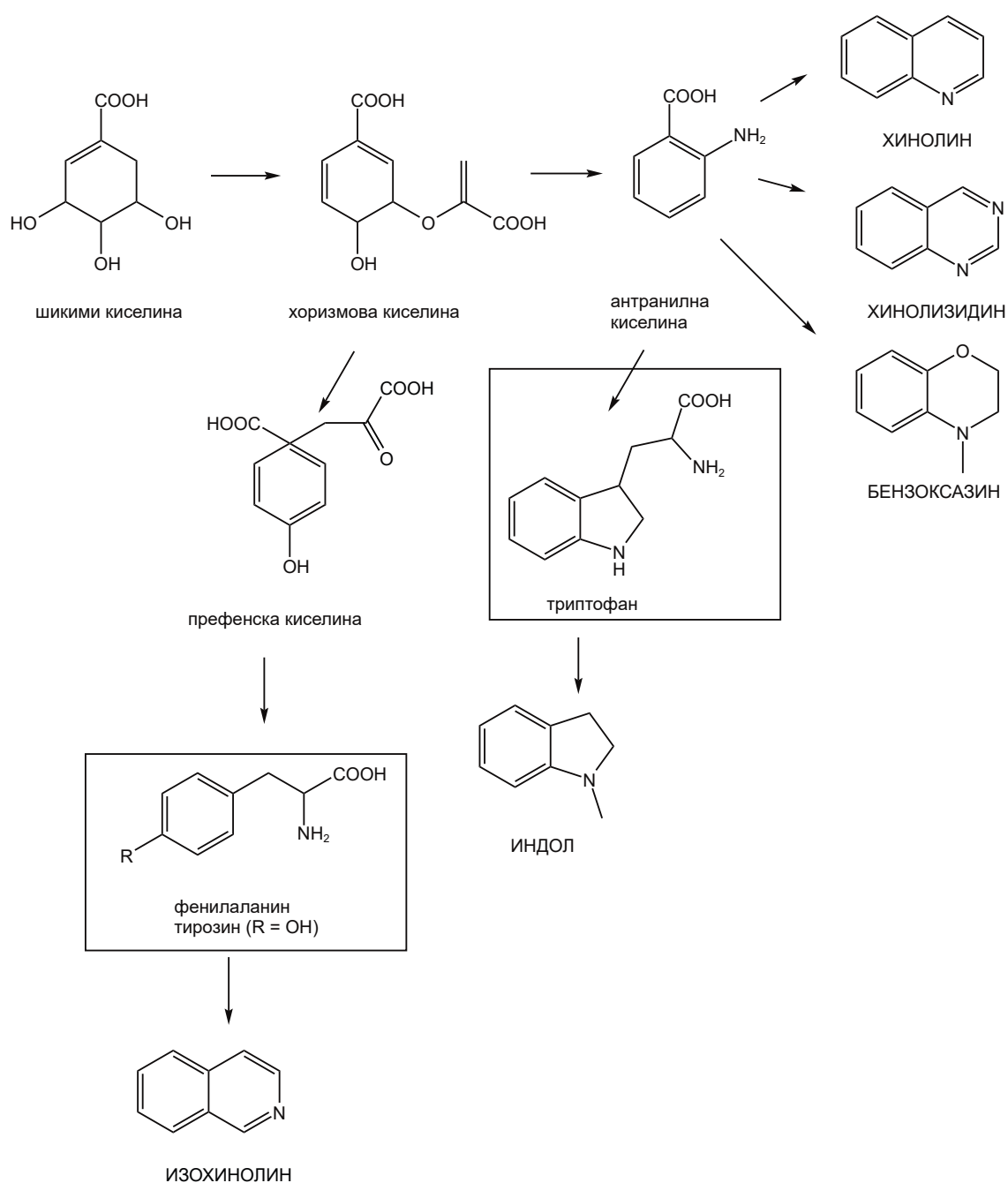
Слика 191. Хетероциклуси што се создаваат од аминокиселината хистидин

Во синтезата на алкалоидите може да учествува една молекула од аминокиселина или по потреба две молекули од една иста киселина, поретко од различни киселини. Дополнителни C-атоми се вклучуваат од интермедиерите, како што се: ацетати, диметилалил пирофосфати или други активирани компоненти.

Хемиска градба на алкалоидите. Алкалоидите претставуваат многу разновидна група на природни производи. Нивната класификација е отежната заради различните пристапи. Хемиската класификација се изведува врз база на структурата на хетероцикличниот прстен со азот кој претставува основа на молекулата. Во одредена смисла оваа класификација е поврзана и со нивната биосинтеза, бидејќи хетероцикличниот азот потекнува од точно определена аминокиселина. Така разликуваме:

- тропански и егдониски алкалоиди, пиролизидински и индолизидински, како и пиперидински алкалоиди кои потекнуваат од орнитин и лизин, делумно и со вклучување на никотинската киселина.
- различни класи на изохинолински алкалоиди (апорфински, протоберберински, бензилтетраизохинолински, трополонски и монотерпенско-изохинолински) кои потекнуваат од фенилаланин и тирозин. Од фенилаланинот и од тирозинот се создаваат и фенилетиламински алкалоиди кои претставуваат протоалкалоиди,

- различни класи на индолни алкалоиди (езерински, бета-карболински, ерголински, монотерпенско-индолни) кои се создаваат од триптофан,
- имидазолски алкалоиди кои потекнуваат од хистидин,
- хинолински алкалоиди кои потекнуваат од антранилна киселина,
- и други.



Слика 192. Хетероциклуси што се создаваат од аминокиселините фенилаланин/тирозин и триптофан

Биолошко-фармаколошка активност и употреба. Алкалоидите се интересни секундарни метаболити токму поради разновидноста во нивната фармаколошка активност. Тие дејствуваат:

- врз CNS, како депресанти (морфин, скополамин) или како стимуланти (стрихнин, кофеин)
- врз вегетативен нервен систем, како симпатомиметика (ефедрин), симпатолитика (јохимбин, некои ергот алкалоиди), парасимпатомиметика (езерин, пилокарпин), антихолинергични агенси (атропин, хиосциамин) и ганглиоплагични средства (спартеин, никотин),
- како локална анестетика (кокаин),
- цитостатика (винбластин, винкристин, елиптицин),
- антимальарика (хинин),
- некои се антибактериски (берберин) или амебициди (еметин) агенси,
- друго.

Разновидноста во фармаколошката активност овозможува широка употреба на алкалоидни растителни суровини. Некои се користат во форма на хербални лекови (помамнаца, датурса, буника), а многу поголем број како растителни суровини за екстракција и изолација на алкалоиди (хинонова кора за хинин, опиум за морфин, ‘ржена гламна заергот алкалоиди и др.). Некои алкалоиди се добиваат со трансформација на други алкалоиди (кодеин се добива со метилација на морфин, хинин се конвертира во хинидин, серпентин во ајмалицин и сл.). Во некои случаи, се преферира директна синтеза на некои алкалоиди како поевтина постапка за нивно добивање (теофилин, папаверин). Можна е и комплетна синтеза на аналогни молекули на природните, со цел да се добијат супстанции со подобрена ефикасност, а помала токсичност. Изолирани чисти алкалоиди се користат како лекови. Некои алкалоиди се користат и како додатоци на исхраната (теобромин, берберин, кофеин и др.).

10.1. Алкалоиди што се производи на орнитин и лизин

Алифатични аминокиселини, орнитин и лизин, со 4 односно со 5 C-атома во низа, се биосинтетски прекурсори на голем број алкалоиди, од многу едноставни до доста сложени и комплексни структури. Не навлегувајќи подлабоко во биосинтезата на посебните групи алкалоиди, може да се каже дека аминокиселината орнитин е прекурсор на 5-члените прстени со N (пиролидин, пирилизидин, тропан), додека аминокиселината лизин на 6-члените прстени со N (хинолизидин и индолизидин). Секако дека во градењето на комплексните структури значајна улога имаат и други прекурсори, како што се: оцетна киселина, фенилаланин, триптофан, никотинска киселина и фенилпропанска киселина. Во биосинтезата на пиридинските алкалоиди како прекурсор се јавува никотинската киселина.

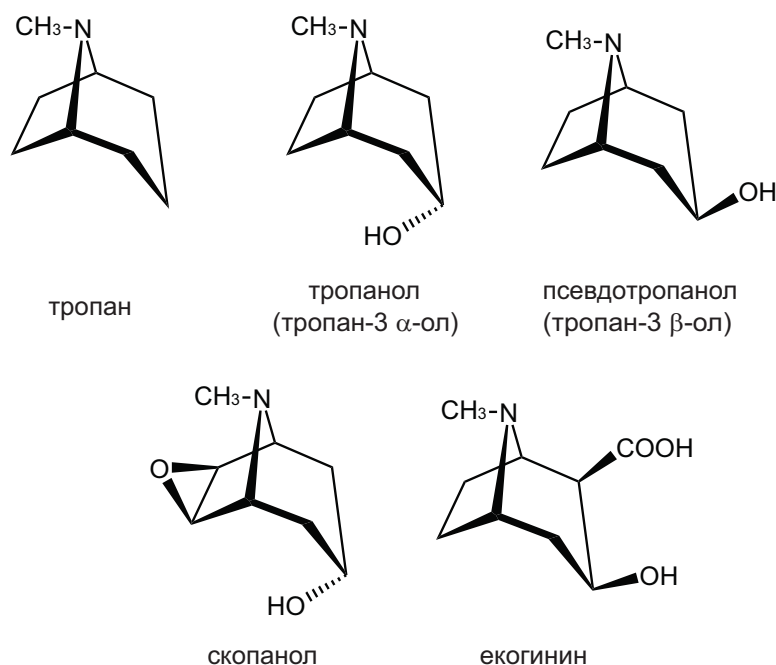
Во алкалоиди производи на лизин и на орнитин спаѓаат:

1. Тропански алкалоиди
2. Пиролизидински алкалоиди
3. Пиперидински алкалоиди
4. Индолизидински алкалоиди.

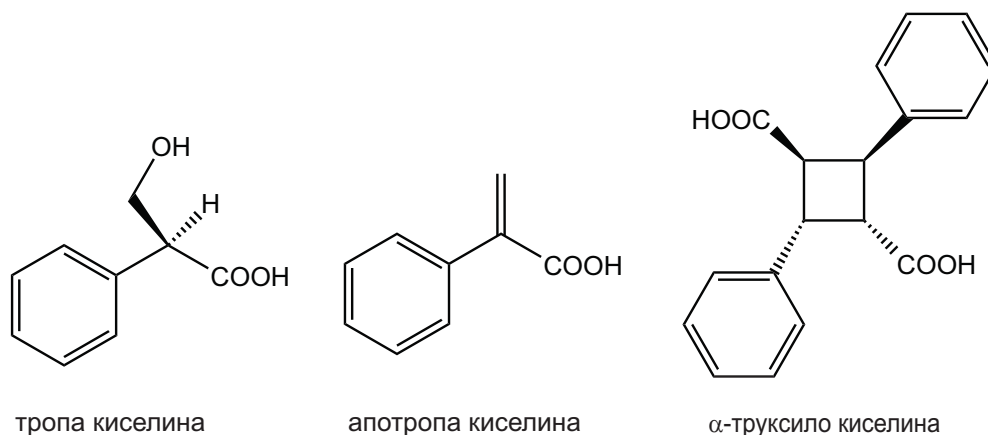
10.1.1. Тропански алкалоиди

Тропанските алкалоиди имаат тропански скелет, бициклична структура со вкупно 8 C-атоми бицикло-октан составен од условно кондензиран пиролидин и пиперидин со 2 заднички C-атоми и заеднички атом на азот (слика 193). Познати се околу 200 различни структури што се дистрибуирани во неколку фамилии од скриеносемени растенија, особено од фамилијата Solanaceae, во која спаѓаат некои зеленчукови растенија како што се компирот, доматиот, пиперката и други, но и неколку значајни медицински растенија како што се поамница, татула и буника.

Тропанските алкалоиди се естри на тропанските алкохоли тропаноли и алифатичните или ароматичните киселини. Во зависност од ориентацијата на хидроксилната група на C-3 атомот разликуваме две серии на тропански алкохоли. Дериватите на тропан-3 α -ол (вистински тропанол) се многу почести и влегуваат во градбата на вистинските тропански алкалоиди. Во отсуство на други супституенти, тропанолот е оптички неактивен. Тропанолите се често хидроксилирани на C₆, на C₇ или на двете позиции, а можна е и 6,7-епоксидација. Најзначајни тропаноли се тропанол и скопанол. Тропан-3 β -ол влегува во состав на екгонинските алкалоиди, кои се подгрупа на тропанските алкалоиди. Во природата речиси сите алкалоиди од оваа група се естри на алкохолот екгонин кој претставува тропан-3 β -ол супституиран на C-2 со β -конфигурирана карбоксилна група. Значаен алкохол од оваа група е псевдотропанол кој има бета-конфигурирана ОН-група на C-3, но нема карбоксилна група на C-2 (слика 193). Во градбата на естерските врски кај двете групи алкалоиди може да се вклучат алифатични киселини (оцетна, бутерна, изовалеријанска, тиглинска, ангелика) или ароматични киселини (тропа киселина, апотропа = атропинска киселина, бензоева, фенилоцетна, циметна киселина или нивни деривати) (слика 194). Поретко можат да се јават и хетероциклични киселини. Некои киселини покажуваат оптичка активност.



Слика 193. Структури на најзначајни тропански алкохоли



тропа киселина

апотропа киселина

 α -труксило киселина**Слика 194.** Ароматични киселини карактеристични за тропански алкалоиди

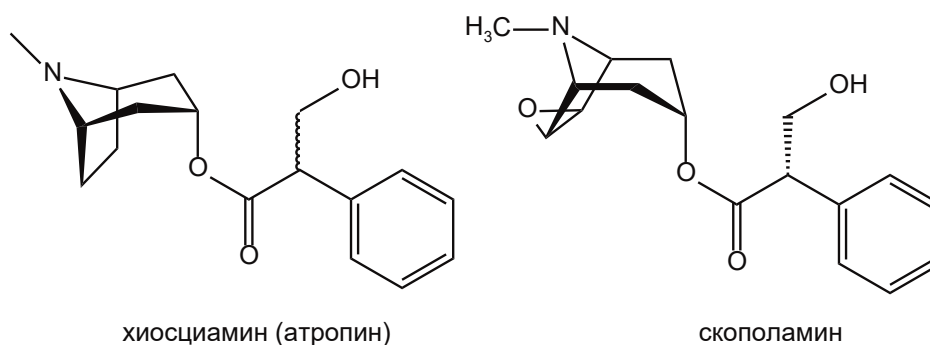
Најзначајни алкалоиди од групата на тропанските алкалоиди се апоатропин, хиосциамин и скополамин, а од групата на екгонинските кокаин и цинамоликокаин (слика 195). Кај двете групи алкалоиди се можни две конфигурации на N-метил групата (аксијална и екваторијална), но во алкалоидите што се од интерес за терапијата присутна е секогаш екваторијалната конфигурација. Помал број алкалоиди се јавуваат како димери како што се тропанските естри на дикарбоксилни киселини (труксилин, беладонин, шизантин D). Алкалоид хиосциамин е естер на тропанол и на тропна киселина. Физиолошки е активен левогирниот облик. Во текот на екстракцијата или во процесот на сушењето на растителниот материјал, хиосциаминот се изомеризира и дава рацемска смеса која се означува како ($\pm$)-атропин. Се смета дека атропинот не претставува природна (генуина) состојка на растенијата, туку се создава при обработката на собраниот растителен материјал (веројатно во текот на екстрактивните процедури). Естер на скопанол и на тропна киселина е алкалоид (-)-скополамин, а неговиот рацемат е ($\pm$)-атросцин. Естер на атропинската киселина е познат како апоатропин, а се јавува и во димерна форма како беладонин. Екгонинскиот алкалоид кокаин е двоен естер на екгонин со бензоева киселина и метанол, а цинамоилкокаин со циметната киселина и метанол (слика 195).

Естерските алкалоиди се нестабилни, особено (-)-хиосциаминот, кој брзо се разложува на тропна киселина и тропанол, а подоцна со интрамолекуларна дехидратација се трансформира во апотропа киселина која е оптички неактивна. Кај скополаминот кисела или алкална хидролиза доведува до создавање на (-)- и на ($\pm$)-тропа киселина. При ензимска хидролиза кокаинот се хидролизира до екгонин, метанол и бензоева киселина, додека парцијалната хидролиза доведува до формирање бензил-екгонин.

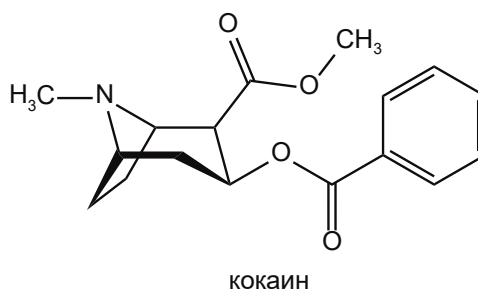
Од групата на вистинските тропански алкалоиди практична примена имаат алкалоидите атропин, хиосциамин и скополамин. Се добиваат со екстракција и изолација од растенијата поманица, татула, буника, бел бун, дубоиса и од др. извори. Се користат како конвенционални лекови, кај кои активната супстанција е добиена од природен материјал. Атропинот и хиосциаминот дејствуваат врз парасимпатикусот така што ги блокираат мускаринските рецептори. Со конкурентивните механизми инхибираат врзување на ацетилхолин за негови рецептори и предизвикуваат забрзана работа на срцето. Ја релаксираат мазната мускулатура, го намалуваат тонусот и перисталтиката на мазните мускули на дигестивниот тракт, го намалуваат бронхоспазматот предизвикан од ацетилхолин. Намалуваат секреција на слезина, солзи, пот, слез во респираторен тракт и ензими во органите на дигестивниот тракт. Во око то предизвикува пасивна мидријаза, парализирајќи ги мускулите на пупилата, при што го зголемуваат интраокуларниот притисок. Хиосциаминот и атропинот се користат како преанестетични средства, во офталмологијата за предизвикување мидријаза, како спазмолитици при спазам на мазна мускулатура (бубрежни, жолчни коли-

ки), како антидот при труење со некои габи, органофосфорни соединенија, некои гасови и слични агенси. Скополаминот дејствува парасимпатолитички на потполно ист начин, но со намален интензитет. Дејствува и врз централниот нервен систем седативно. Скополаминот се користи во терапијата на паркинсоновата болест, за опуштање на акутен и болен спазам на мазната мускулатура и во превенцијата на кинетозите (болест на патување). Атропинот и хиосциаминот се користат во форма на сол сулфат, а скополаминот како хидробромид.

деривати на тропанол



деривати на екгонин



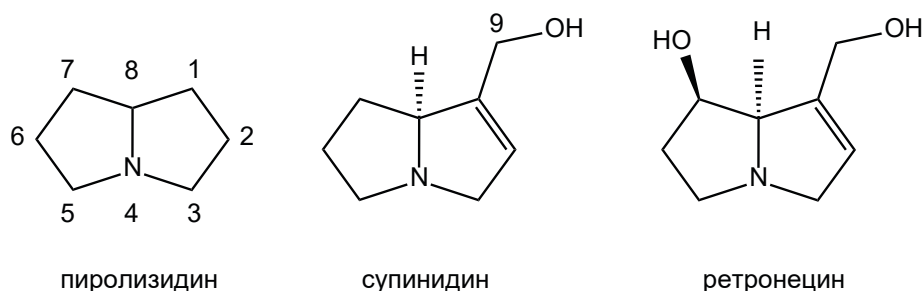
Слика 195. Најзначајни тропански алкалоиди

Екгонинските алкалоиди имаат ограничена употреба во терапија. Се добиваат од листови на различни видови од растението кока. Поголемо значење има кокаинот кој дејствува локално анестетично и вазоконстрикторно на периферната циркулација. Дејството се должи на блокирањето на транспортот на јоните преку клеточните мембрани на невроните и спречување на преносот на сигналите. Практична примена има кокаин хлорид, што се користи во офталмологија и оториноларингологија. Поради изразена токсичност на природните алкалоиди, како локални анестетични средства поголема примена имаат синтетските алкалоиди што претставуваат структурни хомолози на природниот кокаин. Кокаинот има силно стимулативно дејство врз ЦНС и спаѓа во наркотични средства што се злоупотребуваат. Несоодветна употреба перорално, со шмукување или парантерално создава зависност (кокаинизам). Во регионите на Јужна Америка во кои растението кока расте или се одгледува, локалното население традиционално користи листови од кока за цвакање и оваа појава се означува како кокаизам.

10.1.2. Пиролизидински алкалоиди

Пиролизидинските алкалоиди во најголема мера се јавуваат во растенијата од фамилиите Boraginaceae и Asteraceae. Претставуваат токсични супстанции и растителните суровини што ги содржат може да бидат токсични за човекот. Треба да се познава нивната хемија, физичко-хемиските својства и нивниот токсичен потенцијал како би се избегнале труења или други токсични манифестации при користење на вакви растителни суровини. Според хемиската градба пиролизидинските алкалоиди претставуваат естри што се формираат помеѓу аминокислотите и една или две алифатични монокарбоксилни или дикарбоксилни киселини. Аминокислотите се викаат уште и нецин-бази, а најчесто ги имаат следните карактеристики на основниот скелет (слика 196):

- C_1 - CH_2OH -група (при што C -атомот од ова група има позиција 9),
- C_1 - C_2 - незаситена врска (често присутна),
- C_7 - присуство на супституент.



Слика 196. Пиролизидински аминокислоти (нецин бази)

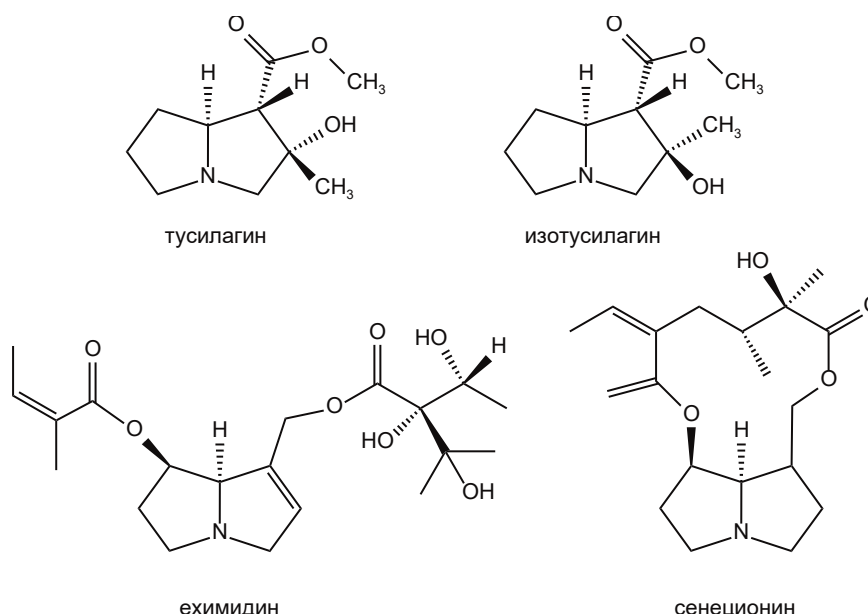
Пиролизидинските алкалоиди се јавуваат како (слика 197):

- естри на монокарбоксилна киселина со OH -групата на позицијата C_9 од алкохолот;
- диестри на монокарбоксилните киселини со OH -групите на позициите C_7 и C_9 од алкохолот;
- макроциклични диестри на дикарбоксилните киселини со истовремена естерификација на OH -групите на позициите C_7 и C_9 од алкохолот.

Како киселини се јавуваат најчесто т.н. нецин киселини со алифатични низи долги од 5 до 10 C -атоми, со една или со две $COOH$ -групи.

Денес се потврдени повеќе различни биолошки дејства на пиролизидинските алкалоиди. За дејството се задолжени пиrolните естри што настануваат како разградни продукти од нивниот метаболизам. Пиrolните естри се силни алкилирачки агенси и се врзуваат за нуклеофилите во биолошките средини (ДНК, протеини, ензими) манифестирајќи цитотоксично, хепатотоксично, мутагено или друго дејство. Најтоксични во оваа смисла се макроцикличните диестри. Незаситената врска на C_1 дополнително ја зголемува токсичноста. Акутните труења со пиролизидинските алкалоиди ретко се случуваат. Многу позначајни се хроничните труења што настануваат со подолготрајна употреба на растителни суровини и екстракти што ги содржат, а се манифестираат

со губење на апетит, абдоминални болки, едем на екстремитети, хепатотоксични промени (хепатомегалија и цирроза) и др.

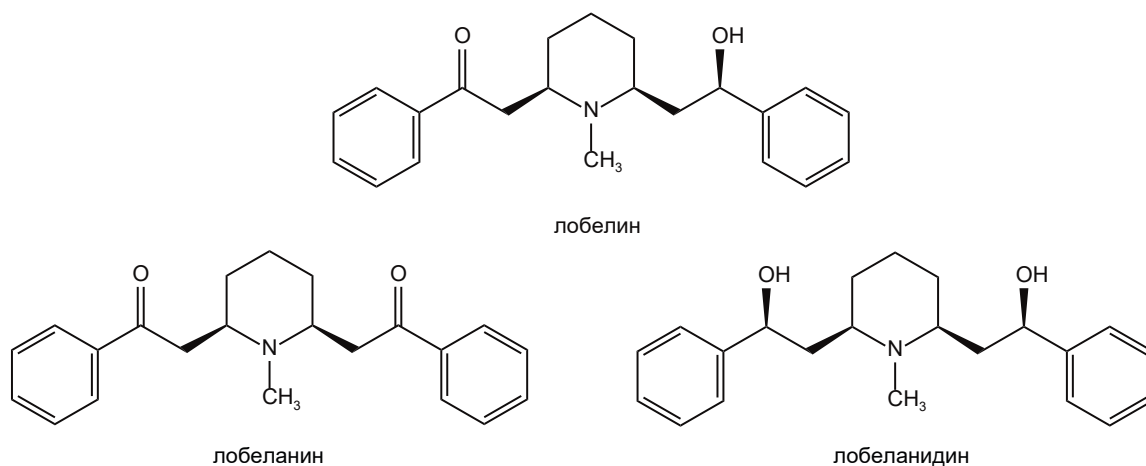


Слика 197. Структури на некои моноестерски, диестерски и макроциклични естерски пирилизидински алкалоиди

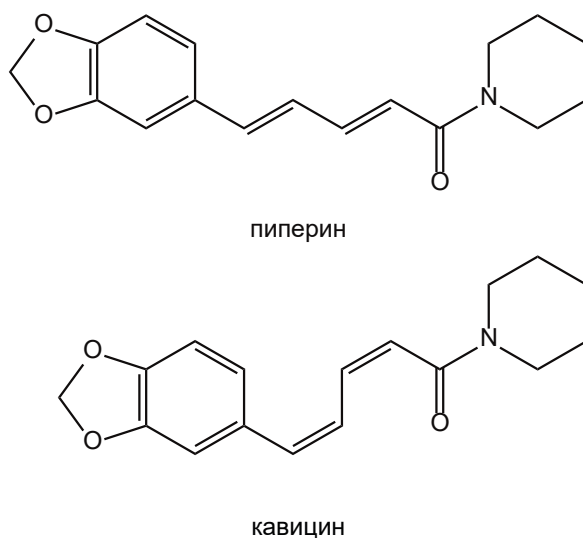
Денес е познато дека одредени растителни сировини што се користат во традиционалната медицина, но и во современата фитотерапија, претставуваат потенцијално токсични сировини поради содржината на пирилизидинските алкалоиди. Растителни сировини што ги содржат се: лист од подбел кој се користи во третманот на кашлица, корен од гавез или црн корен кој има изразено антиинфламаторно дејство, корен и лист од растението лопух што се користат во третманот на проблеми во респираторниот тракт и за превенција од мигрена и др. Според современите фитотерапевтски препораки, растителни сировини што содржат пирилизидински алкалоиди треба да се користат само во препарати за надворешна употреба. Сепак, на пазарот се присутни и хербални лекови и уште повеќе различни додатоци на исхраната што содржат пирилизидински алкалоиди како придружни, непосакувани состојки во екстрактите. Самата растителна сировина може да биде, врз база на хемизамот и дејството на активните состојки, сметана за безбедна сировина ако не се познава дека истата природно содржи пирилизидински алкалоиди. На слика 197 се прикажани структури на некои пирилизидински алкалоиди меѓу кои со особена токсичност се издвојува сенеционин кој претставува макроцикличен естер со дополнителна двојна врска на позицијата C₁. Токму макроцикличните естри се состојките што покажуваат најизразена токсичност. За некои растителни сировини се воведени строги ограничувања во нивната употреба или се сосема напуштени. Треба да се напомене дека пирилизидинските алкалоиди кои се јавуваат како моноестри и кои имаат заситен пирилизидински прстен (без двојна врска на C₁) речиси да не покажуваат хепатотоксичност. Такви алкалоиди се тусилагин и изотусилагин (слика 197) кои се присутни во различни видови од Asteraceae. Присутни се на пр., во растението ехинацеа што денес се користи како хербален лек и како додаток на исхраната, со имуностимулативно дејство. Бидејќи ги содржи алкалоидите тусилагин и изотусилагин, и покрај изразено нискиот токсичен потенцијал, како мерка на претпазливост воведена е препорака производите на база на ехинацеа за перорална употреба да не се користат во еден терапевтски циклус подолго од 8 недели.

10.1.3. Пиперидински алкалоиди

Пиперидинските алкалоиди настануваат како производи на метаболизмот на аминокиселината лизин. Вообичаено биосинтезата на алкалоидите што претставуваат деривати на лизин, покрај аминокиселината како прекурсори ги вклучува и адекватните амини или киселини на лизин, односно аминот кадаверин и пипеколинската киселина. Најзначајни алкалоиди од оваа група се:



Слика 198. Алкалоиди од групата на лобелин



Слика 199. Пиперидински алкалоиди на биберот

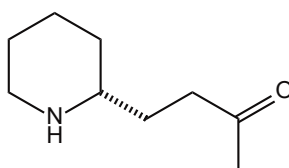
- Лобелини (лобелин, лобеланин, лобеланидин и др. изолирани од лобелиа, *Lobelia inflata*) (слика 198). Најзначаен алкалоид е лобелинот, кој дејствува стимулативно врз дишењето и ја

подобрува респирацијата. Ги стимулира и ганглиите и β -адренергичните рецептори. Во поголеми дози е токсичен и врши парализа на ганглиите. Чист лобелин (како лобелин хидрохлорид) се користи во препарати наменети: за одвикнување од пушење, за стимулирање на дишењето, кај новороденчиња, и за третман на труења настанати со средства што дејствуваат депресивно врз ЦНС. Аналептичното дејство му е краткотрајно.

- Пиперин и кавицин изолирани од плодот на биберот (црн пипер) (*Piper nigrum*). Претставуваат амиди на пиперидин со соодветните киселини: пиперинска и кавицинска киселина (слика 199).

