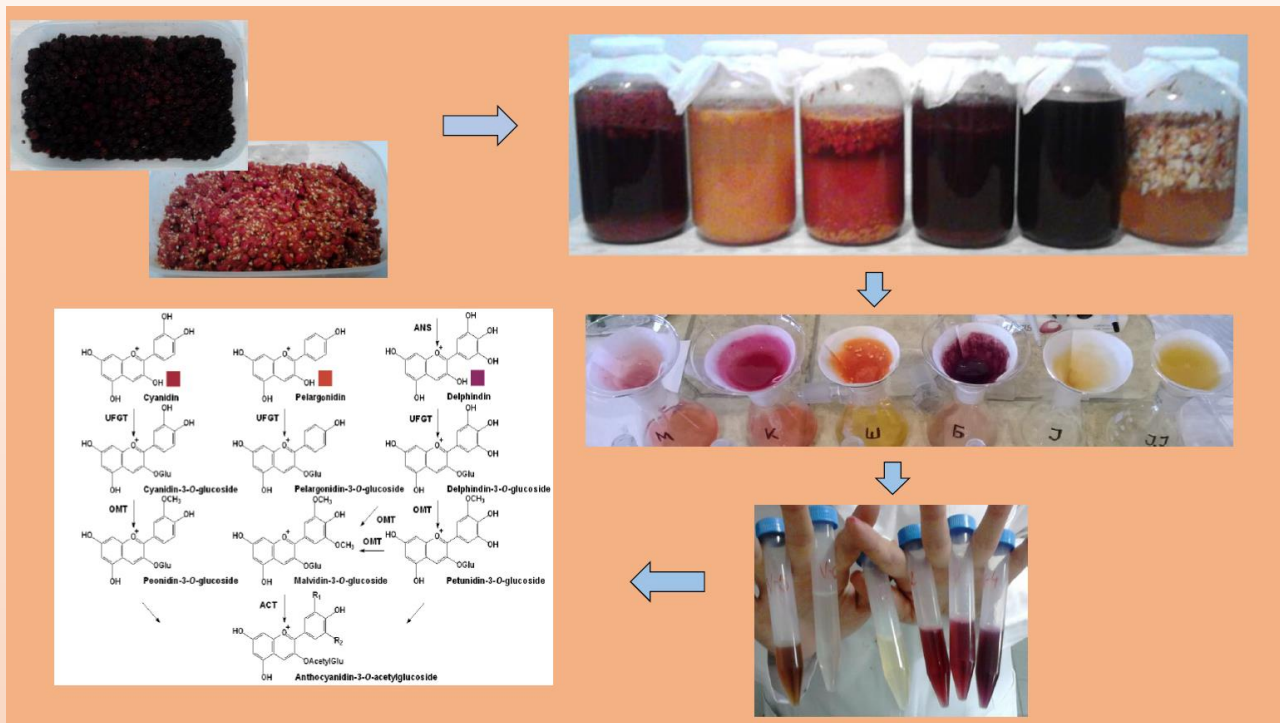


Биљана Ѓорѓеска
Сања Костадиновиќ Величковска

УЧЕБНИК ПО „ИЗОЛАЦИЈА НА ПРИРОДНИ ПРОДУКТИ“ (второ издание)



Штип, 2024

Биљана Ѓорѓеска

Сања Костадиновиќ Величковска

УЧЕБНИК ПО „ИЗОЛАЦИЈА НА ПРИРОДНИ ПРОДУКТИ“ (второ
издание)

Автори:

Проф. д-р сци. Биљана Ѓорѓеска
Проф. д-р Сања Костадиновиќ Величковска

УЧЕБНИК ПО „ИЗОЛАЦИЈА НА ПРИРОДНИ ПРОДУКТИ“ (второ издание)

Рецензенти:

Проф. д-р. Зорица Арсовска Серафиновска
Вонр. проф. д-р. Викторија Максимова

Лектор:

Ранко Младеновски

Уредник:

Лилјана Колева Гудева

Техничко уредување

Сања Костадиновиќ Величковска

Издавач:

Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип

Објавено во е-библиотека:

<https://e-lib.ugd.edu.mk>

DOI <https://www.doi.org/10.46763/9786082770574>

CIP - Каталогизација во публикација

Национална и универзитетска библиотека "Св. Климент Охридски",
Скопје

615.322.012.8(075.8)

661.12:615.322.012.8(075.8)

ЃОРЃЕСКА, Биљана

Учебник по изолација на природни продукти [Електронски извор] /
Биљана Ѓорѓеска, Сања Костадиновиќ Величковска. - (2. изд.). - Штип :
Универзитет "Гоце Делчев", Факултет за медицински науки, 2024

Начин на пристапување (URL): <http://e-lib.ugd.edu.mk/1196>. - Текст во
PDF формат, содржи 139 стр., илустр. - Наслов преземен од екранот. -
Опис на изворот на ден 23.05.2024. - Биографски податоци: стр. 139. -
Библиографија: стр. 130-138

ISBN 978-608-277-057-4

ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ



Автори

Проф. д-р сци. Биљана Ѓорѓеска

Проф. д-р Сања Костадиновиќ Величковска

**УЧЕБНИК ПО „ИЗОЛАЦИЈА НА ПРИРОДНИ
ПРОДУКТИ“ (второ издание)**

Штип 2024

Изолација на природни продукти

ПРЕДГОВОР

Природните продукти служеле како важен извор на активни компоненти уште од древните времиња и околу половината од корисните дроги денес се добиени од природни извори. Фактот што тие претставуваат *повеќекомпонентни системи* останува како критичен фактор со кој може да се осигура дека методите за откривање на нови лековити компоненти од природно потекло може да се натпреваруваат со последните, најново развиени технологии како што се високонпредните скрининг методи за комбинирани испитувања на синтетски продукти. Ефикасната употреба на *автоматизирани процедури* и бази на податоци за изолација, идентификација и биолошко профилирање на биоактивните состојки од природните извори е најдобра гаранција за постојаното откривањето на нови генотипови во природните производи. Проучувањата **структура-активност**, во комбинација со **компјутеризирани методи**, доведува до откривање модели на активност на потенцијално активни молекули и резултира со селекција на молекули со оптимална биоактивност и биорасположивост, помалку несакани ефекти и прифатлив терапевтски индекс, а следствено на тоа и **потенцијални нови соединенија за развој на нови лекови**.

Во второто издание од овој учебник по предметот „Изолација на природни продукти“ во вкупно единаесет (11) поглавја објаснети се најупотребуваните методи и техники за изолација на природни продукти од комплексни смеси, структурата на изолираните продукти како и индустриско производство на природни продукти кои може да се употребуваат како лекови.

Во **првото** поглавје од овој учебник даден е краток хронолошки преглед за изолација на природни продукти кои во минатото биле користени како лекаства. Исто така, наведени се првите билни продукти кои биле користени како лекови.

Во **второто** поглавје дефинирани се екстрактите од билните дроги, начинот на нивното екстрахирање, нивните физички и хемиски својства, карактеристиките како и контролата на квалитетот во однос на активните компоненти. Во ова поглавје издвоен е и посебен раздел за индустриско производство на билни екстракти.

Во **третото** поглавје објаснети се постапки за изолација на терпенско масло од марихуана како и етерични масла од спеарминт и ким. Во оваа поглавје објаснета изолациона или противструјна хроматографија како и изолација на антоцијани (природни пигменти) од комиње од грозје со противструјна или изолациона хроматографија.

Четвртото и петотот поглавје од учебникот се однесуваат на суперкритична флуидна екстракција и микробранова екстракција како најсовремени техники за изолација на термолабилни природни продукти подложни на оксидација.

Шестото и седмото поглавје од овој учебник се однесуваат на потврдување на структурата на изолираните продукти со инфрацрвена и нуклеарно-магнетна резонантна спектроскопија. Најпрво, во **шестото** поглавје објаснето е за кои изолирани компоненти е најпогодна инфрацрвена спектроскопија како поевтина, побрза и подостапна, а објаснети се и практични примери на идентификација на изолираните компоненти.

Во **седмото** поглавје од овој учебник објаснета е протонската НМР спектроскопија и НМР спектроскопија со јаглерод-13. Во ова поглавје објаснето е во кои случаи се употребува НМР спектроскопијата, за кои видови на изолирани компоненти и на практични примери објаснето е што може да се прочита за структурата на една компонента од спектарот на протонската НМР или од НМР спектроскопијата со јаглерод-13.

Во **осмото** поглавје, објаснети се начините на изолација на алкалоидите како фармаколошки најзначајни природни продукти заедно со сите техники кои беа објаснети во претходните поглавја од овој учебник. Поконкретно објаснети се постапките на изолација на

Изолација на природни продукти

хиосцијамин од *Belladonnae radix*, кофеин од *thea folium*, кинин од *Cinchonae cortex*, морфин од опиум, како и изолација на кардиотонични гликозиди и флавоноиди со посебен акцент на изолација на рутин како флавоноид со значајна фармаколошка активност.

Деветото поглавје од овој учебник се однесува на антиоксидативен потенцијал на биоактивни компоненти изолирани од растителни дроги.

Во **десетото**, **единаесетото** и **дванаесетото** поглавје се објаснети постапките за изолација на алкалоиди од дроги и бактерии, изолација на анти-туморни, анти-хив и анти-маларични природни продукти од растителни дроги. Во тринаесетото поглавје објаснета е изолација и карактеризација на биоактивни компоненти од цвет и лист на Трника (црн трн, дива слива) додека во последното **четринаесето поглавје** од овој учебник објаснети се постапки за изолација на биоактивни секундарни метаболити од Мексикански медицински растенија. Посебен осврт е даден на антипротозоични проантоцијанидини од *Geranium niveum*, *Geraniaceae* и цитотоксични ацетогенини од *Rollinia mucosa* и *Annona purpurea*, *Annoniaceae*. Посебен акцент е ставен на хемиски состав на *Rollinia mucosa* и *Annona purpurea*. Во ова последно поглавје објаснети се и активноста на пестицидни лимоноиди изолирани од *Swietenia humilis*, *Meliaceae*.

Содржина

1. Хронолошки преглед на изолацијата на природни продукти.....	1
2. Екстракти од билни дроги – дефиниција, производство, карактеристики, контрола и примена.....	3
2.1. Екстракти (extracta).....	4
2.2. Производство на екстракти за индустриски цели.....	9
3. Изолација на терпенски масла за фармацевтски цели.....	11
3.1. Екстракција на терпенско масло од канабис (<i>Cannabis sativa</i> L., <i>Cannabis indica</i> L. и <i>Cannabis ruderalis</i> L.).....	11
3.1.1. Идентификација и квантификација на масло од спеарминт и ким: (+) и (–) карвони со употреба на гасна хроматографија.....	20
3.2. Противструјна (изолациона) хроматографија.....	23
3.3. Постапка за изолација на еугенол од каранфилче.....	29
4. Суперкритична флуидна екстракција.....	31
5. Микробранова екстракција.....	33
5.1. Теорија на микробраново зрачење.....	33
5.2. Микробранова екстракција.....	33
6. Идентификација на изолирани компоненти со инфрацрвена спектроскопија (IR).....	35
6.1. Идентификација на вештачка арома изопентил ацетат (банана масло) со инфрацрвена спектроскопија.....	42
7. Нуклеарно-магнетна резонантна спектроскопија (НМР)....	45
7.1. Нуклеарно-магнетна спектроскопија со водород (¹ H НМР).....	52
7.2. Нуклеарно-магнетна спектроскопија со јаглерод-13 (¹³ C НМР).....	53
8. Изолација на алкалоиди – фармаколошки најзначајни природни продукти.....	57
8.1. Вообичаена процедура за изолација на алкалоиди.....	60
8.1.1. Изолација на хиосцијамин од <i>Belladonnae radix</i>	61
8.1.2. Изолација на кофеин од <i>Thea folium</i>	62
8.1.3. Изолација на хинин од <i>Cinchonae Cortex</i>	63
8.1.4. Изолација на морфин од опиум.....	65
8.1.5. Изолација на гликозиди.....	66
8.1.6. Изолација на флавоноиди.....	73

9. Антиоксидативен потенцијал на биоактивни компоненти изолирани од растителни дроги.....	79
10. Изолација на алкалоиди од дроги и бактерии.....	95
10.1. Полусинтетски аналози на винка алкалоиди.....	97
10.2. Анти-канцерни агниси кои се користат во медицински цели, добиени од микробни извори.....	99
10.3. Микробни дроги во клиничка употреба.....	99
10.4. Антитуморни лекови добиени од секундарни метаболити на виши растенија.....	101
11. Природни продукти како анти-ХИВ агенци.....	105
12. Антималарични природни продукти.....	109
13. Изолација и карактеризација на биоактивни компоненти од цвет и лист на Трника (црн трн, дива слива).....	115
14. Биоактивни секундарни метаболити изолирани од Мексикански медицински растенија.....	119
14.1. Антипротозоични проантоцијанидини од <i>Geranium niveum</i> , <i>Geraniaceae</i>	121
14.2. Цитотоксични ацетогенини од <i>Rollinia mucosa</i> и <i>Annona purpurea</i> , <i>Annoniaceae</i>	122
14.2.1. Хемиски состав на <i>Rollinia mucosa</i>	123
14.2.2. Хемиски состав на <i>Annona purpurea</i>	125
14.3. Цитотоксични ефекти на ацетогенините од <i>Rollinia mucosa</i> и <i>Annona purpurea</i>	126
14.4. Пестицидни лимониди од <i>Swietenia humilis</i> , <i>Meliaceae</i>	127
Библиографија.....	130

1. Хронолошки преглед на изолацијата на природни продукти

Постојат археолошки наоѓалишта во Ирак и древната Месопотамија (5.000 години пред новата ера) каде што се пронајдени остатоци од некои биолошки видови кои во тоа време се користеле како *лекарства*. Во месопотамиската медицина, сумерските свештеници како лекари освен со магии, лекувале и со разновидни природни продукти кои биле познати во тоа време. Околу 2.300 години пред новата ера, Вавилонците и Асирците го сочувале сумерскиот јазик и културата и го користеле сумерското писмо кое од сликовито се развило во пишано (графемско) писмо. На сликата 1.1. е претставена глинена плоча (15x8cm), 2.200-2.100 години пред новата ера во Ирак, која претставува **најстар лекарски прирачник**, т.н. **најстара позната рецептурна книга** во која сумерски свештеник и лекар врежал **12 рецепти за масти и лекови за внатрешна употреба** (Sarker and Nahar, 2012).



Слика 1.1. Најстар лекарски прирачник, т.н. најстара позната рецептурна книга со 12 рецепти за масти и лекови за внатрешна употреба (Gjorgjeska and Kostadinović Veličkovska, 2017)

Вавилонците се занимавале и со одгледување на лековити билки. Имале изградено и ботаничка градина со голем број растителни видови од вкупно 67 родови. Асирскиот крал Асурбанипал (668-626 пред новата ера) ја направил најголема т.н. книжара од тоа време, пронајдена во остатоците од древниот главен град Нинива каде што се пронајдени повеќе од 20.000 плочи со сликовито писмо на кои се претставени медицински текстови. На 660 плочки постојат врежани податоци за лековити билки како смоква, лук, лен, чемпрес, дабова кора и разни лисја. Врежаните податоци содржат и информации за одредени техники што ги употребувале, а кои потсетуваат на денешната екстракција со вода, млеко, квасец или со масло. Древната медицина го достигнува својот врв во древниот Египет. Египетските медицински установи им припаѓале на моќните свештеници и биле тесно поврзани со храмовите. Биле опкружени со огромни градини за одгледување на лековити билки. На сликата 1.2. е прикажана *Papyrus ebers* (1.550 пред новата ера). *Papyrus ebers* била главна книга од староегипетската медицина и фармација, книга за подготвување на лекови од

лековити билки за сите болести, напишана на хиероглифско писмо (за подготвување на рецепти класифицирани според болестите), а содржи и точни називи за неколку стотици употребувани лековити билки.



Слика 1.2. *Papyrus ebers* – главна книга од староегипетската медицина и фармација (Hallmann-Mikołajczak, 2004)

Од древните култури кои имале големо познавање од областа на лековите и на лековитите билки била и *хебрејската медицина*, од која не е сочувано или пронајдено до денеска ниту едно стручно медицинско дело. Со медицина се занимавале свештеници. Во Библијата е повеќепати опишана точно одредена личност која може и смее да ракува со овие лековити билки и да подготвува масти (се смета за претходник на фармацевтите) со следните активности:

- одгледување на ароматични билки и зачини;
- подготвување на течни лековите препарати во масло или во вино;
- подготвување на масти од смола или од масло;
- подготвување на процедени масти од семки; ги користи за нанесување на рани, кожни болести и козметика;
- приготвување на инфузи и декокти.

Старите Грци и Римјани ги преземале старите искуства од Вавилонците, Асирците, Египќаните и од другите стари народи. Ги поставиле темелите врз кои се развила денешната фармакогнозија. Хипократ, Теофраст и Диоскорид се особено значајни за развој на медицината и на фармацијата. Хипократ напишал 60-70 значајни медицински дела кои даваат увид во грчката медицина во IV и V век пр.н.е. Теофраст (Аристотелов ученик и пријател) ги дополнил пишувањата на Аристотел со значајни записи од областа на ботаниката и минералогичката. Се нарекува и татко на ботаниката кој во своите записи има опишано над 500 растителни видови. Диоскорид – грчки фармаколог ја напишал *DE MATERIA MEDICA* со 944 поглавја, со 657 обработени растителни видови и растителни компоненти и 105 лековити животински видови. Дрогите се одлично опишани и методички поделени, опишано е нивното терапевтско дејство, наведени се и можните замени. Најголем дел од записите од средниот и новиот век се темелат врз Диоскоридовите податоци. Во 500 година од нашата ера неговото дело за првпат е преведено на латински, а подоцна и на други светски јазици (Cohen et al., 1997).

Последниот најголем грчко-римски лекар бил Гален. Сметал дека на болниот треба да му се даде лековита компонента во облик во кој пациентот најлесно би ја примил. Напишал многу дела кои го покажуваат севкупното знаење и познавање на грчко-римскиот народ за медицината (Sarker et al., 2005).

Авицена бил лекар од арапскиот свет. Најважно дело му е *Канони* на медицината, кое претставува еден совршен медицински прирачник. Најстарата аптека која постоела во арапскиот свет датира од 700 година од нашиот век. Со почетокот на 12 век арапската медицина продира и во Европа. Во фармацијата се воведени многу новитети и се раширила употребата на дополнителни, дотогаш непознати, дроги. Во 13 век е издадена првата арапска фармакопеја *KARABADINI*.

Во средновековна Европа, во 1240 година, законски се пропишува одвојување на аптеките и работата на фармацевтите од работата на лекарите. Постепено се развива систем на сè поголемо запознавање и проучување на лековитите билки, природните лековити суровини и начинот на лекување. Се основаат првите ботанички градини и се изготвува нивна соодветна класификација. Првите ботанички градини се основани од италијанските високи здравствени школи, за да продолжи понатаму и во преостанатите универзитети во Европа. Во 1545 година е основана првата универзитетска ботаничка градина која воедно и е најстара во светот. Валериус Кордус (Valerius Cordus/ 1515-1544) во 1546 година ја објавува првата германска фармакопеја, додека Николас Монардес (Nicolas Monardes/ 1493-1578) ја создава и ја уредува првата збирка од американски лековити билки, т.е. *Билките од новиот свет* (Cos et al., 1998).

2. Екстракти од билни дроги – дефиниција, производство, карактеристики, контрола и примена

Препарати од растителни дроги (*herbal drug preparations*) или хербални преработки во поширока смисла, се производи кои се добиваат од растителни суровини со примена на специфични постапки како што се:

- дестилација;
- цедење;
- екстракција;
- фракционирање;
- прочистување;
- концентрирање;
- ферментација.

Под поимот растителни дроги се подразбираат иситнети и спрашени растителни органи, но како препарати од растителни дроги кои се добиваат со нивна преработка може да се земат есенцијалните масла, растителни сокови, тинктури и преостанатите типови на екстракти (Seidel, 2012).

Важни параметри при изборот на изолациска процедура на активните компоненти од растителните дроги се:

- поларноста на молекулите;
- големината;
- стабилноста;
- електричниот полнеж.

Основни методи за изолација на активните компоненти се:

- екстракција (со растворувачи или суперкритични течности);
- дестилација;
- пресување.

Редоследот на основните постапки за изолација на активните компоненти од растителни дроги е следен:

1. уситнување на дрогите;
2. екстракција;
3. прочистување на екстрактот;
4. концентрирање и сушење на екстрактот;
5. раздвојување на компонентите;
6. идентификација на изолираните компоненти.

2.1. Екстракти (Extracta)

Екстрактите се концентрирани препарати, добиени од растителни или од животински суровини. Тие може да имаат:

- течна (*extractum fluidum*);
- полуцврста (*extractum spissum*);
- цврста конзинстенција (*extractum siccum*).

Тинктурите (Tincturae), исто така, се сметаат за екстрактивни препарати.

Течни екстракти (Extracta fluida)

Течните екстракти се екстракти од дроги кои се изработуваат така што по екстракцијата еден дел од течниот екстракт содржи активни компоненти од еден дел од дрогата. Најчесто се изработуваат со перколациска постапка, односно сè до целосен, рационален степен на искористување. Денеска главно се изготвуваат со примена на процесот на т.н. циркулаторна екстракција (Cragg et al., 1997).

Полуцврсти екстракти (*Extracta tenua, Extracta spissa*)

Полуцврстите екстракти претставуваат производи со густа, хомогена конзистенција добиени со делумно испарување на растворувачот од течниот екстракт. Според сите принципи на нивна изработка мора да содржат **најмалку 70% сув остаток**. При изработка на полуцврстите екстракти се користи етанолско-воден вехикулум. Етанолот прв испарува, а заостанатата количина на вода му дава пластична конзистенција на екстрактот. Денеска полуцврстите екстракти сосема малку се користат поради тоа што се *нестабилни и се подложни на микробиолошка контаминација* (Boyd et al., 1993).

Суви екстракти (*Extracta sicca*)

Сувите екстракти се екстракти од дроги од кои со соодветна постапка целосно се отстранува средството за екстракција. Содржат 90-95 % сув остаток. Сувите екстракти се изразито *хигроскопни* па затоа во процесот на изработка на препаратот се додаваат адсорбенси, најчесто аеросил и трикалциум фосфат, сè со цел намалување на процентот на влага. Сувите екстракти во кои се додадени адсорбенси покажуваат стабилност во средина со 90 % релативна влажност. Тие смеат да содржат најмногу 5 % влага и може да се растворат во вода или во алкохол и на тој начин формираат *течни екстракти или тинктури* (Alali et al., 1999).

Тинктури (*Tincturae*)

Според Ph. Jug. V, тинктурите се етанолско-водени екстракти на дроги или етанолско-водени раствори на екстракти од дрога. *Се изработуваат така што од еден дел дрога се добиваат пет дела тинктура*. Тинктурите од дроги се најчесто со силно дејство и, доколку не е поинаку пропишано, се изработуваат така што од еден дел дрога со пропишан степен на уситнетост се приготвува 10 дела тинктура (Chin et al., 2006). За екстракција се користи етанол во различна концентрација (најчесто 40-70 % V/V), а многу ретко мешавина на етанол со некој друг растворувач (глицерол, етер, оцетна киселина). Се изработуваат со мацерација, перколација или со растворање на сув екстракт во вода (Delazer et al., 2012). Како средство за екстракција (вехикулум) најчесто се користи:

- алкохол со различна концентрација;
- помалку поларни растворувачи (ацетон, хексан или етер);
- поларни растворувачи (пропилен гликол или глицерол);
- минерални масла.

За приготвување на екстрактот се користат:

- *дисконтинуирани процеси* како: мацерација, дигестија, турбо-екстракција;
- *континуирани процеси* како: перколација, реперколација и циркулаторна екстракција;
- *современи процеси* како: екстракција со суперкритични флуиди, микробранова екстракција и ултразвучна екстракција.

Изолација на природни продукти

Фактори кои влијаат врз процесот на екстракција се: степенот на уситнетост на материјалот, должината на траење на процесот на екстракцијата, вискозност на средината, температурата и растворувачот (вода, етанол или глицерол).

Во табелата 2.1. се прикажани најпогодните растворувачи за најкористените природни продукти кои се, всушност, растителни метаболити.