Плод од бибер се користи: како зачин и како арома-супстанција, покажува антиоксидативна активност, претставува луто ароматично средство (*acria aromatica*) што се користи за поттикнување на апетитот и подобро варење на храната. Експериментално е потврдено дека пиперин дејствува смирувачки врз ЦНС.

- Пелетиерини, алкалоиди што се изолираат од кора на калинка. Најзначаен е пелетиеринот (слика 200), покрај изопелетиеринот, метилпелетиеринот и др. Овие алкалоиди се многу се токсични и порано се користеле како антхелминти (средства за уништување на цревни паразити). Денес ретко се користат, главно во ветеринарната медицина за уништување на тенија.

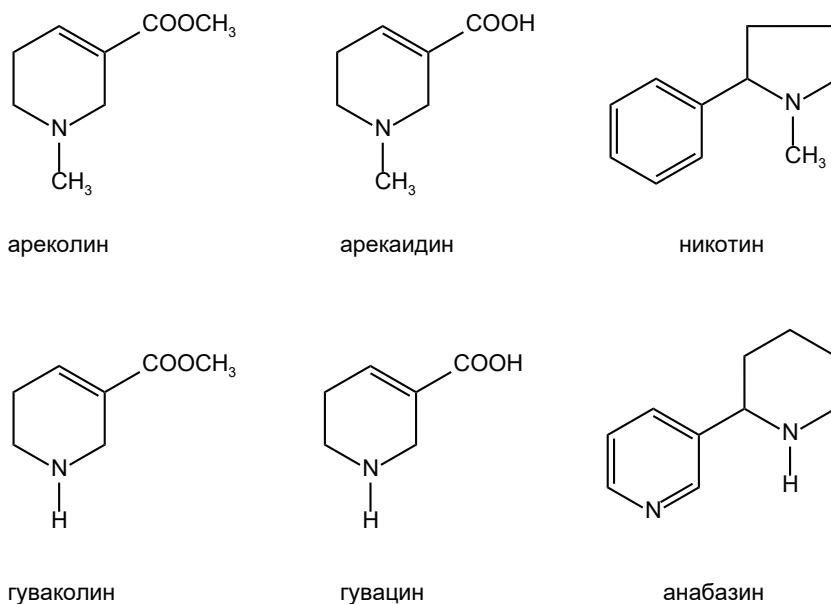


пелетиерин

Слика 200. Основен алкалоид во групата на пелетиерините

10.1.4. Пиридински алкалоиди

Пиридинските алкалоиди се деривати на никотинска киселина. Опфаќаат мал број структури од кои позначајни се следните (слика 201):



Слика 201. Пиридински алкалоиди, деривати на никотинска киселина

- Никотин. Се добива од листовите на тутунот, *Nicotiana tabacum* и *N. rustica*, Solanaceae. Претставува маслена течност со изразена хигроскопност. Настанува како производ на метаболизмот на никотинска киселина и аминокиселината орнитин. Во растителното ткиво се наоѓа во облик на сол со лимонска киселина. Во чиста состојба најмогу се изолира од лист од тутун, но може да се произведува и синтетски. Многу е токсичен и не наоѓа примена во терапевтски цели. Се користи како силен инсектицид и како антипаразитик во ветеринарната практика. Значаен е како појдовна супстанција за добивање никотин амид и никотинска киселина.
- Ареколин, арекаидин, гувацин и гуваколин. Се добиваат од семето на палмата катеху, *Areca catechu*, Araceae. Ареколин е парасимпатомиметик кој дејствува врз мускаринските рецептори, а во поголеми дози и врз никотинските. Предизвикува вазодилатација, хипотензија, брадикардија, го зголемува тонусот и перисталтиката на интестинумот, ја зголемува секрецијата на плунката и на егзокрините жлезди. Нема примена во хуманата медицина. Се користи како антихелминтик во ветеринарната медицина. Палмата катеху расте во тропските делови на Азија и на островите во Тихиот Океан. Се смета дека потекнува од Филипините и дека во другите региони е внесена како одгледувана култура. Се одгледува како украсно растение заради убавиот изглед. Во некои делови од тропска Азија (јужни и југоисточни региони), арека семе се премачкува со варна каша и се завиткува во лист од палма бетел и потоа цвака, сè до добивање на влакнеста структура која се исплукува. „Цвакањето бетел“, како што се нарекува оваа практика, овозможува внесување на алкалоидите од арека семе во организмот, кои го намалуваат чувството за глад и потребата од внесување на храна.

- Анабазин. Се добива од сув надземен дел (херба) од растението анабазис, *Anabasis aphylla*, *Amaranthaceae*. Нема примена во хуманата медицина. Се користи како контактен инсектицид и како антипаразитик во ветерината, на ист начин како и никотинот. Претставува појдовна супстанција за добивање никотинска киселина и никотин амид.

10.2. Алкалоиди што се производи на фенилаланин и на тирозин

Голем број алкалоиди во растителниот свет се создаваат преку метаболизмот на аминокиселините фенилаланин и тирозин или од соодветните амини што настануваат со декарбоксилација на киселините. Од киселините се создаваат протоалкалоиди од фенилетиламински тип, што не претставуваат алкалоиди во вистинска смисла на зборот, бидејќи во својата градба немаат хетероцикличен прстен со азот, туку азотот е врзан во бочен ланец во составот на амидна или на аминогрупа. Правилните алкалоиди од оваа група настануваат од амините (фенилетиламин и тирамин), а во биосинтезата може да биде вклучен и некој од хомологните амини (на пр. допамин) или изопрен. За овие алкалоиди е карактеристичен изохинолински прстен, настанат со циклизација на амините. Оттука, оваа голема група на алкалоиди се дели на: фенилетиламински алкалоиди и изохинолински алкалоиди. Изо-хинолинските алкалоиди се голема група соединенија што опфаќа алкалоиди со различни структури како што се:

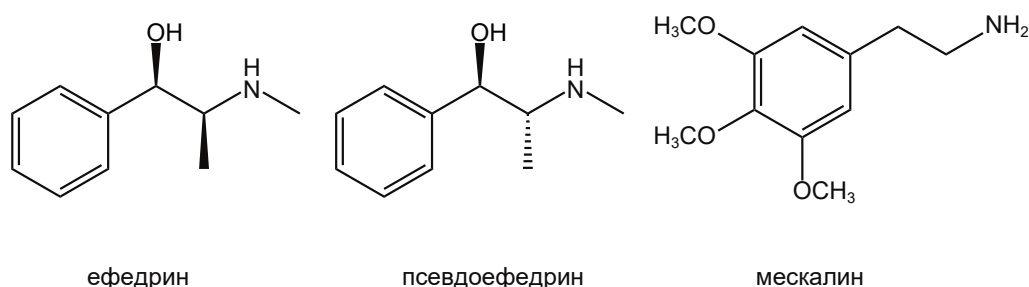
1. Прости тетрахидроизохинолински алкалоиди,
2. Бензилтетрахидроизохинолински алкалоиди,
 - бензилизохинолински алкалоиди,
 - бисбензилтетрахидроизохинолински алкалоиди,
 - апорфински алкалоиди,
 - протоберберински алкалоиди,
 - морфинански алкалоиди и др.
3. Фенилетилизохинолински алкалоиди,
4. Алкалоиди на претставници од *Amaralldaceae*,
5. Монотерпенско-изохинолински алкалоиди.

10.2.1. Фенилетиламински алкалоиди

Фенилетиламинските алкалоиди се јавуваат во голем број растенија. Најзначајни се ефедрин, псевдоефедрин и други слични алкалоиди и соодветни *нор* и *N,N*-диметил деривати на ефедрин и псевдоефедрин, што се изолирани од различни претставници од родот *Ephedra* (слика 202). Во терапевтски цели се користи само (–)-ефедрин.

Ефедринот дејствува како индиректен симпатомиметик. Структурно е многу сличен со адреналинот, дејствува како адреналин, но со послаб интензитет. Активноста се должи на директна стимулација на α и β -адренергичните рецептори и индиректната активност, преку ослободувањето на норадреналинот од депоата во пресинаптичките завршетоци на норадренергичниот вегетативен нервен систем. Како резултат на активноста настануваат: вазоконстрикција, зголемување на крвниот притисок, релаксација на мазните мускули на бронхиите (бронходилатација) и на

гастроинтестиналниот тракт, мидријаза, зголемена контрактилност на скелетните мускули, зголемена метаболичка активност (гликогенолиза и липолиза). Во терапевтски дози ефедринот го зголемува крвниот притисок и врши периферна вазоконстрикција. Го стимулира ЦНС и центарот за дишење. Во терапија се користи како назален деконгестив и за сузбивање на симптомите на настинка. Како бронходилататор се користи во симптоматскиот третман на бронхијалната астма. Се користи како сол ефедрин хидрохлорид во форма на таблети, раствори (капки за око и уво), инхалациони спрејови или инјекции.



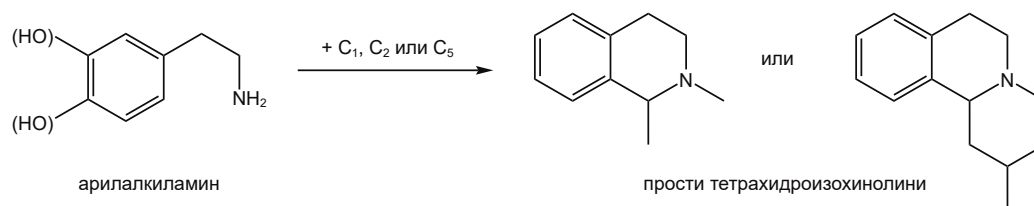
Слика 202. Фенилетиламински алкалоиди

Во фенилетиламинските алкалоиди спаѓаат мескалин (3,4,5-триметоксифенилетиламин) и нему слични структури што се наоѓаат во посебен вид кактус (*Echinocactus*), наречен пејотл. Овој кактус расте во сушни и полупустински предели во Мексико и во Тексас. Мескалинот (слика 202) дејствува стимулативно врз ЦНС, така што предизвикува халуцинации, слични на оние што ги предизвикува синтетскиот халуциноген агенс LSD. Нема примена во терапијата. Се користи во разновидни религиозни ритуали за предизвикување состојба на транс. Парчиња од исушен пејотл се користат како стимулативно средство за зголемување на физичката сила и работоспособноста кај домородците во Мексико и во другите региони од средна Америка. Продолжената употреба на пејотл и хроничната изложеност на мескалин предизвикуваат зависност.

10.2.2. Изохинолински алкалоиди

10.2.2.1. Прости и тетрахидроизохинолински алкалоиди

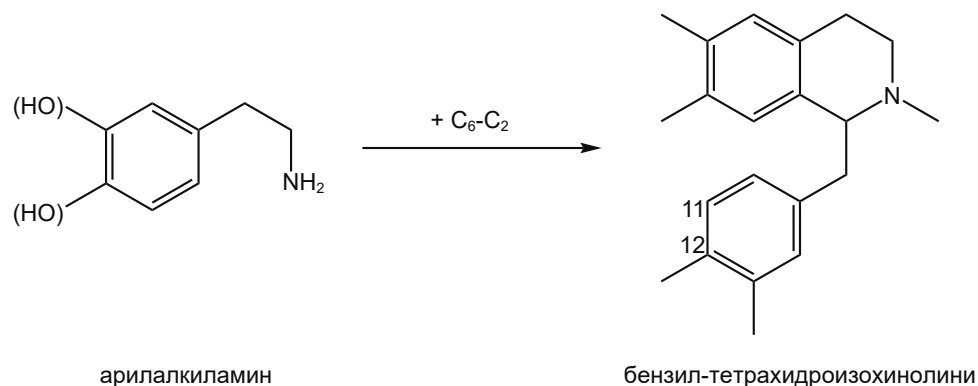
Алкалоиди од оваа група се создаваат од пирогроздова киселина (C_2) или од леуцин (C_3) во реакција со арилалкиламин при што се формира 1-алкилтетрахидроизохинолин. Во реакција со формалдехид (C_1) се создава тетрахидроизохинолин (слика 203). Немаат поголемо значење во медицината ниту пошироко.



Слика 203. Создавање на основни структури на тетрахидроизохинолински алкалоиди

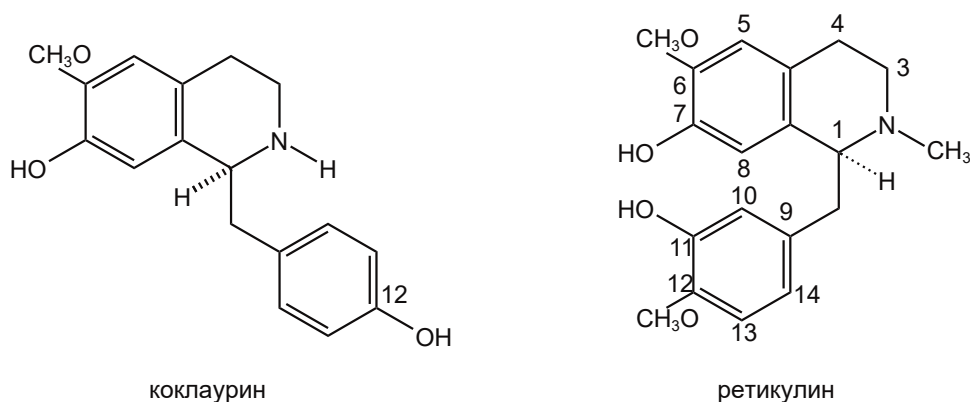
10.2.2.2. Бензилтетрахидроизохиолински алкалоиди

Алкалоидите од оваа група се тетраhydro деривати на изохиолин. Основна карактеристика на овие соединенија е скелет кој има општа структура $C_6-C_2-N-C_2-C_6$. Овој скелет се создава во реакција на арилалкиламин со аминокиселината тирозин (C_6-C_2) (слика 204).



Слика 204. Создавање на основна структура на бензилтетрахидроизохиолински алкалоиди

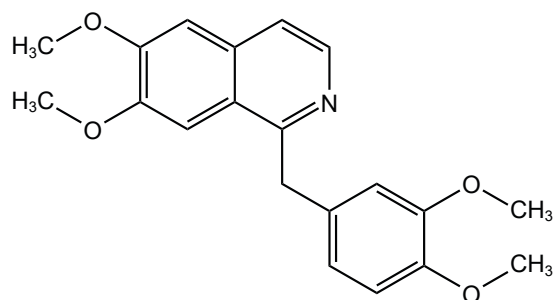
Во групата на бензилтетрахидроизохиолински алкалоиди најчесто се присутни структурите од коклаурински тип (12-моносупституирани деривати) или од ретикулински тип (11,12-дисупституирани деривати) (слика 205). Овие две структури се прекурсори на сите изохиолински алкалоиди. Во позициите 6 и 7 најчесто се супституирани со одредени групи и се поврзани со бензолово јадро кое може да има дополнителни радикали во една, во две или во три положби.



Слика 205. Прекурсори на изохиолинските алкалоиди

10.2.2.3. Бензилизохинолински алкалоиди

Доколку коклауринот се редуцира до бензилизохинолин се создаваат алкалоиди бензилизохинолини, од кои најзначаен е папаверин (слика 206). Се наоѓа во млечниот сок на растението афион (*Papaver somniferum*, Papaveraceae). Дејствува спазмолитично врз мазната мускулатура, особено врз церебралните, пулмонарните и периферните крвни садови, бронхиите, интестинумот, уретрите и мочниот меур. Има одреден ефект врз срцето, ја намалува ексцитабилноста и го подобрува коронарниот крвоток. Активноста му се должи на способноста да ги инхибира фосфодиестеразите што се задолжени за хидролиза на cAMP, со што се зголемува концентрацијата на cAMP во клетките, а се намалува концентрацијата на клеточниот Ca^{2+} .



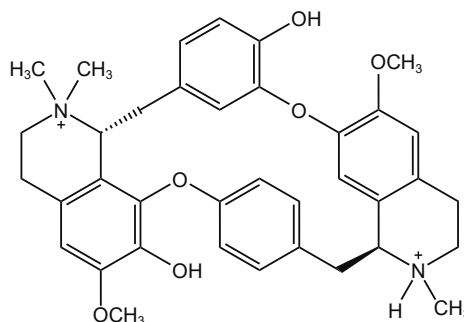
Слика 206. Бензилизохинолински алкалоид папаверин

Папаверинот се користи во терапија на циркулаторните болести како што е церебралната инсуфициенција, за подобрување на симптомите на сенилност и во терапија на исхемија на око. Се користи и во терапијата на капиларна фрагилност, во комбинација со други средства. Како анти-спазмодик влегува во состав на препарати наменети за третман на stomachни тегоби (надуеност, дијареја и др.). Се изолира од млечниот сок (од исушениот млечен сок односно опиум) или од сувите зрели чушки на афионот, а како лековита супстанција се користи сол папаверин хидрохлорид.

10.2.2.4. Бисбензилтетрахидроизохинолински алкалоиди

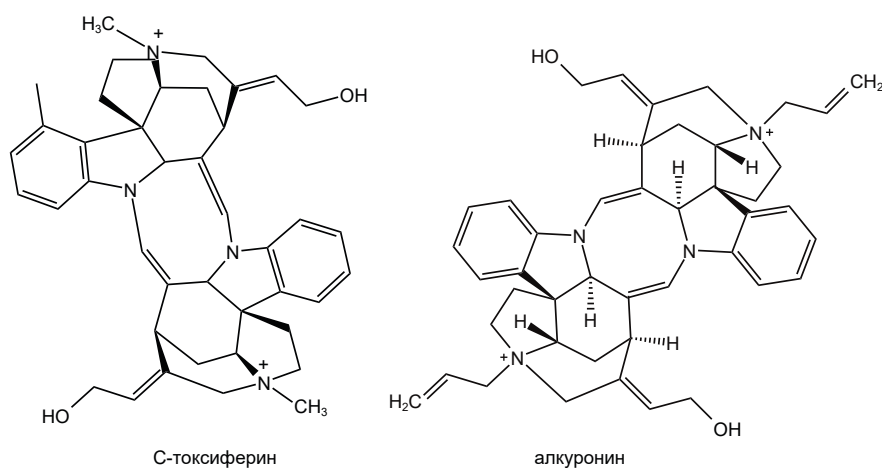
Бисбензилтетрахидроизохинолински алкалоиди претставуваат голема група соединенија (околу 400) кои се создаваат со поврзување на коклауринска и ретикулинска структура во димерна форма. Се јавуваат во претставници од околу 10 фамилии, меѓу кои најзначајна е фамилијата Menispermaceae. Класификација на оваа голема група алкалоиди се прави врз база на: видот на „димер“ структурата (дали е од глава-опаш или опаш-опаш тип), во зависност од начинот и местата на врзувањето, број на т.н. мостови во молекулата, видот на врската помеѓу двата дела од молекулата и видот на супституентите. И покрај големиот број структури, само неколку алкалоиди од оваа група наоѓаат практична примена поради специфичната фармаколошка активност. Значајни се алкалоидите што се изолираат од една густа понекогаш цврста маса што се добива со извривање на водени екстракти од гранки, листови, кори и корени од неколку растенија од Menispermaceae, а која е позната под називот кураре. Овој производ е историски познат по неговата употреба како отров за стрели во прашумите на Амазонија. Зависно од кои растенија се добива содржи различни алкалоиди, но во основа нивната фармаколошка активност е речиси идентична.

Се пакува во туби од бамбус и се нарекува тубо-кураре. Најзначаен алкалоид е декстрогирниот (+)-тубокурарин (слика 207) кој се означува со кратенката DTC. Тој е токсичен бисбензил-изохинолин чија структура е утврдена во 1970 год. Се состои од две коклаурински единици што се асиметрично поврзани со два кислородни моста. Двата азота во структурата се кватернерени, поради што тубокураринот се однесува како кватернерна амониумова база. Други слични алкалоиди се: курин, изохондродентрин, хондрокурин и др.



Слика 207. (+)-Тубокурарин

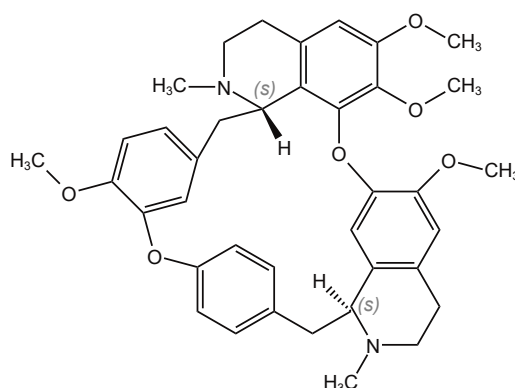
Кураре алкалоиди по перорална употреба не се ресорбираат и мора да се користат парентерално. Ги блокираат холинергичните рецептори на моторните плочи на скелетните мускули, блокирајќи го врзувањето на ацетилхолинот. Како последица на блокадата се предизвикува релаксација на мускулниот тонус и прогресивна парализа. Природни кураре алкалоиди, тубокурарин како тубокурарин хлорид, се користат како миорелаксанти средства во хирургија за отпуштање на мускулите, а се применуваат паралелно со анестезија. Развиваат значајни несакани ефекти (блокирање на ганглиите, хипотензија), а го ослободуваат и хистаминот и доведуваат до бронхоспазам. Поради несаканите ефекти, денес се користат нивни полусинтетски и синтетски деривати, со зачувана активност, а со помала токсичност.



Слика 208. Бисиндолни алкалоиди со миорелаксантно дејство (природен С-токсиферин и полусинтетски добиен алкуронин)

Отровот кураре се подготвува и од делови на растенија што припаѓаат на фамилијата Loganiaceae. Алкалоидите што ги синтетизираат растенијата од оваа фамилија се биосинтетски деривати на аминокиселината триптофан. Спаѓаат во групата на индолни алкалоиди, и тоа бисиндолни структури што имаат слично однесување и дејство како бисметин. Најзначаен алкалоид е С-токсиферин кој дејствува миорелаксантно на начин на кој дејствува и тубокураринот. Многу е токсичен и во практиката, во анестезиологијата, се користи полусинтетски дериват алкуронини, кој хемиски претставува N,N-диалил-нортоксиферин (слика 208).

Во бисбензилтетрахидроизохинолински алкалоиди спаѓа и тетрандрин (слика 209), кој е изолиран од коренот на растението *Stephania tetrandra*, Menispermaceae и од други кинески и јапонски растенија од истата фамилија. Покрај тетрандринот, тетрандра содржи и многу други алкалоиди со слична структура. Корен од тетрандра се користи во традиционалната кинеска медицина за ублажување на болка и за зголемување на диурезата. Испитувањата покажуваат дека тетрандринот поседува низа значајни биолошко-фармаколошки дејства: антиинфламаторно, имунолошко и антиалергено дејство; инхибира дегранулацијата на мастоцити; има антиаритмичко дејство слично на дејството на хинидин; дејствува вазодилататорно и антихипертензивно; поседува потенцијал за третман на заболување на црниот дроб; поседува потенцијал за намалување на вишок лузни/фиброза во конјунктивата во случаи на тешки воспаленија на истата; има антифиброгено дејство и сл. Во експериментални студии на глупци тетрандринот покажал ефикасност против вирусот на ебола. Има потенцијал за третман на тинитус (зуење во увото).

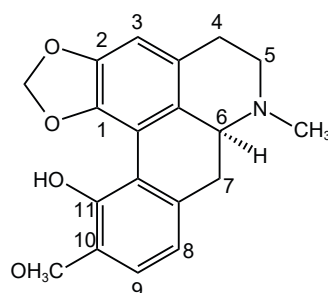


Слика 209. Структура на тетрандрин

10.2.2.5. Ајорфински алкалоиди

Апорфински алкалоиди се голема група соединенија, околу 500, со структури на проапорфини и апорфини и нивни деривати. Апорфини се N-метил деривати што на C_1 и C_2 имаат хидроксилна, метокси или метилendioксигрупа. Често се супституирани на C_9 и на C_{10} , или на C_{11} , во едната или во двете позиции, поретко на C_8 или на C_3 . На C_7 се понекогаш оксидирани, поретко на C_4 , а познати се и 7-алкил апорфини и различни деградациони производи од коишто позначајни се фенантрени. Типичен апорфински алкалоид е булбокапин кој се наоѓа во растенија од родот *Corydalis* (особено европскиот вид *Corydalis cava*) и родот *Dicentra*, од фамилијата Fumariaceae (слика 210). Познат е по својата токсичност и фаталните труења кои биле предизвикани кај овците и говедата кои паселе надземни делови од растенијата *Corydalis* (особено американски вид *C. caseana*). Се покажа дека булбокапинот дејствува како инхибитор на ацетилхолинестераза и инхибитор на биосинтезата на невротрансмитерот допамин. Инхибира формирање на амилоид бета-протеински (Aβ)

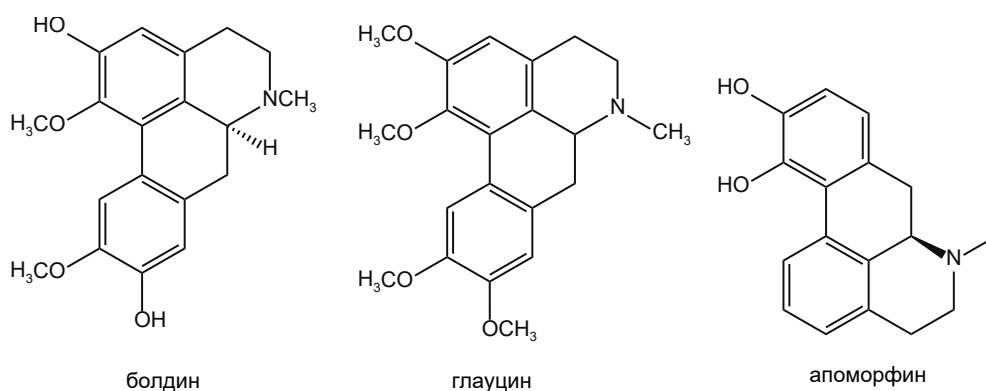
влакна, чие присуство е белег на Алцхајмерова болест. Оттука, булбокапинот е потенцијален терапевтски лек за оваа болест, според хипотезата за амилоид и неговото значење за развојот на Алцхајмер. Има потенцијал за инхибиција на рефлексните и моторните активности на напречно-пругастите мускули. Се користи во лекувањето на мускулниот тремор и вертиго (вртоглавица).



Слика 210. Структура на булбокапин

Апорфинските алкалоиди генерално покажуваат значајни биолошко-фармаколошки дејства. Тие се: депресори на ЦНС, антагонисти на допаминот, антитусици, фунгистатици и др. Се користат чисти во изолирана состојба како лекови. Растителните сировини што содржат апорфински алкалоиди, освен што се користат за изолација на алкалоидите, претставуваат многу важни сировини за производство на екстракти кои се користат за производство на хербални лекови и на додатоци на исхраната со определено дејство. Позначајни апорфински алкалоиди се:

- Болдин. Се наоѓа во листот од растението болдо (*Peumus boldus*, Monimiaceae) кои се користат за подготовка на екстракти што имаат позитивно влијание врз функцијата на дигестивниот тракт. Болдо е ниско дрво или грмушка што расте во аридните подрачја од Чиле. Листот од болдо има својствен мирис и горчлив вкус. Содржи околу 0,2-0,5 % вкупно алкалоиди од апорфински тип, меѓу кои е најзначаен болдин (слика 211).



Слика 211. Структури на некои природни и полусинтетски добиени апорфински алкалоиди

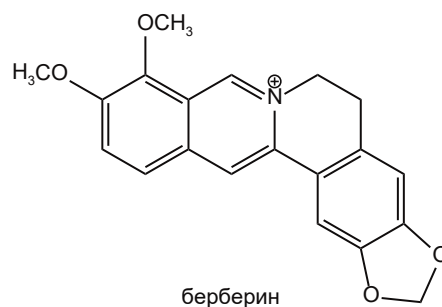
- Алкалоидот болдин и екстрактите што го содржат дејствуваат позитивно врз продук-цијата на жолчката и релаксирачки врз мазната мускулатура во дигестивниот тракт (холеретично и спазмолитично). Експериментално е потврдено дека екстрактите од болдо поседуваат антиоксидативно дејство (инхибираат липидна пероксидација кај стаорци и дејствуваат хепатопротективно при индукција на оксидативен стрес на црн дроб со јаглен тетрахлорид). Листот од болдо и екстрактите се користат за производство на традиционални хербални лекови за стимулација на жолчниот тракт, за третман на нарушувања во варењето на храната (диспепсија), како стомахик, седатив, диуретик и антисептик. Во голема мера екстрактите што соржат болдин се користат за производство на додатоци на исхраната наменети за одржување на здравјето на дигестивниот тракт, за подобрена функција на жолчката и како стомахик и спазмолитик.
- Глауцин. Апорфински алкалоид со 4 ОН-групи, на позициите 1, 2, 9 и 10 (слика 211). Се наоѓа во претставници од родот *Glaucium*, Papaveraceae (*Glaucium flavum* и *Glaucium oxylobum*) и во некои видови од Euphorbiaceae. Има бронходилататорно, невротептично и антиинфламаторно дејство. Во медицината се користи како лек за сува, непродуктивна кашлица (антитусик). Од неодамна се утврдени несаканите ефекти што може да ги предизвика: седација, замор и халуцинации што се карактеризираат со шарени визуелни слики. Врз база на халуциногеното дејство категоризан е како нова психоактивна дрога. Испитувањето на механизмот на халуциногеното дејство покажа големи сличности со халуциногеното дејство на познати халуциногени, како што се мескалин и псилоцибин.
- Апоморфин. Полусинтетски производ што се добива со кисела деградација на морфин на висока температура. Претставува допаминергичен D2 агонист и многу значаен лек за третман на Паркинсонова болест (супкутани инјекции), во напредна фаза од болеста. Апоморфинот може да предизвика гастроинтестинални пречки (гадење и емеза) и вообичаено се дава заедно со некој допаминергичен антагонист, за да се превенира емезата. Од друга страна, еметичната активност на апоморфинот наоѓа примена за предизвикување емеза при различни труења, но само во случаи кога емезата не е контраиндицирана. Апоморфинот наоѓа примена во програмите за одвикувањето од алкохолизам. Инхибира формирање на амилоидни бета-протеински влакна и се разгледува како потенцијален лек за третман на Алцхајмеровата болест.