Табела 2.1. Најпогодните растворувачи за најкористените природни продукти – растителни метаболити (Gu et al., 1995).

Растворувач	Растителни метаболити
Ацетон и етер	Алкалоиди, липиди, восоци и смоли
Хлороформ	Алкалоиди и хетерозиди
Етанол	Алкалоиди, хетерозиди, танини, етерични масла, смоли, шеќери, органски киселини и каротеноиди
Вода	Алкалоиди, хетерозиди, протеини, шеќери, гуми, органски киселини, ензими и каротеноиди
Глицерол	Танини, гуми, смоли и скроб
Пропиленгликол	Алкалоиди, етерични масла, растителни пигменти

Покрај класичните методи во галенската фармација, денеска се применуваат и технолошки усовершени методи кои соодветствуваат со индустриското производство на екстракти. Такви методи се:

- екстракција по Soxhlet;
- турбоекстракција;
- ултразвучна екстракција;
- противструјна екстракција;
- циркулаторна екстракција;
- екстракција со помош на флуиди (гасови под висок притисок); најчесто се користи CO₂ или водена пареа.

Откако ќе се добие **сувиот екстракт**, тој понатаму се обработува за да се отстранат непожелните материи со таложење со олово ацетат, седиментација при ниска температура, со загревање и додавање на други селективни растворувачи.

Концентрирање (отстранување на растворувачот) подразбира делумно или целосно отстранување на растворувачот. Во течна средина доаѓа до деградација на активните компоненти, па со самото тоа и до квалитативни и квантитативни промени во составот на самиот екстракт. Со отстранување на растворувачот се постигнува

зголемување на хемиската стабилност и економичност поради тоа што истиот растворувач може повторно да биде искористен за друга екстракција.

Конзервирање се применува кај водените екстракти кои многу често содржат јагледнахидрати и протеини, па според тоа претставуваат идеален медиум за развој на микроорганизми. За разлика од нив, алкохолните екстракти кај кои концентрацијата на етанолот е поголема од 15 % или кај кои концентрацијата на пропиленгликолот е поголема од 30 % покажуваат ефект на т.н. *самоконзервирање*. Со оглед на тоа дека екстрактите често се користат за изработка на други препрати, мора да се назначи типот на конзервансот што се користи поради можна инкомпатибилност со компонентите од другиот препарат (Heftmann, 1975).

Стандардизацијата на екстрактот е особено важна за сите растителни екстракти (за медицинска, козметичка и прехранбена употреба) и тоа од производствен, технолошки и фармаколошки аспект. Стандардизираните екстракти се означуваат како екстракти со константна содржина на активните компоненти или со константен состав. Стандарден квалитет на екстрактите се постигнува со стандардизација на постапката за екстракција или, пак, стандардизација на самиот екстракт.

Стандардизацијата на постапката за екстракција се овозможува со: изедначување на квалитетот на влезните растителни сировини, растворувачот (концентрација, количина, тип) и други помошни материи и соодветноста на опремата. *Одржувањето на стандардни услови* се постигнува во текот на процесот на екстракција (температура, време, притисок, големина на серија) и на обработка на екстрактот (Nahar and Sarker, 2011).

Систем за контрола на квалитетот подразбира влезна, меѓуфазна и контрола на финалниот производ. Исто така, системот за контрола на квалитет вклучува стандардизирана постапка на екстракција за производство на екстракти со изедначен состав и со минимално отстапување помеѓу различни серии од истиот производ.

Сепак, многу е тешко да се стандардизира процесот на производство на екстракти, а во некои случаи дури и невозможно! Затоа се прибегнува кон *стандардизација на екстрактот*, односно се пристапува кон стандардизирање на финалниот производ. Процесот на стандардизирање на финалниот производ опфаќа: одредување на параметрите за квалитет на екстрактот и одржување на дефинираниот квалитет на екстрактот со додавање на растворувач, „концентрирање“ или „разблажување“ на екстрактот.

Параметрите кои го дефинираат квалитетот на крајниот производ – екстрактот најчесто се однесуваат на односот *дрога* : *вехикулум*, количеството на остатокот по отпарувањето и сушењето, односот *дрога* : *екстракт*, вкупната количина на активните компоненти изразена како доминантна или најактивна компонента, количеството на поединечните компоненти во целокупниот комплекс од активните компоненти и количеството на т.н. маркер компоненти.

Присуството на одговарачките состојки во екстрактот се одредува со *квалитативна анализа* и најчесто применувана техника е тенкослојна хроматографија (за која ќе стане збор во петтото поглавје од овој учебник).

Проверката на квалитетот на екстрактот се врши со *квантитативна анализа* како гравиметрија, волуметрија, спектроскопија, течна, гасна или планарна хроматографија или НМР (сите овие техники подетално се објаснети во поглавјата што следуваат во овој учебник).

Подолу во текстот се наведени некои најупотребувани екстракти за фармаколошки цели и начин на кој тие се означуваат.

Curcumae rhizoma extractum siccum (9,5 - 12,6:1; етанол 60 % v/v),

Hyperici herbae extractum siccum (5 - 7:1; стандардизиран содржи вкупно 0,3 % нафтодиантронски дериват, пресметано како хиперицин),

Hederae heliсis folii extractum siccum (8:1; стандардизиран содржи 4,85 % вкупни сапонозиди),

Capsici extractum oleosum normatum (стандардизиран содржи вкупно 4,5 % алкалоиди, пресметано како капсаицин),

Liquiritiae radісis extractum fluidum ethanolicum normatum (стандардизиран содржи 3,0-5,0 % глициризинска киселина),

Hederae heliсis folii extractum siccum (стандардизиран сув етанолски екстракт од лист од бршлен),

Capsici extractum oleosum normatum (стандардизиран маслен екстракт од плод на пиперка),

Liquiritiae radісis extractum fluidum ethanolicum normatum (стандардизиран течен етанолски екстракт од сладок корен),

Curcumae rhizoma extractum siccum (сув етанолски – воден екстракт од ризом).

Некогаш е неопходно **означување на екстрактите** при што се нагласува дека екстрактот не треба да содржи одредена компонента, односно мора да постои ограничување во нивното количество, како на пример *Ginkgo bilobae folii extractum siccum normatum (50:1)*. Екстрактот е стандардизиран да содржи вкупно 24 % флавоноиди, пресметано како кварцетин глукозид, вкупно 5-7 % терпенолактон (2,8-3,4 % гинколид А, В и С; 2,6-3,2 % билобалид) и помалку од 5 ppm гликолна киселина (Kolegate and Molyneux, 2008).

Билните екстракти се, веројатно, најупотребуваната група на растителни екстракти во фармацевтијата. Може да се користат како основна активна компонента или помошна компонента во производи од следните групи:

- лекови од растително потекло (ОТС, кај нас помошни лековити супстанции);
- медицинска козметика;
- козметички препарати и препарати за домашна хигиена (препарати за општа употреба);
- диететски суплементи;
- адитиви за прехранбена индустрија и други сродни индустрии.

Крајната примена на билните екстракти зависи од:

- одбирањето и начинот на подготовка на сировините;
- одбирањето на растворувачот;
- одбирањето на методите и технологијата на екстракција;
- стандардизацијата;

- количеството што се додава во производот (Latif and Sarker, 2012).

2.2. Производство на екстракти за индустриски цели

Процесот на производство на екстракти започнува со **уситнување на дрогата**. Оптималната уситнетост на дрогата овозможува подобра екстракција на активните компоненти со масло. Изборот на мелницата зависи од карактеристиките на дрогата. Процесот на **издвојување на активните компоненти од дрогата** врз основа на различната растворливост во растворувачот во кој се врши екстракцијата најчесто се одвива со два истовремени процеси: *плакнење* и *дифузија*. Најчесто употребуваниот метод вклучува **предекстракција** (служи за отстранување на нечистите компоненти од растителниот материјал како, на пример, отстранување на маснотиите од семките или хлорофилот во листовите, со хексанон или со петролетер) и екстракција на посакуваните, потребните компоненти. Притоа, **изборот на растворувачот** е особено важен. Најважни својства на растворувачот за екстракција се: селективност за компонентите кои е потребно да се екстрахираат, капацитет за екстракција, нереактивност со растителните компоненти, безбедност за луѓето и опремата, (не)стабилност и ниска цена (за ова подетално ќе биде дискутирано во третото поглавје од овој учебник). **Фактори** кои влијаат врз екстракцијата се: температура, големина на честичките, движење на растворувачот и pH (подетално ќе биде дискутирано за ова во четвртото поглавје од овој учебник). **Неконтинуирани постапки** за екстракција се: *мацерација* (еднократна екстракција при собна температура во однос 1:5 или 1:10), *ремацерација* (мацерацијата се повторува двапати), *степенеста мацерација* (поединечни компоненти за екстракција се додаваат постепено), *дигестија* (еднократна мацерација на зголемена температура), *мацерација со мешање* (мацерација на собна или зголемена температура со постојано мешање на смесата од дрога и растворувач), *вртложна мацерација* (екстракција со екстремно зголемени осцилации на екстракторот околу својата оска) и ултразвучна мацерација (екстракција со примена на ултразвук). **Континуирани постапки** за екстракција се: *преколација* (екстракција на собна температура со еднократно протекување на растворувачот низ колоната со дрога во перколаторот), *реперколација* (поголем број на перколатори споени во низа), *еваколација* (континуирана екстракција со примена на вакуум), *диаколација* (континуирана екстракција на зголемен притисок), *soxhlet-екстракција* (континуирана екстракција на зголемена температура во Soxhlet-апаратот), *проивструјна екстракција* (континуирана екстракција со која растителниот материјал се воведува во струјата на течењето на растворувачот, за која ќе стане збор во петтото поглавје од овој учебник) (Mcalpine et al., 2012).

Во табелата 2.2 прикажана е споредба на мацерација, преколација и soxhlet-екстракција при изолација на природни продукти.

Изолација на природни продукти

Табела 2.2. Споредба на мацерација, преколација и soxhlet-екстракција при изолација на природни продукти (Mcalpine et al., 2012)

Тип на екстракција	Предности	Недостатоци
Мацерација (погодна за активни компоненти со ниска концентрација кои се цврсто врзани или бавно дифундираат).	Едноставна, евтина.	Активните компоненти мора постепено да се растворуваат во растворувачот, долготрајност на процесот.
Преколација (погодна за слабо врзаните активни компоненти, присутни во поголеми концентрации или слабо растворливи).	Можност за добра искористеност на растителниот материјал, „благ“ метод.	Неопходно е постојано надгледување на процесот, доголтраен процес, потребно е големо количество на растворувач.
SOXHLET-екстракција (погодна за термостабилните активни компоненти).	Употреба на мала количина растворувач, не е потребно постојано надгледување на процесот, помалку штетно влијание на растворувачот врз луѓето и околината (затворен систем).	Потребна е електрична енергија и проток на вода, можно температурно разградување, не е погодна за големи количества.

Според *Европската фармакопеа* екстрактите се дефинирани како концентрирани течни препарати, со крута или густа конзистенција, кои се добиваат главно од растителен материјал и од суровини со животинско потекло. Најчесто се добиваат со мацерација, перколација или со други погодни методи. Најмногу се употребува етанол или некој друг соодветен растворувач. Како што спомнавме на почетокот на ова поглавје, во однос на конзистенцијата, екстрактите се делат на: **extracta fluida – течни екстракти** (однос дрога и растворувач 1:1), **extracta sicca – сув екстракт** (сув дел најмалку 95 %) и **extracta spissa - густ екстракт** (сув дел најмалку 70 %). Иако во ова поглавје од учебникот ги продискутиравме речиси сите постапки кои вклучуваат индустриско производство на екстракти, сепак на крај да сумираме дека следните постапки за производство на квалитетен екстракт се клучни, а тоа се: **прочистување на екстрактот** со декантирање, центрифугирање и филтрирање, **концентрирање на екстрактот** со едноставно обично испарување, со испарување во ротациски вакуумски испарувачи и со дестилација (екстрактот е долго време изложен на зголемена температура), **испарување** во проточни испарувачи (континуиран процес, течниот екстракт протекува низ мали загреани комори и се концентрира, од последната комора излегува густ екстракт, на пример за 15 минути изложен на температура од 50 °C), **концентрирање** според Кестнер (Kestner) (одозгора надолу, во долги и тенки загреани цевки се воведува екстрактот, концентрираните порции се враќаат на дното и процесот се повторува сè до посакуваната конзистенција на екстрактот), или со примена на тенкослоен испарувач (со многу брзо испарување, екстрактот во тенок филм се движи кон загреаната површина, на пример со примена на вакуум, течниот

екстракт протекува во тенок слој низ загреан цилиндар во текот на 30 секунди на температура од 30-50 °C) и **сушење** на екстрактот во обични и вакуумски ексикатори (погодни за термолабилни компоненти), во обични и вакуумски сушални, сушење со загреан воздух, спреј сушење и сушење со смрзнување (лиофилизација) (Nahar and Sarker, 2012).

3. Изолација на терпенски масла за фармацевтски цели

3.1. Екстракција на масло од канабис (*Cannabis sativa* L., *Cannabis indica* L. и *Cannabis ruderalis* L.)

Коноп претставува едногодишно растение од фамилијата *Cannabaceae*. Ова индустриско растение се користи за добивање на храна, масло, влакна и медицински препарати. Постојат три вида на коноп и тоа: *Cannabis sativa* (обичен коноп), *Cannabis indica* и *Cannabis ruderalis*. Сите три вида на коноп потекнуваат од Северна и Јужна Азија. Семето содржи два котиледони и ембрион кои содржат масло. Процентот на маслото во семето се движи во опсег од 28-35 % и воглавно зависи од климатски услови и географска положба на која се одгледува канабисот. Во однос на биохемиските карактеристики, семето содржи 20-25 % протеини, 20-30 % јаглехидрати и 10-15 % минерали. Семето од коноп не содржи глутен па може да се користи за добивање на безглутенско брашно (Kostadinović Veličkovska, 2021).

Коноп (*Cannabis sativa* L.) е годишно растение со потекло од Централна Азија кое се користи за добивање храна, масло, растителни влакна и лековити препарати (закон за изменување и дополнување на Законот за контрола на опојни дроги и психотропни супстанции објавен во Службен весник на РМ, бр. 37 од 26.2.2016 година).

Коноп се одгледува во индустриски цели затоа што е добар извор на растителни влакна, семиња и биомаса. Влакната од конопот со децении широко се користат во производството на изолациски подни облоги и внатрешни панели за автомобили, како и во текстилната, градежната и индустрија за производство на хартија.

Покрај влакна, во последниве години има голем интерес од истражувачите за примена на семе од коноп и биомаса во производството на биоенергија, за производство на етанол, биодизел и биогаз.



Слика 3.1. Одгледување на *Cannabis sativa* L. во затворен простор (Hussain et al., 2021)

Во последниве години, интересот за протеини од семе од коноп расте како резултат на неговиот исклучителен состав на **аминокиселини**, пред сè заради неговата висока содржина на **аргинин**. (Kostadinović Veličkovska, 2021).

Покрај тоа, семето од коноп содржи значителна количина минерални витамини, и поради тоа е зголемена употребата на коноп во прехранбената индустрија.



Слика 3.2. Семе од канабис (Andre et al., 2016)

Маслото од канабис, кое се добива со ладно цедење на семето има *зелена боја*, со добар вкус и мирис. Ова масло се употребува:

- поради неговата хранлива вредност и оптималниот однос на омега 3 и 6 масни киселини, има позитивен ефект врз здравјето на луѓето, го намалува холестеролот и високиот крвен притисок;
- се користи како зачин во подготовката на разни јадења, а може да се користи и како додаток во козметиката, бидејќи го спречува стареењето на кожата.

Најголемо учество во маслото од коноп имаат полинезаситените масни киселини (75,7-78,07 %), потоа следуваат мононезаситените масни киселини (10.12-13,27 %), а најмал е процентот на незаситените масни киселини (6,99-9,4 %). Во составот на полинезаситени масни киселини најголем удел има линолеинска (омега 6-масна киселина) со над 50 %. Од мононезаситени масни киселини, само олеинска киселина е присутна во масло од семе од коноп, додека од заситени масни киселини присутни се палмитинска и стеаринска киселина. Ова масло се користи при готвење, за подготовка на салати, мариниран зеленчук и сосови. Употребата на маслото од коноп во постапките за термичка подготовка не се препорачува, бидејќи незаситените масни киселини на различни температури полимеризираат и оксидираат. Во последниве години, постојат студии за примена на масло од коноп во производството на биодизел (Kostadinović Veličkovska, 2021).

Според законот за изменување и дополнување на Законот за контрола на опојни дроги и психотропни супстанции (член 1) под поимот „*коноп*“ се сите надземни свежи или суви делови на растението, освен семето од различни видови на растението канабис (*cannabis sativa*, *cannabis indica* и *cannabis ruderalis*).

„Масло од конопово семе“ е масно масло, рафинирано или не рафинирано, добиено со ладно цедење или некој друг вид на екстракција од семки на растенија што припаѓаат на различни видови од родот *Cannabis* и во себе не содржи повеќе од 10 mg/kg на тетрахидроканобинол (ТХЦ), чија примарна примена е во козметички и хигиенски производи, лубриканти, бои или како храна (закон за изменување и дополнување на Законот за контрола на опојни дроги и психотропни супстанции објавен во Службен весник на РМ, бр. 37 од 26.2.2016 година).

„Масло од канабис/коноп“ е течен смолест екстракт добиен со екстрахирање на олеорезината од надземните делови (без семето) на растенија што припаѓаат на

различни видови од родот Cannabis и има висока содржина на канабиноидни компоненти, особено на тетрахидроканабинол (ТХЦ). “

Постојат повеќе начини на екстракција на масло од канабис и тоа:

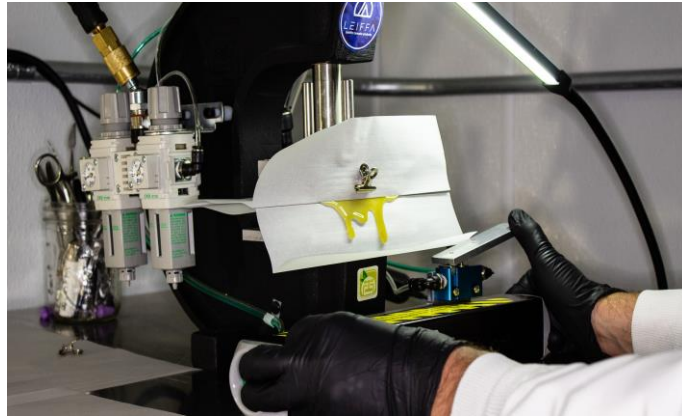
- Алкохолна екстракција на семе од канабис при што канабисот се измива еднаш, два или три пати во алкохолот, обично етанол од 96 %, потоа растителниот материјал се отстранува, течноста се филтрира и алкохолот се отстранува со некоја форма на испарување, за да се направи на крајот декарбоксилација. Вака добиено масло е богато со ЦБД а не содржи повеќе од 10 мг/кг ТХЦ;
- CO₂ екстракција на канабис при која заедно со екстрахираните компоненти од канабисот, суперкритичниот CO₂ оди во кондензатор и се претвора во течност која може да се филтрира и повторно да се користи. Како резултат на тоа, се користи многу мало количество на реагенс. Тоа го прави овој метод релативно почист, со што ја намалува потребата за отстранување на отпадот;
- Мацерација на масло од семе од коноп се врши во ерленмаер со затворач (100 мл) кој е сместен во загреана водена бања. Семето (5 g) и соодветното количество на хексан се истураат во ерленмаерот кој е поставен во загреана водена бања на одредена температура. Продуктот добиен по филтрацијата се мие два пати со 20 ml свеж хексан. Потоа, комбинираниот филтрат се испарува на 50 °C до постојана маса во вакуумски евапоратор.
- **Екстракција по Сокслет** се врши на тој начин што меленото семе од коноп (50 g) се става во сад од целулоза, кој потоа се става во апаратот „Сокслет“ додека n-хексан (500 ml) се додава во проширениот дел од садот. Екстракцијата се извршува за 180 мин. (околу 15 повторувања). По извлекувањето, екстрактот се испарува на 50 °C до константна маса во вакуумскиот испарувач (закон за изменување и дополнување на Законот за контрола на опојни дроги и психотропни супстанции објавен во Службен весник на РМ, бр. 37 од 26.2.2016 година).



Слика 3.3. Екстракција на масло од канабис со „Сокслет“ апаратура (Lazarjani et al., 2012)

- **Екстракција на масло со пресување на семе од коноп** се врши со хидраулична преса (комета). Пресувањето на несомелено семе од коноп се врши преку дизна со дијаметар од 10 мм. По екстракцијата, маслото се филтрира во инка за да се отстрани цврстата фаза, додека смесата за филтрација се меле во електрична мелница (Alpina 2813) во времетраење од 1 минута. Сомелената смеса потоа подложи на екстракција по Сокслет за да се

утврди преостанатото количество на масло. За екстракција на маслото од смесата се користи хексан, а екстракцијата трае 180 минути. Добиениот екстракт се испарува на 50 °C до константна маса во вакуумскиот испарувач (закон за изменување и дополнување на Законот за контрола на опојни дроги и психотропни супстанции објавен во Службен весник на РМ, бр. 37 од 26.2.2016 година).



Слика 3.4. Ладно цедено масло од коноп (Lazarjani et al., 2012)

- Екстракции на масло од канабис **без растворувач** се врши на тој начин што **кифот** може да се одвои од тупките на канабисот, едноставно со *мелење* и *просејување*. Постојат неколку катни грендери со сито специјализирани за таа намена, за собирање на кифот во домашни услови. Кога се одделува од канабисот, **кифот** изгледа исто како прав или полен (слика 8.7.).



Слика 3.5. Киф од канабис (Nahas et al., 1975)

Маслото од конопово семе може, исто така, да се трансформира во биодизел преку процес наречен **трансестерификација**.

И покрај терапевтските придобивки од канабисот, сепак постојат премногу нејасни работи во врска со маслото од коноп. Важно е да се расчистат заблудите

околу производите од канабис и да се знае кои се придобивките и недостатоците од неговата употреба. Во однос на предностите и недостатоците, и двата вида (*Cannabis sativa* и *Cannabis indica*) содржат многу психоактивни и непсихоактивни супстанции. Сативата е позната по **психостимулаторен ефект**, додека индиката е позната по **смирувачкиот ефект**. Изминатите неколку децении повеќето видови се одгледувани со цел да се зголеми нивото на главната психоактивна состојка – ТХЦ. Сепак, истражувачите стануваат сè позаинтересирани за медицинските придобивки на состојката **канабидиол** (ЦБД). (Kostadinović Veličkovska, 2021). Оваа состојка не е психоактивна, но се покажала како корисна во многу медицински случаи. Постојат разни видови канабис сатива со разво количество ТХЦ и ЦБД. Сативата и конопот се ист вид, **а разликата е во тоа што сативата со над 0,3 % ТХЦ се смета за марихуана**. Тогаш се поставува прашањето: *која е разлика помеѓу масло од коноп, масло од семе од коноп, ЦБД масло и масло од канабис?* Маслото кое се добива од стеблото на конопот се користи најмногу поради состојката ЦБД. Легално, мора да има помалку од 0,3 % ТХЦ. Од друга страна, маслото од коноп кое се добива од семето **нема или содржи многу малку ТХЦ или ЦБД** и се користи заради незаситените масни киселини кои се есенцијални во исхраната на луѓето. Од погоре наведеното можеме да дадеме сумирани изводи.

❖ ЦБД масло

Во државите каде што канабисот е легален, маслото се добива од канабис сатива или коноп **и се прави од целото растение**. Во државите каде што канабисот не е легален, маслото се прави од коноп, односно **стеблото** на растението.

❖ Масло од канабис сатива (коноп)

Ова масло се добива од растението канабис сатива и може да содржи и ЦБД и ТХЦ. Поради ова, не може да се купи во држави каде што канабисот не е легален. Покрај тоа, бидејќи маслото може да содржи повисоко количество ТХЦ, може да претставува проблем за луѓето кои ги избегнуваат психоактивните ефекти од него.

❖ Што е масло од канабис сатива (коноп)?

Како што споменавме, маслото од коноп се добива од стеблото на растението коноп. Процесот на екстракција вклучува користење растворувач со кој се одвојува маслото од стеблото. Постојат бројни растворувачи од кои сите имаат свои предности и недостатоци.

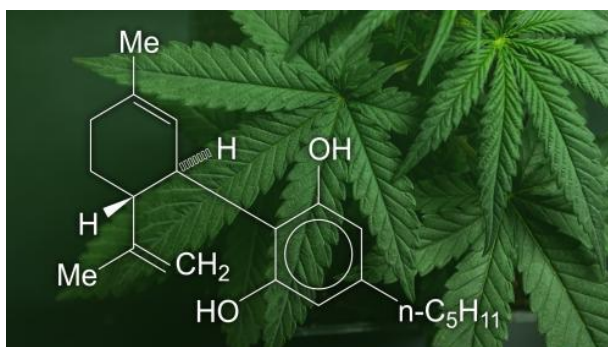
❖ Методи на екстракција на масло од канабис сатива (коноп)

Најдобри методи за екстракција на концентрати од канабис сатива (коноп)

Техниките за екстракција се користат за одделување на активните компоненти на канабисот и отстранување на растителната матрица. Техниките за екстракција се користат и за концентрирање на одредени состојки.

Разни техники за екстракција често се користат за изолирање на специфични посакувани соединенија, а канабисот содржи **над 113 канабиноиди** при што секојдневно се откриваат и нови. Од друга страна, производителот на екстракт често пати сака да создаде единствен екстракт со голем број соединенија од канабисот со широк канабиноиден спектар и овие екстракти понекогаш се нарекуваат целосни растителни екстракти, наспроти изолираните екстракти. Вклучувајќи ги и подобро познатите канабиноиди, истражувачите идентификувале **повеќе од 550 хемиски компоненти** во канабисот воопшто, вклучувајќи компоненти како **терпени**. Покрај канабиноидите, маслата од коноп „КАНОИЛ“ содржат и терпени, есенцијални масла

одговорни за мирисот и вкусот на производите од канабис, што исто така може да го модулира (подобри) ефектот на канабидиолот. Овие терпени во последно време стануваат многу популарни при производство на т.н. електронски цигари, кои се користат за одвикнување на пушачите зависни од никотин. Во последно време, канабиноидите добиваат сè поголема глобална афирмација поради нивниот **голем терапевтски потенцијал**. Исто така, тие се основа за медицинска и научна примена на канабисот, заради многубројните позитивни ефекти, истражувани во значително долг временски период. КАНОИЛ маслата од коноп содржат CBD (Cannabidiol), а не содржат THC (9-делта тетрахидроканабинол) кој е одговорен за психотропниот ефект. Маслата од коноп КАНОИЛ имаат строго контролиран состав на канабиноиди. Покрај CBD и неговата карбоксилзирана форма CBDA (канабидиолична киселина), содржат и CBN (Cannabinol), CBG (Canabigerol) и други канабиноиди присутни во растението.



Слика 3.6. Хемиска структура на ЦБД во масло од коноп(www.fda.gov)

Канабидиол (CBD) е најважниот фитоканабиноид или втор најзастапен канабиноид кај различни лековити препарати кои се произведуваат од растението. Кај канабисот, CBD е присутен во горната третина од растението и цветовите, во концентрации од **0,5 до 2 %**. Во Германија и во многу други земји, на производителите на коноп им е дозволено да одгледуваат сорти на канабис со високи концентрации на CBD и ниски концентрации на THC, наменети за производство на влакна или индустриски сировини, додека семето од коноп се користи за производство на растително масло. Од неодамна се зголемува интересот за терапевтскиот потенцијал на CBD, бидејќи не предизвикува психотропни ефекти, ниту други несакани ефекти, дури и во високи дози. Досега се спроведени неколку клинички студии, а основните истражувања укажуваат на потенцијална терапевтска примена кај голем број на болести или симптоми. „Готвењето“ на масло од канабис може да биде опасно и не може секогаш да се изведе во домашни услови. Во многу случаи, реагенсите, растворувачите и начинот на кој тие се користат, плус малку невнимание и непромисленост (на пример, искра во просторија во која испарува растворувачот), може да создадат опасни ситуации, дури и експлозии! Како резултат на тоа, многу од техниките бараат сигурносна опрема, како аспиратор и боца за гасење пожар. Процесот на екстракција мора да се изведе правилно за да се произведе безбеден и potentен производ за хумана употреба, а резултатите треба да се проверат со соодветно аналитичко тестирање (Kostadinović Veličkovska, 2021).

„**Хаш масло**“ може да се добие со екстракција на канабис со смеса од пропан-бутан. Користењето на бутан како растворувач за екстракција го создава она што е познато како **butane hash масло** (BHO - Butan Hash Oil). За да се изведе оваа постапка, процесот започнува со канабис и течен бутан гас во систем под притисок и топлина. Преку испарување под вакуум, можно е да се отстрани бутанскиот растворувач. Вакуумот го претвора бутанот од течност во пара, што го олеснува отстранувањето. Екстрактот што се добива при овој вид на екстракција е, исто така,

познат како **шетер (shatter)**, што е *стаклест цврст концентрат* кој обично вклучува THC, CBD и други хемиски компоненти, а исто така, и терпени. За да се екстрахира **шетер**, што е цврста верзија на бутан хаш масло, треба да се внимава терпените да не испарат и да не оксидираат, во спротивно, тие функционираат како растворувач што го прави екстрактот мек. Заради тоа, во почетната мостра може да се намалат терпените присутни во финалниот производ со *екстракција на цветови*. Од друга страна, **бутан хаш** маслото може да се загрее за да се отстранат терпените по екстракцијата, бидејќи се многу понестабилни од канабиноидите како ТХЦ и ЦБД. Зошто е потребна **правилна декарбоксилација на канабидиол! Како и кога CBD станува CBD?!** Оваа постапка вклучува некои потенцијални опасности. **Бутанот лесно гори во гасна фаза!!** Значи, мора внимателно да се контролира температурата, зашто во спротивно постои сериозен ризик од експлозија на гас!! Покрај тоа, системот треба да вклучува циркулатори кои го отстрануваат и рециклираат бутанот. Со постапка на отстранување треба да се елиминира и најмал процент на бутан во екстракт. Во сите случаи, сепак, треба да се направи аналитичко тестирање за да се осигура отстранувањето на бутанот, бидејќи е многу токсичен за луѓето! Ваквата опасност може да ја направи оваа постапка помалку посакуван избор од страна на пациентите, но е често користена од страна на рекреативните корисници. **Овие постапки се забранети и смеат да се извесуваат во фармацевтската индустрија само со специјална дозвола!** Сепак, екстракцијата со бутан е популарна постапка за производителите на екстракти од канабис, главно поради релативно евтина опрема и трошоци за работа. Наместо „**бутан хаш маслото**“, некои производители избираат да произведуваат „**пропан хаш**“ масло. Во оваа постапка се користи течен пропан наместо бутан. Овде, високиот притисок го задржува пропанот да тече и екстракцијата се одвива на пониска температура, бидејќи температурата на вриење на пропанот е помала од бутанот. Температурата на екстракција влијае врз компонентите отстранети од канабисот. Значи, овие две постапки – екстракција со бутан и пропан – овозможуваат добивање на различни екстракти. Во некои случаи, екстракцијата со бутан и пропан може да се користи во комбинација за да се создаде производ со поширок хемиски профил. Сепак, како и процесот со бутан, посебно внимание треба да се обрне при екстракција со пропан за да се отстрани колку што е можно повеќе од растворувачот и да се докаже тоа со хемиска анализа.



Слика 3.7. „Хаш масло“ од канабис (Al-Zouabi et al., 2018)

Вреди да се спомне дека постојат повеќе примитивни техники за екстракција на посакуваните компоненти од растителната матрица на канабисот. **Кифот**, на пример,

може да се одвои од туфките на канабисот, едноставно со *мелење и просејување*. Постојат „неколку катни грендери“ со сито специјализирани за таа намена, односно за собирање на кифот во домашни услови. Како што беше спомнато во текстот погоре, овие кристални формации сочинуваат дел од структурите познати како трихоми кои се наоѓаат на многу растенија, вклучувајќи го и канабисот. Нивниот интензивен горчлив вкус и силните ароми го прават растението неприфатливо за тревопасните животни и исто така, се верува дека го инхибираат растот на некои габи. Кога се одделува од канабисот, кифот изгледа исто како прав или полен. Бидејќи канабиноидите и терпеноиди се особено концентрирани во трихомите, овој прав може да се додаде во производите од канабис за да се зголеми потентноста или може да се конзумира како самостоен производ, активиран или суров. Од неодамна, **Швајцарија започна со производство на легален хашиш**.



Слика 3.8. Блокче пресуван хашиш (во лева рака загреано, во десна рака неагреано)
(El Alaoui et al., 2013)

Традиционалниот хаш или хашиш, е уште еден пример за екстракт од канабис кој не содржи растворувачи. Повторно, идејата е да се одвојат трихомите од растителниот материјал, бидејќи тие содржат највисока концентрација на пожелни соединенија. Постојат две главни постапки за собирање на хаш: еден вклучува собирање на **замрзнати туфки од канабис** и **нивно кршење на помали делови** над платното. Во процесот, трихомите се одделени од растението и паѓаат низ ситото, а потоа се притискаат во блокови; Друга постапка на екстракција без растворувачи вклучува **употреба на замрзната вода**, за да се одделат трихомите од туфките. По сушењето, добиената екстрахирана смеса може да се оформи во хаш-блок. **Чарасот** е друга форма на екстракт без употреба на растворувач, со рачно собирање на смолата од цветовите и листовите.



Слика 3.9. Чарас од канабис (Ghalat & Kalra, 1985)

Бидејќи е потребно големо количество стебла за да се произведе маслото од коноп, постои ризик од контаминација од токсини кои ги има во растението. Ова се случува поради тоа што конопот има способност да ги повлекува токсините од почвата на која расте. Маслото може да се консумира орално, да се нанесе локално или сублингално, или да се пуши преку испарување. Испарувањето и сублингалното нанесување имаат побрз ефект, додека на пилулите и продуктите за јадење им се потребни од 30 до 90 минути за да почнат да дејствуваат. Локално, маслото се нанесува директно на проблематичните места.

❖ Придобивки од маслото од канабис сатива (коноп)

Кога станува збор за придобивките, тие најчесто се однесуваат на количеството на ЦБД во маслото. Иако се потребни подолготрајни истражувања, некои од досегашните истражувања дадоа неверојатни резултати.

• Епилепсија

Маслото од коноп се користи кај пациенти со епилепсија со децении. Едно неодамнешно истражување покажало значително намалување на нападите по користење на медицински канабис збогатен со ЦБД. Во истражувањето 52 % од испитаниците покажале намалување на нападите до 50 %.

• Анксиозност

Истражување од 2011 година покажало значително намалување на анксиозноста кај испитаниците кои го користеле маслото.

• Болка

Некои истражувања покажале намалување на болката со локално нанесување на маслото. Досегашните податоци покажуваат дека комбинацијата на ЦБД и ТХЦ е најефективна за болка.

• Алцхајмерова болест

Мало истражување од 2014 година покажало дека ЦБД го спречува развивањето на неспособноста за социјално распознавање, нешто што е честа појава кај пациентите со Алцхајмерова болест. Сепак, потребни се дополнителни истражувања за да се потврди овој заклучок.

➤ Дозирање на масло од коноп

За различни масла, дозирањето е различно! Секој пациент реагира индивидуално на одредени дози ЦБД. Најдобро е пациентите индивидуално да тестираат што им одговара најмногу. **Треба да се започне со најмали дози!** Не треба да се заборава фактот дека ако се внесува орално, потребни се 30 до 90 минути за да почне маслото да дејствува.

➤ Несакани ефекти од маслото од коноп

Иако се многу ретки, некои луѓе пријавиле несакани ефекти од употребата на масло од коноп. Најчести се низок крвен притисок, сува усна шуплина, намалена способност за размислување и седација. Истражувањата на животни не покажале никакви токсични несакани ефекти од употребата на маслото. Сепак, бидејќи не постојат долгорочни истражувања на оваа тема, неопходна е консултација со лекар пред да се започне со употреба на масло од коноп.

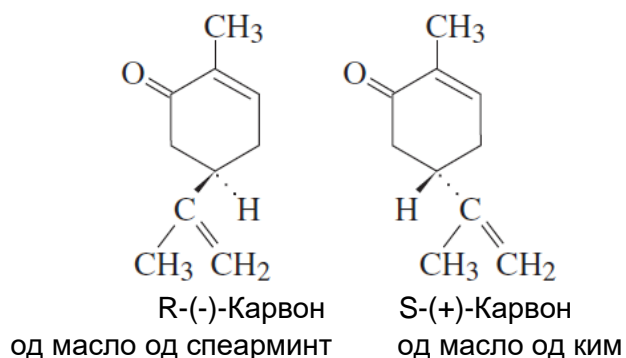
За производство на биодизел од маслото од коноп најчесто се користат хомогени базни катализатори: KOH, NaOH и NaOCH₃. Поради високата содржина на полинезаситени масни киселини во маслото од коноп, јодниот број на маслото од коноп е повисок од пропишаниот стандард за квалитет на биодизелот, па поради тоа биодизелот е оксидационо релативно нестабилен. Биодизелот од маслото од семе од коноп со подобар квалитет е добиен со симултано изведување на реакцијата на **метанолиза** и **селективно хидрогенирање**. Најдобри се резултатите коишто се добиени со примена на бифункционален катализатор Cu/SrO, во кој SrO е поефикасен катализатор за метанолиза, а Cu е повисоко каталитички активен во хидрогенизацијата на метил линолеат и линолеат во олеат.

При оптимални услови (молски однос на метанол : масло 12 : 1, количеството на Cu/SrO катализатори треба да изнесува до 10 %, температура 180 °C, притисок од 3,0 MPa и време на реакцијата 3 h) постигнат е принос од 96 % и намалување на јодниот број од 164 g I₂ /100 g на 113 g I₂ /100 g. Главни недостатоци на овој комбиниран процес се големите инвестициони вложувања, големата потрошувачка на енергија и со самото тоа големи се инвестиционите вложувања, голема потрошувачка на енергија и со самото тоа и големи трошоци на производство (Kostadinović Veličkowska, 2021).

3.1.1. Идентификација и квантификација на масло од спеарминт и ким: (+) и (-)-карвони со употреба на гасна хроматографија

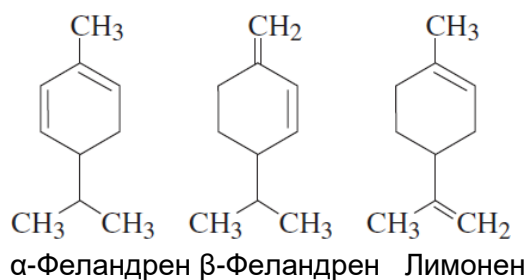
Во овој дел од учебникот ќе ги споредиме (+)-карвонот од масло од ким и (-)-карвонот од масло од спеарминт со помош на гасна хроматографија. Доколку е достапна гасна хроматографија од препаративна скала, може да се изолираат чисти примероци од секој од карвоните од нивните соодветни масла. Доколку опремата не е достапна, чисти примероци од двата карвона набавени од комерцијални извори може да бидат од полза, а секоја работа со гасната хроматографија ќе биде стриктно аналитичка.

Мирисите на двата енантиомерни карвона значително се разликуваат еден од друг. Присуството на еден или на друг изомер го дава карактеристичниот мирис на секое од маслата. Разликата во мирисите е очекувана, бидејќи мирисните рецептори во носот се хирални. Овој феномен во кој хиралните рецептори интерферираат различно со секој од енантиомерите на хиралното соединение е наречен **хирално препознавање** (слика 3.10.).

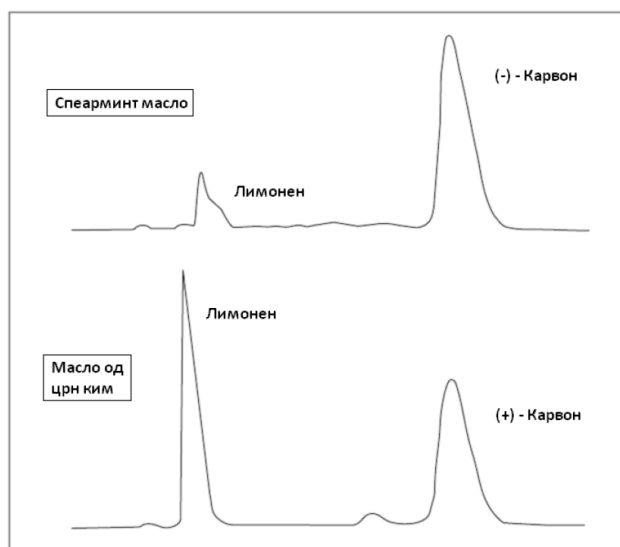


Слика 3.10. Енантиомери на карвон во масло од спеарминт и масло од ким (Pavia et al., 2013)

Иако треба да очекуваме оптичката ротација на изомерите (енантиомери) да биде со спротивен знак, другите физички својства треба да бидат идентични. Така за двата (+) и (-) карвони претпоставуваме дека инфрацрвените спектри, ретенционите времиња во гасната хроматографија, рефрактивните индекси и температурите на вриење ќе бидат идентични. Според тоа, единствени разлики во својствата што можете да ги забележите се различните мириси.



Слика 3.11. Хемиски структури на монотерпени во масло од спеарминт и ким (Pavia et al., 2013)



Слика 3.12. Зголемување на ретенционото време (Pavia et al., 2013)

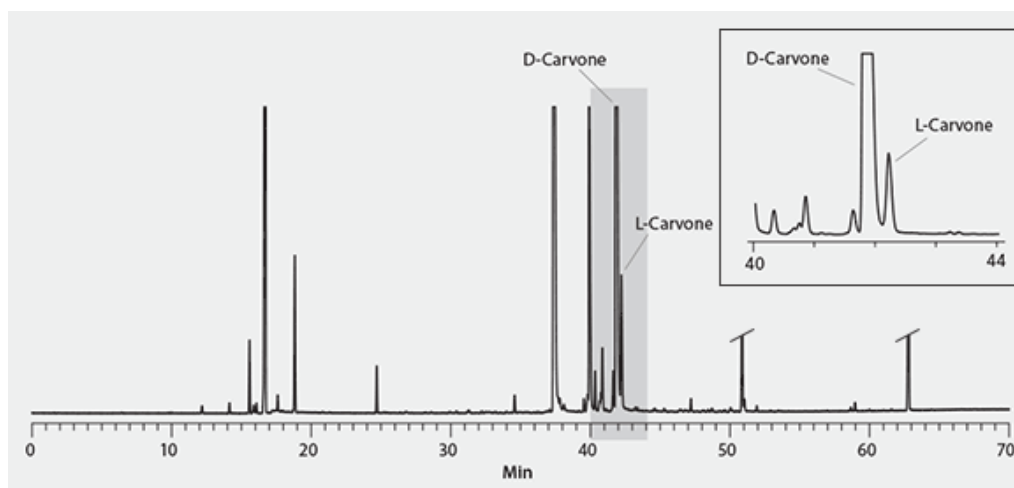
Етерично маслото од ким најмногу содржи лимонен и (+)-карвон. Гасниот хроматограм за ова масло е прикажан на сликата погоре. (+)-карвон (Т.В. 203 °С) може лесно да биде раздвоен од лесно испарливиот лимонен (Т.В. 177 °С) со гасна хроматографија, како што е прикажано на сликата. Доколку имаше *препаративен гасен хроматограф*, (+)-карвонот и лимоненот може да бидат собрани одделно како елуенти од гасно хроматографската колона. **Етерично спеарминт маслото** содржи главно (-)-карвон со мало количество на лимонен и сосема мало количество на терпени со ниска температура на вриење, α - и β -феландрен. Гасниот хроматограм на ова масло, исто така, е прикажан на сликата. Со препаративна апаратура возможно е лесно да се собере (-)-карвонот доколку тој постои во колоната. Понатаму, многу потешко е да се собере лимоненот во чиста форма. Возможно е да биде контаминиран со други терпени, бидејќи сите имаат слична температура на вриење.

Најпрвин треба да се подготват хроматограми од двата изомера и лимонен како референтни стандарди. Соодветен референтен стандард вклучува смеса од (+)-карвон и лимонен, а втората смеса (-)-карвон и лимонен. Гасните хроматограми треба да бидат прикажани со ретенциони времиња.

Гасниот хроматограф треба да биде подготвен на следниот начин: температура на колона 200 °C, температура на инјектор и детектор 210 °C, проток на гас носач 20 mL/min. Препорачаната должина на колоната е 2,43 m (8 стапки) со Carbowax 20M како стационарна фаза. Вообичаено е да се користи инструментот Gow-Mac 69-350 со дополнителен препаративен систем за овој инструмент.

Треба однапред да ја наполните полариметриската кивета (0,5 dm) со неразредени (+) и (-) карвони. Исто така, треба да има четири шишиња од масло од спеарминт и ким и (+) и (-) карвон. Двата енантиомера се комерцијално достапни.

Мирис. Внимателно помирисајте ги садовите со спеарминт и со масло од ким, и двата карвони. Околу 8-10 % од популацијата не може да ја детектира разликата помеѓу мирисите на оптичките изомери. Сепак, за многу луѓе разликата е очигледна.



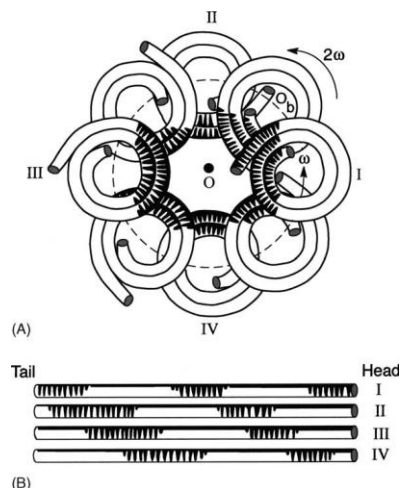
Слика 3.13. Хирален хроматограм на D- и L-форма на карвон (Pavia et al., 2013.)

3.2. Противструјна (изолациона) хроматографија

Противструјна или изолациона хроматографија е аналитичка техника која **најмногу се користи за изолација на фармаколошки активни супстанции.**

Во суштина, противструјната хроматографија е течна хроматографија каде што стационарната и мобилната фаза се состојат од две течности кои меѓу себе не се мешаат, без присуство на цврста стационарна фаза (Kostadinović Veličkobska et al., 2013).

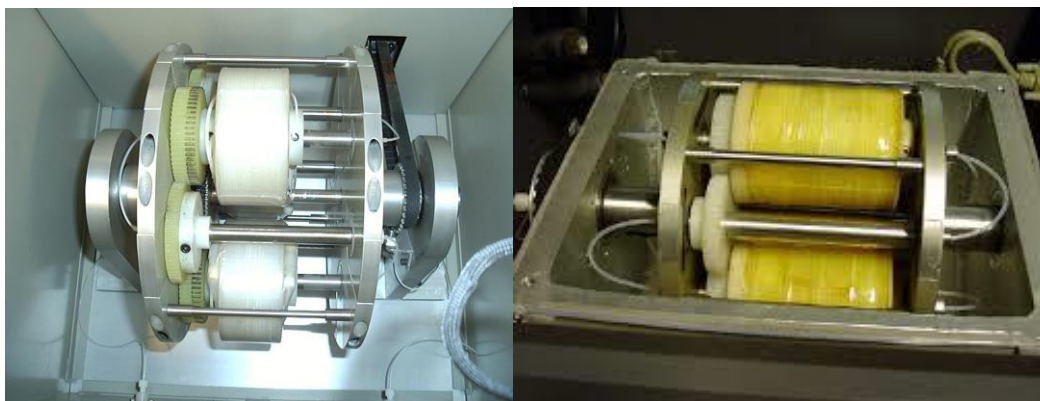
Системот за противструјна хроматографија се состои од комора (сепаратор) во која има најчесто три повеќеслојни намотки составени од многу тенки цевчиња со голема должина (слика 3.14.). Цевчињата од еден сепаратор во друг се поврзани со таканаречен систем „глава-опашка“ што овозможува примерокот кој се распределува меѓу двете течни фази да преминува од еден сепаратор во друг со што се овозможува **повеќекратна екстракција.**



Слика 3.14. Механизам на раздвојување и изолирање на компоненти со противструјна или изолациона хроматографија (Kostadinović Veličkovska, 2012)

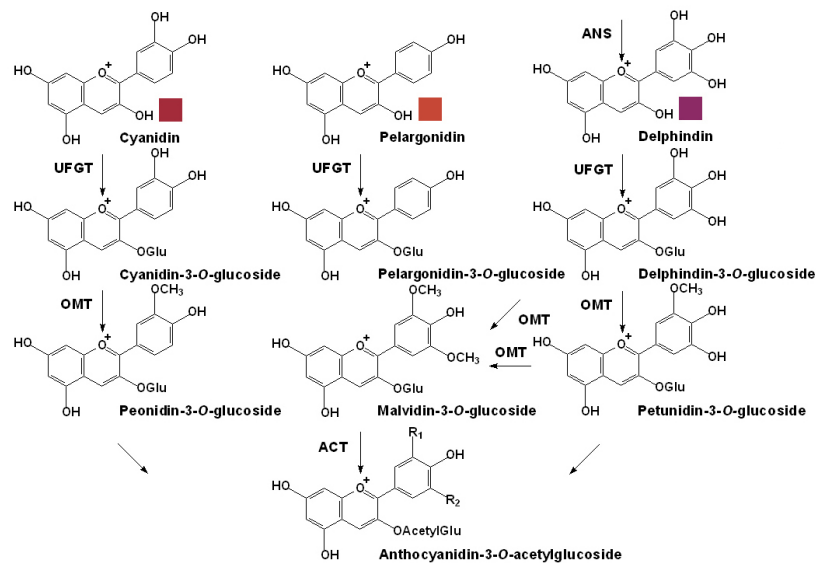
Пред да се инјектира примерокот, најпрвин целиот систем (повеќеслојните намотки) се полни со стационарна фаза **која е течност**. Потоа системот се приклучува за мобилна фаза која е исто така течност, но **комpletely немешлива со стационарната фаза** (McAlpine et al., 2012).