10.2.2.6. Протоберберински алкалоиди

Протоберберините се широко распространети алкалоиди со тетрацикличен скелет во кој азотот е дел од циклусот и може да биде кватернерен (4-валентен) или терцијарен (3-валентен). Поседуваат разновидна и интересна биолошка и фармаколошка активност. Денес, неколку природни или делумно трансформирани чисти алкалоиди се користат во терапевтски цели. Растителни суровини и екстракти што ги содржат се користат за производство на традиционални хербални лекови, но сè повеќе и за производство на додатоци на исхраната. Најзначајни протоберберински алкалоиди во оваа смисла се:

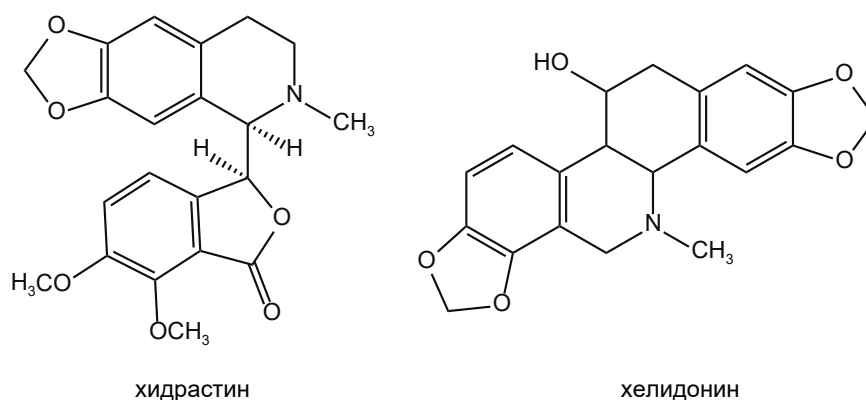
- Берберин, антибактериски агенс, фунгистатик и антипаразитик, изолиран од кисел трн (*Berberis vulgaris*) (слика 212). Во терапијата се користи за лекување инфекции и иритации на око. Традиционално, коренот се користи како холагог, стомахик, тоник и антихеморагично средство (запира крвавења). Во народната медицина е хемостатик што се користи при продолжени менструални крвавења. Изолиран берберин поседува изразено антимикробно дејство врз повеќе грам-позитивни и грам-негативни бактерии, врз некои габи и некои протозои. Најновите истражувања покажуваат дека може да се користи во третманот на тип 2 дијабетес мелитус (антидијабетик). Додатоци на исхраната со берберин или со екстракти од кисел

трн што содржат берберин се промовираат за здравје на кардиоваскуларниот систем и како поткрепа на имунолошкиот систем и на метаболизмот.



Слика 212. Структура на берберин (протоберберински алкалоид со кватернерен азот)

- Хидрастин, алкалоид изолиран е од коренот од растението канадска жолтика (*Hydrastis canadensis*) (слика 213). Канадската жолтика се користи во народната медицина за запирање на продолжени менструални крвавења. Поседува антиинфламаторно дејство. Поголема практична примена има чист изолиран алкалоид кој во форма на хидрастин хлорид се користи за производство на капки за очи за третман на конјуктивата при појава на сезонски алергиски реакции. Екстракт од канадска жолтика се користи за производство на додатоци на исхраната што се наменети за регулирање на физиолошките функции на респираторниот тракт, но и за третман на кашлица, за подигање на имунолошкиот систем, смирување на воспалителни процеси во респираторниот тракт и слично. Наоѓа примена за третман на гастроинтестинални нарушувања.



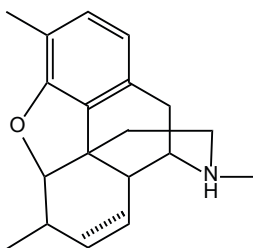
Слика 213. Структури на протоберберински алкалоид со терцијарен азот

- Хелидонин, алкалоид изолиран од херба на растението руса или змиско млеко (*Chelidonium majus*) (слика 213). Хербата од руса се користи како спазмолитик, холеретик и холагог. Има и слабо аналгезично дејство. Спазмолитичната активност се должи на хелидонинот. Во фитотерапијата се користи во форма на различни фитопрепарати што содржат екстракт, прашок или тинктура од хербата. Најголем број препарати се наменети за третман на болести на црниот дроб, како холеретик и холагог. Сок од свежо растение се користи традиционално како кератолитик и кератопластик, за отстранување брадавици, орожнати делови околу прстите и на

петиците, плускавици и др. Се смета дека за ова дејство се одговорни хелеретринот и сангвинаринот и определени ензими коишто го помагаат дејството. Екстрактите од руса се користат за производство на додатоци на исхраната наменети за одржување на здравјето и функцијата на жолчниот тракт, на црниот дроб и на дигестивниот систем.

10.2.2.7. Морфински алкалоиди

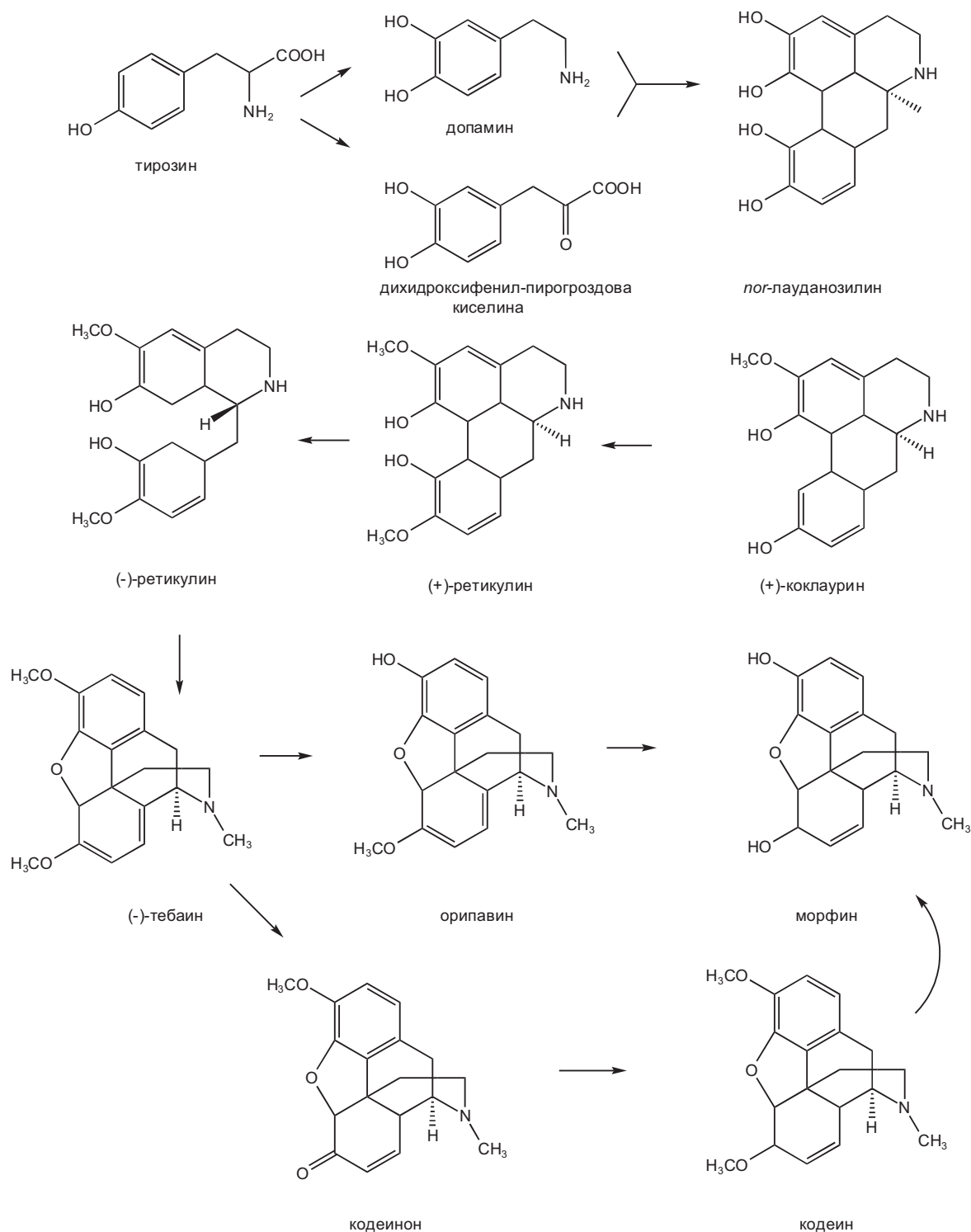
Морфинските алкалоиди се деривати на морфинан, ексклузивно врзани само за растението афион (*Papaver somniferum*) и неколку други видови од родот *Papaver*, кој токму поради биосинтезата на овој тип алкалоиди се разликува од другите родови од фамилијата Papaveraceae, што создаваат други класи на изохинолински алкалоиди. Родот *Papaver* опфаќа преку 100 различни вида, но само неколку од нив се интересни поради биосинтеза на морфинските алкалоиди. Најзначајни алкалоиди од оваа група се морфин и кодеин, покрај тебаинот, орипавинот, морфинонот и др.



Слика 214. Структура на морфинан

Морфинанот кој во основа е изохинолинско-фенантренски прстен се создава како производ на метаболизмот на тирозинот односно неговиот амин тирамин (слика 214). Резултатите од повеќето експерименти во кои биле користени маркирани изотопи на јаглерод недвосмислено потврдуваат дека тираминот се оксидира до допамин кој во реакција со дихидроксипирогроздова киселина создава прво прекурсор норлауданозилин од кој понатаму се создава прекурсорот коклаурин. За биосинтезата на морфинските алкалоиди неопходни се посебни ензими кои на ниво на високоспецијализираните клетки на секреторните канали на афионот го трансформираат коклауронот во ретикулин, и тоа од негов првичен декстрогирен облик во левогирен ретикулин кој може да циклизира во насока на создавање на тебаин. Во некои претставници од родот *Papaver* биосинтезата завршува во оваа фаза и тебаинот се добива како краен морфински алкалоид. Во афионот биосинтезата продолжува понатаму и од тебаинот кој хемиски е диметоксилиран морфинан, со деметилација на алкохолната ОН-група се добива кодеин, а со деметилација и на фенолната ОН-група морфин (слика 215). Кодеинот може да се деметилира до крајниот производ морфин. Самата биосинтеза е сложена и протекува со создавање на голем број различни интермедиери. Дел од од нив заостануваат необработени со ензимите поради што афионот во млечниот сок, покрај морфинот и кодеинот, содржи помали количества од тебаин, морфинон, кодеинон, орипавин, норлауданозили, лауданозилин и др. состојки што се однесуваат како алкалоиди и се дел од вкупната смеса на морфинските алкалоиди на афионот.

Морфинските алкалоиди уште се нарекуваат опиумски алкалоиди бидејќи се наоѓаат во опиумот. Опиумот е исушен млечен сок кој истекува од зарезани, зелени, афионови чушки. Претставува сјајна, тврда и смолеста маса, со темна црвено-кафеава боја, со горчлив и опор вкус и својствен, наркотичен мирис.



Слика 215. Биосинтеза на изохинолинско-фенантрени алкалоиди од групата морфински алкалоиди

Содржи морфински алкалоиди но и други алкалоиди, во вкупно количество 10-20 %. Најзначаен опиумски алкалоид е морфинот, застапен во опиумот во количини од 10 до 12 %, во некои случаи и до 25 %. Базните особини на морфинот потекнуваат од терцијарната аминогрупа, а киселините од фенолната функција, заради што се карактеризира со амфотерни особини. Присуството

на ОН-групата на C_3 придонесува до специфична растворливост во раствори од алкални и земноалкални хидроксиди во што формира растворливи фенолати наречени морфинати. Фенолната група е одговорна за редуктивните својства на морфинот. Идентификација на оваа група вообичаено се врши со $Fe(III)$ соли, со што морфинот гради темно сино-зелено обоени комплекси.

Покрај морфинските, опиумот содржи и други алкалоиди: папаверин, орипавин, наркотин ((-)-на) и слични деривати (наркотилин, нарцеин, норнарцеин и др). Наркотинот е слаба база, соли-те му се тешко растворливи, а поради присуство на лактон во структурата, во алкалната средина е нестабилен.

Фармаколошко дејство и употреба. Морфинските (опиумските) алкалоиди се карактеризираат со значајна фармаколошка активност и со голема примена во куративната медицина. Најзначајни се:

- Морфин, дејствува врз ЦНС како силен аналгетик, инхибирајќи ослободување на супстанцијата P, која претставува невротрансмитер на болката. Дејствува депресивно на центарот за дишење и на центарот за кашлица. Дава и значителна психоактивација – еуфорија и привремени сензации на благосостојба, а со подолготрајна употреба создава зависност. Може да го зголеми тонусот на мазната мускулатура и да ја релаксира скелетната мускулатура. Предизвикува емега, стегање на свингтерите и констипација, како спореден ефект дава задршка на урината (антидиуретик), а во повисоки дози брадикардија, вазодилатација и хипотензија.
- Кодеин е антитусик. Активноста е проследена со блага депресија на респираторниот центар, блага брохоконстрикција што се должи на директниот ефект врз мазните мускули, намалување на секрецијата и ослободување на хистаминот. Кодеинот е и силен аналгетик. Ефикасен е во комбинација со ацетилсалицилната киселина и парацетамолот, а се користи перорално.

Од другите алкалоиди на опиумот значајно дејство и употреба имаат:

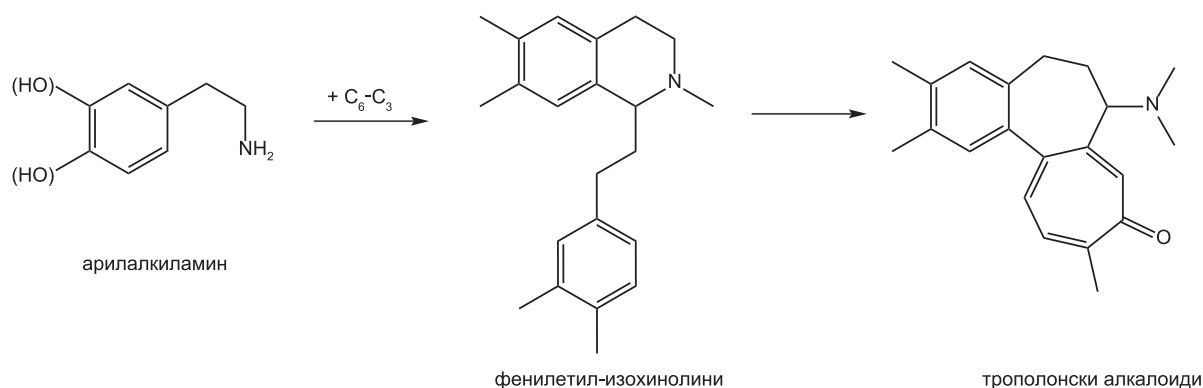
- Наркотин (носкапин), антитусик за непродуктивна кашлица, кој дејствува со централни и со периферни механизми, но не предизвикува депресија на дишењето и нема аналгетска активност. Бидејќи хемиски значително се разликува од морфинските алкалоиди, со структура на тетрахидроизохинолин, покажува друг механизам на дејство.
- Папаверин (безилизохинолин) е спазмолитик што се користи како активен принцип во лекови што се наменети за третман на стомачни тегоби. Се користи во терапија на циркулаторните болести, за подобрување на симптомите на сенилност, во терапија на исхемија на око и во терапијата на капиларна фрагилност.

Дериват на морфин што се добива во реакција на морфинот со анхидрид на оцетната киселина е О,О-диацетилморфин попознат како хероин. Нема терапевтско значење и примена, но како силен психостимулатор се злоупотребува и по подолготрајна употреба доаѓа до израз неговата токсичност. Хероинот спаѓа во најсилни наркотични средства и брзо создава една од најтешките форми на зависност, психичка и физичка, истовремено.

10.2.2.8. Фенилетилизохинолински алкалоиди - ѿројолонски алкалоиди

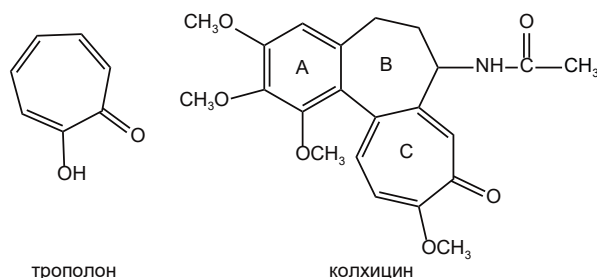
Алкалоидите од оваа група настануваат со поврзување на арилалкиламин со молекул на ароматична киселина (најчесто циметна киселина) и формирање скелет со општа формула $C_6-C_2-N-C_3-C_6$. Биосинтезата на трополонските алкалоиди сè уште не е доволно разјаснета, бидејќи кај

овие алкалоиди доаѓа до внатрешно реаранжирање на основниот скелет. Извесно е дека фенилаланинот (фенилетиламин) е појдовната аминокиселина од која преку циметната киселина се создава ароматичниот прстен со три јаглеродни атома во бочниот ланец (фенилпропаноид), додека од аминокиселината тирозин се создава трополонскиот прстен (слика 216).



Слика 216. Формирање на базични структури на фенилетилизохинолински алкалоиди

Најзначаен трополонски алкалоид е колхицин (слика 217), ексклузивно врзан за растението мравец (*Colchicum autumnale*).

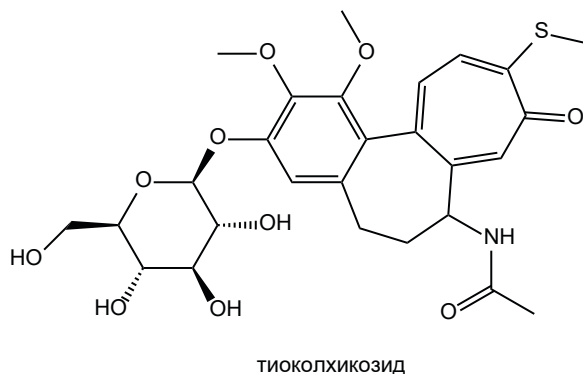


Слика 217. Најзначаен трополонски алкалоид - колхицин

Овие алкалоиди се во најголем дел амиди (со N во страничен ланец), поради што немаат базни својства или, пак, тие се многу слабо изразени. Не градат соли и во растенијата се јавуваат во слободна состојба, како амиди што се растворени во клеточен сок. Во структурата има 3 прстени од кои прстенот A е бензенски, B циклохептански, а C е трополонски.

Фармаколошка активност и употреба. Колхициноот е клеточен отров што ја блокира делбата на јадрото во метафаза, не дозволувајќи делење на делбеното вретено. Поради оваа активност се користи во цитологијата како реагенс за броење хромозоми. Дејствува антиинфламаторно, а се користи во терапија на гихт, особено при акутни напади. Колхициноот е многу токсичен и предизвикува труење при перорален внес на 10 mg. Дози од 40 mg може да предизвикаат смрт, која настапува, генерално во рок од три дена. Симптоми на труење се абдоминални болки, гастроентеритис пропратен со хеморагии, дијареја, дехидратација, хипокалиемија и ацидоза. Поради големата токсичност на колхициноот, правени се различни измени во оригиналната структура со цел создавање полусинтетски деривати со помала токсичност, а значајна фармаколошка активност. Денес, во терапијата се користат неколку структурни хомолози на колхициноот што се

помалку токсични. Значајна супстанција е тиоколхикозид, кој во структурата содржи сулфур, а хемиски претставува секундарен амин (слика 218).

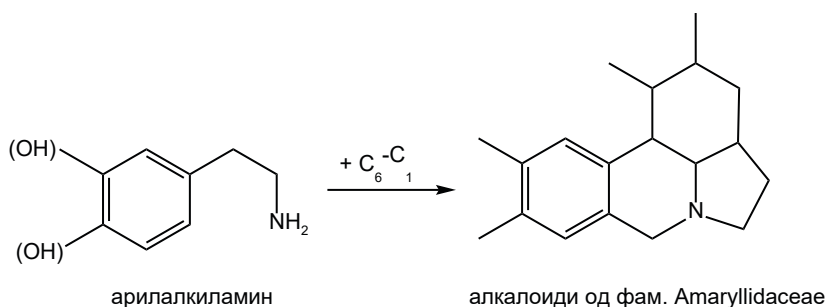


Слика 218. Полусинтетски аналог на колхицинот

Тиоколхикозидот е мускулен релаксанс. Не дејствува како алкалоидите на кураре, туку преку централен нервен систем. Се користи во ревматологијата за отстранување болки настанати од мускулни спазми.

10.2.2.9. Алкалоиди на фамилијата *Amaryllidaceae*

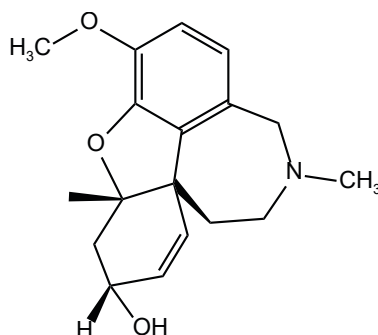
Алкалоидите од оваа група имаат структура со општа формула $C_6-C_2-N-C_1-C_6$ која се создава со поврзување на две ароматични аминокиселини, при што едната од нив се редуцира до C_6-C_1 соединение. Во нивната меѓусебна реакција се создава тетрациклична структура составена од индозидински прстен поврзан со бензен и циклохексан (слика 219).



Слика 219. Формирање на *Amaryllidaceae* алкалоиди

Овој тип алкалоиди се јавува само во претставниците од *Amaryllidaceae*. Растенијата од оваа фамилија имаат сиромашен фармаколошки профил и главно не се користат во терапевтски цели, а и алкалоидите не наоѓаат некоја позначајна употреба. Нивното проучување е значајно поради тоа што пројавуваат изразена токсичност, а токму растенијата што ги содржат се чести украсни орнаменти во градините и парковите, популарни поради убавиот изглед и раното цветање напролет

(момина солза, снегулка, нарцис и др.). Досега се изолирани преку 100 различни алкалоиди од оваа група. Од нив значаен алкалоид е само галантамин, кој е изолиран прво од видовите од родот *Galanthus* (видови на момини солзи), а потоа и од *Narcissus*, *Lycoris* и др. Денес во поголемо количество може да се изолира од снегулка (*Leucojum aestivum*).



Слика 220. Структура на галантамин

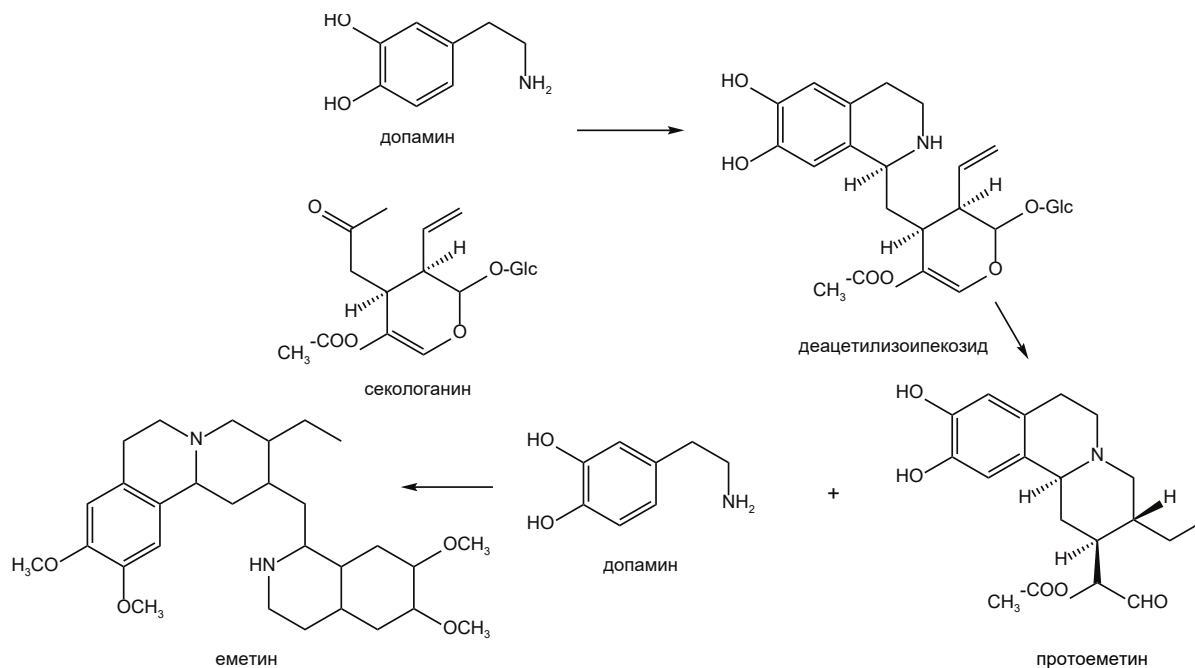
Галантамин е инхибитор на ензимот ацетилхолинестераза (слика 220). Резултатите од истражувања врз лабораториски животни покажаа дека инхибицијата на ензимот во мозочните синапси доведува до централна холинергична трансмисија, која инаку е нарушена при Алцхајмеровата болест. Галантаминот доведува до значајно подобрување на благи форми на ова заболување. Истражувањата покажаа дека добро се поднесува и дека не дејствува хепатотоксично. Од неодамна е воведен како лек за почетни форми на Алцхајмеровата болест. Се користи во форма на галантамин хидробромид. Во земјите од Источна Европа се користи во анестезиологијата. Во некои западноевропски земји (Италија) се користи при интоксикации со централни антихолинергични средства.

10.2.2.10. Монотерпенско-изохинолински алкалоиди

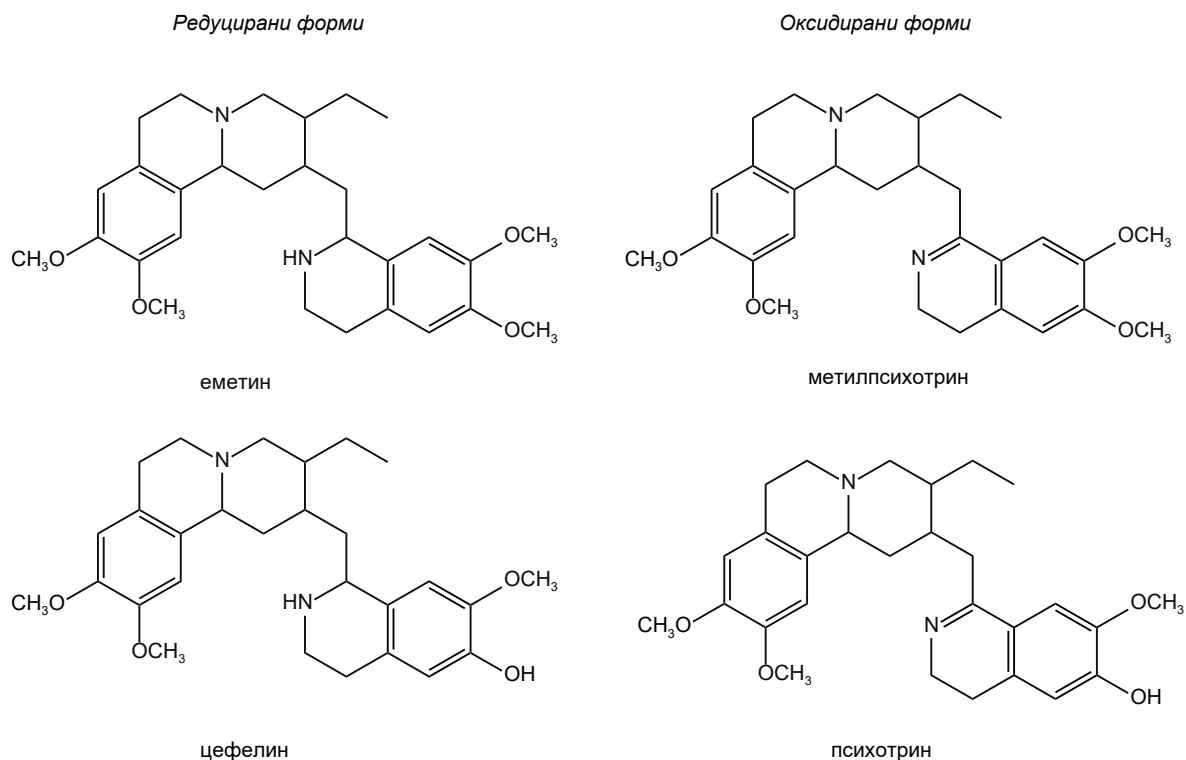
Алкалоидите од оваа група се ретки во растителниот свет. Се создаваат во реакција на допамин со монотерпенски гликозид секологанин, при што се создава интермедијерот деацетилизопекозид. По одвојување на шеќерот се создава протоеметинот кој реагира со уште една молекула на допамин и создава еметин (слика 221). Од еметинот се создаваат останатите монотерпенско-изохинолински алкалоиди. Овие алкалоиди се изолирани од неколку вида ипекакуани, јужно и централно-американски растенија, а се јавуваат и во неколку други видови, што се од помало значење. Најголема употреба има коренот од бразилската (рио или мато гросо) и од костарика ипекакуана кој содржи: еметин, цефелин, психотрин и металпсихотрин (слика 222). Психотрин и метилпсихотрин се оксидирани форми на еметинот и на цефелинот, кои се редуцирани форми. Цефелин и психотрин се фенолни алкалоиди, а еметинот и метилпсихотринот се нивни метилирани деривати. Практична примена има еметинот. Може да се добие полусинтетски, со метилација на цефелин.

Коренот од ипекакуана дејствува еметично (предизвикува емеза – повраќање). Дејството се должи веројатно на цефелинот, а коренот се користи во екстрактивна форма или како сируп при труења со: киселини, алкалии, конвулзивни средства или испарливи јаглеводороди. Во помали дози екстрактите и сирупот дејствуваат експекторантно, како рефлексни експекторанси, чиј механизам на дејство се состои во рефлексната реакција на бронхиите поради надрзнувањето на горниот сид на желуднокот каде што се наоѓаат завршетоците на *nervus vagus*, нерв од парасимпатичниот нервен

систем. Оваа дразба рефлексно предизвикува секретомоторно и во помала мера, секретолитично дејство во бронхијалното стебло, со што се овозможува искашлување при продуктивна кашлица. За експекторантното дејство е одговорен еметинот.



Слика 221. Биосинтеза на еметин

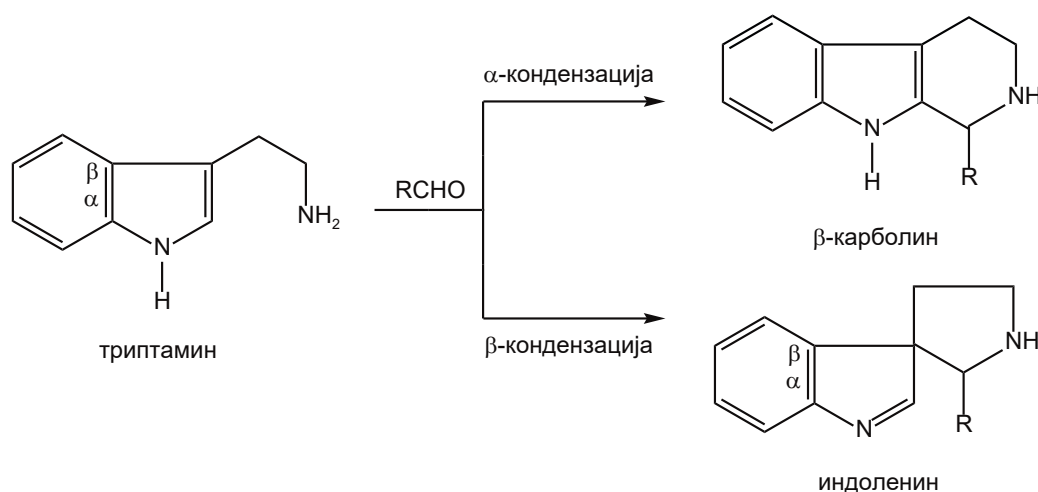


Слика 222. Алкалоди на ипекакуана

Чистиот еметин како еметин хидрохлорид, дејствува и амебицидно – го уништува предизвикувачот на амебната дизентерија (*Entamoeba histolytica*). Во терапевтски дози еметинот ги уништува само вегетативните (подвижните) форми на паразитот, но не и цистичните форми. Може да ги уништи и цистичните форми, но во дози кои се многу високи и ризични, поради екстремната токсичност и можност за труење. Со цел да се добијат поефикасни и побезбедни терапевтски средства, еметинот бил предмет на различни структурни манипулации од кои само синтетскиот дериват дехидроеметин се покажал доволно безбеден и задоволително ефикасен за третман на акутни и на хронични амебидијази. Дехидроеметинот се користи како конвенционален лек од групата амебициди.