При инјектирање на примерокот (екстракт од којшто треба да се изолираат неколку компоненти) се стартува системот и на тој начин мобилната фаза се движи низ системот **во спротивна насока од насоката** на стационарната фаза. Примерокот, патувајќи низ системот составен од две фази кои не се мешаат меѓу себе, се распределува низ фазите во моментот кога овие две фази се придвижуваат една кон друга и се добиваат повеќе изолирани компоненти кои ги детектира UV/VIS детекторот (слика 3.15.). Пишувачот врз основа на абсорбанцата исцртува хроматограм во кој секој пик се однесува на соодветно изолирана компонента (Kostadinović Veličkovska et al., 2013).



Слика 3.15. Противструјна или изолациона хроматографија (Kostadinović Veličkovska, 2012)

Речиси сите природни пигменти (бои) преку процесот на изолација може да се изолираат во многу чиста форма (дури и до 98 % чистота). На шемата подолу дадена е постапката за изолација на хемиските структури на црвените пигменти (пелагонидин, цијанидин и малвидин – сите со различна црвена нијанса).

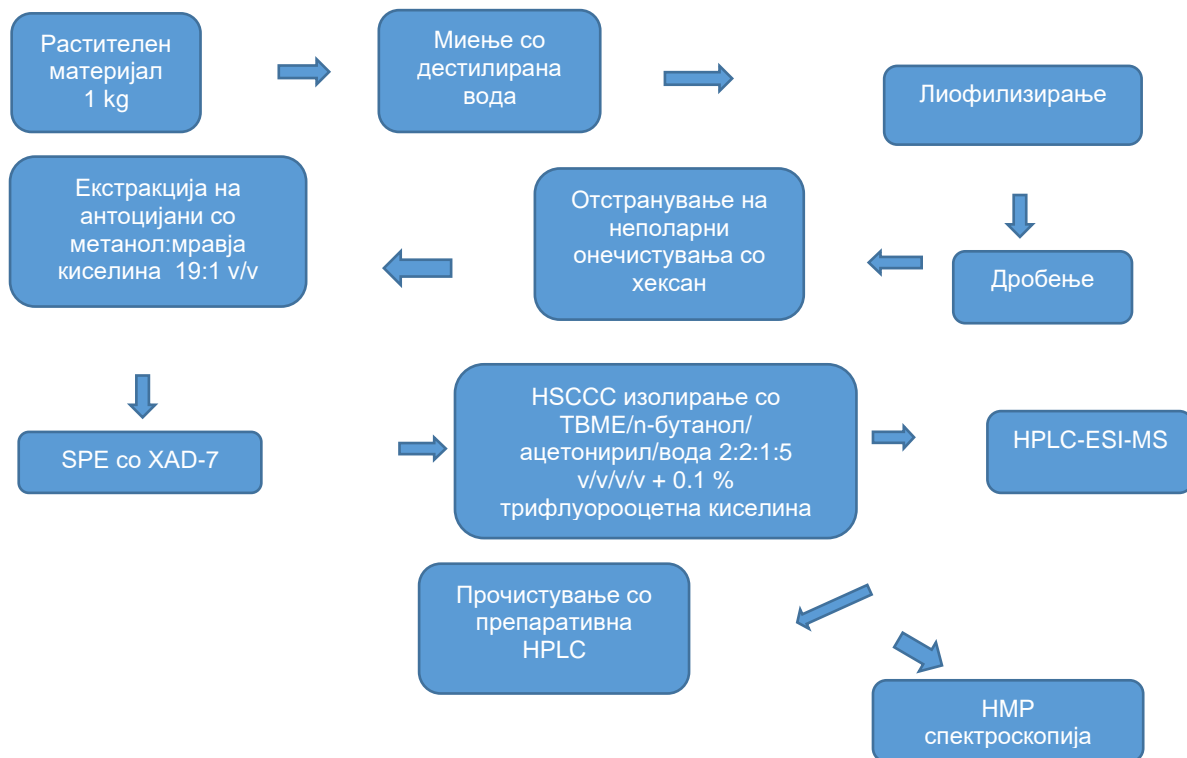


Слика 3.16. Црвени нијанси на природни пигменти од грозје (Kostadinović Veličkovska, 2012)

Овие пигменти може да се издвојат преку сложена хроматографска техника наречена изолациона хроматографија. Изолационата хроматографија овозможува повеќекратна екстракција на растителниот материјал помеѓу две немешливи фази од коишто една е поларна, а друга неполарна.

Коефициентите на распределба на секој од наведените пигменти овозможува тие да се екстрахираат од растителниот материјал (на пример, комиње од грозје) и да се распределат низ поларната или неполарната фаза. На тој начин преку разделување на фракциите и нивно испарување, концентрирање и прочистување се добиваат природни црвени пигменти со чистота над 95 %. На сликите подолу е прикажан шематски приказ за начин на изолација на пигментите, структурата на изолираните пигменти и нивната чистота потврдена со нуклеарно-магнетна резонанца.

Изолација на природни продукти

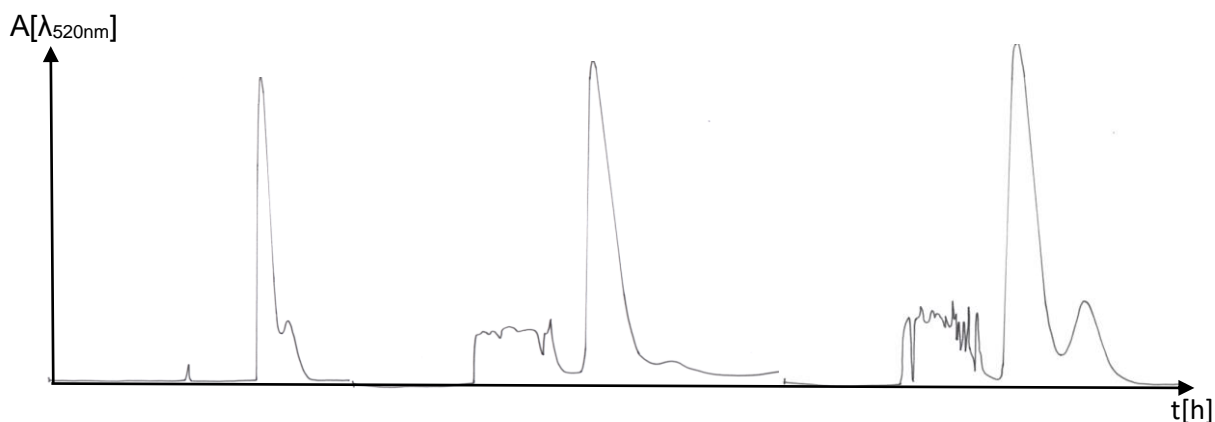


Слика 3.17. Шематски приказ за начин на изолација на пигментите (Kostadinović Veličkova, 2012)

Како што може да се забележи од приказот погоре (слика 3.17.), растителниот материјал (комиње од „Вранец“, „Мерлот“ или некое друго црвено грозје) најпрвин се промива со дестилирана вода за да може нечистотиите кои имаат поларен карактер да се отстранат. Ваквиот промиен растителен материјал потоа се лиофилизира (во посебни уреди наречени лиофилизатори, најпрвин водата од растителниот материјал се замрзнува и потоа како мраз се отстранува од растителниот материјал). Сувиот лиофилизиран материјал се дроба и се ситни за да може да се зголеми контактната површина со цел да се екстрахираат понатаму поефикасно потребните пигменти. Потоа ваквиот сув и иситнет растителен материјал се екстрахира со хексан за да може да се отстранат неполарни компоненти како што се, на пример, хлорофилот и каротеноидите. Бидејќи за успешна екстракција на антоцијаните потребно е средно поларна и кисела средина, екстракцијата се врши со смеса од метанол и мравја киселина во волуменски сооднос 19:1. Откако е добиен темно-црвен „суров“ екстракт, тој се прочистува со цврсто-фазна екстракција (со помош на хроматографија со колона) и полнител XAD-7, а потоа се врши сепарација, разделување и изолирање на компонентите (одделни антоцијани) со противструјна или изолациона хроматографија.

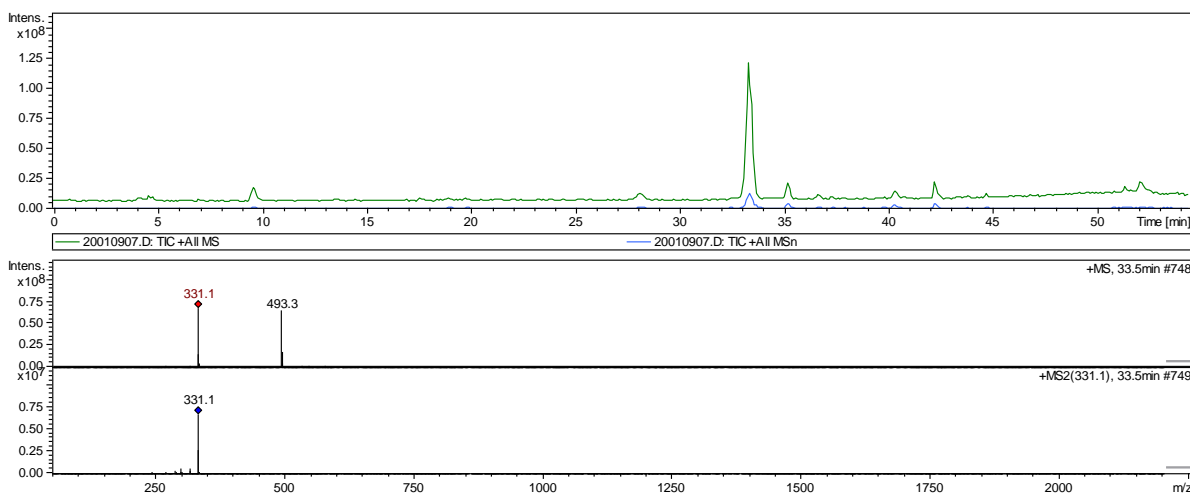
За таа цел системот се полни со две немешливи течни фази приготвени со мешање на терц-бутил метил етер/n-бутанол/ацетонитрил/вода во волуменски однос 2:2:1:5 закиселен со 0,1 % трифлуорооцетна киселина (Latif and Sarker, 2012). Потоа во коморите за изолација се инјектира 1 г од растителниот екстракт растворен во оваа смеса од растворувачи и започнува најпрвин сепарација, а потоа и изолација на секој од пигментите. Хемиската структура на секој одделен пигмент од секоја епрувета со фракциите најпрвин се идентификува со високоефикасна течна хроматографија поврзана со масен детектор. Доколку е потребно се прочистува со препаративна течна

хроматографија и конечната структура на изолираните компоненти се потврдува со нуклеано-магнетна резонантна спектроскопија (НМР).



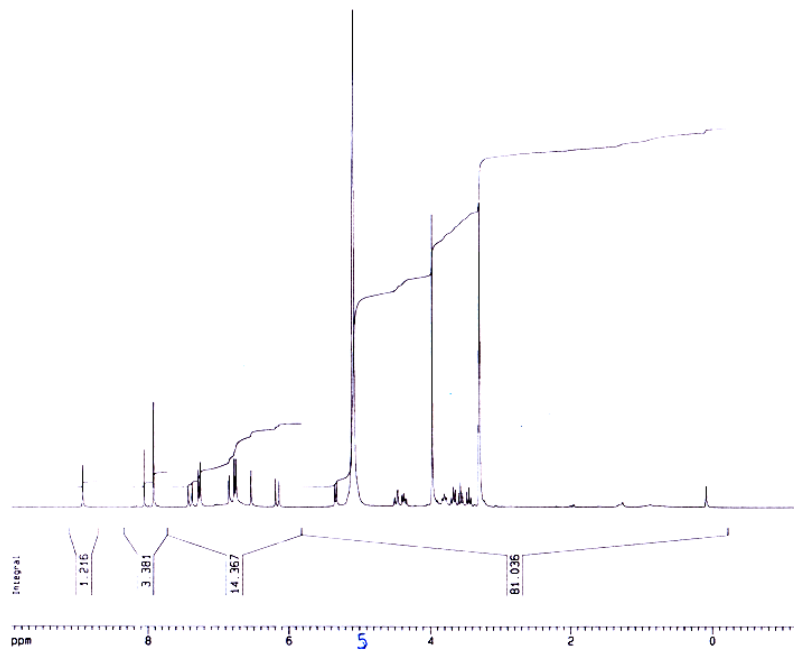
Слика 3.18. Изолациони хроматограми од антоцијани од комиње на „пинот ноар“, „мерлот“ и „вранец“ (средниот најголем пик е од најдоминантниот антоцијанин малвидин-3-гликозид) (Kostadinović Veličkovska, 2012)

Откако компонентата (најголемиот пик) на горниот (изолационен) хроматограм е изолирана во епрувета, растворувачот се испарува и потоа компонентата се подложува на идентификација со високоефикасна течна хроматографија со масена спектрометрија. Како што може да се забележи на долната слика, пикот се елуира помеѓу 30 и 35 минути ретенционо време.



Слика 3.19. Хроматограм и масен спектар на малвидин-3-гликозид (Kostadinović Veličkovska, 2012)

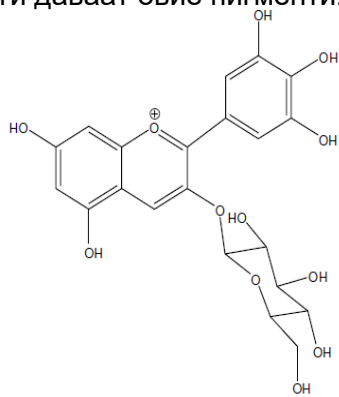
Масениот спектар на сликата 3.19. претставува доказ дека станува збор за чист малвидин-3-гликозид изолиран со противструјна или изолациона хроматографија. Крајна потврда, односно уште еден сигурен доказ дека изолираното соединение има структура на малвидин-3-гликозид е протонски НМР спектар (^1HMR) прикажан на сликата 3.20 (Colegate and Molyneux, 1993).



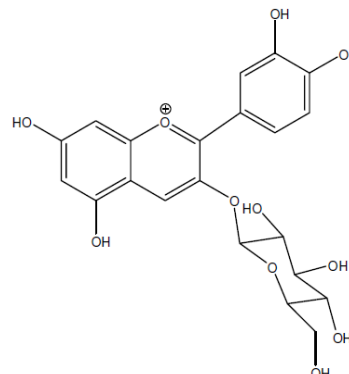
Слика 3.20. ^1HMP спектар на малвидин-3-гликозид (Kostadinović Veličkovska, 2012)

Бојата на изолираните пигменти зависи и од рН вредноста на средината во која се аплицираат овие пигменти. Кисела средина околу рН 3-3,5 овозможува добар интензитет на боја како и промена на нијансата. При производство на безалкохолни пијалаци каде што вредноста на рН изнесува 3,3 овие пигменти имаат многу добра растворливост и стабилен интензитет на боја.

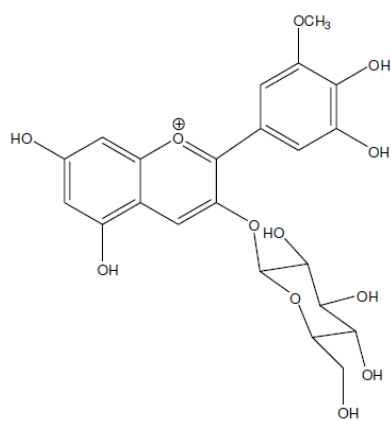
На сликата 5.43. прикажани се структурите на изолираните антоцијани како и нијансите што ги даваат овие пигменти.



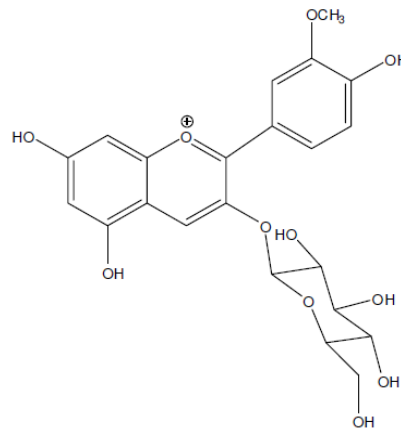
Делфинидин-3-гликозид



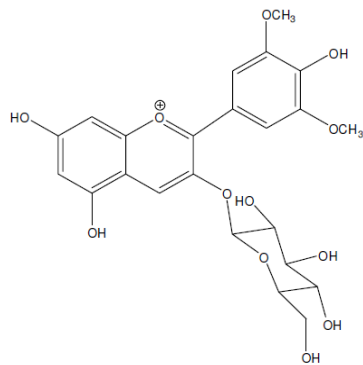
Цијанидин-3-гликозид



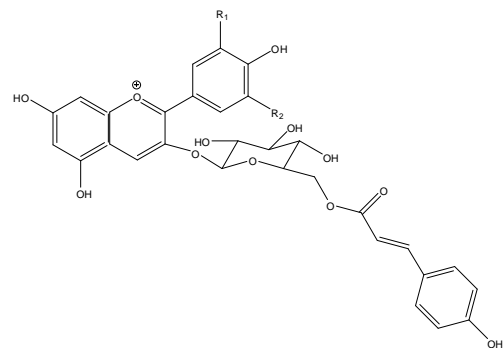
Петунидин-3-гликозид



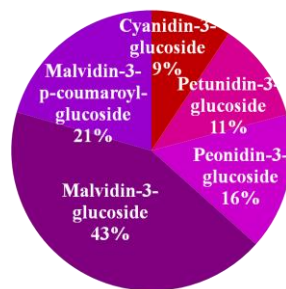
Пеонидин-3-гликозид



Малвидин-3-гликозид



Малвидин-3-*p*-кумароил-гликозид



Слика 3.21. Нијанса на петте најзастапени пигменти одговорни за крајната боја на грозјето од сортата „вранец“ (Kostadinović Veličkovska, 2012)

3.3. Постапка за изолација на еугенол од каранфилче

Приготвување на раститена дрога. Измерете приближно 3,0 g од цветот од каранфилче на хартија за мерење и забележете ја точно неговата маса. Доколку вашиот зачин веќе е иситнет, можете да продолжите без да го толчите. Во спротивно, истолчете го семето со помош на нож или со толчник или, пак, исечкајте ги големите парчиња на помали со помош на ножици. Измешајте го зачинот со 35-40 ml вода во колбата со тркалезно дно од 100 ml додавајќи каменче за вриење и повторно приклучете ја на вашиот дестилационен апарат. Оставете го зачинот да се натопи во вода околу 15 минути пред да започнете со загревањето. Треба да внимавате целиот зачин да биде натопен. Доколку е неопходно, проклумкајте ја колбата внимателно.

Дестилација со водена пареа. Пуштете ја водата за ладење во кондензаторот и започнете да ја загревате смесата за да се овозможи соодветна брзина на дестилацијата. Доколку премногу брзо ја достигнете температурата на вриење, може да имате проблем со пенење или со потреси на колбата. Ќе треба да го пронајдете вистинското количество на топлина што ќе овозможи соодветна брзина на дестилацијата без пенење и без потреси на колбата. Соодветна брзина на дестилацијата може да се постигне со капнување на течност на секои 2-5 секунди. Продолжете ја дестилацијата сè додека не бидат собрани најмалку 15 ml од дестилатот. Се разбира, при дестилацијата со водена пареа дестилатот ќе биде матен поради сепарацијата на есенцијалното масло при ладењето на пареата. Понекогаш може и да не го забележите ова, а сепак да добиете задоволителни резултати.

Екстракција на есенцијално масло. Префрлете го дестилатот во одделителна инка и додадете 5,0 mL метилен хлорид (дихлорметан) за да го екстрахирате дестилатот. Клумкајте ја инката силно и повремено вентилирајте ја. Оставете ги слоевите да се разделат. Доколку слоевите не се раздвојуваат добро, смесата може да се исцентрифугира. Размешувањето со шпатула понекогаш овозможува емулзијата побргу да се раздвои. Исто така, може да биде корисно додавање на заситен раствор од натриум хлорид. За натамошната работа во секој случај имајте го предвид фактот дека заситениот раствор на солта е тежок па водениот слој може да си ја замени местоположбата со слојот од метилен хлоридот којшто најчесто е на дното.

Помалиот слој од метилен хлорид преместете го во чист и сув ерленмаер. Повторете ја екстракционата постапка (процедура) со свежа порција од метилен хлорид и сместете ја во истиот ерленмаер кој веќе се користеше за првата екстракција. Доколку има видливи капки од вода, потребно е метилен хлоридот внимателно да го претурите во чиста и сува колба отстранувајќи ги капките од вода.

Сушење. Исушете го растворот од метилен хлоридот со додавање на околу 1 g грануларен анхидриден натриум сулфат во ерленмаер. Оставете го растворот да отстои околу 10-15 минути и потоа внимателно исклумкајте го.

Испарување. Кога органскиот раствор ќе биде сув, земете чиста и сува епрувета со средна големина и точно измерете ја. Во измерената епрувета декантирајте порција (околу една третина) од исушениот органски слој, отстранувајќи го агенсот за сушење. Додадете каменче за вриење и, работејќи во дигестор, испарете го метилен хлоридот од растворот со слаба пареа од воздух или од азот и со загревање на водена бања. Кога првата порција ќе биде редуцирана до мал волумен од течност, додадете втора порција од растворот на метилен хлорид и испарете ја на истиот начин. Кога ќе ја додадете крајната порција, користете мали количества на чист метилен хлорид за да го измиете реагенсот за сушење, овозможувајќи остатокот од растворот целосно да се префрли во епруветата. Внимавајте да не го пренесете и натриум сулфатот (Pavia et al., 2013).



Слика 3.22. Изолација на еугенол од каранфилче (DeFranchesco, 2021)

4. Суперкритична флуидна екстракција

Суперкритичната флуидна екстракција на најефикасен начин овозможува екстракција на фармаколошки активни компоненти од комплексни смеси како што е растителен материјал.

Иако во претходната лекција дискутиравме неколку начини на изолатија на фармаколошки активни супстанции и етерични масла со различни дестилациони методи, сепак за премногу осетливи компоненти кои лесно оксидираат или се распаѓаат, ниту една од наведените дестилациони техники не може да биде од полза како и ниту еден вид екстракција (течно – течна или цврсто – течна).

Во такви случаи се прибегнува кон најновата техника за изолатија на природни продукти – **суперкритична флуидна екстракција** (Nahar and Sarker, 2012).

Зошто овој вид на екстракција е супериорен во однос на сите други познати видови на екстракција?

За да одговориме на ова прашање, треба да се земе предвид дека најважен чекор при секоја екстракција е **растворувач**. За жал, понекогаш, ниту една комбинација од познати органски растворувачи не може да помогне. Зошто? Затоа што кога станува збор за екстракција, **не** се подразбира само **поларноста** на растворувачот, туку и неговата **вискозност, густина и коефициент на дифузија**.

Флуиди во суперкритична состојба (**над** суперкритичен притисок и/ или температура) имаат **многу поголема растворливост** од класичните течни растворувачи. Понатаму, нивната вискозност и густина се ниски, додека **коефициентот на дифузија може да биде и до 100 пати поголем** од оној на класичните течни растворувачи. Под такви услови, суперкритичните флуиди се супериорни во однос на класичните течни растворувачи (Nahar and Sarker, 2012).

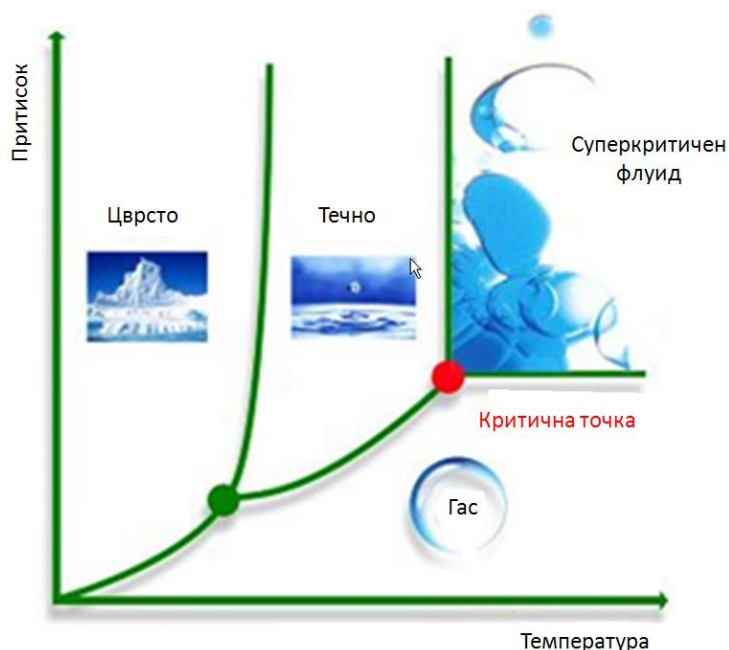
Што се подразбира под суперкритичен притисок и суперкритична температура?

Секој гас којшто под точно определен притисок и температура може да се **втечни** и да ги задржи во исто време и својствата на гасови и течности се нарекува **флуид**, додека температурата и притисокот **над** кој гасот преминува во флуид се нарекуваат суперкритична температура и суперкритичен притисок.

Гасовите како што се пропан, бутан, фреони и јаглерод диоксид може да се преобразат во течност со зголемување на притисокот (од 5 до 74 бари за јаглерод диоксид) и тоа на температури многу пониски од критичната температура (31,3 °C за јаглерод диоксид) и во тој случај се однесуваат како течности и имаат висока моќ на растворање.

Наместо да менуваме различни растворувачи или нивни смеси за да добиеме течност со соодветна густина, вискозност и коефициент на дифузија кај екстракцији со класични растворувачи, во суперкритичната флуидна екстракција **само менуваме притисок и температура** и на тој начин добиваме речиси идеален флуид (растворувач) за да може да изолираме соодветна фармаколошки активна компонента.

Оваа техника е нова. Нејзините зачетоци почнуваат во 1970 година и како прв гас за суперкритична екстракција се користел јаглерод диоксид. Зошто? Затоа што CO₂ е нетоксичен, односно не ја загадува средината, не е скап и не е запалив. Исто така, поради ниска суперкритична температура (31,3 °C), а висок притисок, со помош на јаглерод диоксид може да се изолираат термолабилни компоненти без или со минимална деформација во нивната структура (слика 7.1).



Слика 4.1. Дијаграм за суперкритичен притисок и температура на јаглерод диоксид (сивиот дел означува услови при кои CO_2 е флуид, односно во исто време има карактеристики и на гас и на течност и станува супериорен растворувач) (www.jasco-global.com/principle/principles-of-supercritical-fluid-systems-1-what-is-a-supercritical-state/)

Густината на јаглерод диоксидот на **притисок од 200 бари** е многу слична на хексан па така тој врши улога на речиси идеален неполарен растворувач за изолација на триглицериди, есенцијални масла од лековити билки и мирисливи масла од јасмин, роза, ирис за потребите на парфимериската индустрија. При вакви услови, јаглерод диоксидот е идеален и за изолација на метаболити од пациенти, бидејќи се работи на температура под $36\text{ }^\circ\text{C}$ и нема опасност од распаѓање или оксидација.

Сепак, најголемата предност оди во прилог на изолатот. Зошто? Затоа што за ваков изолат нема потреба да се испарува понатаму или на кој било начин да се третира, **туку само се враќаат притисокот и температурата при што јаглерод диоксидот станува гас и тој испарува, а во екстракторот ни останува 100 % чист, нераспаднат и неоксидиран изолат.** Понатаму, истото количество на јаглерод диоксид повторно се втечнува при нова количина на растителен или биолошки материјал и со исто количество на флуид се екстрахира ново количество на изолат.

На тој начин не се губи ниту една лековита компонента од етеричното масло, не се нарушува структурата ниту на една фармаколошки активна супстанција и не испарува, односно не се губи, ниту една компонента од мирисот на јасмин, ирис или роза.

Оваа екстракциона техника досега нашла најголема примена при декофеизинирање на кафе и чај (изолација на кофеин со суперкритичен јаглерод диоксид), производство на путер без холестерол (изолација на холестерол со суперкритичен јаглерод диоксид), месо со низок процент на маснотии (изолација на триглицериди и масни киселини со суперкритичен јаглерод диоксид), изолација на сквален од цигер на ајкула и изолација на масло од жолто ноќничче (*Oenothera biennis L.*) за лекување на егзема, псоријаза, акни и други воспалителни процеси на кожата.

Постојат 2 типа на суперкритична екстракција со јаглерод диоксид:

1. **Студена екстракција** со низок притисок која започнува со ладење на CO_2 на $35 - 55\text{ }^\circ\text{F}$ и пумпање низ добро иситнет растителен материјал под притисок од $800 - 15.000\text{ psi}$.

2. *Суперкритична екстракција* која започнува со загревање на CO₂ на температура над 78 F и пумпање низ добро иситнет растителен материјал на притисок помеѓу 6.000 – 10.000 psi (Nahar and Sarker, 2012).

Сепак, студената екстракција на низок притисок е најдобар начин на екстракција на фармаколошки активни компоненти од растителен материјал за да се избегне можноста од оксидација.

5. Микробранова екстракција

5.1. Теорија на микробраново зрачење

Микробраново зрачење е нејонизирачко зрачење со **фреквенција помеѓу 300 MHz и 300 GHz** кое се состои од **две осцилаторни полиња** и тоа **едно електрично и едно магнетно**. Микробрановото загревање претставува **диелектрично загревање** кое се базира врз способноста на некои супстанции да го преведат електромагнетното зрачење во топлина. Самиот процес на загревање со помош на микробраново зрачење се базира врз: **јонска кондуктивност (спроводливост) и ротација на диполните моменти**. Под влијание на електричното поле доаѓа до електрофоретичка миграција на јони, односно до феномен познат под името „**јонска кондуктивност**“. При миграција на јоните во раствор, растворот дава **отпор** кој предизвикува **триење** кое доведува **до загревање**. Втор важен механизам кој доведува до загревање е **ротација на диполните моменти**. Под влијание на електромагнетното зрачење, **диполните моменти на молекулите во растворот се ориентираат кон правецот на електричното поле**. При тоа доаѓа до **вибрации на молекулите и до генерирање на топлина заради триењето со преостанатите молекули од растворувачот**.

Микробрановото загревање се употребува во фармацијата и во медицината поради тоа што го скратува времето, а се зголемува чистотата и приносот на изолираните компоненти (Sarker, 2005).

5.2. Микробранова екстракција

Под микробранова екстракција се подразбира метод за изолација на природни продукти од комплекси органски смеси. За изолација на природни продукти со микробранова екстракција направени се посебни апарати наречени **микробранови екстрактори**. Денеска постојат два типа на микробранови екстрактори и тоа од **отворен и затворен тип**.

Во отворен систем екстракцијата се врши под атмосферски притисок, додека во затворен систем екстракцијата се врши под контролиран притисок и температура.

Најголема предност на микробранова екстракција во однос на друг вид досега изучувани екстракции е тоа што оваа техника овозможува изолација на посакуваната компонента **СО УПОТРЕБА ИЛИ БЕЗ УПОТРЕБА НА РАСТВОРУВАЧ**. Доколку станува збор за микробранова екстракција **БЕЗ УПОТРЕБА НА РАСТВОРУВАЧ**, овој вид на екстракција претставува комбинација од микробраново зрачење и „сува дестилација“. Оваа техника е особено погодна за екстракција на осетливи компоненти при изолација на етерични масла од лековити билки (Delazer et al., 2012).

При споредба на досега проучуваните класични дестилации и микробранова екстракција, неспоредливо поквалитетни етерични масла од босилок, мајчина душичка и нане се добиени со микробранова екстракција и тоа од многу помало количество на растителен материјал. На сликата 8.1. е прикажано како изгледа микробранов екстрактор за екстракција на есенцијални масла.



Слика 5.1. Микробранов екстрактор за „сува екстракција“ (ats-scientific.com/products/ethos-ex-microwave-extraction)

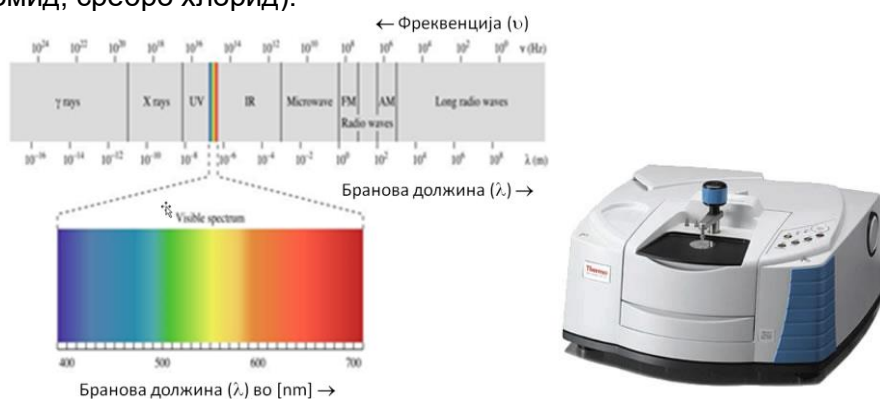
6. Идентификација на изолирани компоненти со инфрацрвена спектроскопија (IR)

Секое соединение кое има **ковалентни врски**, независно од тоа дали станува збор за органско или неорганско соединение, **ќе апсорбира фреквенции на електромагнетно зрачење во инфрацрвениот регион од спектарот**. Инфрацрвениот регион од електромагнетниот спектар има бранови должини подолги од оние на видливата светлина, а тоа се бранови должини помеѓу 400 nm и 800 nm ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) и бранови должини пократки од оние на радиобрановите кои имаат бранови должини подолги од 1 cm. Најбитен е **вибрациониот дел од инфрацрвениот спектар**. Овој дел вклучува зрачење со бранови должини (λ) помеѓу **2,5 μm и 15 μm ($1 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$)** (Pavia et al., 2013).

Како и со другите видови на апсорбирана енергија, молекулите се ексцитираат во високоенергетска состојба кога апсорбираат инфрацрвено зрачење. Апсорпцијата на инфрацрвеното зрачење, како и другите апсорпциони процеси, претставува квантизиран процес. **Молекулата ги апсорбира само селектираните фреквенции (енергии) од инфрацрвеното зрачење**. Апсорпцијата на инфрацрвеното зрачење одговара на промена на енергијата од 8-40 kJ/mol (2-10 kcal/mol). **Зрачењето во овој регион одговара на растегањето и свиткувањето на вибрационите фреквенции на врските на најголем дел од ковалентните молекули**. При апсорпционите процеси, овие фреквенции од инфрацрвеното зрачење, кои одговараат на природните вибрациони фреквенции од молекулата, апсорбираат и апсорбираната енергија ја зголемува амплитудата на вибрационите движења на врските во молекулата.

Најголем број од хемичарите го обележуваат зрачењето во вибрациониот дел од инфрацрвениот регион на електромагнетниот спектар со единици наречени **бранови броеви ($\ddot{\text{u}}$)**. **Брановите броеви се изразуваат во реципрочни сантиметри (cm^{-1}) и лесно се пресметуваат со земање на реципрочна вредност на бранова должина (λ) изразена во сантиметри**. Оваа единица има предност при пресметувањето, бидејќи е правопрпорционална на енергијата (слика 9.1.). Така, вибрациониот инфрацрвен регион од спектарот се зголемува од 4.000 cm^{-1} до 650 cm^{-1} (или бранови броеви).

За да се определи инфрацрвениот спектар на соединението, тоа мора да се смести во држач за примерок или во кивета. Во инфрацрвената спектроскопија ова веднаш предизвикува проблем. Стаклото, кварцот и пластиката апсорбираат силно во инфрацрвениот регион на спектарот (најчесто апсорбира секое соединение со ковалентни врски) и не може да се користат за производство на кивети (држачи) за примерок. Поради тоа, за производство на кивети мора да се користат јонски супстанции. За оваа цел најчесто се користат металните халиди (натриум хлорид, калиум бромид, сребро хлорид).



Слика 6.1. Инфрацрвено зрачење и инфрацрвен спектрофотометар (Pavia et al., 2013)

- Натриум хлоридни кивети

Поединечните кристали од натриум хлоридот се сечат и се полираат за да дадат плочки кои се транспарентни во инфрацрвениот регион. Овие плочки потоа се користат за производство на кивети кои се користат за *течни* примероци. Бидејќи натриум хлоридот е растворлив во вода, примероците мора да бидат **суви** пред да се сними спектарот. Плочките изработени од калиум бромид може да се користат наместо плочки изработени од натриум хлорид.

- Сребро хлоридни плочки

Кивети може да се произведат и од сребро хлорид. Овие плочки може да се користат за *течни* примероци кои содржат мало количество вода, бидејќи сребро хлоридот е *нерастворлив* во вода. Понатаму, бидејќи водата апсорбира во инфрацрвен регион, дури и кога се работи со сребро хлоридни плочки, треба да се отстрани водата што е можно повеќе. Сребро хлоридните плочки мора да се чуваат на темно. Тие потемнуваат на светлина и не може да се користат за соединенија кои во својата структура содржат аминокиселина група. Амините реагираат со сребро хлоридот.



Слика 6.2. Постапки за снимање на инфрацрвени спектри (Pavia et al., 2013)

- Примероци во цврста агрегатна состојба

Најлесен начин да се ракува со примерок во цврста агрегатна состојба е тој да се раствори во некој органски растворувач, да се капнат неколку капки од овој раствор на плочката од сол и да се овозможи растворувачот да испари. Овој метод на **„Филм“** може да се користи само со модерни ИР спектрофотометри. Другиот метод што е објаснет во текстот може да се користи и со ИР и со дисперзионите спектрофотометри. **Мало количество од примерок во цврста агрегатна состојба може да се дисперзира со калиум бромид и да се направи плочка.** Примерокот во цврста агрегатна состојба може, исто така, да се дисперзира со минерално масло кое апсорбира само во специфичен регион од инфрацрвениот спектар. Според третиот метод, примерокот во цврста агрегатна состојба може да се раствори во соодветен растворувач и да се нанесе растворот помеѓу двете плочки од натриум хлорид или сребро хлорид.

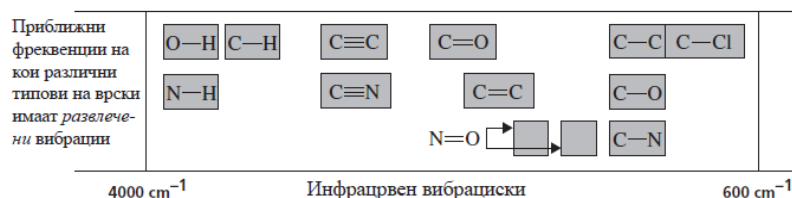
- Течни примероци – NaCl плочки

Наједноставен начин за приготвување на примерок, доколку станува збор за течност, е да се нанесе тенок слој од течност помеѓу две натриум хлоридни плочки чијшто површини се мазни и полирани. Овој метод е најдобар доколку треба да снимите спектар од чиста течност.

Поради тоа што секој тип на врска има различна природна фреквенција на вибрација и поради тоа што една иста врска кај различни соединенија е во малку поразлична околина, не постојат молекули со различна структура кои имаат сосема ист инфрацрвен отпечаток или **инфрацрвен спектар**. Иако некои од апсорбираните фреквенции во двата случаи може да бидат исти, сепак не постојат две различни

молекули кај кои инфрацрвениот спектар (или отпечаток) е идентичен. Така, инфрацрвениот спектар може да се користи за идентификување на молекулите на ист начин како што отпечатокот на палецот се користи за идентификација на луѓето. Доколку се спореди инфрацрвениот спектар на двете супстанции и се заклучи дека спектрите се идентични, тогаш станува збор за идентични соединенија. Доколку при споредувањето на пик по пик (апсорпција по апсорпција) спектарот е идентичен, тогаш со сигурност може да се тврди дека станува збор за идентична супстанција (Seidel, 2012).

Втора и многу поважна полза од инфрацрвениот спектар е добивањето на структурна информација за молекулата. Апсорпциите на секој тип на врска (N–H, C–H, O–H, C–X, C=O, C–O, C–C, C=C, C≡C, C≡N и така натаму) се регуларно најдени само во некои мали делови од вибрациониот инфрацрвен регион. За секој тип на врска може да биде дефиниран мал опсег на апсорпција. Надвор од овој регион, апсорпциите, се разбира, би биле резултат на некои други типови на врски. Така, на пример, која било апсорпција во опсег од 3.000 до 150 cm^{-1} ќе се појави поради присуството на C–H врската во молекулата. Апсорпцијата во опсег од 1.700 до 100 cm^{-1} ќе се појави поради присуството на C=O (карбонилната група) во молекулата. Ист тип на опсег се применува и за секој тип на врска. Редоследот според кој овие ленти се раширени низ вибрациониот спектар е шематски прикажан на сликата 6.3.



Слика 6.3. Приближни региони во кои апсорбираат различни типови на врски (Pavia et al., 2013)

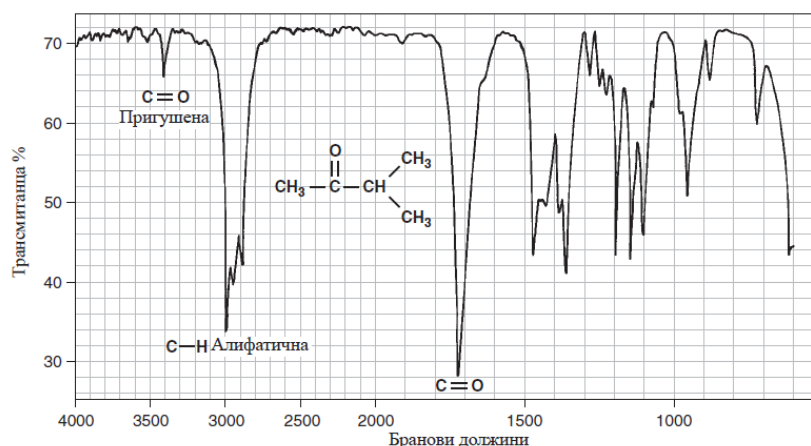
Постојат повеќе видови на вибрации во инфрацрвениот спектар во и надвор од рамнината на молекулата (слика 6.4).



Слика 6.4. Вибрации во инфрацрвениот спектар (Pavia et al., 2013)

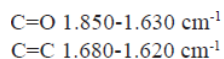
За да се разбере и проучи инфрацрвен спектар, во овој учебник најпрвин ќе ги разгледаме инфрацрвени спектри на некои едноставни соединенија.

На следната слика е прикажан и објаснет инфрацрвен спектар на метил изпоентил кетон (слика 6.5).



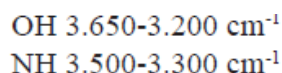
Слика 6.5. Инфрацрвен спектар на метил изопентил кетон (Pavia et al., 2013)

Како што може да се забележи од сликата погоре, карактеристични вибрации за ова соединение се: кето групата и -C-H алифатична вибрација. Изразената апсорпција во средината на спектарот одговара на карбонилната група C=O. Забележете дека C=O пикот е многу интензивен. Покрај ова, карактеристичната позиција на апсорпцијата, **обликот** и **интензитетот** на овој пик е, исто така, единствен за C=O. Тоа е така речиси за секој апсорпционен пик. Може да бидат опишани карактеристичниот облик и карактеристичниот интензитет, па според овие описни карактеристики често може да се препознае пикот во еден сложен или нејасен спектар. На пример, за некои големини двете C=O или C=C врски апсорбираат во истиот регион од инфрацрвениот спектар:



Понатаму, C=O врската има силна апсорпција, додека C=C врската апсорбира многу слабо. Така, трениран аналитичар вообичаено нема да го интерпретира силниот пик на 1.670 cm^{-1} за двојната врска јаглерод-јаглерод, или слабата апсорпција на оваа фреквенција во однос на карбонилната група.

Формата на пикот често дава клучна информација за идентитетот. Така, иако NH или OH регионите во инфрацрвениот спектар се прекриваат



NH најчесто дава **остар** апсорпционен пик (апсорбира во многу тесен опсег на фреквенции), додека OH, кога е во NH регионот, најчесто дава **широк** апсорпционен пик. Примарните амини даваат две апсорпции во овој регион, додека алкохолите даваат само една.

Поради тоа, додека го проучувате едноставниот спектар што следува подолу, треба да ги забележите облиците и интензитетите. Тие се еднакво важни како и фреквенциите на кои апсорпциите се појавуваат, па мора да го тренирате вашето око да ги забележи овие карактеристики. Во литературата по органска хемија често ќе најдувате на апсорпции означени како јаки (s), средни (m) или слаби (w), широки или остри. На овој начин, авторот се обидува да ви го опише обликот на апсорпционите ленти без да прикаже спектар. Иако интензитетот на апсорпцијата често дава корисни информации за идентитетот на пикот, треба да се земе предвид дека релативните

интензитети на сите пикови во спектарот зависат од количеството на примерокот кој е користен како и чувствителноста на инструментот. Така, *актуелниот* интензитет на поединечниот пик може да варира од спектар до спектар и мора да ги земете предвид *релативните* интензитети.

За да се извлече информација за структурата на примерокот од инфрацрвен спектар, мора да ги знаете фреквенциите и брановите должини на кои апсорбираат различни функционални групи. Инфрацрвените **корелациони табели** даваат информација за апсорпцијата на различни функционални групи. Делот од книгата на крајот од овој раздел дава опширна листа на корелационите табели. Понекогаш, информацијата за апсорпцијата дадена на графикон е наречена **корелационен графикон**. Поедноставени корелациони табели се дадени во табелата 6.1.

Потоа, следниот чекор е помнење на „типичните апсорпциони вредности“ за секоја функционална група од спектарот. Оваа вредност ќе биде единечен број кој ќе служи како основна вредност за помнење. На пример, започнете со едноставен алифатичен кетон како општ модел типичен за сите карбонилни соединенија. Типичниот алифатичен кетон има апсорпција на карбонилната група $1.715 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$. Без водење сметка за варирањето, запомете ја вредноста 1.715 cm^{-1} како основна за апсорпцијата на карбонилната група. Потоа научете го опсегот на карбонилната група и формата на лентата во однос на тоа како различни карбонилни групи се распоредени во овој регион од инфрацрвениот спектар. Забележете ја, на пример, табелата 6.2. која дава типични вредности за карбонилната група. Исто така, научете како факторите, како што е големината на прстенот (кога функционалната група е поврзана за прстен) и конјугацијата, влијаат врз основната вредност (односно во која насока се поместени вредностите). Научете ги трендовите – секогаш помнејќи ја основната вредност (1.715 cm^{-1}).

При анализирање на спектар од непознато соединение, концентрирајте се прво на потврдување или отфрлање на неколку главни функционални групи. Најзабележителни пикови се: C=O, O–H, N–H, C–O, C=C, C≡C, C≡N и NO₂. Доколку се присутни, тие веднаш ја даваат информацијата за структурата на соединението. Не обидувајте се да ги анализирате во детали C–H апсорпциите близу 3.000 cm^{-1} . Речиси сите соединенија ги имаат овие апсорпции.