10.3. АЛКАЛОИДИ ШТО СЕ ПРОИЗВОДИ НА ТРИПТОФАН

Алкалоидите што водат биогенетско потекло од аминокиселината триптофан се најбројни во растителниот свет. Имаат значајна фармаколошка активност и терапевтска примена. Интересни и од аспект на нивната хемиска градба, во поглед на голем број структурни варијации, биосинтетски можности, но и во поглед на предизвикот за нивната лабораториска и индустриска синтеза. Триптофанот е прекурсор на алкалоидите од оваа група, но само за подгрупата на едноставни триптамини. Кај останатите подгрупи во биосинтезата учествува декарбоксилираната киселина односно триптаминот и други соединенија: ацетати, мевалонати, секологанин и други компоненти, што условува појава на голем број разновидни структури. Основната структура ја чини индолниот прстен кој потекнува од триптофанот, па оттаму овие алкалоиди генерално се означуваат како индолни. Сите спаѓаат во групата на вистински алкалоиди. Генерално, биосинтезата на индолните алкалоиди се одвива преку α - и β -кондензација на триптамин, при што настануваат β -карболин (со α -кондензација) и индоленин (со β -кондензација) (слика 223). Сите индолни алкалоиди имаат една од овие две основни структури.



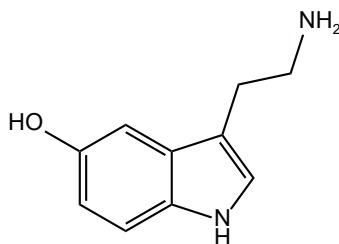
Слика 223. Потекло на прекурсорите на индолните алкалоиди

Од групата на индолни алкалоиди, од поголемо медицинско значење се алкалоидите од само четири групи:

1. Прости амини и β -карболински алкалоиди (природни халуциногени состојки)
2. Езерински алкалоиди
3. Ерголински алкалоиди
4. Монотерпенски индолни алкалоиди.

10.3.1. Триптамини и β -карболински алкалоиди - природни халуциногени супстанции -

Природните халуциногени се психоактивни супстанции кои предизвикуваат халуцинации и краткотрајни перцепциони модификации на слухот, на видот, на мирисот и на вкусот, а со тоа и модификација на свеста и на расположението. Некои од овие ефекти ги предизвикуваат и некои други растителни производи, како што се опиумот и тропанските алкалоиди или производи како што се алкохолот и органските растворувачи. Халуциногеното дејство се должи најчесто на соединенијата кои имаат индолна структура или се правилни алкалоиди од триптаминска, карболинска, ерголинска или алкиларил-аминска (мескалин) група. Сите наведени структури во хемиски поглед се многу блиски до структурите на природните, физиолошките невротрансмитери: серотонин, адреналин и норадреналин (слика 224). Природните халуциногени имаат афинитет за стимулација на рецепторите на невротрансмитерите или интерферираат на друг начин со природните невротрансмитери, од каде доаѓа до манифестациите на ЦНС, психоактивација и во поголеми дози халуцинации. Растенијата што ги содржат халуциногените соединенија во терапевтска смисла се речиси без значење. Познати се од најстарите времиња, а особено се значајни за поранешните, примитивни цивилизации, кај кои се користени како составни елементи на ритуали и на религиозни обреди, при што се постигнувала состојба на транс и се воспоставувала „врска со натприродните сили“. Понекогаш биле користени за лекување на некои психички нарушувања.



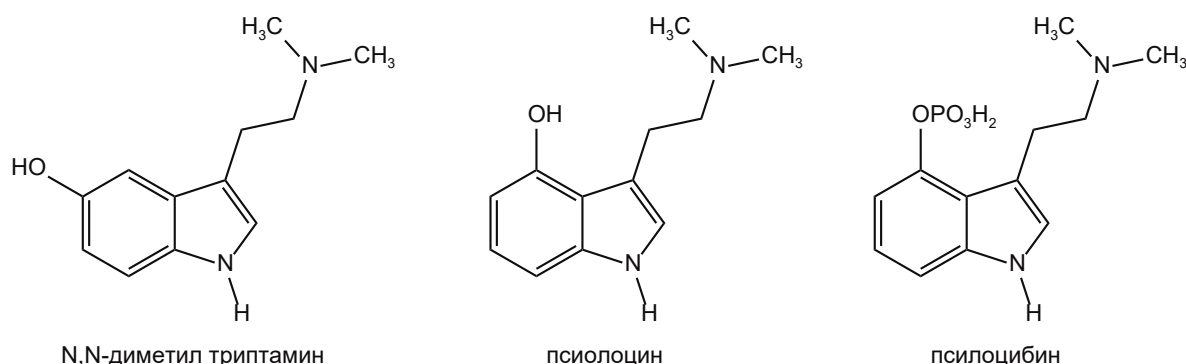
Слика 224. Структура на серотонин

Позначајни групи природни халуциногени состојки потекнуваат од:

- халуциногени печурки од фамилијата Agaricaceae што се карактеристични за Централна Америка,
- претставници од фамилијата Malpigiaceae што се карактеристични за Јужна Америка,
- претставници од некои халуциногени треви од фамилијата Zingiberaceae, и
- претставници од фамилијата Convolvulaceae, од Централна Америка и Мексико.

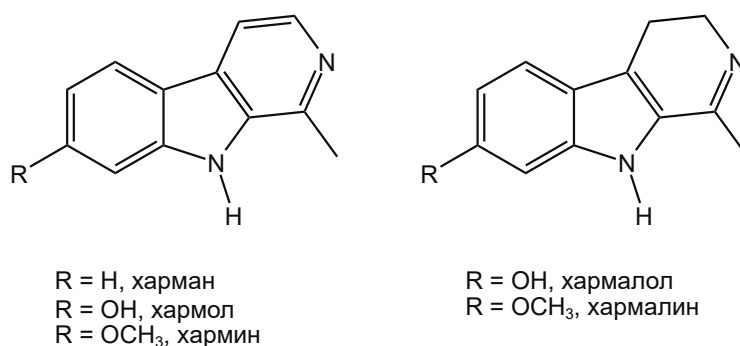
Agaricaceae. Халуциногени печурки (габи) од Agaricaceae биле користени од племето Ацтеки, а и денес се користат во некои делови од Мексико. Не се добро дефинирани туку се означуваат според припадноста на родовите: *Panaeolus*, *Conocybe*, *Psilocybe* и *Stropharia*. Употребата и значењето на овие габи за примитивните цивилизации во Централна Америка и Мексико е култно, за

што сведочат пронајдени статуи со човечки или со животински ликови на тело во облик на габа, кои потекнуваат од овие региони, а кои се стари неколку илјади години (потекнуваат од 1000 год. пр. н. е.). Иако бројот на видовите габи што се користат во оваа намена е многу голем, денес е познато дека сите содржат главно деривати псилоцин и псилоцибин што се одговорни за специфичното халуциногено дејство. По својата хемиска градба овие алкалоиди се типични N,N-диметил триптамини (слика 225). Во регионите од каде што потекнува нивната употреба познати се под називот „свети габи“. Денес се предмет на злоупотреба и нивно подолготрајно користење предизвикува зависност. Спаѓаат во наркотични средства со силно дејство врз ЦНС.



Слика 225. Природни триптамински халуциногени

Malpigiaceae. Од фамилијата Malpigiaceae се добиваат два вида халуциногени производи, познати под називот *ayahuasca*, од Перу и од Еквадор и *saapi* од Бразил. Кора на неколку ползавки од родот *Banisteriopsis* се ренда и се мацерира во ладна вода или се користи директно за цвакање. Кората содржи β-карболински алкалоиди: харман, хармол и хармин и тетрахидрохармински алкалоиди: хармамол и хармалин (слика 226), кои дејствуваат халуциногено.



Слика 226. Природни бета-карболински халуциногени

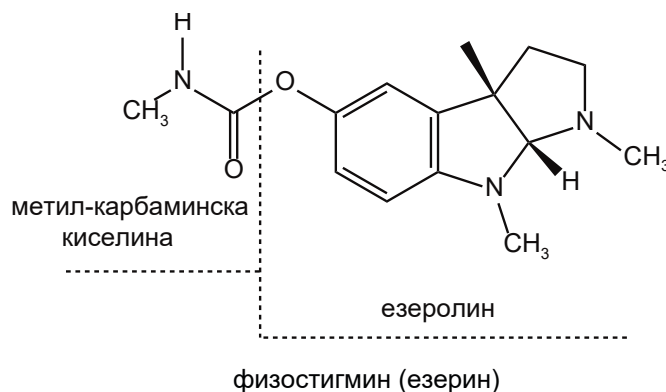
Денешните сознанија покажуваат дека овие алкалоиди дејствуваат преку инхибицијата на ензимот MAO (моноаминооксидаза) кој е значаен за ендегеното разложување на серотонин. Инхибицијата на ензимот овозможува зголемување на нивоата на серотонин, што како последица има зголемената експитација на ЦНС.

Халуциногени тревн од *Zigophyllaceae*. Халуциногено дејствуваат семиња од неколку тревести растенија од фамилијата *Zigophyllaceae*, што растат природно во регионот од северна Африка сè до Индија и Манџурија на исток. Најзначаен вид е *Peganum harmala* чии семиња содржат 3-4 % алкалоиди што се хемиски идентични со алкалоидите на *ayahuasca*. Силно го стимулираат ЦНС. Во некои делови од Азија е воспоставена практиката семињата да се фрлат во оган за да ослободат психоактивни пареи што се вдишуваат, за да се постигне дејството.

***Convulvulaceae*.** Претставниците од оваа фамилија содржат различни активни состојки кои хемиски не претставуваат триптамини, но кои се деривати на триптофанот, со многу посложена градба. Историското значење на овие претставници за примитивните цивилизации на Централна Америка е споредливо со она на „светите габи“. Називите под кои се користат денес се задржани уште од времето на Ацтеките. Утврдено е дека биолошки извори на халуциногени производи од оваа група се растенијата турбина и ипомеа. Денес сè уште се користат во Мексико за „предвидување на иднината“ и „за дијагностицирање и лекување на заболувањата“. Имаат силно дејство врз ЦНС и предизвикуваат халуцинации што се споредливи со оние што ги предизвикува синтетската супстанција LSD.

10.3.2. Езерински алкалоиди

Езерински индолни алкалоиди хемиски претставуваат естри на алкохол езеролин и метилкарбаминска киселина. Како естерски соединенија се карактеризираат со голема нестабилност и во базна средина се разложуваат на метиламин, јаглерод диоксид и езеролин. Најзначајни алкалоиди се: (-)-физостигмин (=езерин) (слика 227), потоа норфизостигмин, езерамин, физовенин, генезерин и др., изолирани се од семето на калабарскиот грав, *Physostigma venenosum*, ползавка, што расте во Африка, во шумите на Нигерија, Камерун и Габон.



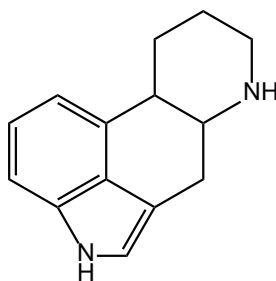
Слика 227. Структура на најзначаен езерински алкалоид езерин

Алкалоидите на калабарскиот грав се реверзибилни инхибитори на холинестеразата и дејствуваат како парасимпатомиметици. Предизвикуваат миоза, зголемено лачење на сите жлезди, брадикардија, бронхоспазам, спазам на мазната мускулатура, брадикардија и хипотензија. Определено значење во терапија има само физостигмин, нестабилна безбојна супстанција која на воздух брзо оксидира во црвено обоен продукт. Солите се, исто така, нестабилни, а нешто поголема стабилност покажува само физостигмин салицилат. Во оваа форма физостигминот се користи за производство на капки за око што се користат како миотик и за намалување на покачен интрао-

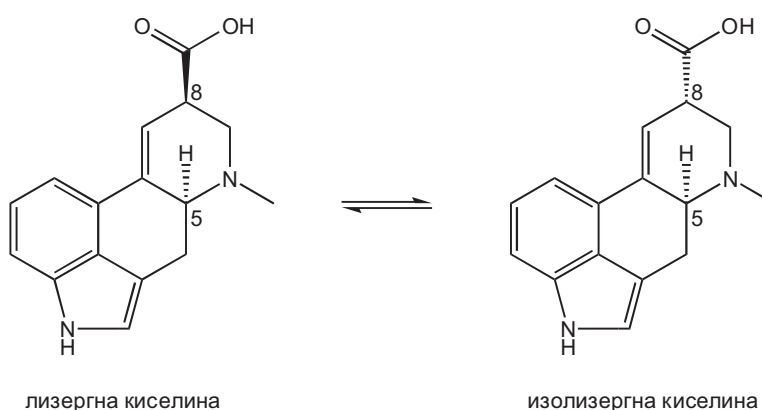
куларен притисок кај лица со глауком. Бидејќи често дава несакани ефекти (иритација на конјуктивата) денес е речиси сосема заменет со синтетски деривати: неостигмин и пиридостигмин. Во структурата на синтетските супстанции зачувана е естерската врска со метилкарбаминската киселина, бидејќи токму тој дел од структурата е значаен за дејството. Алкохолот езеролин кај синтетските супстанции е заменет со поедноставни ароматични алкохоли.

10.3.3. Ергот алкалоиди

Алкалоидите од оваа група се деривати на ерголин, тетрацикличен октахидроиндол-хинолин. Бисинтезата на ерголинот вклучува три компоненти: триптофан, мевалонската киселина и метионин (слика 228). За основниот ерголински прстен можат да бидат врзани различни радикали, а во ерголинот можат да бидат присутни различно распоредени двојни врски, што условува повеќе различни базични структури. Во зависност од хемиската градба, ерголинските алкалоиди се делат на повеќе подгрупи од кои најзначајна подгрупа се ергот алкалоиди. Тие се деривати на лизергна (левогирниот изомер) и на изолизергна киселина (декстрогирниот) изомер (слика 229). Киселините се 9,10-дехидро деривати на ерголин, со двојна врска помеѓу C_9 и C_{10} .



Слика 228. Структура на ерголин



Слика 229. Изомерите на лизергната киселина

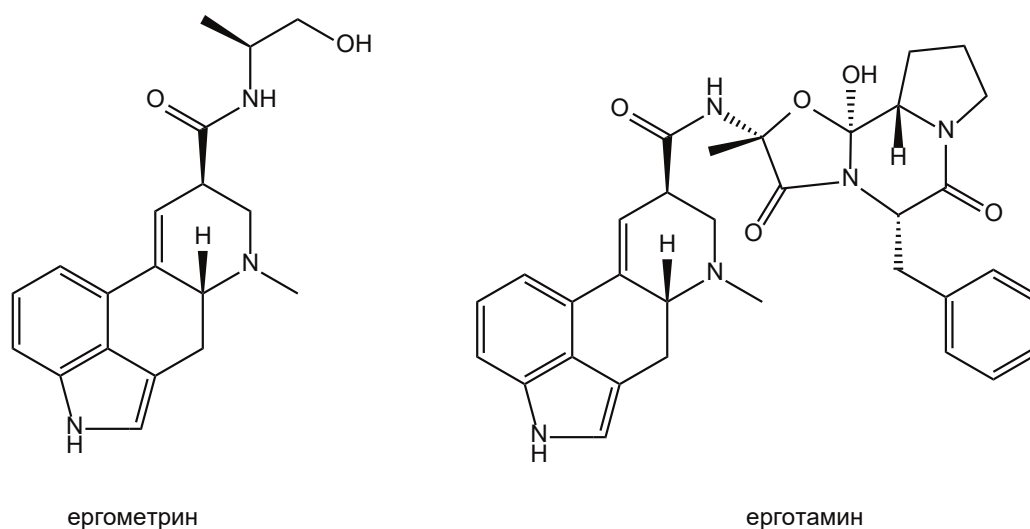
Биолошка и фармаколошка активност поседуваат само алкалоидите што се деривати на лизергна киселина, левогирниот облик, а се делат во две основни групи:

- амиди на лизергната киселина и
- ерго-петидни алкалоиди.

Амидите на лизергната киселина се означуваат уште и како ергометрини, а најзначаен алкалоид е токму ергометрин (познат и како ергоновин). Растворлив е во вода и хемиски претставува амид на лизергната киселина и алкохол 2-аминопропанол. Ерго-пептидните алкалоиди се речиси нерастворливи во вода, а се раствораат во алкохол и во други органски растворувачи. Претставуваат производи на лизергна киселина со соодветни аминокиселини што го градат пептидниот дел од молекулата. Пептидниот дел е составен од три аминокиселини кои се меѓусебно поврзани во т.н. трипептидна група. Во зависност од аминокиселината што гради пептидна врска директно со лизергната киселина, ерго-пептидните алкалоиди се поделени во три групи:

- ерготаминска група, со аминокиселината аланин,
- ерготоксинска група, со аминокиселината валин и
- ергоксинска група, со 2-аминобутерна киселина.

Втората киселина во трипептидот е секогаш пролин, а за неа се врзува трета, варијабилна аминокиселина (фенилаланин, леуцин или валин). Најзначајни ерго-пептидни алкалоиди се алкалоидите од ерготаминската (ерготамин, ергозин) и ерготоксинската група (ергокрисин, ергокриптин и ергокорнин) (слика 230).



Слика 230. Алкалоид од групата амиди на лизергна киселина (ергометрин) и ерго-пептиди алкалоиди (ерготамин)

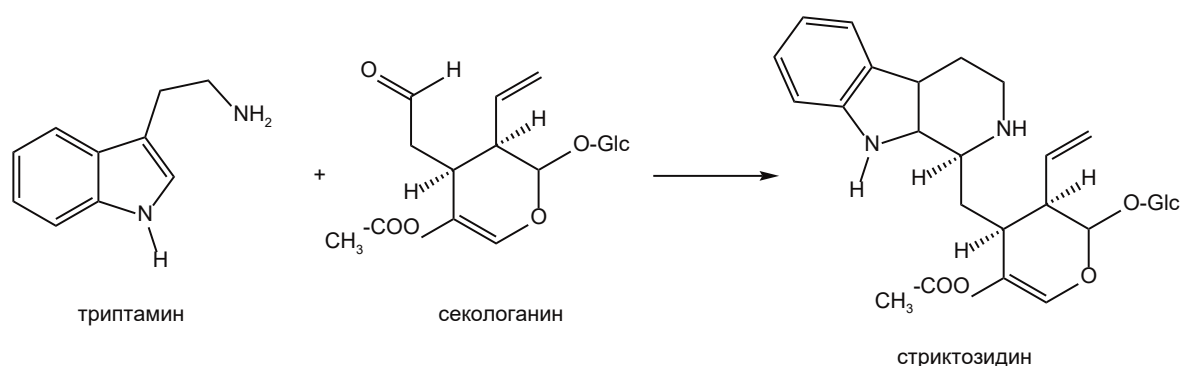
Ергот алкалоидите се наоѓаат во склероциумот на габата „ржена гламна“ од кој се изолираат во чиста состојба. Може да се произведуваат и по биотехнолошки пат во биореактори, во кои се искористува мицелиумот од габата. „Ржената гламна“ (*Claviceps purpurea*) е габа што паразитира на „рж“ и на други житни растенија (пченица, пченка, јачмен, овес и др.). Во текот на својот развој создава траен мицелиум кој служи за презимување на габата кој се нарекува склероциум (латински назив е *Secale cornutum*). Склероциумот е темно црно-виолетов, трирабен, долг неколку сантиметри, тенок, лесно се крши и мириса на расипана габа. Созрева во времето кога зрее житото и со жнеенето, а потоа со сеенето и мелењето на „рж“, пченица или друго жито се јавува како онечистување. При мелење на житото се меле и склероциумот на габата и брашното се онечистува со ергот алкалоиди, особено со ерго-токсини. Во средниот век користење на вакво брашно во исхраната било причина за појава на заболување ерготизам, кое се јавувало во епидемски разме-

ри. Заболувањето се карактеризира со болни конвулзии и гангрена на екстремитетите, и неретко завршувало со летален исход. Во средниот век ерготизмот се сметал за вид на чума, а се означувал како Света чума (*Sacra Pestis*) или како Свет оган (*Ignis Sacra*). Во периодот од 12-ти до 19-ти век забележани се околу 300 големи епидемии на ерготизам. Ерго-токсините предизвикуваат и посебни психички состојби како дилириум и транс. Ваквите состојби во средниот век, но и подоцна се сметале за пракса на вештерки (вештерење) кое било драстично казнувано од католичката црква. Ерготизмот денес е искоренет. При одгледувањето на житните култури се користат различни средства за заштита, меѓу кои и определени фунгициди кои недозвојуваат развој на габата, со што ризикот од појавата на ергот алкалоиди во брашното се сведува на минимум.

Ергот алкалоидите имаат големо медицинско значење. Се користат изолирани чисти алкалоиди во форма на определени соли како лекови во гинекологијата и во акушерството и за третман на нарушувања во циркулацијата. Во терапијата се користат за стопирање на крвавења по породување или по хируршка интервенција на репродуктивниот тракт на жената. Во оваа смисла се значајни ерогаметринот и ерготамините. Полусинтетски добиени 9,10-дихидро деривати на ерготамините и на ерготоксините (со заситена двојна врска помеѓу C₉ и C₁₀) се користат како лекови, специфични аналгетици во терапија на мигрена и лекови за третман на сенилна церебрална инсуфициенција.

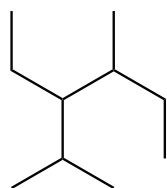
10.3.4. Монотерпенско-индолни алкалоиди

Монотерпенските индолни алкалоиди вбројуваат околу 2000 структури, што се разликуваат во поглед на промените што се случуваат во монотерпенскиот дел, во кој можат да настанат различни реаранжирања што придонесува до појава на многу голем број различни структури. Типичниот прекурсор во биосинтезата на монотерпенско-индолни алкалоиди е стриктозидин, кој се создава со кондензација на триптамин и секологанин (слика 231).

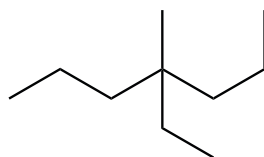


Слика 231. Биосинтетско потекло на стриктозидин

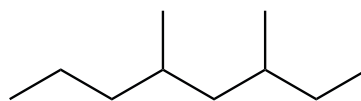
Во зависност од промените во терпеноидниот дел од структурата, кај монотерпенско-индолните алкалоиди се јавуваат три основни структури, од каде алкалоидите кои настануваат од овие почетни структури се означуваат како коринантиани, аспидоспермани и ибогани (слика 232).



корнантиан



аспидосперман

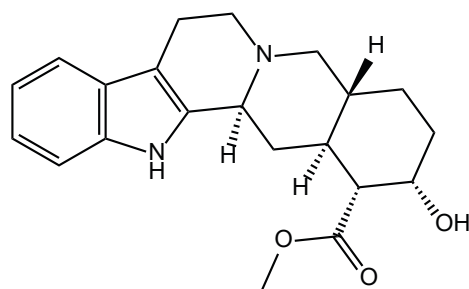


ибоган

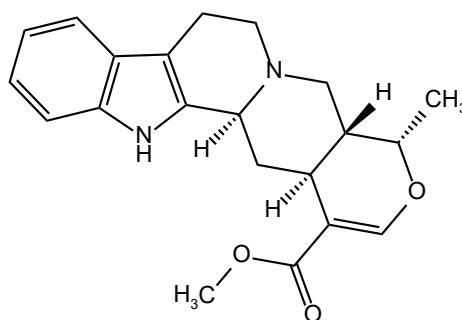
Слика 232. Можните реаранжирања во монотерпенскиот дел од структурата на монотерпенско-индолните алкалоиди

10.3.4.1. Коринантиани и аспидоспиремани

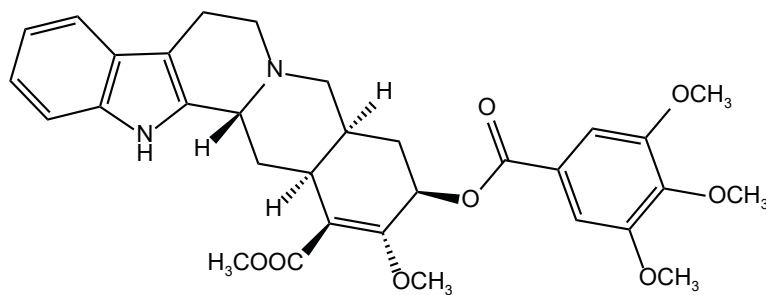
Од монотерпенско-индолни алкалоиди поголемо значење имаат коринантиански и аспидоспермански тип на алкалоиди. Коринантианите може да бидат со една од две можни структури: јохимбани или хетеројохимбани. Се означуваат уште и како I – A група на монотерпенско-индолни алкалоиди. Кај јохимбаните не постои хетероцикличен прстен со кислород, додека тој дел од структурата на секологанинот кај хетеројохимбаните е зачуван, поради што тие имаат хетероциклически кислород (слика 233).



јохимбин



ајмалицин (раубазин)



резерпин

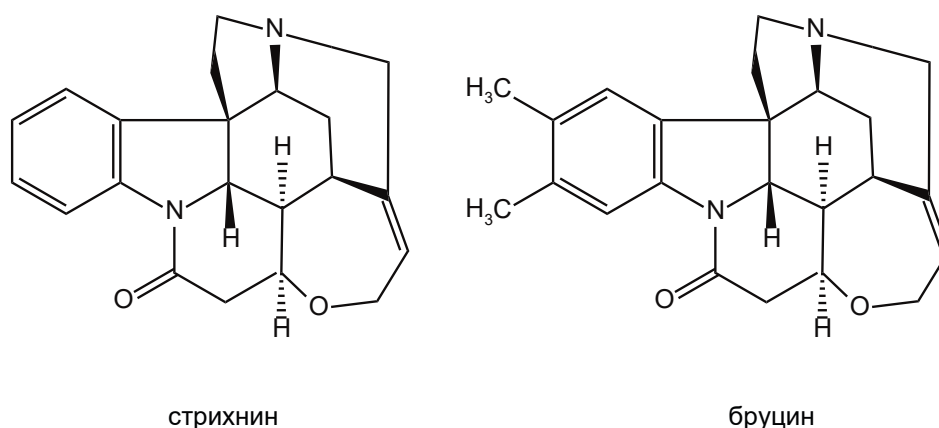
Слика 233. Најзначајни јохимбани и хетеројохимбани

Во групата на јохимбаните значајни алкалоидите се резерпин, ресцинамин и десерпидин, а кај хетеројохинбаните раубазин (=ајмалицин). Алкалоидите од оваа група се карактеристични за растенијата од родот *Rauwolfia*, Аросупасеае, меѓу кои е особено значаен индискиот вид *Rauwolfia serpentina*. Изолирани чисти алкалоиди и екстрактите што содржат алкалоиди се користат како лекови за третман на покачен крвен притисок. Дејствуваат спазмолитично (ајмалицин е спазмолитик од групата на α -блокатори) и невroleптично. Екстрактите од рауволфия се користат за производство на додатоци на исхраната што се промовираат за регулирање на покачен крвен притисок и за подобрување на циркулацијата. Овие производи се базираат на Ајурведската традиционална медицина.

Во групата на јохимбани спаѓа и алкалоидот јохимбин (слика 233) кој се изолира од кората на дрвото јохимба. Јохимбинот се користи во голема мера за производство на додатоци на исхраната што се наменети за одржување на здравјето на репродуктивниот тракт кај мажите. Се промовира како афродизијак, иако за ова дејство нема валидни клинички докази за ефикасноста, а безбедноста е дискутабилна.

Покрај алкалоидите што спаѓаат во I – A група, значајни се некои структури што спаѓаат во I – B група, а кои се означуваат како стрихнани. Најголемо значење имаат алкалоидите на растението стрихнос, *Strichnos nux vomica*, фам. Loganiaceae.

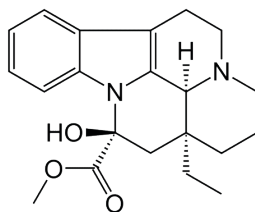
Стрихнос е ниско дрво кое расте во Индија и во југоисточна Азија. Има топчести плодови кои потсетуваат на плод од портокал. Внатрешноста на плодот е месеста пулпа во која се сместени плоскати семенки. Алкалоидите се изолираат од семето, а меѓу нив се најзначајни стрихнин и неговиот диметокси дериват бруцин (слика 234). Стрихнин е многу токсичен алкалоид и денес ретко се користи како аналептик, при труење со барбитурати, додека бруцинот наоѓа примена исклучиво како реагенс и како горчлива супстанција за определување на степен на горчина на други горчливи сировини и супстанции.



Слика 234. Најзначајни стрихнански алкалоиди

Претставници од фамилијата Loganiaceae од Јужна Америка, прашумите на Амазонија, создаваат димерни алкалоиди бис-стрихнани (бис-индоли) кои имаат миорелаксантно дејство, речиси идентично со она на бисбензилтетраизохинолинските алкалоиди на кураре (тубо-кураре). Водени екстракти од растенијата од Loganiaceae се впаруваат и од нив се подготвува смолеста маса – отров кураре, со кој се премачкуваат врвовите на стрелите кои домородното население ги користи во ловот на животни. Ова кураре се пакува во мали издупчени тикви и се нарекува калабаш кураре (calabash curare). Од алкалоидите што ги содржи најголемо значење има C-токсиферин. Се

користи во полусинтетското добивање на N,N-диалилтоксиферин (алкуронин) кој се користи во анестезиологијата, како миорелаксанс.



Слика 235. Структура на винкамин

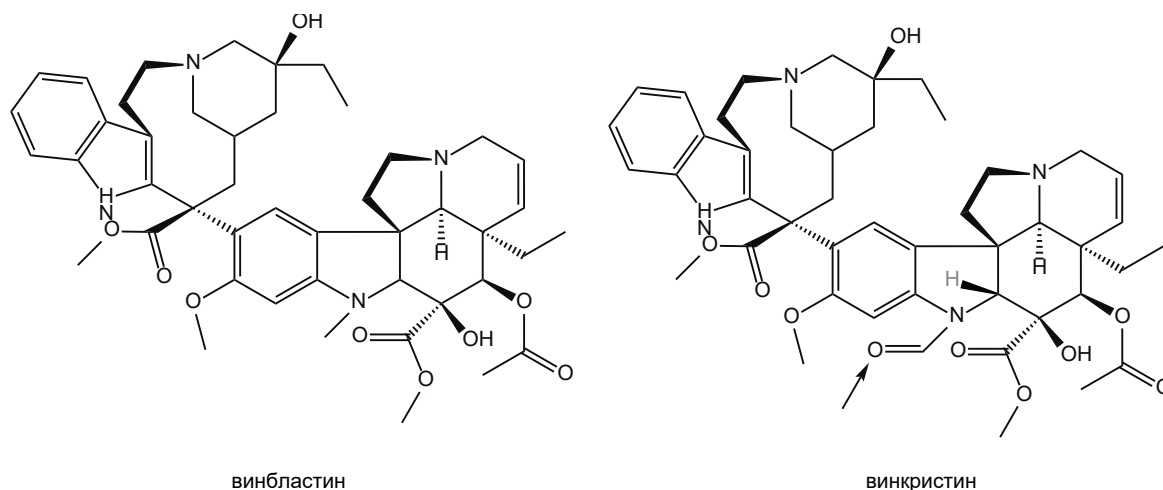
Аспидоспермански алкалоиди се голема група на состојки од кои практично значење има само еден алкалоид, со видоизменета структура во насока на ебурнан. Станува збор за алкалоидот винкамин кој се изолира од надземните делови на растението зимзелен или винка (*Vinca minor*, Аросупасеае) (слика 235). Винка е полугрмушка со полеганото стебло од кое излегуваат адвентивни корени. Има стерилни изданоци кои имаат само листови и кои се легнати на земја, и фертилни кои терминално завршуваат со виолетов цвет. Расте во шумите и на ридските и планинските пасишта. Се одгледува како украсно растение. Во целото растение има алкалоиди, но за изолација на винкаминот се користи надземен дел во цвет (херба). Винкаминот ги дилатира крвните садови во мозокот и ја подобрува циркулацијата и снабдувањето на мозокот со крв, а со тоа и со кислород. Изолиран чист алкалоид се користи како лек во терапија на физиолошки и на психолошки симптоми на сенилност, а наоѓа примена и во посттрауматскиот третман на мозочен удар, при нарушување на рамнотежата и ориентацијата и др. Подолготрајната примена може да доведе до развој на несакани ефекти меѓу кои најсериозен е аритмија. Екстрактите од винка што содржат винкамин се користат како лекови, но и за производство на додатоци на исхраната што се промовираат за надминување на проблемите што настануваат при лоша циркулација во мозокот (губење на меморија, проблеми со видот, вртоглавица и др.).

Посебни групи монотерпенско-индолни алкалоиди се:

- Бинарни монотерпенско-индолни алкалоиди и
- Хиолински (хинуклидински) алкалоиди.

10.3.4.2. Бинарни монотерпенско-индолни алкалоиди

Овие алкалоиди се создаваат со поврзување на две молекули од мономерни алкалоиди. Најзначајни се винбластин и винкрестин (слика 236), коишто настануваат со поврзување на катарантин (монотерпенско-индолски алкалоид) и виндолин (дихидро дериват). Двата алкалоиди се разликуваат по супституентот на азотниот атом во дихидроиндолскиот дел. Кај винбластинот се врзува метил, а кај винкрестинот формил остаток. Двата алкалоиди се создаваат во растението катарант, *Cantharanthus roses*, Аросупасеае, повеќегодишна тревеста грмушка што автохтоно расте на Мадагаскар. Видот е интродуциран во други делови од светот, се одгледува како украсно и како лековито растение и денес има пантропска дистрибуција (тропски региони од двете страни на екваторот).

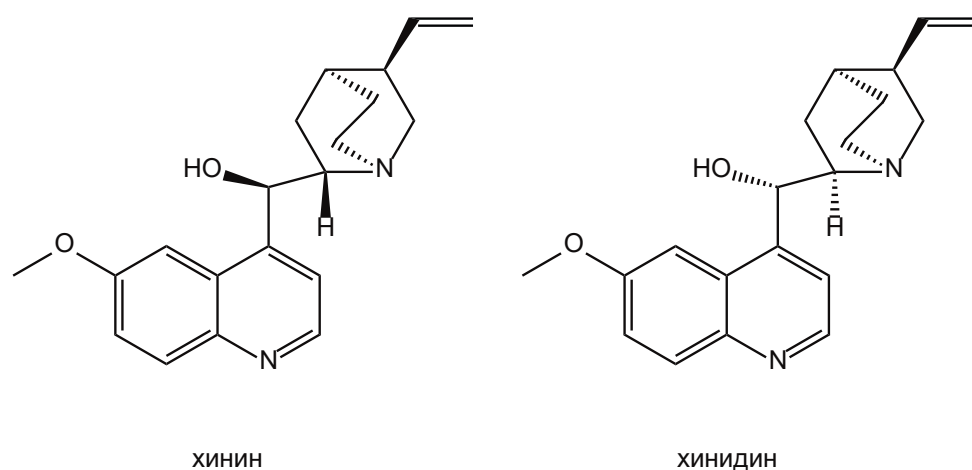


Слика 236. Најзначајни бинарни монотерпенско-индолни алкалоиди

Винбластин и винкрисстин се користат како цитостатски лекови во хемотерапијата на различни видови леукемија, акутна лимфоцитна леукемија, акутна миелоидна леукемија, Хочкинова болест, невробластом и ситноклеточен карцином на белите дробови, меѓу другите.

10.3.4.3. Хиолински (хинуклидински) алкалоиди

Посебна група на монотерпенско-индолни алкалоиди се хиолинските (хинуклидинските) алкалоиди што се наоѓаат во кората од хининово дрво (хина), *Cinchona* spp., Rubiaceae. Имаат сложена структура во која хиолинското јадро со хидроксиметиленски мост е поврзано со хинуклидинско јадро. Се создаваат од секологанин и од триптамин, преку стриктозидин. Најзначајни алкалоиди се стереизомерните парови: хинин и хинидин и цинхонин и цинхонидин (слика 237).



Слика 237. Најзначајни алкалоиди на хининово дрво

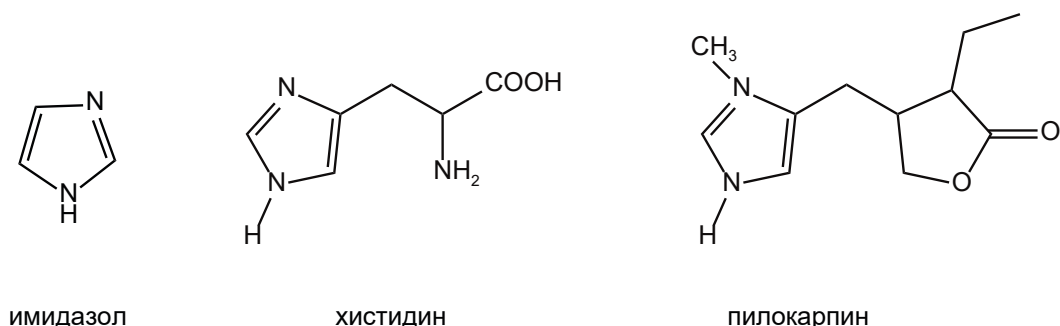
Хининово дрво (хина) е трајно зелено дрво со кожести, сјајни и елиптични листови и ситни белузлави цветови собрани во соцветија во пазувите на листовите. Расте во Јужна Америка, на па-

дините на планинскиот масив Анди во Боливија и Перу, на височини и до 3 400 м н.в. Од растението се собира кора од стебло, од гранки и од коренот, бидејќи во кората се локализирани и депонирани хинуклидинските алкалоиди. За потребите на фармацевтската индустрија хината се одгледува во Индонезија (особено на островот Јава), во Индија, Кина, Шри Ланка, Боливија, Колумбија, а денес сè повеќе во тропските делови во Африка (Конго). Кората од хина содржи преку 20 различни алкалоиди со хинолинска односно хинуклидинска градба, од кои најмногу хинин и неговиот изомер хинидин, помалку цинхонин и цинхонидин. Во кората се врзани за хина киселина или за други киселини, но може да градат и комплекси со танини. Танините на хината се од групата на катехински танини, лесно се оксидираат и полимеризираат при што даваат црвено обое-ни производи флобафени (танински црвенила). Поради присуство на танинските црвенила кората има црвеникава боја и позната е како црвена кора од хина. Ако бојата на кората е жолта тогаш во кората нема танини и алкалоидите се присутни само како соли (жолта кора од хина). Црвена и жолта кора од хина се добиваат од различни видови *Cinchona*.

Кората од хина се користи за индустриска екстракција на алкалоиди. Алкалоидот хинин се користи за превенција и лекување на маларија, има и аналгетично, антипиретично и тонично дејство. Хинидинот се користи како лек за третман на срцева аритмија. Традиционално кората и екстрактите од кората се користат како атстрингенти (заради танините), како амара горчливи средства и антипиретика (за намалување на покачена телесна температура), а во народната медицина дополнително како утеротоник, за индуцирање на контракции кај бремени жени со цел полесно породување. Екстракт од хина кора и сомелена кора се користат за производство на традиционални хербални лекови и на додатоци на исхраната што се промовираат за унапредување и зачувување на здравјето на целиот организам, со посебни придобивки кон подигањето на имунолошкиот систем и подобрување на дигестијата.

10.4. Алкалоиди што се производи на хистидин

Алкалоиди што се деривати на хистидин имаат имидазол во структурата, поради што се означуваат и како имидазолски алкалоиди (слика 238). Во растителниот свет се среќаваат ретко. Досега се најдени во некои претставници од Rutaceae. Практична примена има само пилокарпин (слика 238), што се добива од листовите на јаборанд, *Pilocarpus* ssp., Rutaceae. Хемиски пилокарпинот е лактон на пилокарпинската киселина. Претставува маслено-сирупеста течност, која во форма на соли лесно кристализира.



Слика 238. Најзначаен алкалоид на растението јаборанд

Пилокарпинот дејствува стимулативно врз мускаринските рецептори во окото, предизвикувајќи констрикција на мускулите на пупилата и на цилијалната мускулатура, што доведува до миоза и контракција на зеницата. Оваа реакција овозможува намалување на покачен интраокуларен притисок. Во организмот пилокарпинот предизвикува засилена секреција, спазам на мазната мускулатура и брадикардија, поради што не се користи како перорален лек. Главно се користи во облик на хидрохлорид или нитрат како парасимпатомиметик и миотик во офталмологијата, најчесто во форма на капки или масти за третман на глауком. Препаратите на пилокарпинот подобро се поднесуваат во споредба со препаратите на физостигмин, кои имаат слично дејство, но кое е проследено со изразени несакани ефекти (иритација на конјуктивата). Денес, пилокарпин е лек од избор за третман на покачен интраокуларен притисок.

10.5. ТЕРПЕНСКИ АЛКАЛОИДИ

Терпенските алкалоиди се псевдоалкалоиди од групата на терпени, во кои азотот се инкорпорира во подоцнежни фази од нивната биосинтеза, од аминокиселини што се разликуваат од оние што се дефинирани како прекурсори на вистинските алкалоиди. Во растителниот свет се присутни и други групи алкалоиди кои имаат мешовито биосинтетско потекло како што е случај со монотерпенско-индолните алкалоиди кои делумно настануваат како деривати на триптофан, а делумно како монотерпенски деривати. Друг пример претставуваат алкалоиди деривати на антранилната киселина која се создава по патот на шикими киселината (фенолни соединенија), а делумно од изопентенилпирофосфат (терпенски соединенија).

Терпенските алкалоиди се јавуваат ретко во растителниот свет и распространети се во мал број видови и фамилии. Малку се проучени и ограничено се користат во терапијата. Зависно од бројот на изопренските остатоци во молекулата се класификуваат на:

- моно и сескви терпенски алкалоиди,
- дитерпенски алкалоиди,
- тритерпенски алкалоиди и
- стероидни алкалоиди.

10.5.1. Моно и сесквитерпенски алкалоиди

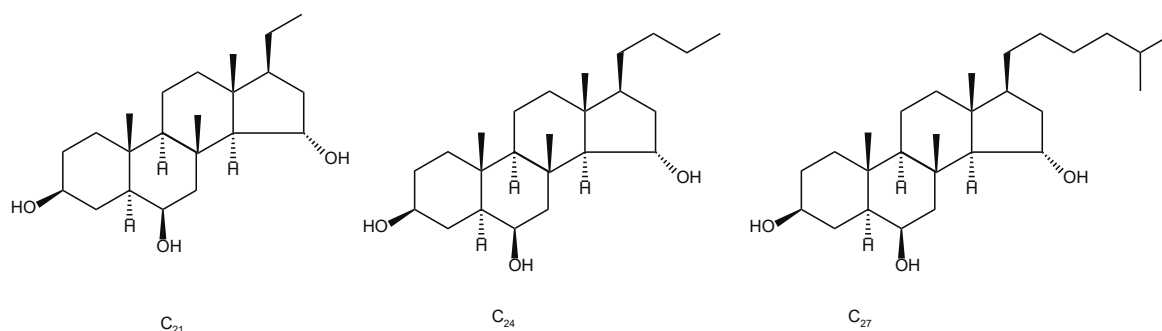
Алкалоидите од оваа група имаат мал фармаколошки потенцијал и со тоа мало медицинско значење. Само некои алкалоиди што се изолирани од ризомот на растението воден цвет наоѓаат ограничена примена за лекување на кожни заболувања, третман на изгореници, третман на воспаленија при каснување од инсекти и сл. Дитерпенските алкалоиди се карактеризираат со изразена токсичност, поради што сите видови што ги содржат се отровни. Имаат сложени хемиски структури, со C₂₀ дитерпенски и со C₁₉ *nor*-дитерпенски алкалоиди. Распространети се главно во претставници од две фамилии, Ranunculaceae и Rosaceae, ретко во други видови. Практична примена има само алкалоидот аконитин што се изолира од грутките на растението јадиче (различни видови од родот *Aconitum*, особено *A. napellus*, Ranunculaceae). Овој алкалоид е пропатен со низа други дитерпенски алкалоиди што паралелно се присутни во грутката: бензилаконин, метилаконин, хипаконитин, мезаконитин и др. Аконитин хемиски претставува диестер на аминоалкохол аконин со оцетна и со бензоева киселина. Како естер значајно е нестабилен. Исклучително е токсичен и предизвикува труење што се манифестира со парализа на дишењето и прекин на работа на срцето, со смртен исход за затруениот. Смрт може да настапи со внесување на само

2 mg чист алкалоид или 1 g од растителен материјал. Токсичноста може да се појави преку кожата, дури и допирањето на растението може да ги анестезира врвовите на прстите. Аконитинот предизвикува парализа на периферните нервни завршетоци, го анестезира ткивото и ја намалува мускулната болка при невралгии (болка што се јавува при оштетување на периферни нерви). Порано се користел како антипиретик и аналгетик, а сè уште има ограничена примена во хербалната медицина, иако малата терапевтска ширина го отежнува пресметувањето на соодветната доза. Денес ретко се користи како лек за третман на невралгии. Растителната суровина, грутка од јадиче, е една од позначајните суровини што се користат во хомеопатската медицина.

10.5.2. Стероидни алкалоиди

Стероидните алкалоиди се најзначајна група псевдоалкалоиди. Имаат стероидно јадро (циклопентаноперхидрофенантрон), а во зависност од бројот на C-атомите во страничната низа се делат на три групи (слика 239):

- C₂₁ алкалоиди.
- C₂₄ алкалоиди.
- C₂₇ алкалоиди.



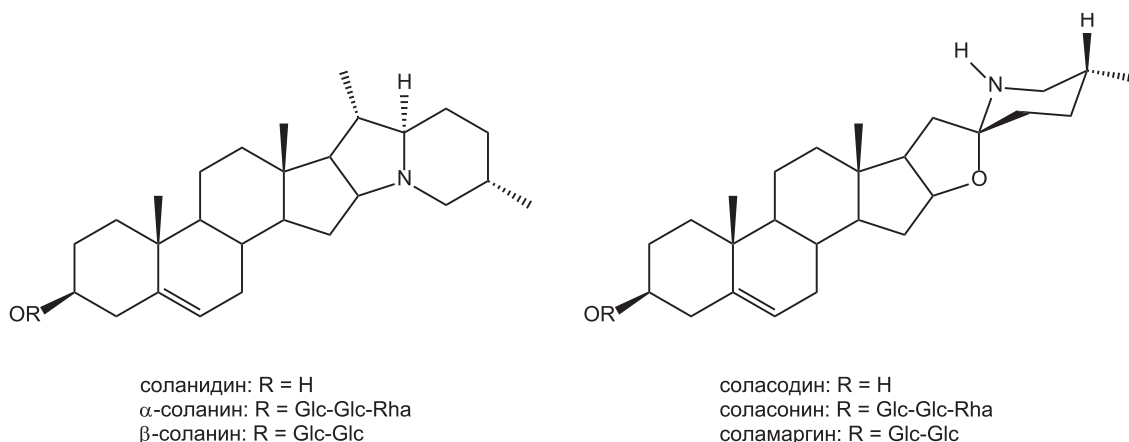
Слика 239. Основни структури на C₂₁, C₂₄ и C₂₇ стероидни алкалоиди

Најзначајна група се C₂₇ алкалоиди, кои се јавуваат во претставници од фамилијата Solanaceae. Се означуваат и како соланум-алкалоиди. Биогенетски и структурно се блиски до стероидните сапонини, односно нивните агликони, со кои имаат и слични физичко-хемиски својства и слично биолошко дејство. Најчесто се јавуваат во хетерозиден облик, а според градбата на агликонот можат да бидат (слика 240):

- соланидински хетерозиди (соланини), кај кои азотот е дел од индолизидински остаток,
- соласодински хетерозиди (соласонин и соламаргин), кај кои азотот влегува во оксо-азо-спиро-деканска структура.

Стероидните алкалоиди речиси да немаат примена во терапија и повеќе се значајни од аспект на нивната токсичност. Поголемо практично значење имаат само алкалоидите на *Solanum laciniatum*, Solanaceae, соласонин и соламаргин (слика 240), коишто се користат како прекурсори во полусинтетското производство на стероидните хормони, кортикостероидите и другите стероидни лекови. Стероидните алкалоиди може да се најдат во зеленчукот кој потекнува од истата фамилија (Solanaceae). Соланински алкалоид од групата на томатин (слика 230) за прв пат бил најден во

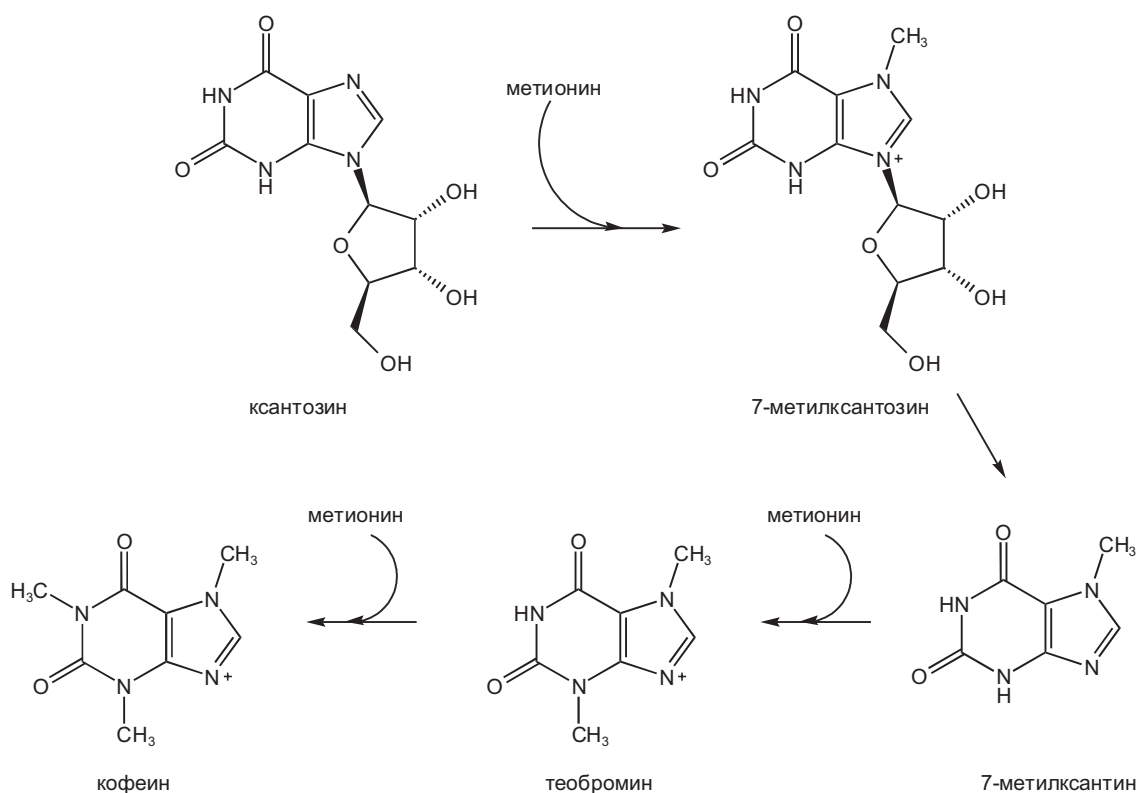
компирот, во неговите зелени делови. Испитувањата покажуваат дека овие алкалоиди се синтетизираат во близина на хлорофил, поради што ги има во листовите и во зелените стеблики на компирот и на домотот. Она што е важно, дека изртен компир и зазеленет поради долго стоење на сонце, ќе содржи соланин и томатин, како и зелените плодови од домотот. Оттука, не се препорачува консумација на ваков компир ниту на зелен домот. Соланин и другите стероидни алкалоиди од групата C_{27} -стероиди може да го иритираат гастроинтестиналниот тракт и да дејствуваат како инхибитори на холинестеразата (влијаат на невротрансмитерите). Акутни труења со соланин ретко се случуваат, но документирано е дека по нивната ингестија може да дојде до сериозно повраќање и дијареја, депресија на централниот нервен систем, па дури и смрт.



Слика 240. Структури на најзначајните стероидни алкалоиди од групата C_{27} -стероиди

10.6. ПУРИНСКИ АЛКАЛОИДИ

Пурински алкалоиди се хетероциклични соединенија што теоретски настануваат со поврзување на пиримидинскиот и имидазолскиот прстен. Со оглед што аминокиселината хистидин содржи имидазол во својата градба, хистидинот се доведува во врска со биосинтезата на пуринските алкалоиди. Де факто, биосинтезата на хистидинот и пуринските бази се одвива по истиот биосинтетски пат. Пуринските бази се вклучуваат во градењето на нуклеотидите и на нуклеинските киселини. Биосинтеза на пуринските алкалоиди вклучува метаболизмот на пуринските нуклеотиди и ниво разложување до ксантозин, од кој со вклучување на метионин се создава 7-метилксантозин, а од него 7-метилксантин. Понатамошна биосинтеза оди во насока на создавање на теобромин од кој се создава кофеин, со повторно вклучување на метионин (донор на CH_3 -радикал) (слика 241).

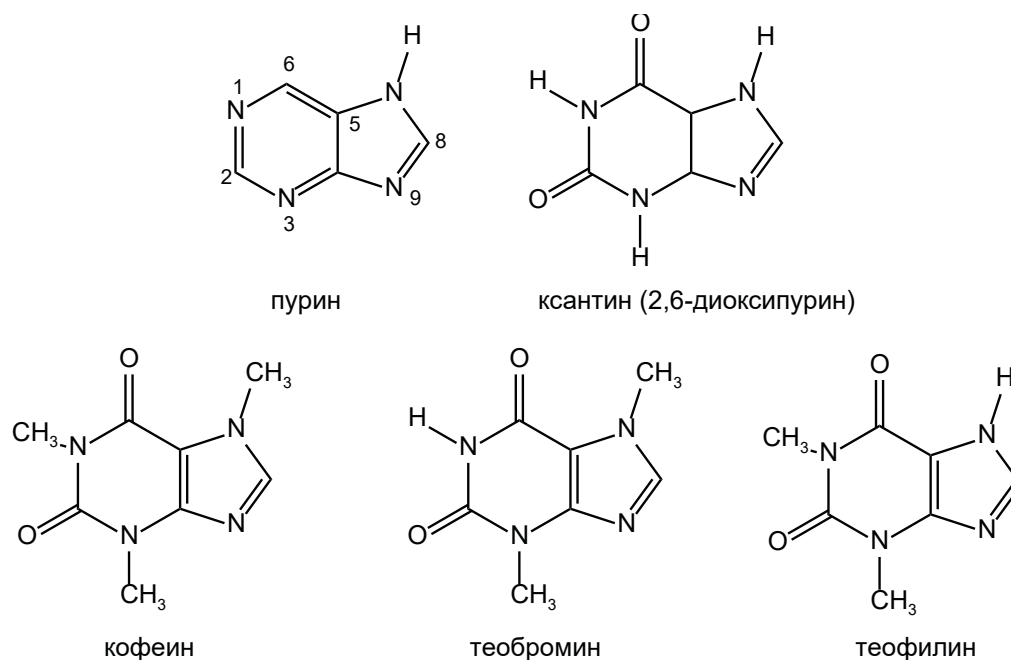


Слика 241. Биосинтеза на пурински алкалоиди

Пуринските алкалоиди може да се разгледуваат како оксидирани деривати на пурин кои се означуваат како ксантини. Поради метилација на позициите 1, 3 и 7 се означуваат како метилксантини. Најзначајни алкалоиди од оваа група се теобромин, теофилин и кофеин (слика 242). Теоброминот е 3,7-диметилксантин, теофилинот 1,3-диметилксантин, а кофеинот 1,3,7-триметилксантин.

Пуринските алкалоиди се акумулираат во ограничен број растителни видови од кои најзначајни се: кафе, чај, мате, кола, какао и гварана. Од кафето, какаото и гвараната се користи семе, а

од чајот и од мате лист. Сите наведени суровини, особено семе од кола и лист од чај се користат за изолација на кофеин и теофилин, додека теоброминот главно се изолира од семените лушпи на какаото. Изолираните алкалоиди како чисти супстанции се користат како лекови. Кофеинот дејствува стимулативно врз CNS и врз кардиоваскуларниот систем. Го подобрува дишењето, когнитивните активности (памтење, процес на размислување и друга ментална работа), го намалува осетот за замор, ја забрзува работата на срцето и дејствува слабо диуретично. Спаѓа во супстанции кои се означени како GRAS (Generally Recognized As Safe), а возрасни лица главно користат дози до 400 mg на ден, кои се безбедни и протекуваат без развој на несакани ефекти. Кофеинот влегува во состав на голем број аналгетски и антипиретски лекови. Значајно поголеми дози на кофеин, преку 1 g на ден, предизвикуваат вознемиреност, тремор, губиток на сон, периферна дилатација, тахикардија и др. манифестации. Кај лица што се чувствителни на кофеин, несаканите ефекти може да се јават со внес на дози од кофеин што се пониски од 1 g, а кај некои и терапевтските дози може да предизвикаат вознемиреност, палпитации, несоница и др. Теофилинот е неспецифичен бронходилататор, ги дилатира крвните садови на бубрегот, ја зголемува гломеруларната филтрација, дејствува умерено диуретично и ја подобрува респирацијата, но послабо во споредба со кофеинот. Теоброминот ги шири крвните садови во бубрегот, ја зголемува гломеруларната филтрација, дејствува умерено диуретично и ја подобрува респирацијата, но многу послабо во споредба со кофеинот. Теофилинот и неговите полусинтетски деривати наоѓаат примена во третманот на акутните напади на астма и на други заболувања што настануваат поради бронхоспазам. Теоброминот ретко наоѓа примена во терапијата, главно како вазодилатор и диуретик.



Слика 242. Пурински алкалоиди – метилксантини

Растителните суровини што содржат пурински алкалоиди, пред сè кофеин, широко се користат за подготвување ладни и топли напитки за секојдневна употреба, како средства за освежување и уживање (чај, кафе, какао и др.) и како безалкохолни пијалаци како што се различни кола базирани сокови и гварана напитки. За одбележување е фактот дека консумацијата на чајот (чајната напиевка – инфуз од чајните листови) е на второ место во светот, веднаш по водата.

10.7. ЕКСТРАКЦИЈА И ИСПИТУВАЊЕ НА АЛКАЛОИДИ

10.7.1. Екстракција, прочистување и изолација

Екстракцијата на алкалоидите се базира на разликите во растворливоста на алкалоид-бази и алкалоид-соли во вода и во органски растворувач. Општите методи за екстракција на алкалоиди од растителни извори зависат од целта и од обемот на операцијата (на пример, лабораториска во истражувачки цели или индустриска операција во комерцијални цели). Следните пет чекори се од витално значење:

1. Подготовка на примерок. Растителниот материјал се сведува на умерено груб прашок со дробење и мелење, за да се олесни и ефектуира контактот на растворувачот со ткивата и клетките што содржат алкалоиди. Во случај на растителни материи кои се богати со масти и масла, како што се: семиња, плодови и др., присутните неалкалоидни компоненти треба целосно да се елиминираат со екстракција со соодветен неполарен растворувач како *n*-хексан или петрол етер, во Сокслет апарат. Притоа, треба да се има предвид дека некои неполярни алкалоиди може да бидат извлечени од растителниот материјал со органскиот растворувач, поради што се препорачува проверка на органскиот растворувач по завршената екстракција на присуство на алкалоиди.
2. Ослободување на слободна алкалоид-база. Алкалоидите во растителен материјал речиси секогаш се присутни како соли на киселини (оксалати, тартарати, цитрати и др.). Обработка на растителниот материјал со одредена алкалија овозможува лесно пардвојување на алкалоид-бази од овие соли, со оглед дека алкалијата ја истиснува алкалоид-базата од нејзините соли. Притоа, изборот на употребената алкалија ќе зависи од:
 - а). Нативната состојба на алкалоидот во растителниот материјал (сол на силно базен алкалоид со минерална киселина обично има тенденција да претрпи раздвојување под влијание на посилна база. Слично на тоа, соодветната сол на слабо базен алкалоид и релативно слаба органска киселина ќе бара прилично послаба база за нејзино раздвојување).
 - б). Хемиски карактеристики на алкалоидната база: употребата на силни алкали, на пр., NaOH или KOH треба да се избегнува колку што е можно повеќе, поради фактот што одредени алкалоиди се подложени на хидролиза при подолг контакт со силна база (на пр., естерски алкалоиди кокаин, хиосциамин, езерин, фенолни алкалоиди цефелин, морфин и слични структури кои лесно се хидролизираат во присуство на силна база). Затоа поблаги алкални реагенси, на пример, разреден раствор на амонијак се погодни за ослободување на алкалоид бази од нивните соли.
 - в). Присуство на масни материи: Употребата на силни алкали е строго забранета во случај на растителни материјали што содржат маснотии поради формирање на сапонифицирани производи кои предизвикуваат проблематични емулзии. Во такви случаи, секогаш се претпочита да се одмасти растителната супстанција пред да се започне со ослободување на алкалоид-базите.
 - г). Карактеристики на алкалијата со која се раздвојуваат алкалоид-солите. Најдобри резултати се добиваат со воден раствор на амониум хидроксид. Оваа алкалија има значајни предности во однос на други послаби алкални агенси. Прво, има адекватна алкалност за ослободување на повеќето вообичаени алкалоиди, и второ, испарливата природа на

амонијакот овозможува тој да се испари со впарувањето на органскиот растворувач. Раствор на NaOH или KOH се користи кога алкалоидите во материјалот природно се застапени како соли танати (сол на танинска киселина). Во некои случаи дури и силните бази како што се KOH или NaOH не можат да ги раздвојат танатните соли поради силината на воспоставената врска на алкалоидот со танините и нивната екстремна нерастворлива природа.