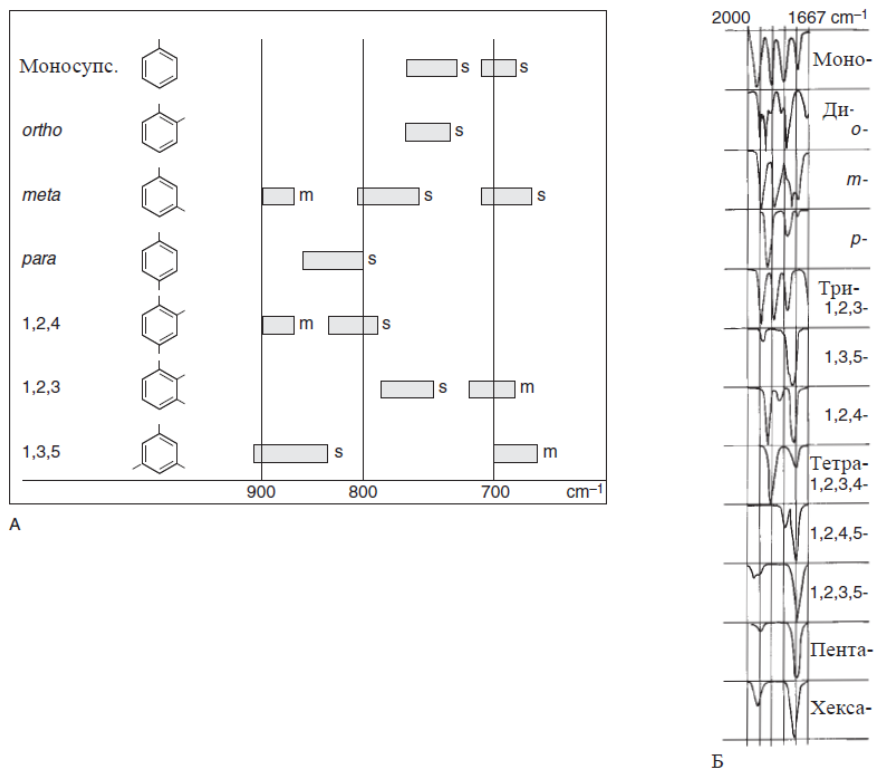
Табела 6.1. Поедноставена корелациона табела (Pavia et al., 2013)

	Тип на вибрација	Фреквенција (cm ⁻¹)	Интензитет ^a
C–H	Алкани (развлечена)	3000–2850	s
	–CH ₃ (свиткана)	1450 and 1375	m
	–CH ₂ – (свиткана)	1465	m
	Алкени (развлечена)	3100–3000	m
	(свиткана)	1700–1000	s
	Ароматични (развлечена)	3150–3050	s
	(свиткана, надвор од рамнината)	1000–700	s
	Алкени (развлечена)	ca. 3300	s
C–C	Алдехиди	2900–2800	w
		2800–2700	w
C–C	Алкан	Не се корисни за интерпретирање	
C=C	Алкен	1680–1600	m–w
	Ароматичен	1600–1400	m–w
C=C	Алкин	2250–2100	m–w
C=O	Алдехид	1740–1720	s
	Кетон (ацикличен)	1725–1705	s
	Карбоксилна киселина	1725–1700	s
	Естер	1750–1730	s
	Амид	1700–1640	s
	Анхидрид	ca. 1810	s
		ca. 1760	s
C–O	Алкохоли, Етери, Естери, Карбоксилни киселини	1300–1000	s
O–H	Алкохоли, Феноли		
	Слободни	3650–3600	m
	Н-врзани	3400–3200	m
	Карбоксилни киселини	3300–2500	m
N–H	Примарни и секундарни амини	ca. 3500	m
C≡N	Нитрили	2260–2240	m
N=O	Нитро (R–NO ₂)	1600–1500	s
		1400–1300	s
C–X	Флуорид	1400–1000	s
	Хлорид	800–600	s
	Бромид, Јодид	<600	s

Табела 6.2. Основни вредности за апсорпции на врски (Pavia et al., 2013)

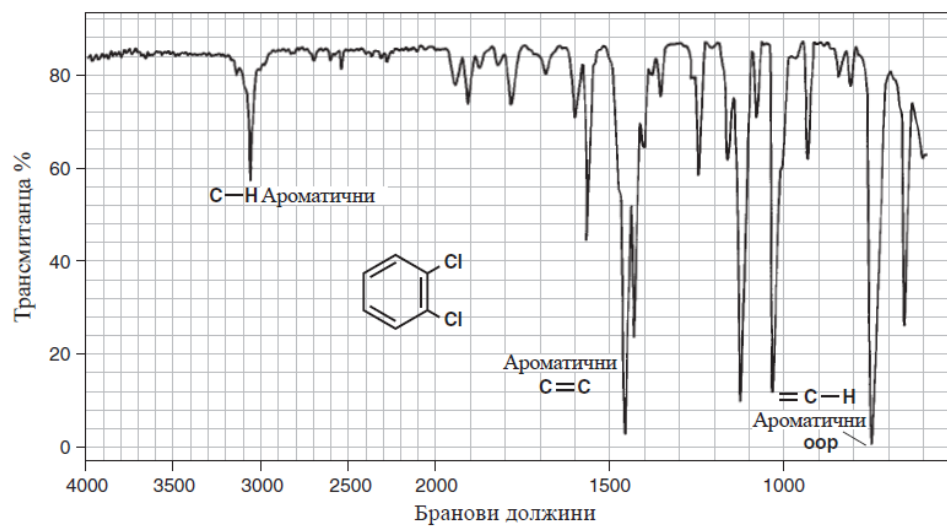
O–H	3400 cm ⁻¹	C≡C	2150 cm ⁻¹
N–H	3500 cm ⁻¹	C=O	1715 cm ⁻¹
C–H	3000 cm ⁻¹	C=C	1650 cm ⁻¹
C≡N	2250 cm ⁻¹	C–O	1100 cm ⁻¹

Постојат многу слаби и препокриени апсорпции кои се појавуваат помеѓу 2.000 cm⁻¹ и 1.667 cm⁻¹. Може да бидат определени релативните облици и броевите на овие пикови доколку ароматичниот прстен е моносупституиран или ди-, три-, тетра-, пента-, и хекса- супституиран. Позиционите изомери, исто така, треба да бидат раздвоени. Бидејќи апсорпциите се слаби, овие ленти најдобро се забележуваат доколку се користи чиста течност или концентрирани раствори. Доколку соединението има високи фреквенции за карбонилната група, тогаш овие апсорпции се препокриваат и имаат изглед на слаби препокриени ленти, па така доколку се анализира овој регион од спектарот, нема да се добијат корисни информации. Бројните фрагменти кои се добиени во овој регион се прикажани на сликата 6.6.



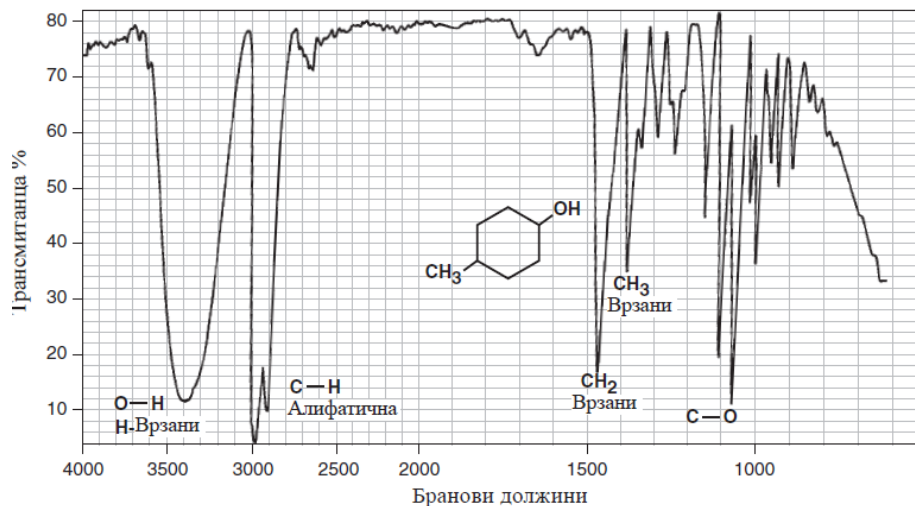
Слика 6.6. Ленти од инфрацрвени спектри на супституирани продукти (Pavia et al., 2013)

Втор пример за проучување на инфрацрвен спектар е дихлоробензен (слика 6.7).



Слика 6.7. Инфрацрвен спектар на дихлоробензен (Pavia et al., 2013)

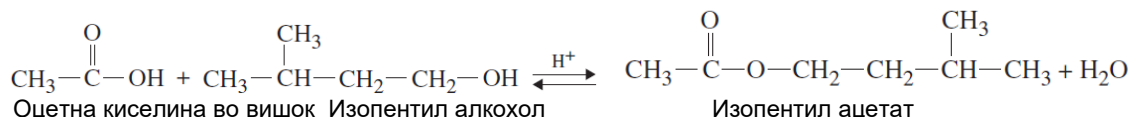
Трет пример за разгледување на инфрацрвен спектар е 4-метилциклохексанол во кој треба да се препознаат вибрациите на метил групата, циклична форма и алкохолна група (слика 6.8).



Слика 6.8. Инфрацрвен спектар на 4-метилциклохексанол (Pavia et al., 2013)

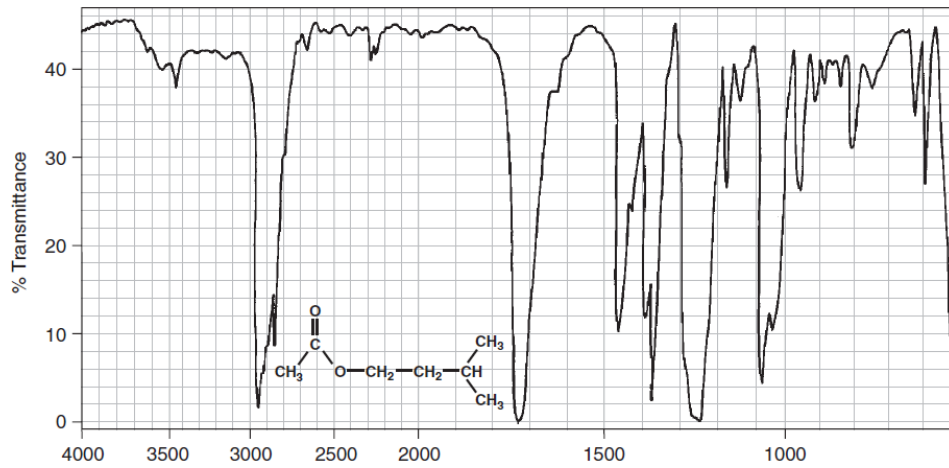
6.1. Идентификација на вештачка арома изопентил ацетат (банана масло) со инфрацрвена спектроскопија

Естерот изопентил ацетат може да се синтетизира вештачки. Овој естер најчесто се нарекува банана масло поради препознатливиот мирис на ова овошје.



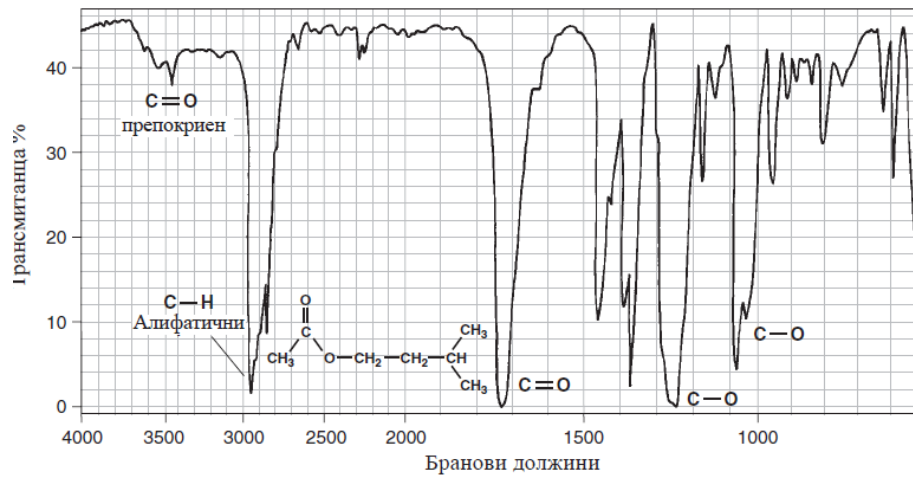
Изопентил ацетатот се приготвува со директна естерификација на оцетна киселина со изопентил алкохол. Бидејќи рамнотежата на двете супстанции не го фаворизира формирањето на естерот, мора да биде поместена на десно со користење на вишок од едниот од почетните материјали. Оцетната киселина се користи во вишок, бидејќи е поевтина во споредба со изопентил алкохолот и многу полесно се отстранува од екстракционата смеса.

Во изолационата процедура најголем дел од вишокот на оцетната киселина и остатокот од изопентил алкохолот се отстранува со екстракцијата со **натриум бикарбонат и вода**. По сушењето со анхидриден натриум сулфат, естерот е прочистен со дестилација. Чистотата на течниот продукт е анализирана преку снимање на инфрацрвен спектар.



Слика 6.9. Инфрацрвен спектар на изопентил ацетат или банана масло (Pavia et al., 2013)

Решението за структурата на инфрацрвен спектар на „банана масло“ е претставено на следниот инфрацрвен спектар.



Слика 6.10. Решение на инфрацрвен спектар на изопентил ацетат или „банана масло“ (Pavia et al., 2013)

7. Нуклеарно-магнетна резонантна спектроскопија (НМР)

Нуклеарно-магнетната резонантна (НМР/NMR) спектроскопија е инструментална техника која овозможува да се определат **бројот, типот и релативните позиции на некои атоми во молекулата. Овој тип на спектроскопија е применлив кај оние атоми кои имаат непарен број на протони и неутрони во јадрата.**

Овие јадра имаат т.н. аголен момент кој се означува како **јадрен спински квантен број I** каде што:

$$I = 1/2n$$

каде што $n = 0, 1, 2, 3, \dots$

Оние јадра кај кои $n = 0$ немаат јадрен спински квантен број и не покажуваат магнетна резонанца (пример ^{12}C ; ^{16}O). Јадрата кај кои $I = 1/2$ (пример ^1H , ^{13}C) покажуваат магнетна резонанца (Nahar and Sarker, 2011).



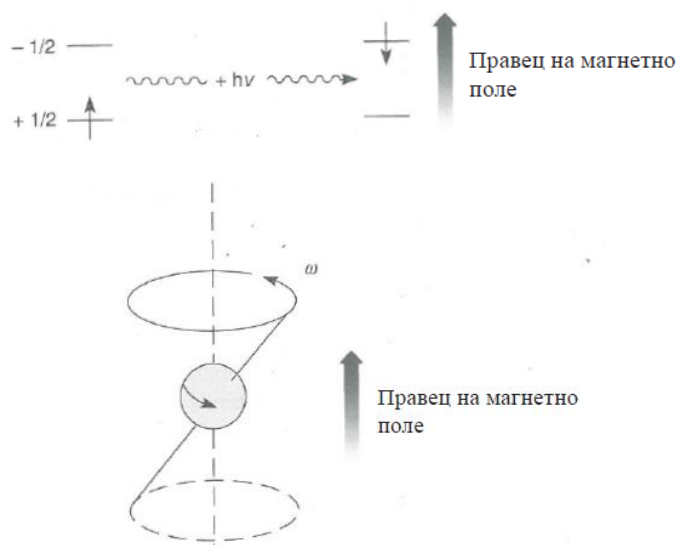
Слика 7.1. НМР спектроскопија (www.cmca.uwa.edu.au/facilities/nmr2/varian-400)

Иако многу атоми го задоволуваат ова барање, сепак од најголем интерес се водородните атоми (^1H). Атомите на обичните изотопи на јаглерод (^{12}C) и кислород (^{16}O) немаат јадрени магнетни моменти, додека обичните атоми на азот (^{14}N), иако имаат магнетни моменти, обично не покажуваат типично НМР однесување. Истото се однесува и за халогените атоми **освен за флуор (^{19}F) кој покажува однесување типично за НМР** (Mora et al. 1990).

Во водородот, кој има дозволени две спински состојби ($+1/2$ и $-1/2$), јадрените моменти од индивидуалните атоми ќе бидат разделени во магнетното поле (со спин $+1/2$) или спротивно (со спин $-1/2$). Главната предност на јадрото во полето настанува поради оваа спинска ориентација која има слаба нискоенергетска состојба на спин. Доколку јадрата се изложат на радиофреквентните бранови со соодветна енергија добиени со ова поле, тие може да го апсорбираат ова зрачење и да се смени насоката на спинот или да бидат преориентирани со јадрен магнетен момент спротивно од насоката на магнетното поле.

Фреквенцијата на зрачењето потребна за конверзија на спинот е директна функција од јачината на применетото магнетно поле. Кога водородното јадро ќе се изложи на дејството на магнетното поле, јадрата добиваат аголна фреквенција ω и изгледаат како детска играчка. Аголната фреквенција од јадрото ω се зголемува по јачина доколку се зголеми јачината на магнетното поле. За да може применетото зрачење да ја индуцира конверзијата на спинот во јадрото на водородот со спин $+1/2$ мора да има фреквенција што одговара само на аголната фреквенција ω . **Ова се**

нарекува резонантна состојба и конверзијата на спинот претставува резонантен процес.



Слика 7.2. NMR апсорпционен процес (Pavia et al., 2013)

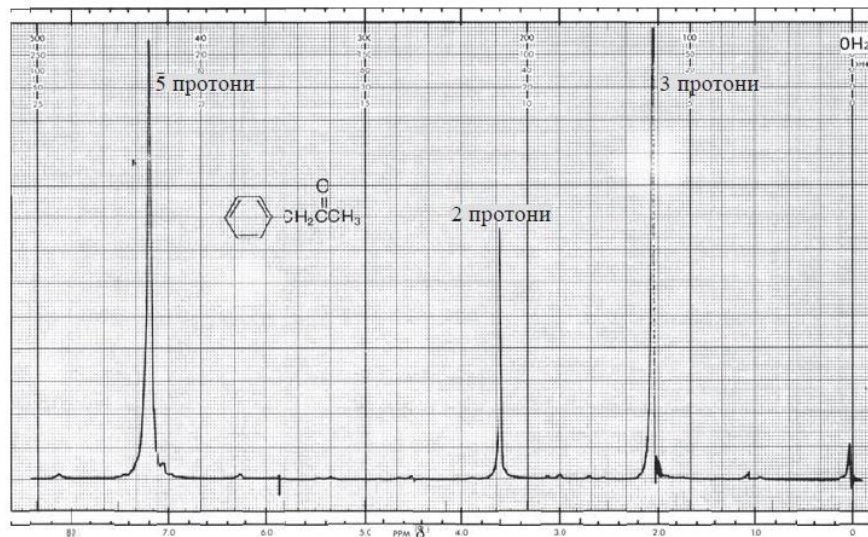
За просечен протон (водороден атом), доколку е применето магнетното поле од приближно 1,4 тесли, потребно е зрачење со фреквенција од 60 MHz за индуцирање на спински премин. Сепак, јачината на магнетното поле, што е потребна за да се индуцираат различните протони во молекулата, претставува осетлива функција од моменталната електронска околина на секој протон. Протонскиот нуклеарно-магнетен резонантен спектрометар поддржува основно радиофреквентно зрачење од 60 MHz на примерокот кој се снима и се зголемува јачината на приложеното магнетното поле преку опсег од неколку делови на милион од основната јачина на полето. Како што се зголемува полето, така различните протони учествуваат во резонанцата (апсорбираат енергија од 60 MHz) и се генерира резонантен сигнал за секој протон. NMR спектарот претставува дијаграм од јачината на магнетното поле во однос на интензитетот на апсорпцијата.

NMR епруветите кои се користат во најголем број експерименти се со просечна димензија од 0,5 cm до 18 cm и се произведени од униформна цевка со тенко стакло. Овие епрувети се лесно кршливи и скапи така што кога се работи со нив мора да се внимава за да не се скршат.

NMR епруветите се направени од многу тенко стакло и лесно се кршат. Никогаш не притискајте го капачето многу силно и внимавајте особено кога се отстранува капачето.

За да подготвите раствор прво мора да изберете соодветен растворувач. Растворувачот не треба да има NMR апсорпциони пикови, што значи дека не треба да содржи протони. Јаглерод тетрахлоридот (CCl_4) ги исполнува овие услови и може да се користи за некои инструменти. Понатаму, бидејќи NMR имаат потреба од деутериум за стабилизирање на полето, органските хемичари како растворувач најчесто го користат деутерираниот хлороформ (CDCl_3). Овој растворувач ги раствора најголемиот дел од органските соединенија и е релативно евтин. Него може да го користите кога работите со кој било инструмент. Не би требало да користите обичен хлороформ (CHCl_3), бидејќи тој содржи протон. Деутериумот ^2H не апсорбира во регионот на протон и затоа е „невидлив“ или не може да се детектира во протонскиот

¹HMR спектар. Користете деутериран хлороформ за да го растворите вашиот примерок доколку не ви биде посочено да користите друг растворувач како што е деутериран дериват на вода, ацетон или диметилсулфоксид. На сликата 7.3. е прикажан ¹HMR спектарот на фенилацетон.



Слика 7.3. ¹HMR спектар на фенилацетон (Pavia et al., 2013)

Како што може да се забележи од ¹HMR спектарот, возможно е да се прочита дека соединението има по 5, 2 и 3 еквивалентни протони. На кој начин се определува еквивалентноста, ќе продискутираме подетално во следните две поглавја од овој учебник за протонска ¹HMR спектроскопија и ¹HMR спектроскопија со јаглерод-13.

7.1. Нуклеарно-магнетна спектроскопија со водород (¹HMR)

Бидејќи атомското јадро на водородот има наелектризирање, движењето на јадрото предизвикува протекување на слаба струја. Кога овие јадра кои хаотично се движат ќе се постават во силно магнетно поле, тогаш нивните магнетни моменти се придвижуваат во однос на магнетното поле. За јадра кои имаат магнетен момент $I = \frac{1}{2}$ постојат две можни ориентации: паралелно со магнетното поле (при пониска енергија) и спротивно од полето (при повисока енергија). Бидејќи паралелната ориентација има пониска енергија, повеќе јадра ќе ја заземат оваа енергија отколку антипаралелна која е повисока.

Доколку ориентираните јадра се изложат на електромагнетно зрачење со точно определена фреквенција, тогаш јадрата со пониска енергија ќе апсорбираат квант на енергија и ќе преминат во ексцитирана состојба. **Во моментот кога јадрото преминува од една пониска енергетска состојба во друга повисока се вели дека јадрото е во резонанција, а бидејќи ова се случува под дејство на магнетно поле станува збор за магнетна резонанција.**

Нуклеарно-магнетната резонанција е апсорпција на зрачење од страна на јадрото во силно магнетно поле. Апсорпцијата на зрачење предизвикува спиновите на јадрата да се изедначат или брзо да преминат во повисока енергетска состојба. По престанувањето на зрачењето, тие ја испуштаат енергијата (ја реемитираат) и преминуваат во состојба со пониска енергија.

Количеството на електромагнетно зрачење зависи од надворешното магнетно поле и од елементот на кој му припаѓа јадрото. Јадрото на протон кога

ќе се постави во магнетно поле од 14.100 гауси, постигнува резонанција при зрачење од 60 MHz (микробраново зрачење).

- **Хемиско поместување** (*објаснување на првиот начин*)

Бидејќи магнетниот дипол на некое јадро е **константен**, тоа значи дека **сите јадра на ист елемент** при точно определена јачина на магнетно поле и применето зрачење **ќе имаат ист спински премин.**

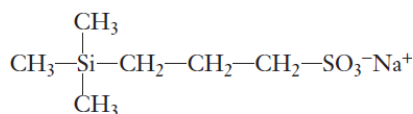
Но, кај органските молекули тоа не е така. Електроните што се наоѓаат околу јадрото имаат свое мало магнетно поле кое се спротивставува на применетото магнетно поле еднадвор и поради тоа го заштитуваат јадрото од влијание на надворешното магнетно поле. Според тоа, јадрата кои се опкружени со повеќе електрони, односно кои имаат поголема електронска густина, ќе имаат поголема заштита отколку оние со помала електронска густина. За да биде видливо јадрото со голема електронска густина треба да се примени посилено магнетно поле, односно она со помала електронска густина.