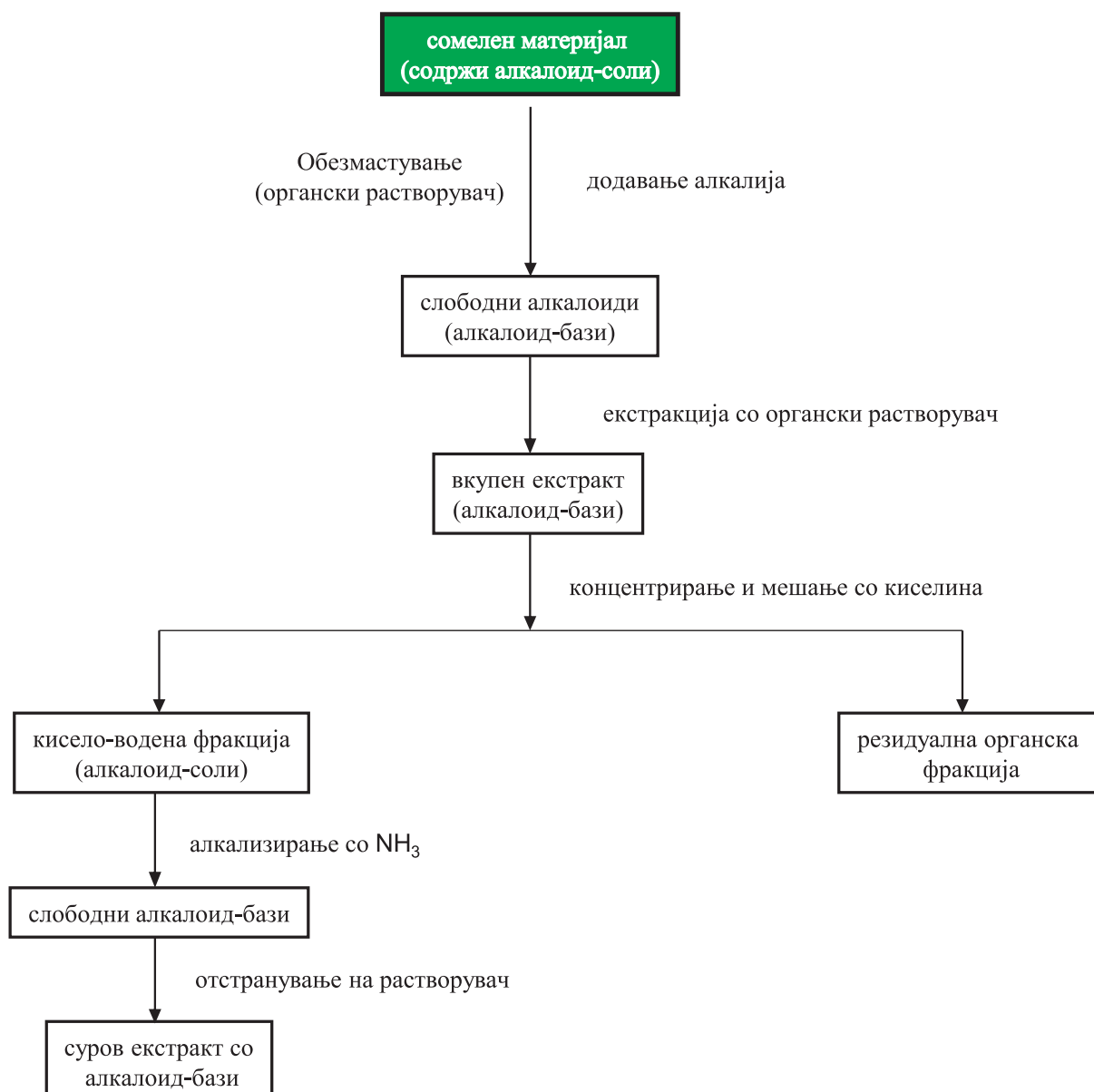
3. Екстракција на алкалоид-база со погоден растворувач. Екстракцијата на алкалоидната база може да се постигне со три различни типа растворувачи:

- а) Екстракција со растворувачи кои се мешаат со вода: Голем број на алкалоиди и нивните соодветни соли се растворливи во алкохоли, како што се: метанол, етанол и изопропанол и затоа, токму овие растворувачи може да се користат и за нивна екстракција од растителни материјали. Вообичаениот преттретман на суровината со алкалија може целосно да се избегне, бидејќи се покажа дека алкохолот ги раствора не само на алкалоидните соли, туку и слободните бази, доколку се присутни во растителната суровина. Во практиката се покажа дека не е потребено ниту закиселување на алкохолот со мала количина на минерална киселина или органска киселина. Екстракцијата на вкупни алкалоиди со алкохол треба да биде пристап од избор, поради максимална ефикасност и економичност на процесот.
- б) Екстракција со растворувачи кои не се мешаат во вода. Најчесто се користат: хлороформ, диетил етер и изопропил етер. Во некои случаи подобра ефикасност се постигнува со други органски растворувачи, како што се: етилен хлорид, јаглерод тетрахлорид и бензол. Генерално, хлороформот се смета за најдобар растворувач од оваа група, иако некои алкалоиди не може да се екстрахираат, како на пр., кватернарните алкалоиди тубокурарин, берберин и др.
- в) Екстракција со вода. Се користи закиселена вода со разреден раствор од HCl, H₂SO₄ или CH₃COOH (0,1 % до 1 %), при што се екстрахираат алкалоид-соли. Добиениот воден екстракт потоа треба да се алкализира, за да се ослободат алкалоид-базите кои се преземат со органски растворувач. Иако водата е најевтин можен поларен растворувач за екстракција на алкалоиди, ваквата екстракција сепак, има значаен обем на недостатоци бидејќи во екстрактот преминуваат голем број други во вода растворливи растителни компоненти (шеќери, пигменти, скроб, танини, протеини и сл.), што на крајот доведува до енормно губење на време, енергија и хемикалии. Денес водата се користи многу ограничено, во исклучителни ситуации, кога навистина дава задоволителен принос.

Општо земено, алкалоидите може да се екстрахираат со кој било од следните три добро дефинирани и широко прифатени екстрактивни процеси:

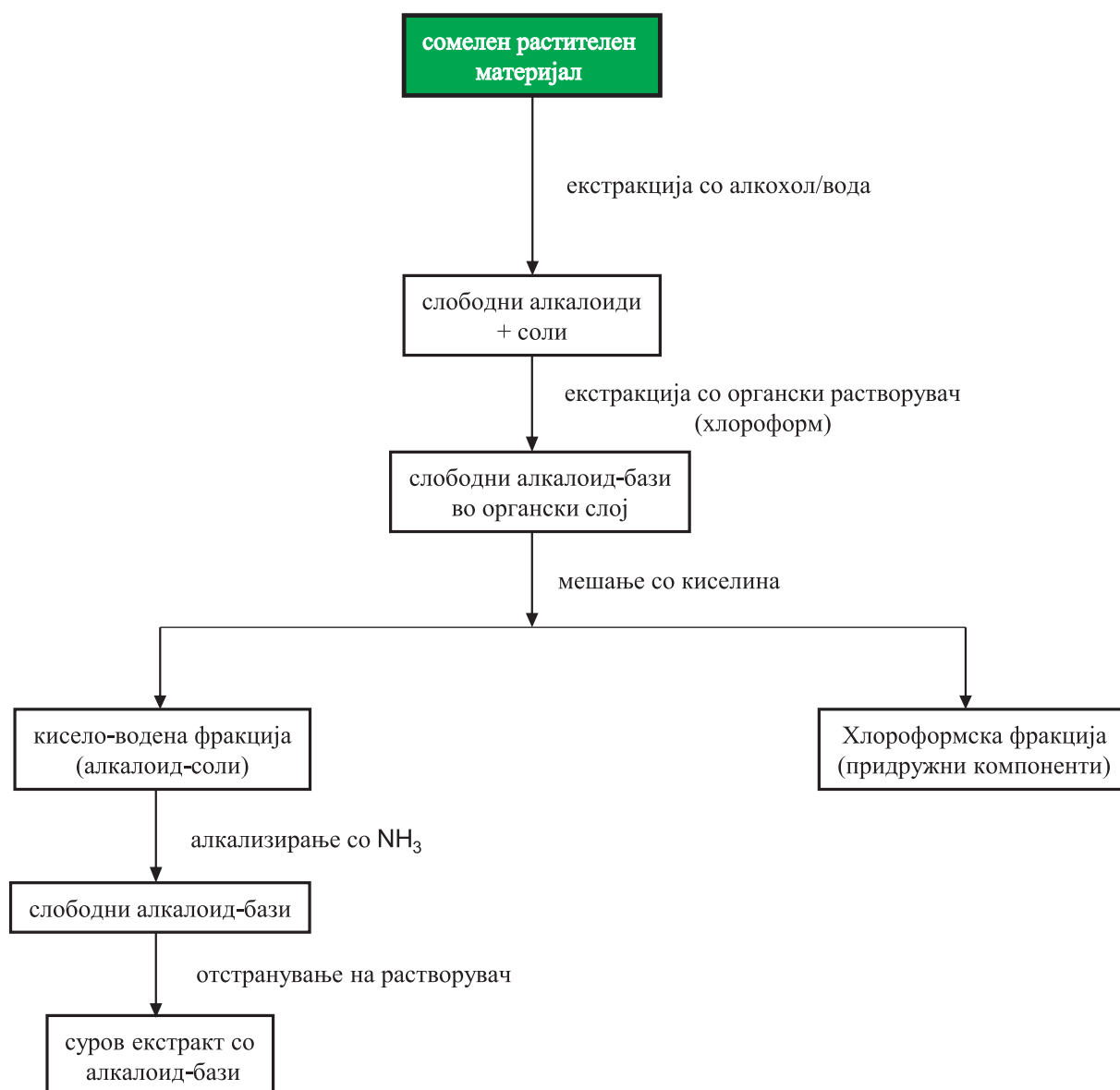
- (а) Екстракција по Сокслет. Во апаратурата по Сокслет, во екстракторот се врши континуиран проток (кружење) на растворувач низ растителен материјал, кој е во прашеста форма и спакуван во посебни целулозни чаури. Се практикува растителниот материјал да се натопи со разреден раствор на амонијак и потоа да се спакува во чаурата. Со континуирано кружење на екстрактивното средство, се овозможува органскиот растворувач длабоко да пенетрира во натопениот растителен материјал со што се овозможува најголема можна екстракција на алкалоидите. Откако ќе се констатира дека екстракцијата е завршена, по филтрирање, растворувачот се испарува во ротационен испарувач, а остатокот се третира понатаму за изолација на поединечни алкалоиди.
- (б) Екстракција по Стас-Ото (Stas-Otto). Методот се заснова на дистрибуцијата на алкалоиди помеѓу разблажена киселина или воден закиселен раствор и органски растворувач, кој не се меша со вода (слика 243). Растителниот материјал се меша со вода и со сла-

ба алкалија, за да се направи хомогена паста, која се екстрахира со хлороформ во апаратура по Сокслет. Додадената алкалијата е најчесто воден раствор од амониум хидроксид и има задача да ги ослободи алкалоид-базите, кои се екстрахираат со хлороформ. Добиениот хлороформски екстракт се впарува до помал волумен и потоа се обработува со разредена сулфурна киселина (во одделителна инка), а добиените кисели фракции се собираат. Во добиената кисела фаза се присутни алкалоид-соли (сулфати) кои се растворливи во вода. Водениот слој потоа се меша со амонијак и алкалоидите се преведуваат во слободни алкалоид-базии, а се создава сол амониум сулфат што е раствора во вода. Слободните алкалоиди (алкалоид-базии) не се растворливи во вода и се таложат. Добиениот талог се суши и потоа соодветно понатаму фракционира.



Слика 243. Екстракција на алкалоиди по Стас-Ото

- (в) Екстракција со вода или со алкохол. Растителниот материјал соодветно уситнет се екстрахира со вода или со алкохол, добиениот воден слој се екстрахира со органски растворувач за да се отстранат липофилните придружни компоненти (масти, масла, восоци и др.), а потоа се обработува со разблажена киселина за да се добијат алкалоид-соли кои преминуваат во водената фаза. Водениот слој потоа се третира со амонијак за да се добијат слободни алкалоид-бази кои се преземаат со органски растворувач. По испарувањето до суво, се добива сув остаток кој претставува смеса од алкалоиди (алкалоид-бази) (слика 244).



Слика 244. Екстракција со закиселена вода или алкохол

- г) Екстракција по Кипенбергер. Екстракцијата се карактеризира со загревање на растителниот материјал со раствор на танин во глицерол (1 : 5) на константна температура од 40 °C, во времетраење од 48 часа. Добиената смеса по истекот на ова време, дополнително

се загрева до 50 °C за да помогне во целосното коагулирање на протеинските материи, се лади до амбиентална температура и потоа филтрира. Филтратот се обработува со петролестер за да се отстранат масните материи (масти, масла и восоци), а трагите од заостанат петролестер во филтратот се отстрануваат со загревање (на водена бања) или со изложување на инфрацрвена светлина. Добиениот суров екстракт без маснотии последователно се закиселува и се екстрахира со хлороформ, за да се извлечат алкалоидите.

4. Прочистување на суров алкалоиден екстракт. Суровиот алкалоиден екстракт секогаш е подложен на понатамошно прочистување, кое може да се изврши на повеќе различни начини. Најчесто се применува екстракција со киселински раствор, при што разредена H_2SO_4 дава добри резултати во споредба со HCl . Добиениот киселински раствор се преведува во алкален со разреден раствор NH_4OH за да се ослободат алкалоидите кои потоа се екстрахираат со органски растворувач. Растворувачот се отстранува под намален притисок, а трагите на влага се отстрануваат со безводен натриум сулфат.

За да се избегне формирање на проблематични емулзии, често се додава раствор од гума-трагакант во водната фаза. Во случај емулзијата сè уште да опстојува, двете фази може да се одвојат со центрифугирање. За отстранување на придружните компоненти што ја отежнуваат екстракцијата на алкалоидите, како што се: пигменти, смоли, восоци, масла и масти, може да се користи 2,5-5 % (w/v) раствор на олово ацетат, со кој придружните компоненти се таложат. Вишокот на олово што останува во екстрактот се отстранува или со гасовит H_2S или со додавање на натриум фосфат.

5. Фракционирање на сурови алкалоиди. Повеќето растителни материјали вообичаено содржат мешавина од хемиски тесно поврзани алкалоиди. Затоа е неопходно да се изврши фракционирање на суровите алкалоиди од екстрактот или на растворот што ги содржи вкупните сурови алкалоиди. Конвенционалните методи кои се долготрајни и не многу успешни, денес се заменети со: (а) фракциона кристализација, (б) фракциона дестилација и (в) дериватизација со производи со ниска растворливост. Се користат препаративната HPLC, HPTLC, CCC и други хроматографски техники, вклучително и CC, IEC и др.

Со оглед дека алкалоидите се многу голема група разновидни структури, при нивна сепарација можни се некои типични ситуации како на пр.

- (а) Поголем дел од алкалоидите да се лесно растворливи во хлороформ и релативно помалку растворливи во други органски растворувачи. Генерално, редоследот на растворливост на алкалоидите во насока од најдобар до најлош растворувач е: хлороформ > ацетон > етанол > метанол > етил ацетат > етер > *n*-хексан. Имајќи го предвид горенаведениот профил на растворливост на алкалоидите во органски растворувачи, доколку еден од алкалоидите е многу помалку растворлив во етанол од хлороформот, можна е фракционална кристализација на овој алкалоид. Во овој конкретен пример, фракцијата на хлороформ се концентрира на соодветно ниво, а топлиот етанол се додава во мали пропорции во интервали. Така, по ладењето алкалоидот, кој е помалку растворлив во етанол, лесно се одвојува.
- (б) Во случај фракционата кристализација да не протекува успешно, алкалоидите може да се преведат во соли и потоа да се изврши раздвојувањето.
- (в) Различни киселини (HCl , HBr , HI , $HClO_4$, HNO_3 , $C_2H_2O_4$ и $C_6H_3N_3O_7$) може да се додат во воден или во метанолен раствор, алкалоидите се преведуваат во соодветни соли, а добиените соли се таложат со додавање на етер (во кој не се раствораат). Исталожените сурови алкалоидни соли може дополнително да се рекристализираат од врел ацетон кој содржи мал дел од метанол.

- (г) Во одредени други специфични случаи, солите на соодветните оксалати, пикрати и перхлорати може да се таложат од нивните раствори во ацетон, со додавање на етил ацетат.

10.7.2. Идентификација и квантификација на алкалоиди

Општата идентификација на алкалоидите во растителен материјал се изведува во кисело-воден екстракт со определени реагенси за алкалоиди. Тие можат да бидат од типот општи реагенси или уште наречени „таложни реагенси“ бидејќи најчесто како производ на реакција се создава талог, тешко растворлив комплекс со соодветна боја. Во овој тип реагенси спаѓаат:

- Мајеров реагенс (K_2HgI_4)
- Драгендорфов реагенс ($KBiI_4$)
- Хагеров реагенс (заситен раствор на пикринска киселина)
- Вагнеров реагенс (KI_3)
- раствор на танинска киселина
- раствор на силико-волфрамова киселина
- раствор на фосфор-молибденска киселина и др.

За идентификација на алкалоидите како многу поспецифични се користат одредени боени реакции, карактеристични за определени групи алкалоиди. Една од таквите реакции е Виталиева реакција за докажување присуство на тропански алкалоиди. Официелна е според Европската фармакопеја за идентификување на лист од поамница и на лист од татула. Протекува така што во метанолан екстракт од лист од поамница или татула се додава испарлива азотна киселина, а по испарување до суво се раствора во ацетон и по додавање на раствор на метанолан калиум хидроксид се добива виолетово обојување од нитриран дериват на тропан. Ергот алкалоидите се идентификуваат со 4-диметиламинобензалдехид во кисела средина при што се добива сино обојување (Вануркова реакција). Идентификацијата на пуринските алкалоиди се врши со мурексидна реакција, која протекува со додавање на бромна вода во сублимиран и кристализиран пурински алкалоид, со што се добива портокаловиот остаток кој по упарување, со амонијак дава пурпурно црвено обојување од создадениот мурексид.

Некои физички особини на алкалоидите можат да бидат искористени во идентификацијата. Типичен пример е кора од хининово дрво која при загревање ослободува пареи од сублимиран хинин со виолетова боја. Алкохолниот раствор на вака ослободен хинин покажува виолетова флуоресценција. Некои алкалоиди се докажуваат преку нивен горчлив вкус, боенето на плунката (берберинот ја бои жолто), или специфичниот мирис (кониин мириса на глувчешка урина) и сл. Специфичните физиолошки ефекти на некои алкалоиди можат, исто така, да се искористат за докажување на нивното присуство во растителен материјал. Така, тропанските алкалоиди се докажуваат преку мидријазата (ширењето на очната зеница) кај лабораториски животни.

Во квалитативната анализа на алкалоидните растителни сировини денес сè повеќе се користат хроматографските техники. Често се користи TLC, при што за идентификација на алкалоидните петна се користат реагенсите што развиваат определена боја: Драгендорфов реагенс (универзално дава темнокафеави петна), јодни пареи, калиум јодоплатинат, цериум или амониум сулфат и др. Се користат и адсорпционата, партиционата, јонско-изменувачката, афинитетната, хартиената, колонската и хроматографијата со исклучување врз база на големината.

Квантитативната анализа се изведува со примена на различни техники, повторно во зависност од базноста и другите карактеристики на алкалоидните соединенија. Квантитативната анализа на алкалоидните дроги најчесто се врши со определување на вкупното количество алкалоиди. Се користат титриметриски, колориметриски, спектрофотометриски, флуориметриски, гравиметри-

ски и др. методи. Во повеќето случаи, се врши HPLC- анализа на алкалоиди во реверзно-фазни системи (RP). Некои алкалоиди како што се тропанските, можне успешно се разделуваат со мобилни фази кои содржат само органски модификатор и вода или пуфер со неутрална pH-вредност, но повеќето алкалоиди во ваквите елуентни системи слабо се раздвојуваат и добиените пикови на хроматограмите се многу асиметрични. Затоа, се препорачува користење на елуенти со кисело pH што се добиваат со додавање на киселини или соодветни пуфери. Намалувањето на pH-јонизацијата на силанол (функционална група Si-O-H) може да го намали задржувањето на компонентите и да го подобри обликот на пикот и ефикасноста на системот. Ретко, за сепарација на алкалоиди се користени мобилни фази со базно pH, во случаи кога јонизацијата на испитуваните соединенија е потисната. Добра симетрија на врвови и добра сепаративна селективност се добива во елуентни системи кои содржат реагенси за спарување на јони (ion pairing reagents). Добри резултати се добиени во многу случаи кога блокаторите на силанол, како што се амини, биле додадени во елуентите. За успешноста на сепарацијата на алкалоидите важен е изборот на стационарната фаза. Оптимизација на стационарна фаза за анализа на базни соединенија, како што се алкалоидите, се постигнува со минимизирање на интеракцијата помеѓу анализот и резидуалните силаноли. Употребата на UPLC-методи за анализа на некои алкалоиди овозможува подобра резолуција и значително намалување на време на анализа. Алтернативните HPLC-методи како што се HILIC и ICE добија сè поголемо внимание и се применуваат за селективна и брза анализа на одбрани алкалоиди. Високата ефикасност, добрите форми на врвови и брзите времињата на анализа беа добиени со користење на овие методи. LC-MS и LC-NMR се особено атрактивни техники што обезбедуваат хроматографски и структурни информации истовремено.

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

- Agidew, M. G. (2022). Phytochemical analysis of some selected traditional medicinal plants in Ethiopia. *Bulletin of the National Research Centre*, 46(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s42269-022-00770-8>
- Alem, F. Z., Gita, S. A., Cougnaud, L., Affnar, C., Nounah, I., Youssef, B., de Oliveira, A. L., Charrouf, Z., & Rhourri-Frih, B. (2020). Lawsone quantification in *Lawsonia inermis* L. by HPLC-MS: How does the temperature and pluviometry affect lawsone concentration?. *Industrial crops and products*, 158, 112960. <https://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/>
- Alexandre, E. M., Moreira, S. A., Pinto, C. A., Pintado, M., & Saraiva, J. A. (2020). Analysis of glucosinolates content in food products. In *Glucosinolates: Properties, recovery, and applications* (pp. 213-250). Academic Press.
- Al-Zehouri, J. (2017). Determination of coumarin in methanol extract of cinnamon (*Cinnamomum cassia* Blume) using reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(4), 726-729.
- Andini, S., Araya-Cloutier, C., Sanders, M., & Vincken, J. P. (2020). Simultaneous analysis of glucosinolates and isothiocyanates by reversed-phase ultra-high-performance liquid chromatography–electron spray ionization–tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(10), 3121-3131.
- Appenteng, M. K., Krueger, R., Johnson, M. C., Ingold, H., Bell, R., Thomas, A. L., & Greenlief, C. M. (2021). Cyanogenic glycoside analysis in American elderberry. *Molecules*, 26(5), 1384.
- Arias-Barrau, E., Olivera, E. R., Luengo, J. M., Fernández, C., Galán, B., García, J. L., Díaz, E., & Minambres, B. (2004). The homogentisate pathway: a central catabolic pathway involved in the degradation of L-phenylalanine, L-tyrosine, and 3-hydroxyphenylacetate in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 186(15), 5062-5077.
- Arnault, I., Christidès, J. P., Mandon, N., Haffner, T., Kahane, R., & Auger, J. (2003). High-performance ion-pair chromatography method for simultaneous analysis of alliin, deoxyalliin, allicin and dipeptide precursors in garlic products using multiple mass spectrometry and UV detection. *Journal of chromatography A*, 991(1), 69-75. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00214-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00214-0)

- Arvindekar, A. U., Pereira, G. R., & Laddha, K. S. (2015). Assessment of conventional and novel extraction techniques on extraction efficiency of five anthraquinones from *Rheum emodi*. *Journal of food science and technology*, 52, 6574-6582. doi: 10.1007/s13197-015-1814-3
- Ashihara, H., Yokota, T., & Crozier, A. (2013). Biosynthesis and catabolism of purine alkaloids. In *Advances in botanical research* (Vol. 68, pp. 111-138). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408061-4.00004-3>
- Ashton, C. H. (2001). Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. *The British Journal of Psychiatry*, 178(2), 101-106. doi:10.1192/bjp.178.2.101
- Assessment report on *Echinacea angustifolia* DC., radix. https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-echinacea-angustifolia-dc-radix_en.pdf
- Assessment report on *Rhodiola rosea* L., rhizoma et radix. https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-rhodiola-rosea-first-version_en.pdf
- Babula, P., Adam, V., Havel, L., & Kizek, R. (2007). Naphthoquinones and their pharmacological properties. *Ceska a Slovenska farmacie: casopis Ceske farmaceuticke spolecnosti a Slovenske farmaceuticke spolecnosti*, 56(3), 114-120.
- Banik, B. K., Sahoo, B. M., & Tiwari, A. (2022). Terpenoids: Chemistry, Biochemistry, Medicinal Effects, Ethno-pharmacology. CRC Press.
- Bian, T., Corral, P., Wang, Y., Botello, J., Kingston, R., Daniels, T., Salloum, R. G., Johnston, E., Huo, Z., Lu, J., Liu, A. C., & Xing, C. (2020). Kava as a clinical nutrient: promises and challenges. *Nutrients*, 12(10), 3044. doi: 10.3390/nu12103044
- Bilbao, A., & Spanagel, R. (2022). Medical cannabinoids: a pharmacology-based systematic review and meta-analysis for all relevant medical indications. *BMC medicine*, 20(1), 259. <https://doi.org/10.1186/s12916-022-02459-1>
- Bilia, A. R., Scalise, L., Bergonzi, M. C., & Vincieri, F. F. (2004). Analysis of kavalactones from *Piper methysticum* (kava-kava). *Journal of Chromatography B*, 812(1-2), 203-214. doi: 10.1016/j.jchromb.2004.07.038
- Blainski, A., Lopes, G. C., & De Mello, J. C. P. (2013). Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, 18(6), 6852-6865. doi: 10.3390/molecules18066852.
- Bligh, S. A., Ogegbo, O., & Wang, Z. (2013). Flavonoids by HPLC. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_97
- Blumenthal, M., Busse, W. R., Goldberg, A., Gruenwald, J., Hall, T., Riggins, C. W., & Rister, R. S. (1998). The Complete German Commission E Monographs. Austin, TX: American Botanical Council. Integr Med Com, Boston.
- Bose, S., Laha, B., & Banerjee, S. (2014). Quantification of allicin by high performance liquid chromatography-ultraviolet analysis with effect of post-ultrasonic sound and microwave radiation on fresh garlic cloves. *Pharmacognosy magazine*, 10(Suppl 2), S288. doi: 10.4103/0973-1296.133279.
- Botelho, A. F. M., Pierezan, F., Soto-Blanco, B., & Melo, M. M. (2019). A review of cardiac glycosides: Structure, toxicokinetics, clinical signs, diagnosis and antineoplastic potential. *Toxicon*, 158, 63-68. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.11.429.
- British Herbal Pharmacopeia 1996, 4th ed., British Herbal Medicine Association, 1996.
- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants (No. Ed. 2). Intercept Limited.