Разликите во јачината на полето на кое различните протони **во молекулата апсорбираат на 60 MHz се екстремно мали.** Различните апсорпциони позиции при дадена јачина на магнетното поле даваат разлики само од неколку делови на милион (ppm). Бидејќи е многу тешко да се измери прецизно јачината на полето на кое секој протон апсорбира помалку од милионити дел, техниката била развиена на тој начин што ќе може **директно да се измери разликата помеѓу две апсорпциони позиции.** За да се определи ова мерење, се користи стандардната референтна супстанција. На овој начин позициите од апсорпциите на сите други протони се измерени релативно, во однос на вредноста на референтната супстанција. Референтната супстанција која е општоприфатена е позната под името **тетраметилсилан** (CH₃)₄Si, или **TMC (TMS)**. Протонските резонанци на оваа молекула се појавуваат на поголема јачина на полето во споредба со резонанците на преостанатите молекули. Исто така, сите протони од TMC имаат резонанца на иста јачина на полето.

TMC (тетраметилсилан/TMS) мора да биде додаден во растворот од примерокот како внатрешен референтен стандард. Оваа супстанција има формула (CH₃)₄Si. Според универзалната конвенција, хемиското поместување на протоните од оваа супстанција се дефинирани како 0,00 ppm. Според тоа, спектарот треба да биде поместен на тој начин што TMC сигналот да се појави на оваа позиција на претходно искалибрирана хартија.

Концентрацијата на TMC во примерокот треба да варира од 1 % до 3 %. Некои аналитичари преферираат да се додадат 1 до 2 капки од TMC во примерокот пред снимањето на спектарот. Бидејќи TMC има 12 еквивалентни протони, нема потреба од додавање на поголемо количество на оваа супстанција. За додавање може да се користи Пастер-пипета или шприц. Многу полесно е доколку во лабораторијата има однапред подготвен раствор кој содржи TMC. Деутерираниот хлороформ или јаглерод тетрахлоридот често содржат TMC. Бидејќи TMC е многу испарлив (Т.В. 26,5 °C), растворот би требало да се чува добро затворен во фрижидер. Чистиот тетраметилсилан треба, исто така, да се чува во фрижидер (Pavia et al., 2013).

Тетраметилсиланот не се раствора во D₂O. За спектрите кои се снимени во D₂O мора да се користи различен внатрешен стандард како што е 2,2-диметил-2-силапентан-5-сулфонат. Овој стандард е растворлив во вода и дава резонантен пик на 0,00 ppm.

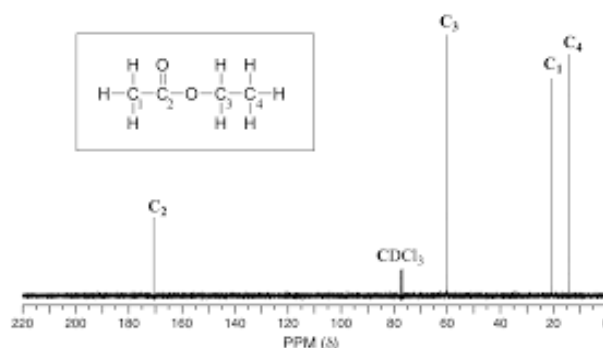


Натриум 2,2-диметил-2-силапентан-5-сулфонат (ДСС)

Хемиското поместување може да го објасниме и на втор начин.

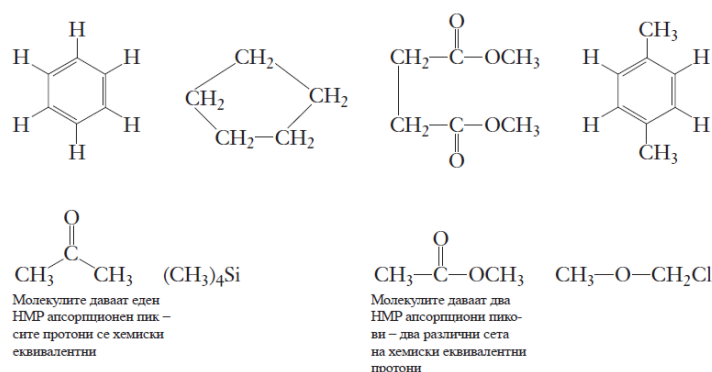
За да се определи позицијата на апсорпцијата на протонот, односно за да се изврши квантитативното мерење, дефиниран е параметар наречен **хемиско поместување (δ)**. Една δ единица одговара на промена на јачината на магнетното поле од 1 ppm. За да се определи вредноста на хемиското поместување за различни протони во молекулата, операторот го определува НМР спектарот на молекулата со мало количество од ТМС додадено директно во примерокот. Ова значи дека двата спектри се определени симултано. ТМС апсорпцијата е прилагодена да одговара на нулта позиција ($\delta = 0$ ppm) на графиконот, која е калибрирана во δ единици, додека δ единиците од апсорпционите пикови за сите други протони може да бидат прочитани директно од графиконот. Скалата во протонска НМР спектроскопија изнесува од 0-12 ppm.

Резултатот е поместување на НМР сигналот на некое јадро во однос на референтен сигнал и ова придвижување се вика хемиско поместување.



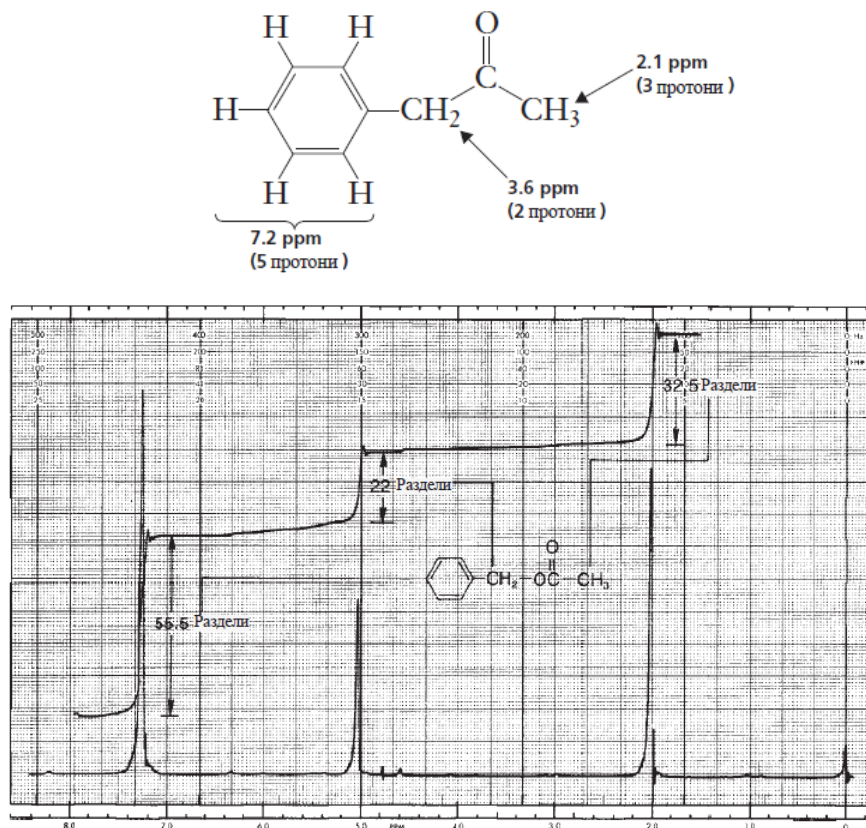
Слика 7.4. Определување на еквивалентни водородни атоми во протонски НМР спектар (Pavia et al., 2013)

Сите протони во молекулата кои имаат хемиски идентични околии често пројавуваат исто хемиско поместување. Така, сите протони во ТМС или сите протони во бензенот, циклопентанот или ацетонот имаат соодветни резонантни вредности на иста δ вредност. Секое соединение дава единечен апсорпционен пик во неговиот НМР спектар. Протоните се **хемиски еквиваленти**. Од друга страна, молекулите кои имаат сетови од протони што се хемиски оддалечени еден од друг даваат апсорпционен пик од секој сет (Kolegate, 2008).



Слика 7.5. Хемиски структури на молекули кои даваат еден или два НМР апсорпциони пикови (Pavia et al., 2013)

НМР спектарот што е даден на сликата 7.6. е спектар на фенилацетон, соединение кое има три различни сета на хемиски еквивалентни протони:



Слика 7.6. Определување на односот на интегралите во бензил ацетат (Pavia et al., 2013)

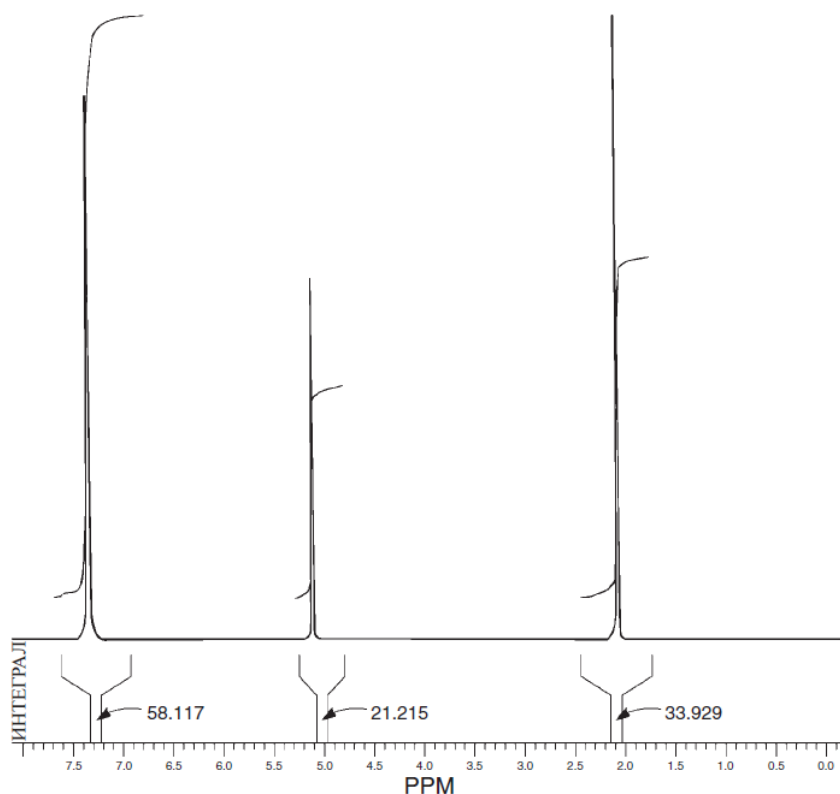
Може веднаш да забележите дека НМР спектарот дава значајни информации. Всушност, преку НМР спектарот не само што може да се разграничи **колку типови на протони содржи молекулата** туку може и да се распознае **колкав број од протоните од секој тип се содржат во дадената молекула**.

Во НМР спектарот површината под секој пик е пропорционална со бројот на водородите кои го генерираат пикот. Така, кај фенилацетонот односот на површините на трите пика изнесува 5 : 2 : 3, исто како односот на бројот на секој тип од водородот. НМР спектрофотометарот може електронски да ја „интегрира“ површината под секој пик. Тоа се постигнува со повлекување на вертикална линија при што висината на линијата е пропорционална на површината под пикот. Во НМР спектарот на бензил ацетатот секој од пиковите е интегриран на овој начин.

Важно е да се забележи дека висината на интегралната линија **не го дава апсолутниот број на протоните**. Всушност, таа ги дава **релативните броеви на секој тип на водород**. За да може кој било интеграл да биде од полза, мора да постои втор интеграл во однос на кој се пресметува првиот. Бензил ацетатот е добар пример за ова. Првиот интеграл се зголемува за 55,5 раздели на хартијата за исцртување на графикони, вториот за 22,0 и третиот за 32,5 раздели. Овие броеви се релативни и ги даваат односите со делење на секој од поголемите броеви на најмал број:

$$\frac{55.5 \text{ div}}{22.0 \text{ div}} = 2.52 \quad \frac{22.0 \text{ div}}{22.0 \text{ div}} = 1.00 \quad \frac{32.5 \text{ div}}{22.0 \text{ div}} = 1.48$$

Така, односот на бројот од протоните за секој тип е 2,52 : 1,00 : 1,48. Доколку земете предвид дека пикот на 5,1 ppm е формиран од двата водорода и дека интегралите се со мала грешка (грешката може да биде околу 10 %), тогаш можете да ги пресметате вистинските односи со множење на секоја слика со 2 и со пресметување добиваме 5 : 2 : 3. Јасно е дека пикот на 7,3 ppm кој се интегрира со 5 ја зголемува резонанцата на протоните од ароматичниот прстен, и дека пикот на 2,0 ppm кој се интегрира за 3 е предизвикан од метил протоните. Резонанцата од двата протона на 5,1 ppm се зголемува од бензил протоните. Обрнете внимание на тоа дека интегралите даваат наједноставни, но не секогаш автентични односи на бројот на протоните од секој тип.

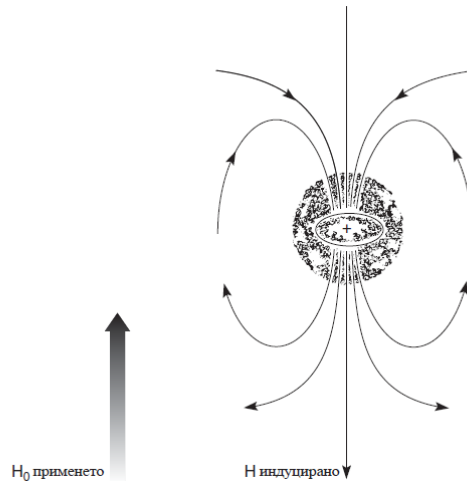


Слика 7.7. Интегриран спектар на бензил ацетат определен на 300 MHz со ФТ-НМР (FT-NMR) (Pavia et al., 2013)

Покрај ова, со зголемувањето на интегралната линија модерните инструменти најчесто даваат дигитализирани нумерички вредности за интегралите. Исто како висините на интегралните линии, овие дигитализирани интегрални вредности не се апсолутни туку релативни и тие ќе бидат објаснети во следниот параграф. Овие дигитални вредности, исто така, не се прецизни како интегралните линии и кај нив постои можност за мали грешки (до 10 %). Сликата 7.7. е пример за интегриран спектар од бензил ацетат определен на 300 MHz со пулсирачки ФТ-НМР инструмент. Дигитализираните вредности на интегралите се појавуваат под пиковите.

Електронегативните супституенти сврзани за јаглеродниот атом, поради нивните електронско-одбивни сили, ја намалуваат густината на валентните електрони околу протонот поврзан за овој јаглерод. Овие електрони го *затсクリваат* протонот од применетото магнетно поле. Овој ефект наречен **локално дијамагнетно**

затскривање се случува затоа што применетото магнетно поле индуцира кружно движење на валентните електрони. Ова кружно движење генерира индуцирано магнетно поле кое се *противставува* на применетото поле. Ова е прикажано на сликата 10.8. Електронегативните супституенти од јаглеродот го намалуваат локалното дијамагнетно затскривање во близината на врзаните протони поради тоа што тие ја намалуваат електронската густина околу овие протони. За супституентите кои го предизвикуваат овој ефект се вели дека го *откриваат* протонот. Колку што е поголема електронегативноста на супституентот, толку е помало затскривањето на протонот и, последователно, толку е поголемо хемиското поместување на овие протони.



Слика 7.8. Локално дијамагнетно затскривање на протон поради неговите валентни електрони (Pavia et al., 2013)

7.2. Нуклеарно-магнетна спектроскопија со јаглерод-13 (^{13}C NMR)

Јаглерод-12, најзастапениот изотоп на јаглеродот, нема спин ($I=0$), но има атомски број и атомска маса. Вториот главен изотоп на јаглеродот, секако, е ^{13}C (јаглерод-13) кој има спин ($I=1/2$). Атомските резонанци на ^{13}C не се забележуваат лесно поради комбинацијата од два фактора. Прво, застапеноста на ^{13}C во природата е незначителна, бидејќи само 1,08 % од сите јаглеродни атоми се ^{13}C . Второ, магнетниот момент μ на ^{13}C е мал. Заради овие причини, резонанците на ^{13}C се околу 6.000 пати послаби отколку оние на водородот. Со специјални Фуриер трансформ (ФТ) инструментални техники, за кои тука не се дискутира подетално, можно е да се набљудува нуклеарно-магнетниот резонантен спектар со ^{13}C (јаглерод-13) на примероци кои содржат само природно застапен ^{13}C .

Најчесто ползуван параметар добиен од спектарот со јаглерод-13 е хемиското поместување. Интегралите се несигурни и не се неопходно поврзани со релативните броеви на атомите од ^{13}C што се присутни во примерокот. Водородите кои се врзани за атомите на ^{13}C предизвикуваат спин-спин разделување, но спин-спин интеракцијата помеѓу соседните јаглеродни атоми е ретка. Поради незначителната застапеност на јаглерод-13 во природата (0,0108), веројатноста од наоѓање на два соседни атоми на ^{13}C е сосема мала.

Спектарот со јаглерод може да се користи за да се определи бројот на нееквивалентните јаглериоди и да се идентификува типот на јаглеродните атоми (метил, метилен, ароматични, карбонилни итн.) кои може да бидат присутни во соединението. Така, NMR спектарот со јаглерод дава директна информација за јаглеродниот скелет во молекулата. Поради ниската природна застапеност на јаглерод-13 во примерокот, често е неопходно да се извршат повеќе скенирања, а тоа е потребно и за протонската NMR.

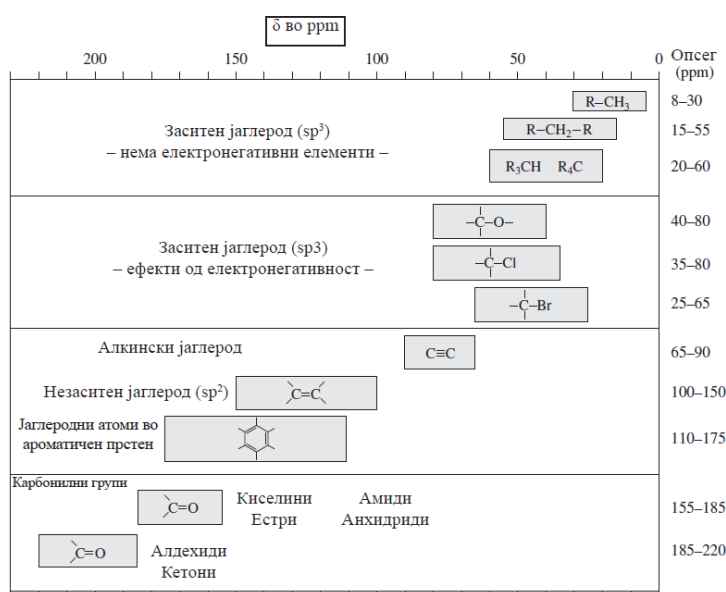
За дадена јачина на магнетното поле, резонантната фреквенција на јадрата од ^{13}C изнесува околу една четвртина од фреквенцијата потребна за разгледување на протонските резонанци. На пример, при применето магнетно поле од 7,05 тесла, протоните се забележливи на 300 MHz, а јадрата на ^{13}C се забележуваат на околу 75 MHz.

Важен параметар добиен од спектрите со јаглерод-13 е хемиското поместување. Корелациониот дијаграм на сликата 10.9. прикажува типични хемиски поместувања наведени за ^{13}C во делови од милион (ppm) од TMS. Во овој случај јаглеродните атоми од метил групите на TMS (не и водородите) се користат како референтни. Обрнете внимание на тоа дека хемиските поместувања се појавуваат во опсег од (0-220 ppm) и се многу поголеми отколку оние што се забележливи од протоните (0-12 ppm). Поради многу широкиот опсег од вредности, речиси секој нееквивалентен јаглероден атом во органската молекула дава зголемување на пикот со различно хемиско поместување. Пиковите ретко се препокриваат за разлика од протонската NMR.

Корелациониот дијаграм е поделен на четири раздели. Заситените јаглеродни атоми се појавуваат во највисокото поле, најблиску до TMS (8-60 ppm). Следното подрачје од дијаграмот го покажува ефектот на електронегативните атоми (40-80 ppm). Третото подрачје вклучува јаглеродни атоми од алкени и ароматични прстени (100-175 ppm). И конечно, четвртото подрачје содржи карбонилни јаглериоди кои се појавуваат во најниското поле со вредности (155-220 ppm).

Електронегативноста, хибридизацијата и анизотропијата имаат влијание врз хемиските поместувања на ^{13}C на речиси ист начин како што тие влијаат врз хемиското поместување на ^1H . На тој начин хемиските поместувања на ^{13}C се околу 20 пати поголеми. Електронегативноста дава ист разделувачки ефект во јаглеродната NMR како и во протонската NMR – електронегативниот елемент предизвикува

поместување кон пониските полиња. Поместувањето е поголемо за атомот на ^{13}C отколку за протонот, бидејќи електронегативниот атом е директно поврзан со ^{13}C и ефектот се случува само низ единечната врска $\text{C}-\text{X}$. Електронегативните атоми се поврзани со протоните за јаглеродот, а не за водородот. Ефектот е посилен доколку тоа се случува низ двете врски $\text{H}-\text{C}-\text{X}$ отколку низ една.



Слика 7.9. Корелационен дијаграм за хемиски поместувања на НМР со јаглерод-13 (^{13}C) (Pavia et al., 2013)

Аналогно на поместувањата на ^1H , промените во хибридизацијата, исто така, даваат поголеми поместувања на јаглерод-13 кој е директно инволвиран (нема врски) во однос на поместувањата на водородните атоми сврзани за јаглерод (една врска). Во нуклеарно-магнетната резонанца (НМР) со јаглерод-13 (^{13}C), јаглеродните атоми од карбонилните групи имаат најголеми хемиски поместувања поради sp^2 хибридизацијата и поради фактот дека електронегативниот кислород е директно поврзан со карбонилниот јаглерод, па дури малку и го открива. Анизотропијата е причина за големите хемиски поместувања на јаглеродните атоми во ароматичните прстени и во алкените.

Обрнете внимание на тоа дека опсегот на хемиските поместувања е поголем за јаглеродните атоми отколку за водородните атоми. Бидејќи факторите кои влијаат врз јаглеродните поместувања се случуваат низ една врска или директно на јаглеродот, тие се поголеми во однос на оние од водородот што се случуваат низ повеќе врски. Како резултат на тоа, целиот опсег на хемиските поместувања станува поголем за ^{13}C (0–220 ppm) отколку за ^1H (0–12 ppm).

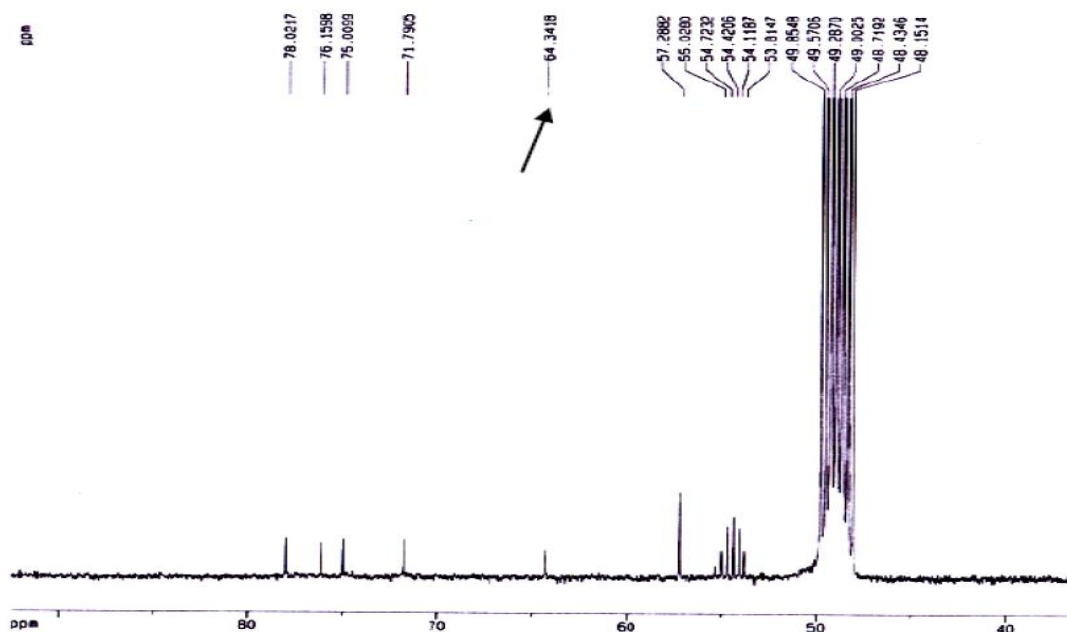
Најголемиот број од функционалните групи во органската хемија, меѓу другото, содржат и карбонилна група. При определувањето на структурата на соединението коешто содржи карбонилна група, најчесто е полезно да се има каква било претстава за типот на карбонилната група во непознатата супстанција. На сликата 10.10. е прикажан типичниот опсег на хемиските поместувања на ^{13}C за некои функционални групи што содржат карбонил. Иако постои препокривање во опсегот, сепак кетоните и

алдехидите се лесни за раздвојување од другите карбонилни соединенија. Податоците за хемиското поместување на карбонилните јаглеродни атоми се повалидни кога тие се комбинираат со податоците од инфрацрвениот спектар.