- Capasso, F. (2003). *Phytotherapy: a quick reference to herbal medicine*. Springer Science & Business Media.
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(6), 3670-3695. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.02.008.
- Craske, J. D., & Bannon, C. D. (1987). Gas liquid chromatography analysis of the fatty acid composition of fats and oils: a total system for high accuracy. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 64(10), 1413-1417. <https://doi.org/10.1007/BF02636990>
- Crozier, A., Clifford, M. N., & Ashihara, H. (2006). *Plant secondary metabolites. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, Blackwell-Publishers.
- Cuong, D. X., Hoan, N. X., Dong, D. H., Thuy, L. T. M., Van Thanh, N., Ha, H. T., Tuyen, D., T., T., & Chinh, N. X. (2019). Tannins: extraction from plants. *Tannins-structural properties, biological properties and current Knowledge*.
- Dai, Y., Zhao, Y., & Nie, K. (2022). The Antiemetic Mechanisms of Gingerols against Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022. doi: 10.1155/2022/1753430.
- Dandawate, P. R., Vyas, A. C., Padhye, S. B., Singh, M. W., & Baruah, J. B. (2010). Perspectives on medicinal properties of benzoquinone compounds. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 10(5), 436-454. doi: 10.2174/138955710791330909.
- Debebe, A., Temesgen, S., Redi-Abshiro, M., Chandravanshi, B. S., & Ele, E. (2018). Improvement in analytical methods for determination of sugars in fermented alcoholic beverages. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2018. doi: 10.1155/2018/4010298.
- del Carmen Ramirez-Ahumada, M., Timmermann, B. N., & Gang, D. R. (2006). Biosynthesis of curcuminoids and gingerols in turmeric (*Curcuma longa*) and ginger (*Zingiber officinale*): identification of curcuminoid synthase and hydroxycinnamoyl-CoA thioesterases. *Phytochemistry*, 67(18), 2017-2029. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.06.028>
- Desgagné-Penix, I. (2021). Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: A review. *Phytochemistry Reviews*, 20(2), 409-431. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09678-5>
- Deutchman, F., Hofmann, B., Sprecher, E., & Stahl, E., *Pharmazeutische Biologie*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 1984.
- Dey, P. M., & Harborne, J. B., *Methods in plant biochemistry*, Vol. 1. Plant phenolics, Edited by Narborne J.B., Academic Press, London San Diego New York Barkeley Boston Sydney Tokyo Toronto 1989.
- Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. (2012). A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, 2(2), 303-336. doi: 10.3390/metabo2020303.
- Doloking, H., Tahar, N., & Ningsi, S. (2022). Flavonoids: A Review on Extraction, Identification, Quantification, and Antioxidant Activity. *Ad-Dawaa' Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(1). <https://doi.org/10.24252/djps.v5i1.29329>
- Dräger, B. (2002). Analysis of tropane and related alkaloids. *Journal of Chromatography A*, 978(1-2), 1-35. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967302013870>
- Dulo, B., Phan, K., Githaiga, J., Raes, K., & De Meester, S. (2021). Natural quinone dyes: A review on structure, extraction techniques, analysis and application potential. *Waste and Biomass Valorization*, 12(12), 6339-6374. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01443-9>

- Duval, J., Pecher, V., Poujol, M., & Lesellier, E. (2016). Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: A review. *Industrial Crops and Products*, 94, 812-833. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.056>
- El Aziz, M. M. A., Ashour, A. S., & Melad, A. S. G. (2019). A review on saponins from medicinal plants: chemistry, isolation, and determination. *Journal of Nanomedicine Research*, 8(1), 282-288.
- European Pharmacopoeia, Council of Europe, Strasbourg.
- Evans, W. C. (2009). Trease and Evans' pharmacognosy. Elsevier Health Sciences.
- Extraction Method of Alkaloids. <https://solutionpharmacy.in/extraction-method-of-alkaloids/>
- Facchini, P. J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual review of plant biology*, 52(1), 29-66. <https://tarjomefa.com/wp-content/uploads/2017/12/8237-English-TarjomeFa.pdf>
- Fan, E., Zhang, K., Jiang, S., Yan, C., & Bai, Y. (2008). Analysis of trans-resveratrol in grapes by micro-high performance liquid chromatography. *Analytical Sciences*, 24(8), 1019-1023. <https://doi.org/10.2116/analsci.24.1019>
- Gander, G. W., Jensen, R. G., & Sampugna, J. (1962). Analysis of milk fatty acids by gas-liquid chromatography. *Journal of Dairy Science*, 45(3), 323-328. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(62\)89393-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(62)89393-X)
- General Methods of Extraction and Isolation of Alkaloids. <http://www.e pharmacognosy.com/2012/07/general-methods-of-extraction-and.html>
- Hashim, S. N., Schwarz, L. J., Boysen, R. I., Yang, Y., Danylec, B., & Hearn, M. T. (2013). Rapid solid-phase extraction and analysis of resveratrol and other polyphenols in red wine. *Journal of Chromatography A*, 1313, 284-290. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.06.052>
- Hayes, M. (2020). Measuring protein content in food: An overview of methods. *Foods*, 9(10), 1340. doi: 10.3390/foods9101340.
- He, J., Hu, X. P., Zeng, Y., Li, Y., Wu, H. Q., Qiu, R. Z., Ma, W. J., Li, T., Li, C.Y., & He, Z. D. (2011). Advanced research on acteoside for chemistry and bioactivities. *Journal of Asian natural products research*, 13(05), 449-464. doi: 10.1080/10286020.2011.568940.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., & Williamson, E. M. (2004). Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy. pub Churchill Livingstone an imprint of Elsevier Science Limited. Dr Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases <http://www.ars-grin.gov/duke>.
- Herbert, R.B., 2001. The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites. Nat. Prod. Rep., 2001, 18, 50–65. [https://web.archive.org/web/20170809014450id_/http://www2.ups.edu/faculty/bdasher/Chem361/Review_Articles_files/Alkaloid %20Biosynthesis.pdf](https://web.archive.org/web/20170809014450id_/http://www2.ups.edu/faculty/bdasher/Chem361/Review_Articles_files/Alkaloid%20Biosynthesis.pdf)
- Hroboňová, K., & Sádecká, J. (2020). Coumarins content in wine: application of HPLC, fluorescence spectrometry, and chemometric approach. *Journal of food science and technology*, 57, 200-209. doi: 10.1007/s13197-019-04048-2.
- Hsieh, Y. J., Lin, L. C., & Tsai, T. H. (2005). Determination and identification of plumbagin from the roots of *Plumbago zeylanica* L. by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1083(1-2), 141-145. doi: 10.1016/j.chroma.2005.06.030. PMID: 16078700.
- Hu, L., Jhoo, J. W., Ang, C. Y., Dinovi, M., & Mattia, A. (2005). Determination of six kavalactones in dietary supplements and selected functional foods containing *Piper*

- methysticum* by isocratic liquid chromatography with internal standard. *Journal of AOAC International*, 88(1), 16-25. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.1.16>
- Hwang, Y. H., Cho, W. K., Jang, D., Ha, J. H., & Ma, J. Y. (2014). High-performance liquid chromatography determination and pharmacokinetics of coumarin compounds after oral administration of Samul-Tang to rats. *Pharmacognosy Magazine*, 10(37), 34. doi: 10.4103/0973-1296.126656.
- Ikeda, Y., Fujii, Y., Nakaya, I., & Yamazaki, M. (1995). Quantitative HPLC analysis of cardiac glycosides in *Digitalis purpurea* leaves. *Journal of Natural Products*, 58(6), 897-901. doi: 10.1021/np50120a012. PMID: 7673934.
- Jancic R., Botanica Pharmaceutica (Kulevanova S., prevod na makedonski jazik.), Nauka, Belgrad, 2004.
- Ji, X., Avula, B., & Khan, I. A. (2007). Quantitative and qualitative determination of six xanthenes in *Garcinia mangostana* L. by LC-PDA and LC-ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43(4), 1270-1276. doi: 10.1016/j.jpba.2006.10.018.
- Jia, S., Du, Z., Song, C., Jin, S., Zhang, Y., Feng, Y., X., & C., Jiang, H. (2017). Identification and characterization of curcuminoids in turmeric using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1521, 110-122. doi: 10.1016/j.chroma.2017.09.032.
- Jiang, Y., Huang, M., Wisniewski, M., Li, H., Zhang, M., Tao, X., Liu, Y., & Zou, Y. (2018). Transcriptome analysis provides insights into gingerol biosynthesis in ginger (*Zingiber officinale*). *The plant genome*, 11(3), 180034. doi: 10.3835/plantgenome2018.06.0034.
- Jiang, Z., Kempinski, C., & Chappell, J. (2016). Extraction and analysis of terpenes/terpenoids. *Current protocols in plant biology*, 1(2), 345-358.
- Joseph, D., & Schulze, J. (2021). Cannabinoid Activity-Is There a Causal Connection to Spasmolysis in Clinical Studies?. *Biomolecules*, 11(6), 826. doi: 10.3390/biom11060826.
- Kemsley, E. K., Zhuo, L., Hammouri, M. K., & Wilson, R. H. (1992). Quantitative analysis of sugar solutions using infrared spectroscopy. *Food chemistry*, 44(4), 299-304. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(92\)90054-6](https://doi.org/10.1016/0308-8146(92)90054-6)
- Khalsa, J. H., Bunt, G., Blum, K., Maggirwar, S. B., Galanter, M., & Potenza, M. N. (2022). Cannabinoids as medicinals. *Current addiction reports*, 9(4), 630-646.
- Kiokias, S., & Oreopoulou, V. (2021). A review of the health protective effects of phenolic acids against a range of severe pathologic conditions (including coronavirus-based infections). *Molecules*, 26(17), 5405. <https://doi.org/10.3390/molecules26175405>
- Kityania, S., Nath, R., Nath, D., Patra, J. K., & Talukdar, A. D. (2023). Acteoside (verbascoside): a prospective therapeutic alternative against hepatocellular carcinoma by inhibiting the expression of axl, fgfr, braf, TIE2 and RAF1 targets. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 26(10), 1907-1919. <https://doi.org/10.2174/1386207326666230315141647>
- Kotra, V. S. R., Satyabanta, L., & Goswami, T. K. (2019). A critical review of analytical methods for determination of curcuminoids in turmeric. *Journal of food science and technology*, 56, 5153-5166. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03986-1>
- Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology reports*, 24, e00370. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>

- Kureshi, A. A., Dholakiya, C., Hussain, T., Mirgal, A., Salvi, S. P., Barua, P. C., Talukdar, M., Beena, C., Kar, A., Zachariah, T. J., Kumari, P., Dhanani, T., Singh, R., Manivel, P., & Kumar, S. (2020). Simultaneous identification and quantification of three biologically active xanthenes in *Garcinia* species using a rapid UHPLC-PDA method. *Acta Chromatographica*, 32(3), 179-188. <https://doi.org/10.1556/1326.2019.00655>
- Kuroda, Y., Nicacio, K. J., da Silva-Jr, I. A., Leger, P.R., Chang, S., Gubiani, J. R., Deflon, V. M., Nagashima, N., Rode, A., Blackford, K., Ferreira, A. G., Sette, L. D., Williams, D. E., Andersen, R. J., Jancar, S., Berlinck, R. G. S., & Sarpong, R. (2018). Isolation, synthesis and bioactivity studies of phomactin terpenoids. *Nature Chemistry*, 10(9):938-945. doi: 10.1038/s41557-018-0084-x. Epub 2018 Jul 30. PMID: 30061613.
- Кулеванова С. *Фармакогнозија, Природи лековити и ароматични сировини*, Култура, Скопје, 2004.
- Кулеванова С., Стефков Ѓ., Карапанцова М. *Фитохемија*, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје, 2011.
- Кулеванова С. *Фитотерапија, Современа хербална медицина*. Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, е-книга. Скопје. 2016.
- Кулеванова С., Стефков Ѓ., Карапанцова М., Цветковиќ Каранфилова И., *Фармакогнозија, Природни лековити и ароматични сировини*, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје, 2023.
- Lee, I. K., & Yun, B. S. (2011). Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi *Phellinus* and *Inonotus spp.*, and their medicinal importance. *The Journal of antibiotics*, 64(5), 349-359. <https://doi.org/10.1038/ja.2011.2>
- Li, L. S., Huang, W. D., He, Q., & Ye, S. (2001). Determination of salicin in extract of willow bark by high performance liquid chromatography. *Se pu= Chinese Journal of Chromatography*, 19(5), 446-448.
- Li, R., Xiang, C., Ye, M., Li, H. F., Zhang, X., & Guo, D. A. (2011). Qualitative and quantitative analysis of curcuminoids in herbal medicines derived from *Curcuma* species. *Food Chemistry*, 126(4), 1890-1895. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.12.014.
- Liu, J., Yang, L., Dong, Y., Zhang, B., & Ma, X. (2018). Echinacoside, an inestimable natural product in treatment of neurological and other disorders. *Molecules*, 23(5), 1213. <https://doi.org/10.3390/molecules23051213>
- Majdi, C., Duvauchelle, V., Meffre, P., & Benfodda, Z. (2023). An overview on the antibacterial properties of juglone, naphthazarin, plumbagin and lawsone derivatives and their metal complexes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 162, 114690. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114690>
- Manthey, J. A., & Narciso, J. A. (2013). The HPLC-fluorescence detection of coumarins in 'Hamlin'sweet orange and 'Marsh'grapefruit leaf cankers. <http://journals.fcla.edu/fshs/article/view/83734/80574>
- Masyita, A., Sari, R. M., Astuti, A. D., Yasir, B., Rumata, N. R., Emran, T. B., Nainu, F., & Simal-Gandara, J. (2022). Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food chemistry: X*, 13, 100217. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100217>

- Matławska, I., Bylka, W., Widy-Tyszkiewicz, E., & Stanisław, B. (2015). Determination of the Juglone Content of *Juglans regia* Leaves by GC/MS. *Natural Product Communications*, 10(7), 1934578X1501000726. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000726>
- Maydt, D., De Spirt, S., Muschelknautz, C., Stahl, W., & Müller, T. J. (2013). Chemical reactivity and biological activity of chalcones and other α , β -unsaturated carbonyl compounds. *Xenobiotica*, 43(8), 711-718. <https://doi.org/10.3109/00498254.2012.754112>
- Mayefis, D., Anugerah, Y., & Rasyid, R. (2019). Determination of Total Xanthone Content in the Preparation of Mangosteen Pericarp Capsules (*Garcinia mangostana* L.) Available on the Market using UV-Visible Spectrophotometry Method. *Majalah Obat Tradisional*, 24(2), 98-103. <https://doi.org/10.22146/mot.43871>
- Mazza, G., Cacace, J. E., & Kay, C. D. (2004). Methods of analysis for anthocyanins in plants and biological fluids. *Journal of AOAC international*, 87(1), 129-145. <https://doi.org/10.1093/jaoac/87.1.129>
- Mazziotti, I., Petrarolo, G., & La Motta, C. (2021). Aurones: A golden resource for active compounds. *Molecules*, 27(1), 2. <https://doi.org/10.3390/molecules27010002>
- Medic, A., Zamljen, T., Hudina, M., & Veberic, R. (2021). Identification and quantification of naphthoquinones and other phenolic compounds in leaves, petioles, bark, roots, and buds of *Juglans regia* L., using HPLC-MS/MS. *Horticulturae*, 7(9), 326. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7090326>
- Minto, R. E., & Blacklock, B. J. (2008). Biosynthesis and function of polyacetylenes and allied natural products. *Progress in lipid research*, 47(4), 233-306. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2008.02.002>
- Moretón-Lamas, E., Lago-Crespo, M., Lage-Yusty, M. A., & López-Hernández, J. (2017). Comparison of methods for analysis of resveratrol in dietary vegetable supplements. *Food chemistry*, 224, 219-223. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.060>
- Mudge, E. M., Brown, P. N., Rimmer, C. A., & Phillips, M. M. (2020). Determination of curcuminoids in turmeric dietary supplements by HPLC-DAD: Multi-laboratory study through the NIH-ODS/NIST Quality Assurance Program. *Journal of AOAC International*, 103(6), 1625-1632. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsaa069>
- Murauer, A., & Ganzera, M. (2017). Quantitative determination of lactones in Piper methysticum (Kava-Kava) by supercritical fluid chromatography. *Planta Medica*, 83(12/13), 1053-1057. DOI: 10.1055/s-0043-100632
- Napagoda, M., & Jayasinghe, L. (Eds.). (2022). Chemistry of Natural Products: Phytochemistry and Pharmacognosy of Medicinal Plants. Walter de Gruyter GmbH & Co KG.
- Negi, J. S., Bisht, V. K., Singh, P., Rawat, M. S. M., & Joshi, G. P. (2013). Naturally occurring xanthenes: chemistry and biology. *Journal of Applied Chemistry*. <https://doi.org/10.1155/2013/621459>
- Negri, R. (2015) Polyacetylenes from terrestrial plants and fungi: Recent phytochemical and biological advances. *Fitoterapia*, 106, 92-109. doi: 10.1016/j.fitote.2015.08.011.
- Ninad, R., Jawade, Abhijeet, R., Chavan (2013). Ultrasonic-Assisted Extraction of Aloin from Aloe Vera Gel. *Procedia Engineering*, 51, 2013, 487-493. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2013.01.069>
- Niyigaba, T., Liu, D., & Habimana, J. D. D. (2021). The extraction, functionalities and applications of plant polysaccharides in fermented foods: A review. *Foods*, 10(12), 3004. <https://doi.org/10.3390/foods10123004>
- Nosal, A., & Skarzewski, J. (1985). Gas chromatographic analysis of 1, 4-naphthoquinones. *Chromatographia*, 20, 19-22. <https://doi.org/10.1007/BF02260481>

- Okuda, T., Yoshida, T., & Hatano, T. (1993). Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. *Phytochemistry*, 32(3), 507-521. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)95129-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)95129-X)
- Orth, H. C. J., Rentel, C., & Schmidt, P. C. (1999). Isolation, purity analysis and stability of hyperforin as a standard material from *Hypericum perforatum* L. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 51(2), 193-200. <https://doi.org/10.1211/0022357991772132>
- Ortiz-Pérez, E., Rivera, G., Salas, C. O., Zarate-Ramos, J. J., Trofymchuk, O. S., Hernandez-Soberanis, L., ... & Vázquez, K. (2021). Natural and synthetic naphthoquinones as potential anti-infective agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 21(22), 2046-2069. <https://doi.org/10.2174/1568026621666210915121348>
- Ouyang, Y., Li, J., Chen, X., Fu, X., Sun, S., & Wu, Q. (2021). Chalcone derivatives: Role in anticancer therapy. *Biomolecules*, 11(6), 894. <https://doi.org/10.3390/biom11060894>
- Paiva, S. R. D., Lima, L. A., Figueiredo, M. R., & Kaplan, M. A. C. (2004). Plumbagin quantification in roots of *Plumbago scandens* L. obtained by different extraction techniques. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 76, 499-504.
- Paramapojn, S., Ganzera, M., Gritsanapan, W., & Stuppner, H. (2008). Analysis of naphthoquinone derivatives in the Asian medicinal plant *Eleutherine americana* by RP-HPLC and LC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(4-5), 990-993. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.04.005>
- Perveen, S., & Al-Taweel, A. (Eds.). (2018). Terpenes and terpenoids. BoD-Books on Demand.
- Petruczynik, A. (2012). Analysis of alkaloids from different chemical groups by different liquid chromatography methods. *Open Chemistry*, 10(3), 802-835. DOI: 10.2478/s11532-012-0037-y.
- Pizzolatti, M. G., Luciano, C., & Delle Monache, F. (2000). Styryl-and dihydrostyryl-2-pyrones derivatives from *Polygala sabulosa*. *Phytochemistry*, 55(7), 819-822. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00301-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00301-0)
- Poulos, A. (1975). Complex lipids: a review. *Pathology*, 7(3), 252. [https://doi.org/10.1016/S0031-3025\(16\)38860-2](https://doi.org/10.1016/S0031-3025(16)38860-2)
- Pourseyed, Lazarjani, M., Torres, S., Hooker, T., Fowlie, C., Young, O., & Seyfoddin, A. (2020). Methods for quantification of cannabinoids: A narrative review. *Journal of Cannabis Research*, 2, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s42238-020-00040-2>
- Recent Advances in Natural Products Analysis. Edited by Nabavi, S.M., Saeedi, M., Nabavi S.F., Sanches Silva, A. Elsevier Science, 2020. pp 878. ISBN 0128175192, 9780128175194
- Ren, Z., Nie, B., Liu, T., Yuan, F., Feng, F., Zhang, Y., Zhou, W., Xu, X., Yao, M., & Zhang, F. (2016). Simultaneous determination of coumarin and its derivatives in tobacco products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Molecules*, 21(11), 1511. <https://doi.org/10.3390/molecules21111511>
- Reper, S., Matthes, S., & Rozhon, W. (2022). Quantification of Arbutin in Cosmetics, Drugs and Food Supplements by Hydrophilic-Interaction Chromatography. *Molecules*, 27(17):5673. <https://doi.org/10.3390/molecules27175673>
- Rijai, L. (2017). Review of fast technics for isolation and structure elucidation of triterpene saponins compound from bionatural products. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(2), 150.
- Romero-Benavides, J. C., Ruano, A. L., Silva-Rivas, R., Castillo-Veintimilla, P., Vivanco-Jaramillo, S., & Bailon-Moscoso, N. (2017). Medicinal plants used as anthelmintics: Ethnomedical, pharmacological, and phytochemical studies. *European journal of medicinal chemistry*, 129, 209-217. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.02.005>

- Rossetto, M. R. M., Shiga, T. M., Vianello, F., & Lima, G. P. P. (2013). Analysis of total glucosinolates and chromatographically purified benzylglucosinolate in organic and conventional vegetables. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1), 247-252. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.022>
- Rozmer, Z., & Perjési, P. (2016). Naturally occurring chalcones and their biological activities. *Phytochemistry reviews*, 15, 87-120. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9387-8>
- Saini, R. K., Prasad, P., Shang, X., & Keum, Y. S. (2021). Advances in lipid extraction methods-a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13643. <https://doi.org/10.3390/ijms222413643>
- Samuelsson, G. (1999). Drugs of natural origin. Apotekarsocieteten.
- Samuelsson, G., & Bohlin, L. (2017). Drugs of natural origin: a treatise of pharmacognosy (No. Ed. 7). CRC Press Inc..
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Latha, L. Y. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African journal of traditional, complementary and alternative medicines*, 8(1). <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v8i1.60483>
- Schulz, V. (1997). Ha] nsel, R., Tyler, VE Rational Phytotherapy: A Physician's Guide to Herbal Medicine.
- Semwal, R. B., Semwal, D. K., Combrinck, S., & Viljoen, A. M. (2015). Gingerols and shogaols: Important nutraceutical principles from ginger. *Phytochemistry*, 117, 554-568. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.07.012>
- Sharma, P., Murthy, P., & Bharath, M. S. (2012). Chemistry, metabolism, and toxicology of cannabis: clinical implications. *Iranian journal of psychiatry*, 7(4), 149.
- Shen, X., Liang, X., He, C., Yin, L., Xu, F., Li, H., Tang, H., & Lv, C. (2023). Structural and pharmacological diversity of 1, 4-naphthoquinone glycosides in recent 20 years. *Bioorganic Chemistry*, 138, 106643. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106643>
- Sieniawska, E. (2015). Activities of tannins—from *in vitro* studies to clinical trials. *Natural Product Communications*, 10(11), 1934578X1501001118.
- Silakari, P., & Piplani, P. (2020). p-Benzoquinone as a privileged scaffold of pharmacological significance: A Review. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 20(16), 1586-1609. <https://doi.org/10.2174/1389557520666200429101451>
- Singh, G., & Pai, R. S. (2014). A rapid reversed-phase HPLC method for analysis of trans-resveratrol in PLGA nanoparticulate formulation. *International Scholarly Research Notices*. <https://doi.org/10.1155/2014/248635>
- Sivakesava, S., & Irudayaraj, J. (2000). Determination of sugars in aqueous mixtures using mid-infrared spectroscopy. *Applied Engineering in Agriculture*, 16(5), 543-550.
- Sproll, C., Ruge, W., Andlauer, C., Godelmann, R., & Lachenmeier, D. W. (2008). HPLC analysis and safety assessment of coumarin in foods. *Food chemistry*, 109(2), 462-469. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.068>
- Sripani, R., Syafri, S., Suryani, M. I., Susanti, M., & Hamidi, D. (2023). Optimisation of Extraction and TLC-Densitometric Analysis of α - and γ -Mangostin from the Rind of *Garcinia mangostana* L. *Tropical Journal of Natural Product Research*, 7(3).
- Stefkov, G., Cvetkovikj Karanfilova, I., Stoilkovska Gjorgievska, V., Trajkovska, A., Geskovski, N., Karapandzova, M., & Kulevanova, S. (2022). Analytical techniques for phytocannabinoid profiling of cannabis and cannabis-based products-A comprehensive review. *Molecules*, 27(3), 975. <https://doi.org/10.3390/molecules27030975>

- Sugiyama, A., Yamazaki, Y., Hamamoto, S., Takase, H., & Yazaki, K. (2017). Synthesis and secretion of isoflavones by field-grown soybean. *Plant and Cell Physiology*, 58(9), 1594-1600. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx084>
- Szeja, W., Gryniewicz, G., & Rusin, A. (2017). Isoflavones, their glycosides and glycoconjugates. Synthesis and biological activity. *Current Organic Chemistry*, 21(3), 218-235.
- Tahir, M. N., Shahbazi, F., Rondeau-Gagné, S., & Trant, J. F. (2021). The biosynthesis of the cannabinoids. *Journal of cannabis research*, 3, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s42238-021-00062-4>
- Tang, Y., & Fields, C. (2019). A UHPLC-UV Method development and validation for determining kavalactones and flavokavains in *Piper methysticum* (Kava). *Molecules*, 24(7), 1245. <https://doi.org/10.3390/molecules24071245>
- Tao, Y. I., Li, W., Liang, W., & Van Breemen, R. B. (2009). Identification and quantification of gingerols and related compounds in ginger dietary supplements using high-performance liquid chromatography– tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(21), 10014-10021. <https://doi.org/10.1021/jf9020224>
- Tawaha, K., Gharaibeh, M., El-Elmat, T., & Alali, F. Q. (2010). Determination of hypericin and hyperforin content in selected Jordanian *Hypericum* species. *Industrial crops and products*, 32(3), 241-245. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.04.017>
- Thygesen, L. G., Jørgensen, K., Møller, B. L., & Engelsen, S. B. (2004). Raman spectroscopic analysis of cyanogenic glucosides in plants: development of a flow injection surface-enhanced Raman scatter (FI-SERS) method for determination of cyanide. *Applied spectroscopy*, 58(2), 212-217.
- Tine, Y., Renucci, F., Costa, J., Wélé, A., & Paolini, J. (2017). A method for LC-MS/MS profiling of coumarins in *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) B. Zepernich and Timler extracts and essential oils. *Molecules*, 22(1), 174. doi: 10.3390/molecules22010174.
- Treml, J., Leláková, V., Šmejkal, K., Paulíčková, T., Labuda, Š., Granica, S., ... & Hošek, J. (2019). Antioxidant activity of selected stilbenoid derivatives in a cellular model system. *Biomolecules*, 9(9), 468. doi: 10.3390/biom9090468.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Tzanova, M., Atanasov, V., Yaneva, Z., Ivanova, D., & Dinev, T. (2020). Selectivity of current extraction techniques for flavonoids from plant materials. *Processes*, 8(10), 1222. <https://doi.org/10.3390/pr8101222>
- Veberič, R. (2010). Bioactive compounds in fruit plants. Ljubljana: Biotehniška fakulteta.
- Walker, E. B. (2007). HPLC analysis of selected xanthenes in mangosteen fruit. *Journal of separation science*, 30(9), 1229-1234. doi: 10.1002/jssc.200700024.
- Walsh, K. B., McKinney, A. E., & Holmes, A. E. (2021). Minor cannabinoids: biosynthesis, molecular pharmacology and potential therapeutic uses. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 777804. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.777804>
- Wang, C. J., Jiang, Y. Q., Liu, D. H., Yan, X. H., & Shuang-Cheng, M. A. (2013). Characterization of phloroglucinol derivatives and diterpenes in *Euphorbia ebracteolata* Hayata by utilizing ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical analysis*, 3(4), 292-297.
- Wang, H. B., Qi, W., Zhang, L., & Yuan, D. (2014). Qualitative and quantitative analyses of alkaloids in *Uncaria* species by UPLC-ESI-Q-TOF/MS. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 62(11), 1100-1109.

- Wang, J., Xu, J., Gong, X., Yang, M., Zhang, C., & Li, M. (2019). Biosynthesis, chemistry, and pharmacology of polyphenols from Chinese *Salvia* species: A review. *Molecules*, 24(1), 155.
- Wang, S., Tang, F., Yue, Y., Yao, X., Wei, Q., & Yu, J. (2013). Simultaneous determination of 12 coumarins in bamboo leaves by HPLC. *Journal of AOAC International*, 96(5), 942-946. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.12-441>
- Wang, S., You, X. T., & Wang, F. P. (1992). HPLC determination of salidroside in the roots of *Rhodiola* genus plants. *Yao xue xue bao = Acta Pharmaceutica Sinica*, 27(11), 849-852.
- Wang, T., & Rodriguez-Saona, L. E. (2012). Rapid determination of sugar level in snack products using infrared spectroscopy. *Journal of food science*, 77(8), C874-C879. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02824.x.
- Weiner M., Winer J., Farnsworth N., Winer's Herbal, Quantum Books, Mill Valley, Ca, Edition 1990.
- Welch, C. R., Wu, Q., & Simon, J. E. (2008). Recent advances in anthocyanin analysis and characterization. *Current analytical chemistry*, 4(2), 75-101. doi: 10.2174/157341108784587795
- Williamson, E. M., Okpako, D. T., & Evans, F. J. (1996). Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material, Volume 1 (Vol. 1). John Wiley & Sons.
- Wulandari, R. (2018). Sudjadi; Martono, S.; Rohman, A. Liquid Chromatography and Fourier Transform Infrared Spectroscopy for quantitative analysis of individual and total curcuminoid in *Curcuma longa* extract. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8, 107-113.
- Xiao, Y., Ren, Q., & Wu, L. (2022). The pharmacokinetic property and pharmacological activity of acteoside: A review. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 153, 113296. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113296.
- Xu, W., Zhong, C., Zou, C., Wang, B., & Zhang, N. (2020). Analytical methods for amino acid determination in organisms. *Amino Acids*, 52(8), 1071-1088. doi: 10.1007/s00726-020-02884-7.
- Yang, J. B., Song, Y. F., Liu, Y., Gao, H. Y., Wang, Q., Wang, Y., Cheng, X. L., Zuo, T. T., Hu, X. W., Wei, F., Jin, H. T., Wang, S. T., & Ma, S. C. (2021). UHPLC-QQQ-MS/MS assay for the quantification of dianthrone as potential toxic markers of *Polygonum multiflorum* Thunb: applications for the standardization of traditional Chinese medicines (TCMs) with endogenous toxicity. *Chinese Medicine*, 16(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s13020-021-00463-w>
- Ye, C. L., Lu, Y. H., Li, X. D., Wei, D. Z., & Whitehead, C. S. (2005). HPLC analysis of a bioactive chalcone and triterpene in the buds of *Cleistocalyx operculatus*. *South African Journal of Botany*, 71(3-4), 312-315.
- Yubin, J. I., Miao, Y., Bing, W., & Yao, Z. (2014). The extraction, separation and purification of alkaloids in the natural medicine. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(1), 338-345. <https://www.jocpr.com/articles/the-extraction-separation-and-purification-of-alkaloids-in-the-natural-medicine.pdf>
- Yuvanatemiya, V., Srean, P., Klangbud, W. K., Venkatachalam, K., Wongsu, J., Parametthanuwat, T., & Charoenphun, N. (2022). A review of the influence of various extraction techniques and the biological effects of the xanthenes from mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) pericarps. *Molecules*, 27(24), 8775. doi: 10.3390/molecules27248775.

- Zagzoog, A., Mohamed, K. A., Kim, H. J. J., Kim, E. D., Frank, C. S., Black, T., ... & Laprairie, R. B. (2020). *In vitro* and *in vivo* pharmacological activity of minor cannabinoids isolated from *Cannabis sativa*. *Scientific Reports*, 10(1), 20405. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77175-y>
- Zaheer, K., & Humayoun Akhtar, M. (2017). An updated review of dietary isoflavones: Nutrition, processing, bioavailability and impacts on human health. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(6), 1280-1293. doi: 10.1080/10408398.2014.989958
- Zhang, H., Qiu, M., Chen, Y., Yun, S., Wang, C., Harry, H. S., & Fong, H. S. (1987). Phytochemistry and pharmacognosy-plant terpenes. *Encycl Life Supp Systems (EOLSS)*, 4, 377-397.
- Zhang, J., Gao, L., Hu, J., Wang, C., Hagedoorn, P. L., Li, N., & Zhou, X. (2022). Hypericin: source, determination, separation, and properties. *Separation & Purification Reviews*, 51(1), 1-10. <https://doi.org/10.1080/15422119.2020.1797792>
- Zhou, A., Li, Q. L., Peng, D. Y., Wu, H. F., & Wang, X. S. (2008). Analysis of xanthones in gamboge by HPLC-PDA-ESI/MS. *Yao xue xue bao = Acta Pharmaceutica Sinica*, 43(8), 838-842.
- Zick, S. M., Ruffin, M. T., Djuric, Z., Normolle, D., & Brenner, D. E. (2010). Quantitation of 6-, 8-and 10-gingerols and 6-shogaol in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *International journal of biomedical science: IJBS*, 6(3), 233.
- Zwergel, C., Gaascht, F., Valente, S., Diederich, M., Bagrel, D., & Kirsch, G. (2012). Aurones: interesting natural and synthetic compounds with emerging biological potential. *Natural product communications*, 7(3), 1934578X1200700322.

КРАТЕНКИ

AALLME	-Air-assisted liquid–liquid microextraction - течно-течна микроекстракција со помош на воздух
APCI	- Atmospheric-pressure chemical ionization - хемиска јонизација со атмосферски притисок
ASE	- Accelerated solvent extraction - забрзана екстракција со течност
ASE	- екстракција со алкален растворувач
ATPE	- Aqueous two-phase extraction - водена двофазна екстракција
CBC	– Cannabichromene - канабихромен
CBD	– Cannabidiol - канабидиол
CBDA	– Cannabidiolic acid - канабидиолна киселина
CBG	- Cannabigerol - канабигерол
CBGA	– Cannabigerolic acid - канабигеролна киселина
CBL	– Cannabicyclol - канабициклол
CBN	– Cannabinol - канабинол
CBND	– Cannabinodiol - канабинодиол
CC	– Column chromatography - колонска хроматографија
CCC	- Counter-current chromatography - контраструјна хроматографија
CD	- Circular Dichroism Spectrometry - метод на кружниот дихроизам спектрометрија
CE	- Capillary electrophoresis - капиларна електрофореза
CEC	- Capillary Electrochromatography - капиларна електрохроматографија
CF-FAB	- Continuous-flow fast-atom bombardment - бомбардирање со брз атом со континуиран проток

- CL-FIA** - Flow-Injection Analysis with Chemiluminescence Detection - анализа на проток-инјекција со детекција со хемилуминисценција
- CPC** - Centrifugal partition chromatography - центрифугална партициона хроматографија
- CPE-екстракција** - Cloud point extraction - екстракција со облак
- CPE-HPLC/DAD** – cloud-point extraction technique -HPLC/DAD - екстракција со облак во комбинација со високоперформансна течна хроматографија со детектор со диодни низи
- CZE** - Capillary zone electrophoresis - капиларо-зонска електрофореза
- DLLME** - Dispersive Liquid-Liquid Microextraction - дисперзивна течна-течна микроекстракција
- DM** - Dynamic maceration - динамична мацерација
- DMAPP** – Dimethylallyl pyrophosphate - диметилалилпирофосфат
- DMSO** – Dimethyl sulfoxide - диметил сулфоксид
- DNP** - 2,4- initrophenylhydrazine - 2,4-динитрофенилхидразин
- EAAE** - Enzyme-assisted aqueous extraction - екстракција со вода потпомогната со ензими
- EACP** - Enzyme-assisted cold pressing - ладно цедење со помош на ензими
- EAE** - Enzyme-assistant extraction - ензимски потпомогната екстракција
- ECD** - Electron capture detector - електрон-врзувачки детектор
- ECG** модификации – electrocardiogram - електрокардиограм
- ELISA** - Enzyme-linked immunosorbent assay - ензимски имуносорбентен тест
- ELSD** - Evaporative light scattering detector - испарувачки детектор со принцип на расејување на светлината
- EO** – Essential oil - етерично масло
- ESE** - Enhanced solvent extraction - подобрена екстракција со растворувач
- ESI** - Electrospray Ionization - електроспреј јонизација
- FID** – Flame ionization detector - пламен-јонизациски детектор
- FPP** - Farnesyl pyrophosphate - фарнезилпирофосфат
- FT-IR** - Fourier-transform infrared spectroscopy - фурие-трансформирана инфрацрвена спектроскопија
- GAE** - Gamma-assisted extraction - екстракција со помош на гама-зрачење
- GC-IRMS** - Gas chromatography - Isotope ratio mass spectrometry - гасна хроматографија во спрега со масена спектрометрија
- GC-MS** - Gas chromatography–mass spectrometry - гасна хроматографија во спрега со масена спектрометрија
- GFDP** - Geranylfarnesyl pyrophosphate – геранилфарнезилпирофосфат

- GGPP** - Geranylgeranyl pyrophosphate – геранилгеранилпирофосфат
- GLC** - gas-liquid chromatography - гасно-течна хроматографија
- GPC/SEC** - Gel Permeation Chromatography / size-exclusion chromatography – гел-пропустлива хроматографија / хроматографија со исклучување врз база на големина
- GPP** – Geranyl pyrophosphate - геранилпирофосфат
- HDL** - high-density lipoprotein - липопротеини со голема густина
- HF-LPME** - Hollow-fiber liquid-phase microextraction - микроекстракција на течна фаза на шупливи влакна
- HID** - хидроксиизофлаванон дехидратаза
- HILIC-UV** - Hydrophilic interaction liquid chromatography-UV - хидрофилна интеракциска хроматографија во комбинација со UV-детекција
- HPCPC** - High performance centrifugal partition chromatography - центрифугална преградна хроматографија со високи перформанси
- HPLC** - High-performance liquid chromatography - високоеперформансна течна хроматографија
- HPLC-DAD** - High-performance liquid chromatography with diode array detector - високоеперформансна течна хроматографија со детектор со диодни низи
- HPLC-FLD** - HPLC fluorescence detector – HPCL-флуоресцентна детекција/детектор
- HPLC-QTOF MS** - high pressure liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry – HPLC-комбиниран со анализатор со време-на-лет со MS
- HPSE** - High-pressure solvent extraction - екстракција со растворувач под висок притисок
- HPTLC** - High-performance TLC - високоеперформансна тенкослојна хроматографија со дензитометриска детекција
- HPTLC** - тенкослојна високоефикасна хроматографија со дензитометриска детекција
- HS екстракција** – Headspace extraction – хеадспејс екстракција
- HSCCC** - High-performance countercurrent chromatography – течно-течна партициона хроматографија
- HWE** - Hot water extraction - екстракција со топла вода
- IAC** - immunoaffinity chromatography – имуноафинитетна хроматографија
- IEC** - Ion-Exchange Chromatography – јон-изменувачка хроматографија
- IFS** - изофлавононска синтаза
- ILMAE** – ionic liquid based, microwave-assisted extraction - метод на јонски раствори за екстракција со помош на микробранови
- IPP** – Isopentenyl pyrophosphate - изопентилпирофосфат
-

- IR** - Infrared spectroscopy – инфрацрвена спектроскопија
- IRAE** - Infrared-assisted extraction - екстракцијата со помош на инфрацрвени зраци
- ITC** - Isothermal titration calorimetry - изотермална титрациона калориметрија
- KBr диск** – Potassium bromide (KBr) – калиум бромиден диск
- LC-MNR** - Liquid Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy - течна хроматографија-нуклеарно магнетно-резонантна спектроскопија
- LC-MS** - Liquid chromatography–mass spectrometry - течна хроматографија и масена спектрометрија
- LDL** - low-density lipoprotein - липопотеини со мала густина
- LLE** – liquid-liquid extraction – течно-течна екстракција
- mAbs** - Monoclonal antibodies – моноклонални антитела
- MAE** - Microwave Assisted Extraction - екстракција со помош на микробранови
- MALDI** - matrix-assisted laser desorption - матрикс-асистирана олеснета десорпциска јонизација со ласер
- MAME** - Microwave assisted micellar extraction - мицеларна екстракција со помош на микробранови
- MEKC** - Micellar electrokinetic chromatography - мицеларна електрокинетичка хроматографијата
- MHPLC** - Micro-high performance liquid chromatography - течна хроматографија со микровисоки перформанси
- MPLC** - Medium-pressure liquid chromatography - течна хроматографија со среден притисок
- MS** - Mass spectrometry - масена спектрометрија
- MSPD** - Matrix Solid Phase Dispersion - матрикс цврсто фазна дисперзија
- MVA** – Mevalonic acid - мевалонската киселина
- NMR** - Nuclear magnetic resonance spectroscopy – нуклеарно-магнетно-резонантна спектроскопија
- NPCE** - Negative pressure cavitation extraction - екстракција со кавитација со негативен притисок
- NPP** – Nerolidyl pyrophosphate – неролидол пирофосфат
- PC** – Paper chromatography - хартиена хроматографија
- PDA** – photodiode array detector - фотоосетлив детектор изграден од серија фотодиоди
- PEF extraction** - Pulsed electric field extraction - екстракција во импулсно електрично поле
- PHWE** - Pressurized hot water extraction - екстракција со топла вода под притисок
- PLE** - Pressurized liquid extraction - екстракција со течност под притисок

PPO -	Polyphenol oxidase - полифенол оксидаза
PVPP -	Polyvinylpyrrolidone - поливинилполипиролidon
PWE -	Pressurized water extraction - екстракција со вода под притисок
RI -	Refractive index – индекс на рефракција
ROS -	Reactive oxygen species - реактивните кислородни видови
RP-HPLC -	Reverse-phase HPLC – реверзно фазна HPLC
SAMN -	Surface-active maghemite nanoparticles - површински активни магемит наночестички
SCE -	Supercritical CO ₂ extraction – суперкритична CO ₂ екстракција
SCWE -	Subcritical water extraction - екстракција со супкритична вода
SDS-PAGE -	Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis - електрофореза со гел на натриум додецил сулфат полиакриламид / електрофореза со денатуирачки средства
SE -	Solvent Extraction - екстракција со растворувач
SFC -	Supercritical fluid chromatography - суперкритична-флуидна хроматографија
SFE -	Supercritical fluid extraction - екстракција со суперкритична течност (суперкритична екстракција)
SFEAP -	Supercritical fluid extraction assisted by pressing - суперкритична екстракција потпомогната со ладно цедење
SFME -	Solvent free microwave extraction - микробранова екстракција без растворувачи
SOD -	Superoxide dismutase - супероксид дизмутаза
SPE -	Solid-phase extraction - екстракција во цврста фаза (цврсто-фазна екстракција)
SPME -	Solid-phase micro extraction - микроекстракција во цврста фаза
TCD -	Thermal conductivity detector - детектор што работи на принцип на мерење на топлотна спроводливост
TCP -	total cyanogenic potential - вкупниот цијаноген потенцијал
Δ⁸-THC -	Δ ⁸ - <i>trans</i> -tetrahydrocannabinol (-)-Δ ⁸ - <i>trans</i> -тетрахидроканабинол
Δ⁹-THC -	Δ ⁹ - <i>trans</i> -tetrahydrocannabinol - (-)-Δ ⁹ - <i>trans</i> -тетрахидроканабинол
TIC -	total ion chromatogram – вкупен јонски хроматограм
TLC -	Thin-layer Chromatography - тенкослојна хроматографија
UAME -	Ultrasound assisted microwave extraction - мицеларна екстракција со помош на ултразвук / микробранова екстракција потпомогната со ултразвук
UHPE -	Ultrahigh pressure extraction - екстракција со ултрависок притисок

- UHPLC-MS/MS** - Ultra-high performance liquid chromatography-MS/MS -
ултрависокоперформансна течна хроматографија со танден масена
спектрометрија
- UMAE** - Ultrasound–Microwave Assisted Extraction - екстракција со помош на
ултразвук со микробранова
- UV/Vis** - Ultraviolet visible spectroscopy - ултравиолетова /видлива спектроскопија
- UVE** - Ultrasound-assisted enzyme extraction - ензимска екстракција со помош на
ултразвук
- UAE** - Ultrasound assisted extraction - екстракција со помош на ултразвук

СПИСОК НА ТАБЕЛИ

Табела 1. Класификација на коензимите според функцијата.....	17
Табела 2. Класификација на терпените.....	242
Табела 3. Општа молекуларна формула на родителскиот заситен јаглеводород	244

СПИСОК НА ИЛУСТРАЦИИ

Слика 1. Структура на моноклеотидот аденозин трифосфат - АТР.....	16
Слика 2. Структура на динуклетидот никотинамид-аденин-динуклеотидот – NAD и фосфорилираниот облик – NADP.....	16
Слика 3. Структура на коензим А (CoA) и на тиоестерот ацетил CoA.....	18
Слика 4. Светлата и темната фаза на фотосинтезата (преземено од https://andrianadimitrov.weebly.com/10921086109010861089108010851090107710791072.html).....	19
Слика 5. Трансформација на α - кетоглутарна киселина во глутаминска киселина и обратно....	21
Слика 6. Бета-оксидација на масни киселини и продукција на ацетил CoA	22
Слика 7. Биосинтетскиот пат на шикими киселина (создавање фенилпропаноиди).....	24
Слика 8. Поликетидна биосинтеза и создавање на ароматичен прстен	25
Слика 9. Продолжување на странична низа на фенилпропаноид (4-кумароил CoA).....	26
Слика 10. Спојување на C ₉ и C ₆ фрагменти и формирање на халкон и на флавоноидните деривати.....	26
Слика 11. Структура на изопрен.....	27
Слика 12. Биосинтеза на изопрен (патот на мевалонска киселина).....	27
Слика 13. Создавање на терпени според биогенетското изопренско правило.....	28
Слика 14. Создавање на различни групи терпени	29
Слика 15. Создавање на гликозидна врска помеѓу агликонот и шеќерот (гликонот) и пример на О-гликозид (салицин).....	30
Слика 16. Структура на полуацеталите на гликоза (α - и β -).....	30
Слика 17. Видови на екстрактивни постапки	37
Слика 18. Техники за квалитативна и квантитативна анализа на природни производи.....	48
Слика 19. Циклични форми на моносахариди: а) Фишерови проекции, б) Хавортови (Haworth-ови) проекции	52
Слика 20. Конформации на столица на β -D-глюкопираноза	53
Слика 21. Структури на дисахариди со трахелоза и малтоза-тип на врски	55
Слика 22. Класификација на полисахаридите.....	56
Слика 23. Структури на амилоза и амилопектин.....	58
Слика 24. Структури на различни пектински соединенија.....	60
Слика 25. Класификација на липиди	72
Слика 26. Карактеристични киселини од ω -6 и од ω -3 серијата	75
Слика 27. Триглицерид: трипалмитат.....	75
Слика 28. Основна градба на лецитин	77

Слика 29. Структури на изомерните лецитини (R_1 и R_2 се масни киселини)	78
Слика 30. Аминоалкохол сфингозин и негови производи	79
Слика 31. Претставници на сфинголипиди	80
Слика 32. Потекло на полиалкини (патот на десатураза)	84
Слика 33. Алифатични полиацетиленски алкохоли што се изолирани од коренот на женшен ..	85
Слика 34. 20 протеински аминокиселини	90
Слика 35. Структури на некои непротеински аминокиселини.....	90
Слика 36. Структура на хемоглобин	99
Слика 37. Структура на хлорофил а.....	100
Слика 38. Структури на позначајни биогени амини.....	101
Слика 39. Потеклото на С-атомот во нитрилната група на цијаногените гликозиди	106
Слика 40. Биосинтеза на цијаногени хетерозиди (поставена во 1969 год.)	106
Слика 41. Општа формула на цијаноген гликозид.....	107
Слика 42. Позначајни цијаногени хетерозиди	107
Слика 43. Хидролиза на цијаногени гликозиди во неутрална (А) и во слабо алкална средина (Б) 108	
Слика 44. Општа шема на биосинтеза на глюкоинолати	110
Слика 45. Основна структура на глюкоинолат	110
Слика 46. Кислородни и сулфурни хомолози на цијановодородната киселина.....	111
Слика 47. Хидролиза на глюкоинолати	112
Слика 48. Конверзија на глюкоинолати во оксазолидини и во тиони	112
Слика 49. Структура на алиин и производи на негова деградација.....	114
Слика 50. Структури на некои монокарбонски киселини.....	119
Слика 51. Структури на најзначајни алифатични дикарбонски киселини	121
Слика 52. Позначајни алфа-хидрокси киселини	122
Слика 53. Позначајни шеќерни киселини	123
Слика 54. Структури на некои алициклични киселини	123
Слика 55. Структури на некои хетероциклични органски киселини.....	124
Слика 56. Класификација на полифенолни соединенија	130
Слика 57. Поликетидна биосинтеза на антрахинон ендокроцин односно емодин	132
Слика 58. Структура на фенол и некои деривати на фенол	134
Слика 59. Арбутин и метиларбутин и нивна хидролиза до хидрохинон.....	135
Слика 60. Структури на позначајните фенолни гликозиди.....	136
Слика 61. Некои прости феноли и некои бензоеви киселини	139
Слика 62. Циметна киселина и нејзини деривати.....	139
Слика 63. Дигална киселина (пример на самоестерификација или т.н. внатрешен естер)	139
Слика 64. Структура на хлорогенска киселина.....	140
Слика 65. Структура на розмаринска киселина	141
Слика 66. Структура на ехинакозид (А) и на салидрозид (Б).....	142
Слика 67. Структури на дисахариден фенилетаноиден гликозид	142
Слика 68. Структура на кумарин	145
Слика 69. Биосинтеза на кумарин	146
Слика 70. Кумарин и некои негови моно-, ди- и трисупституирани производи	147

Слика 71. Структура на дикумаринско соединение дикумарол	147
Слика 72. Структури на основни фуранокумарински соединенија	148
Слика 73. Структури на некои фуранокумарини	149
Слика 74. Појдовни структури на пиранокумарини	149
Слика 75. Структура на токсичен кумарин од групата микотоксини	151
Слика 76. Основна структура на фенилпропан (а) и на лигнан (б).....	153
Слика 77. Основни структури на различните типови лигнани (1-добензилбутан, 2- ментофуран, 3-бутиролактон, 4-арилнафтален, 5-добензоциклооктан, 6-фуранофураноид).....	154
Слика 78. Силибини, флаванолигнан од комплексот силимарин.....	154
Слика 79. Гингероли и шогооли на ѓумбирот	157
Слика 80. Главни куркуминоиди во ризом од куркума: А. куркумин, Б. десметоксикуркумин и В. бисдесметоксикуркумин.....	159
Слика 81. Позначајни стилбеноиди.....	162
Слика 82. Најзначајните стирилпирон (кава-лактони) преку кои се врши стандардизацијата на екстрактот од кава.....	165
Слика 83. Најзначајни флавокаваини во кава.....	165
Слика 84. Основна структура на ксантон	166
Слика 85. Структура на ксанон од комплексот на мангостин од <i>Garcinia mangostana</i>	167
Слика 86. Ксантонско соединение со антиканцер активност	167
Слика 87. Основни структури на флавоноиди	171
Слика 88. Основни структури на бензо-γ-пирони	171
Слика 89. Основни структури на правилни (вистински) флавоноиди.....	172
Слика 90. Флавоноиди, производи на хроман.....	172
Слика 91. Флавоноиди со отворена пропанска низа или со фурански прстен	173
Слика 92. Биосинтеза на различни класи флавоноиди	173
Слика 93. Основна структура на флавоноид со нумерација на позициите	174
Слика 94. Структури на најзначајни флавоноиди (агликони).....	176
Слика 95. Најзначајни агликони на флавоноиди	177
Слика 96. Структури на најзначајните флавоноиди (агликони)	178
Слика 97. Структури на најзначајните дихидрофлавоноиди	178
Слика 98. Создавање црвено обоени флаволиум јони при реакција на флавоноидите со елементарен Mg и концентрирана HCl.....	185
Слика 99. UV-спектар на апигенин со карактеристичните ленти I и II	186
Слика 100. Промена на боја на раствор со антоцијани во зависност од pH на средината.....	188
Слика 101. Основна структура на антоцијанидини	189
Слика 102. Промени во структурата на антоцијанидините при различно pH на средината (R = гликон)	189
Слика 103. Растение синчец (<i>Centaurea cyanus</i>) и комплексирање на антоцијанидини со метален јон.....	190
Слика 104. Најчести антоцијанидини во растителниот свет	190
Слика 105. Структури на најзначајните халкони	194
Слика 106. Основна структура на аурон со нумерација на позициите.....	195
Слика 107. Структура на ауреусидин. Структура на ауреусидин.....	195

Слика 108. Биосинтеза на изофлавоноиди во мешункасти растенија	
Првите изофлавоноидни меѓусоединенија се генерираат од флаванони под дејство на IFS (изофлаван синтаза), за да се формираат 2,4'-дихидроксизофлавонони (2-хидрокси-даидзеин и 2-хидрокси-геистеин) или 2-хидрокси-4'-метокси изофлавонони (2-хидрокси-формонетин и 2-хидрокси-биохаин А) со вклучување на 4'-метокситрансфераза. Од овие соединенија со вклучување на H1D се врши дехидратација на C-2 и се создаваат даидзеин, геистеин, биохаин А и формонетин. Со вклучување на други ензими и други соединенија се создаваат други класи изофлавоноиди (куместани, птерокарпани и др.).	197
Слика 109. Различни класи изофлавоноиди	198
Слика 110. Структура на изофлавонони и најчестите супституенти на C ₅ , C ₇ и C ₄	198
Слика 111. Структура на 8-пренил-наригенин	199
Слика 112. Метаболитите на даидзеинот што се создава под дејство на цревната бактериска флора кај човекот	200
Слика 113. Полифенолни киселини и естри (депсиди) на гална киселина што влегуваат во градба на хидролизирачки танини	203
Слика 114. Кондензирани производи на гална киселина	203
Слика 115. Биосинтеза на хидролизирачки танини	204
Слика 116. Формирање на елагни и посложени гални танини	205
Слика 117. Хемиска структура на олигомерен хидролизирачки танин агримонин (<i>Potentillin</i> -димер)	206
Слика 118. Најзначајните флаван-3-оли што влегуваат во градба на кондензирани танини	207
Слика 119. Димерни проантоцијанидини од тип В	207
Слика 120. Димерен проантоцијанидин од тип А	208
Слика 121. Структура на некои процијанидински тримери	208
Слика 122. Структура на процијанидински полимер – кондензиран танин	209
Слика 123. Основни структури на хинонски соединенија	215
Слика 124. Структури на 1,2 и 1,4-бензохинони	216
Слика 125. Основни структури на 1,2- и 1,4-нафтохинони и структури на најраспространети соединенија од оваа група (југлон, лавсон и плумбагин)	216
Слика 126. Липофилен 1,4-нафтохинон	217
Слика 127. Хидролиза на хидројуглон гликозид до југлон	218
Слика 128. Биосинтеза на нафтохинони: 1. преку о-сукцинилбензоева киселина (SHCHS = хидроксисукцинилциклохексадиен карбоксилат, TRP = тетрафенилпорфирин), 2. преку <i>p</i> -хидроксибензоева киселина со GPP	218
Слика 129. Оксидирани и редуцирани форми на антрон	220
Слика 130. Структури на 1,8-дихидрокси антрахинони	221
Слика 131. Создавање на диантроните во процесот на сушењето на лист од сена	222
Слика 132. Деривати на ализарин	222
Слика 133. Структури на кондензирани производи на антрони (нафтодиантрони)	223
Слика 134. Поликетидна биосинтеза на антрахинон ендокроцин односно емодин	223
Слика 135. Основна структура на флороглуцинол	227
Слика 136. Биосинтеза на некои класи флороглуциноли	228
Слика 137. Структури на пренилирани флороглуциноли во цветот на хмељ	228
Слика 138. Структура на полипренилиран ацилфлороглуцинол од растението жолт кантарион	229

Слика 139. Структура на димерен флортоглуцинол со метиленска група како врска помеѓу мономерите	229
Слика 140. Биолошки активни флороглуцинол-терпени	230
Слика 141. Позначајни канабиноиди (THC = Δ^9 - <i>trans</i> -тетрахидроканабинол, THCV = Δ^9 -тетрахидроканабиварин, CBN = канабинол, CBD = кадабидиол, CBG = канабигерол, CBC = канабихромен)	232
Слика 142. Биосинтеза на канабиноиди CBN – канабинол, CBC – канабихромен, CBD – канабидиол, CBG – канабигерол, CBDA - канабидиолна киселина, CBGA - канабигеролна киселина, CBCA - канабихроменска киселина, GOT - оливетолил геранилтрансфераза, Δ^9 -THCA - Δ^9 -тетрахидроканабинолна киселина, Δ^9 -THC - Δ^9 -тетрахидроканабинол.....	233
Слика 143. Општи екстрактивни постапки за терпенски соединенија.....	240
Слика 144. Типови на врзување на изопренските единици во биосинтезата на терпеноидите	241
Слика 145. Биогенеза на различни класи терпеноиди.....	243
Слика 146. Создавање посебни класи на циклични монотерпени	245
Слика 147. Класи на ирегуларни монотерпени	246
Слика 148. Структури на некои сесквитерпенски соединенија	247
Слика 149. Алифатични и ароматични монотерпени што се јавуваат во етерични масла	250
Слика 150. Најзначајни циклични монотерпенски соединенија што се јавуваат како компоненти во етеричните масла	251
Слика 151. Најзначајните сесквитерпени што се јавуваат како компоненти во етерични масла....	252
Слика 152. Ароматични конституенти на етерични масла	253
Слика 153. Ароматични соединенија и други компоненти што можат да се јават како конституенти на етерични масла.....	254
Слика 154. Екстракција со помош на микробранови за добивање на ЕО	257
Слика 155. Бициклична структура на иридоите	261
Слика 156. Биосинтеза на иридоиди: создавање на прекурсорите на посебните групи иридоиди	261
Слика 157. Различни структури на примарни иридоиди	262
Слика 158. Општа градба на валепотријати и некои валепотријати на маче трева.....	263
Слика 159. Секоиридоид на лист од маслинка.....	264
Слика 160. Најзначајни генциопикрозиди.....	264
Слика 161. Структури на посебни групи сесквитерпенски лактони	266
Слика 162. Поттипови на гермакранолиди според конфигурацијата на двојните врски на $C_1=C_{10}$ и $C_4=C_5$	267
Слика 163. Структури на амбросанолид и на хеленанолид.....	268
Слика 164. Структура на ацикличен дитерпен	271
Слика 165. Циклизација на GGPP во лабдан и <i>ent</i> -лабдан.....	272
Слика 166. Структури на бициклични дитерпени	273
Слика 167. Структури на некои бициклични, трициклични и тетрациклични дитерпени	274
Слика 168. Дитерпени во семето од кафе.....	275
Слика 169. Најзначајни фенолни дитерпени на рузмарин и жалфија	276

Слика 170. Стевиол гликозид стевиозид	277
Слика 172. Формирање на стероидни соединенија	280
Слика 173. Формирање различни класи на тритерпени	281
Слика 174. Основни структури на стероидни сапогенини	282
Слика 171. Биосинтеза на прекурсорите на класите: стероиди и тритерпеноиди	283
Слика 175. Структури на некои спиростански сапогенини	284
Слика 176. Структура на фуростанолени биздезмозид	284
Слика 177. Тетрациклични тритерпенски сапогенини	286
Слика 178. Пентациклични тритерпенски сапонини	287
Слика 179. Номенклатура на стероидното јадро	289
Слика 180. Основни структури на агликоните на кардиотонични хетерозиди	292
Слика 181. Конформациони формули на карденолидите од 5 α - и од 5 β -серијата	292
Слика 182. Некои позначајни агликоните на кардиотонични хетерозиди со дигиталис тип градба.. 293	
Слика 183. Шеќери што се јавуваат во гликонскиот дел на кардиотоничните хетерозиди	294
Слика 184. Структура на кардиотоничен хетерозид со гликонски дел кој се состои од три дигитоксози и терминално врзана гликоза	294
Слика 185. Некои позначајни агликоните на кардиотонични хетерозиди со недигиталис тип на градба	295
Слика 186. Биосинтеза на каротеноиди	297
Слика 187. Најраспространетиот каротеноид во природата, во растенијата	298
Слика 188. Изомерите на атаксантинол	299
Слика 189. Примери на правилен алкалоид, псевдо и протоалкалоид	304
Слика 190. Хетероциклуси што се создаваат од аминокиселините орнитин и лизин	305
Слика 191. Хетероциклуси што се создаваат од аминокиселината хистидин	306
Слика 192. Хетероциклуси што се создаваат од аминокиселините фенилаланин/тирозин и триптофан	307
Слика 193. Структури на најзначајни тропански алкохоли	309
Слика 194. Ароматични киселини карактеристични за тропански алкалоиди	310
Слика 195. Најзначајни тропански алкалоиди	311
Слика 196. Пиролизидински аминокиселини (нецин бази)	312
Слика 197. Структури на некои моноестерски, диестерски и макроциклични естерски пиролизидински алкалоиди	313
Слика 198. Алкалоиди од групата на лобелин	314
Слика 199. Пиперидински алкалоиди на биберот	314
Слика 200. Основен алкалоид во групата на пелетиерините	315
Слика 201. Пиридински алкалоиди, деривати на никотинска киселина	316
Слика 202. Фенилетиламински алкалоиди	318
Слика 203. Создавање на основни структури на тетрахидроизохинолински алкалоиди	318
Слика 204. Создавање на основна структура на бензилтетрахидроизохинолински алкалоиди	319
Слика 205. Прекурсори на изохинолинските алкалоиди	319
Слика 206. Бензилизохинолински алкалоид папаверин	320
Слика 207. (+)-Тубокурарин	321

Слика 208. Бисиндолни алкалоиди со миорелаксантно дејство (природен С-токсиферин и полусинтетски добиен алкуронин)	321
Слика 209. Структура на тетрандрин.....	322
Слика 210. Структура на булбокапин	323
Слика 211. Структури на некои природни и полусинтетски добиени апорфински алкалоиди	323
Слика 212. Структура на берберин (протоберберински алкалоид со кватернерен азот)	325
Слика 213. Структури на протоберберински алкалоид со терцијарен азот	325
Слика 214. Структура на морфинан	326
Слика 215. Биосинтеза на изохинолинско-фенантренски алкалоиди од групата морфински алкалоиди	327
Слика 216. Формирање на базични структури на фенилетилизохинолински алкалоиди.....	329
Слика 217. Најзначаен трополонски алкалоид - колхицин	329
Слика 218. Полусинтетски аналог на колхицинот.....	330
Слика 219. Формирање на Amaryllidaceae алкалоиди	330
Слика 220. Структура на галантамин	331
Слика 221. Биосинтеза на еметин	332
Слика 222. Алкалоиди на ипекакуана	332
Слика 223. Потекло на прекурсорите на индолните алкалоиди.....	333
Слика 224. Структура на серотонин.....	334
Слика 225. Природни триптамински халуциногени	335
Слика 226. Природни бета-карболински халуциногени	335
Слика 227. Структура на најзначаен езерински алкалоид езерин.....	336
Слика 228. Структура на ерголин.....	337
Слика 229. Изомерите на лизергната киселина	337
Слика 230. Алкалоид од групата амиди на лизергна киселина (ергометрин) и ерго-пептиди алкалоиди (ерготамин).....	338
Слика 231. Биосинтетско потекло на стриктозидин.....	339
Слика 232. Можните реаранжирања во монотерпенскиот дел од структурата на монотерпенско-индолните алкалоиди	340
Слика 233. Најзначајни јохимбани и хетеројохимбани.....	340
Слика 234. Најзначајни стрихнански алкалоиди	341
Слика 235. Структура на винкамин.....	342
Слика 236. Најзначајни бинарни монотерпенско-индолни алкалоиди.....	343
Слика 237. Најзначајни алкалоиди на хининово дрво	343
Слика 238. Најзначаен алкалоид на растението јаборанд.....	344
Слика 239. Основни структури на C ₂₁ , C ₂₄ и C ₂₇ стероидни алкалоиди	346
Слика 240. Структури на најзначајните стероидни алкалоиди од групата C ₂₇ -стероиди	347
Слика 241. Биосинтеза на пурински алкалоиди	348
Слика 242. Пурински алкалоиди – метилксантини	349
Слика 243. Екстракција на алкалоиди по Стас-Ото	352
Слика 244. Екстракција со закиселена вода или алкохол.....	353

Ниту еден дел од оваа публикација не смее да биде репродуциран на било кој начин без претходна писмена согласност на авторите!
Е-издание: <https://ukim.edu.mk/e-book/00156>