7.10. Корелационен дијаграм на ^{13}C за карбонилни и нитрилни функционални групи (Pavia et al., 2013)

Изолираниот пигмент од грозјето малвидин-3-*p*-кумароил гликозид со противструјна хроматографија (во поглавјето 3.5. од овој учебник) има специфично хемиско поместување на 64,34 ppm.

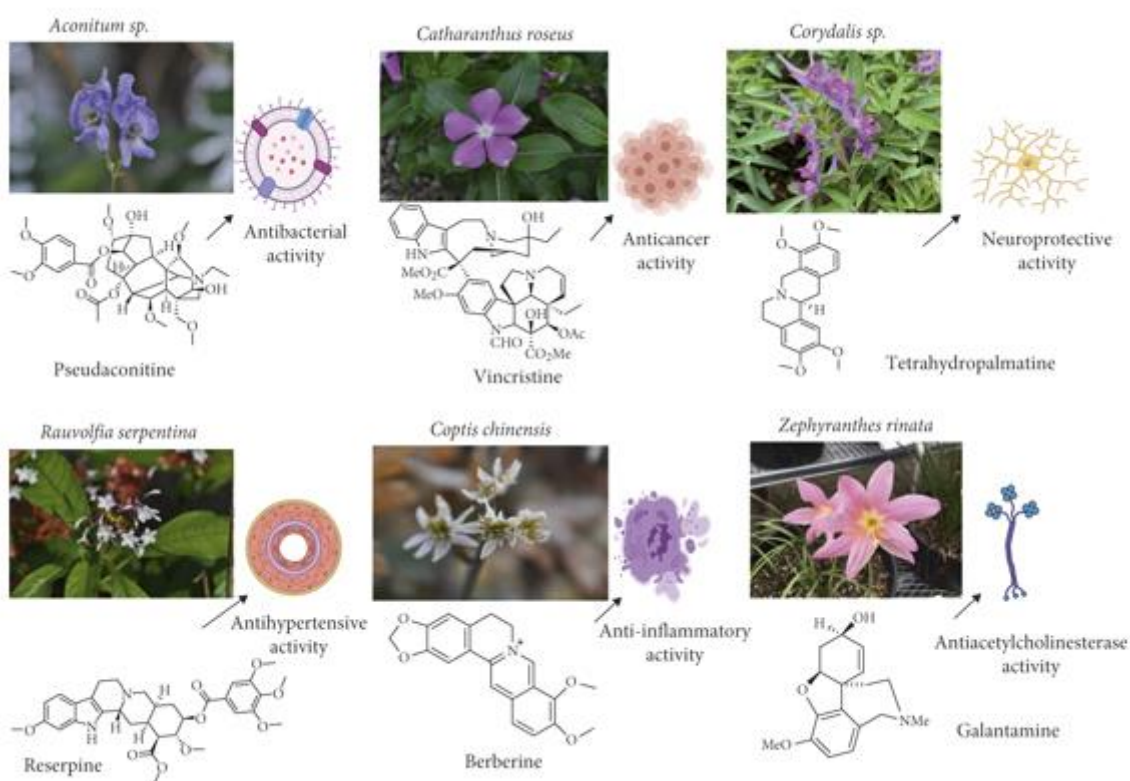


7.11. NMR спектар на малвидин-3-*p*-кумароил гликозид со јаглерод-13 (^{13}C) (Kostadinović Veličkovska, 2012)

8. Изолација на алкалоиди – фармаколошки најзначајни природни продукти

Во претходните поглавја од овој учебник се запознавме со речиси сите поважни техники за изолација на природни продукти и за секоја поединечна техника наведовме пример за изолација. Во последното (единаесетто) поглавје од овој учебник ќе ги сумираме сите досега објаснети техники за изолација на најважните фармаколошки активни компоненти – **алкалоидите**.

Да се потсетиме дека алкалоидите се органски соединенија на азотот, најчесто со хетероциклична структура. Во дрогите главно се врзуваат со кислородот во облик на соли. Такви се аналгетици, анестетици, спазмолитици, седативи, хипнотици, наркотици и цитостатици.

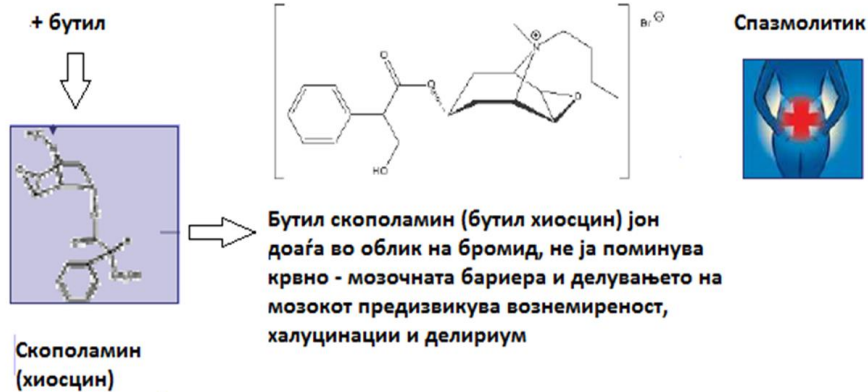


Слика 8.1. Хемиски структури на најзначајните алкалоиди
(static.hindawi.com/articles/ecam/volume-2022/7299778/figures/7299778.fig.007.jpg)

Од пракса:

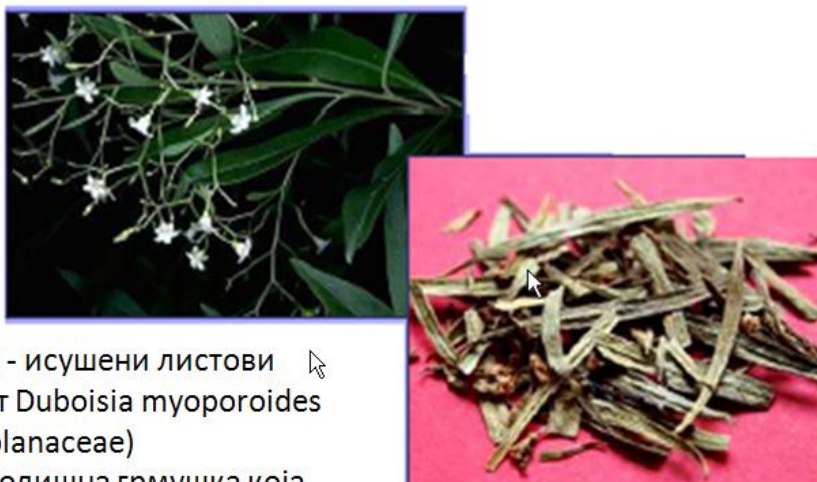


една дражеа содржи 10mg хиосцин бутилбромид
(полусинтетски дериват на скополаминот)



Слика 8.2. Најчесто употребувани лекаства (алкалоиди) (Gjorgjeska and Kostadinović Veličkovska, 2017)

На сликата 8.2. е прикажан скополамин. Активната компонента се добива од автохтон австралиски вид познат како Corkwood tree или Duboisia. Во првата половина на 20 век Берингер Ингелхајм (Boehringer Ingelheim) започнал со истражување и развој на лековите кои во 1951 година за првпат се лансирани на пазарот. Денеска широко се применуваат, а се започнува од искуствата на Аборицините кои ги користеле растенијата за намалување на болката во stomакот. За потребите на фармацевтската индустрија се одгледуваат во Австралија и во Бразил.



Duboisia - исушени листови од видот *Duboisia myoporoides* R. Br. (Solanaceae)
Повеќегодишна грмушка која расте по должината на источниот брег на Австралија

Уделот на алкалоидите може да биде поголем од 3 %
Херба: доминира скополаминот
Листови: основен алкалоид хиосциамин
Дрогата содржи и други тропански алкалоиди

Слика 8.3. Растителен материјал за изолација на скополамин (Roig Celma et al., 2001)

Методите за изолација на алкалоидите вклучуваат: *екстракција со вода* или со разредени киселини, *екстракција со органски растворувач* кој се меша со вода со додавање на бази, *екстракција со растворувач кој се меша со вода* (на пример етанол или метанол), *екстракција со помош на јонски изменувачи*, *екстракција со електролиза* и *екстракција со адсорбенс*.

Екстракцијата со вода или со разредени киселини е едноставен и евтин метод. Овој метод не е соодветен за дроги кои бабрат и алкалоидите се екстрахираат најчесто во облик на соли. При екстракцијата со органски растворувач со додавање на бази се овозможува формирање на солите. Потоа, со органските растворувачи се екстрахираат слободните алкалоиди и доколку се користат фино измелени дроги нема проблеми со бабрење. Екстракцијата со растворувач кој се меша со вода (на пример етанол или метанол) претставува соодветен метод за дроги *кои бабрат* при што алкохолниот екстракт се отпарува, сувиот екстракт се обработува со киселина и се прочистува со органски растворувач. Од добиените соли алкалоидите се ослободуваат со додавање на бази и со екстрахирање со органски растворувач. Може да се прочистуваат со повторување на постапката со повторно преобразување во сол и потоа пак да се добијат во слободни форми. Изолацијата со помош на јонски изменувачи е економична и едноставна постапка, погодна за примена и во индустријата. Алкалоидите најпрвин се екстрахираат со разредени киселини и сировиот екстракт се наносува на јонски изменувач, а потоа се врзуваат за катјонскиот изменувач и се елуираат со бази. Изолацијата со адсорбенси е скапа постапка и се користи за алкалоиди кои тешко се изолираат со други постапки. Изолацијата со електролиза е постапка што нема широка примена во праксата. Водените екстракти на алкалоидите се изложуваат на дејство од еднонасочна струја и алкалоидите патуваат кон катодата.

8.1. Вообичаена процедура за изолација на алкалоиди

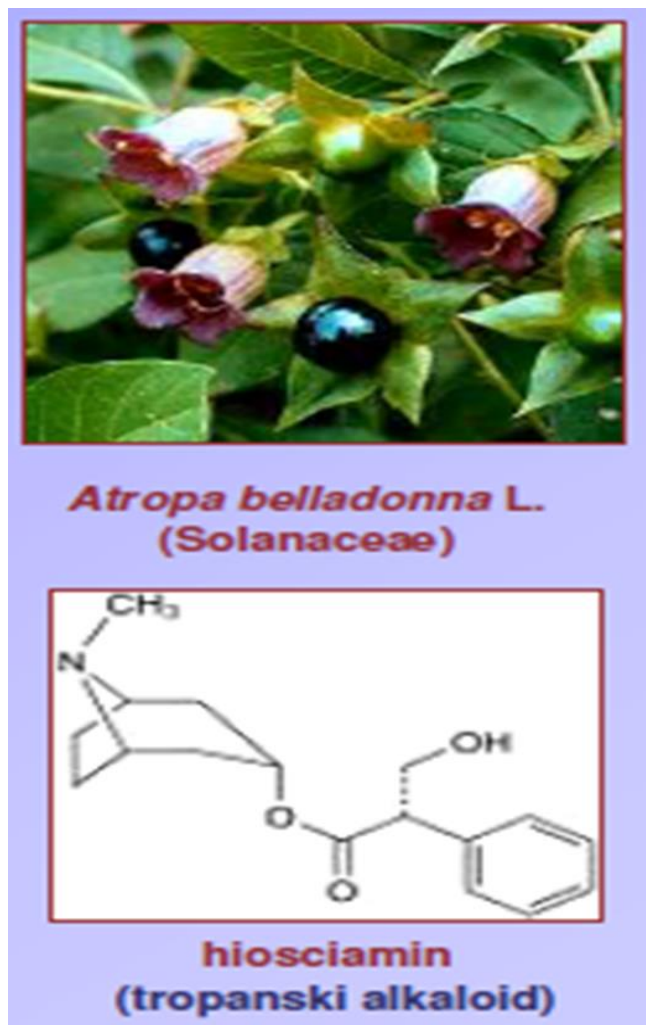
Процедурата започнува кога пулверизираната дрога се натопува со вода и се меша со калциум хидроксид (амониум хидроксид или натриум карбонат) за да се овозможи алкалоидите од форма на соли да се преобразат во слободна форма (истовремено калциум хидроксидот реагира со органските киселини, со танините и со други баласни материји). Алкалоидите во слободна форма се одделуваат од смесата со екстракција со органски растворувач, потоа екстрактот се прочистува со мешање со разредена киселина и алкалоидите во форма на соли поминуваат во поларниот медиум. Дополнително прочистување се постигнува со додавање на бази во водениот раствор со што се ослободуваат соли на алкалоидите кои понатаму може повторно да бидат екстрахирани. Алкалоидите остануваат во сувиот остаток после отстранувањето на органскиот растворувач (хлороформ, етер, етил ацетат, толуен, бензен или петрол етер). Следниот чекор подразбира одделување на поединечните компоненти добиени од смесата на алкалоиди (сложен процес поради тоа што многу често смесите се многу комплексни) со хроматографски методи или со кристализација на слободните алкалоиди или алкалоиди во облик на соли.

Секако, кај ова правило постојат и исклучоци! На пример, алкалоидите со азотот, фенолните алкалоиди и алкалоидните N-оксиди не може да бидат изолирани со стандардна процедура. Кога дрогата се алкализира, фенолните алкалоиди се во облик на фенолати и не може да се екстрахираат со органски растворувач. pH на медиумот мора додатно да се прилагоди, односно да се намали до вредност на која алкалоидите може да се ослободат. Алкалоидните N-оксиди се поларни и многу е тешко да се екстрахираат со органски растворувачи (на пример, не може да се екстрахираат со етер, но може со поларен хлороформ).

Индустриските простапки принципиелно не се разликуваат од лабораториските. Алкализираната дрога се екстрахира со органски растворувач кој повторно се користи во истиот процес за екстракција на нова количина дрога (што е економски и еколошки исплатливо).

8.1.1. Изолација на хиосцијамин од *Belladonnae radix*

Дрогата се екстрахира со метанол околу 6 часа во Соклетова (Soxhlet) апаратура. Од концентрираниот екстракт алкалоидите се префрлаат во разблажена сулфурна киселина со благо загревање. Липосолубилните баласни материи се отстрануваат со мешање со органски растворувач (хлороформ – петролетер 10:1 v/v).



Слика 8.4. Растителен материјал за изолација на хиосцијамин
(sadnja.com/lekovito-bilje/velebilje-biljka-atropa-belladonna-prepoznavanje-upotreba-uzgoj)

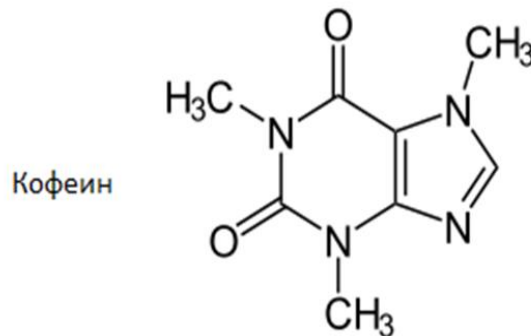
Со алкализирање на растворот со алкалоиди кои се во облик на соли со 10 % амониум хидроксид (pH 8,5) алкалоидите се преведуваат во слободен облик и потоа се екстрахираат со хлороформ. Хлороформскиот раствор се прочистува со активен јаглен, а водата се отстранува со безводен натриум сулфат. По отстранувањето на хлороформот се формираат кристали. Прекристализацијата се спроведува со етер. Дел од хиосцијаминот во смесата лесно рацемизира.

8.1.2. Изолација на кофеин од *Thea folium*

Дрогата се екстрахира со вода со загревање во траење од 15 минути. Примесите се отстрануваат со таложење со 10 % олово ацетат и адсорпција на активен јаглен. Водениот раствор на алкалоидите се алкализира со 10 % амониум хидроксид (pH 8,5) при што алкалоидите се преведуваат во слободен облик и се екстрахираат со хлороформ. По отстранувањето на хлороформот, кофеинот кристализира. Прекристализацијата се спроведува со етанол.



Camellia sinensis (L.)
(Theaceae)

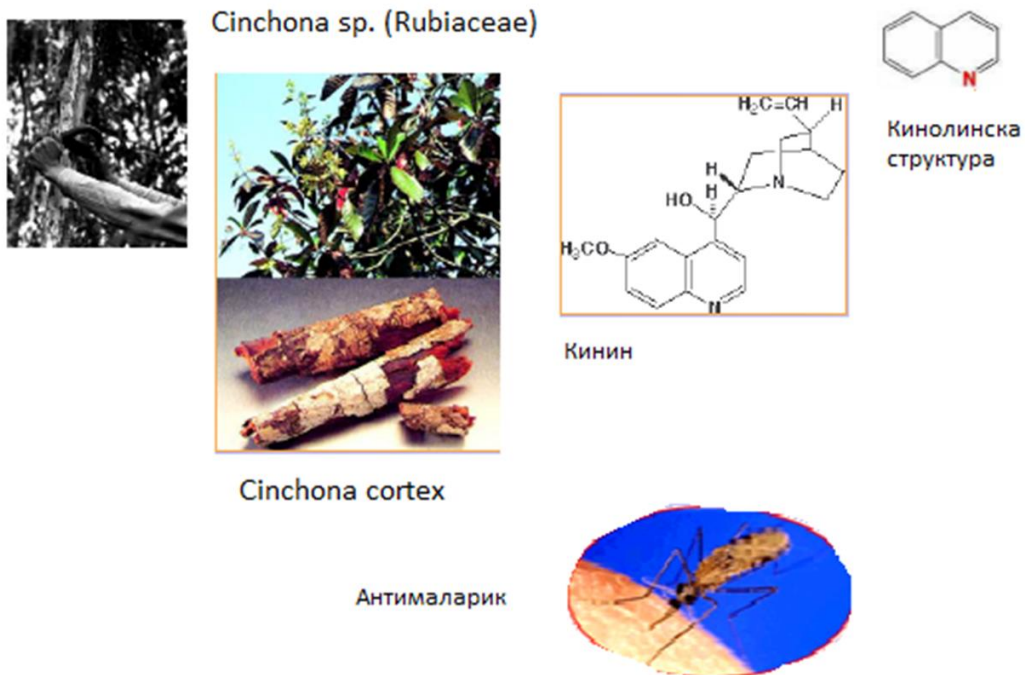


Пурински дериват, нема алкални својства, се вбројуваат во групата на алкалоиди поради присутниот азот во хетероцикличната структура и фармаколошкото дејство

Слика 8.5. Изолација на кофеин од листови чај (Gjorgjeska and Kostadinović Veličkovska, 2017)

8.1.3. Изолација на хинин од *Cinchonae Cortex*

На сликата 8.6. е прикажан растителен материјал и постапка за изолација на хинин. Од пулверизираната дрога алкалоидите се преобразуваат во слободна форма со дејствување на бази, а потоа се екстрахираат со толуен. Со додавање на разредена сулфурна киселина алкалоидите се преобразуваат во соли (хидрогенсулфати лесно растворливи во вода). Со покачување на рН до 6, кинин хидрогенсулфатите од киселиот раствор може да се преобразат во тешко растворлив кинин моносулфат кој се таложи (дополнителна количина на кинин може да се добие од матичното таложење со винска киселина, при што се создаваат тешко растворливи тартарати од кои може да се добие сулфат). По прочистувањето и алкализирањето, се добива слободен кинин кој се кристализира како трихидрат. Се суши и се прекристализира со вода и со етанол.



Слика 8.6. Изолација на кинин од *Cinchona cortex* (Gjorgjeska and Kostadinović Veličkovska, 2017)

Cinchonae cortex
(100g пувис)

Пулверизираната дрога се меша со 25g CaOH и се обликува гранулатна маса со додавање на 150ml 5% NaOH

Алкализирана дрога

Смесата се суши 4-5 часа на водена бања со често мешање, а потоа се разрибува.
Следи варење три саати до 500ml толуен на водено купатило со повратно ладило, се лади и остатокот се измива со 200ml врел толуен

Толуенски екстракт
слободни алкалоиди

Се редуцира волуменот на растворувачот (околу 150ml), се додава разредена сулфурна киселина и се врши мешање со три порции од 25ml вода



Воден раствор на
алкалоиди во облик на соли

Водениот раствор се меша еднократно со 50ml етер. Во водената фаза се додава активен јаглен, се загрева до вриење на магнетна мешалка и се филтрира.
Филтратот повторно се загрева, капка по капка со постојано мешање се додава 10% NaOH до pH 6, со ладење се таложи тешко растворливиот кинин сулфат

Кинин - моносулфат

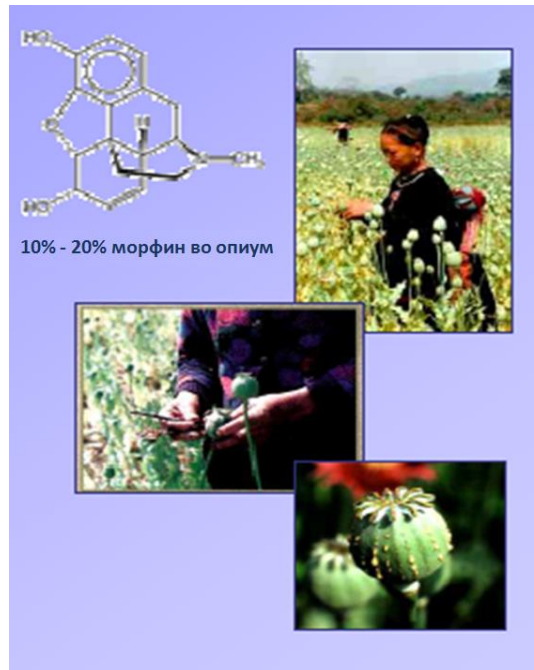
Се раствора во 50ml вода и се загрева до вриење, се додава 6M раствор на амониум хидроксид сè додека да прекине таложењето, се отстранува вишокот на хидроксидот со варење и се остава да се олади.
После неколку дена исталожениот кинин како трихидрат, се испира со вода, се остава да се исуши и се прекристализира со вода и етанол

Кинин

Слика 8.7. Растителен материјал и постапка за изолација на кинин (Gjorgjeska and Kostadinović Veličkovska, 2017)

8.1.4. Изолација на морфин од опиум

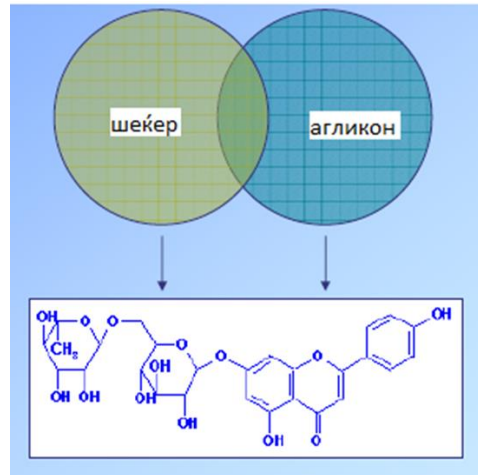
Екстракцијата на алкалоидите во облик на соли се врши со вода на температура од 50 °C. Водениот екстракт содржи морфин, кодеин, тебаин и мала количина на папаверин. Со додавање на заситен раствор од натриум карбонат се исталожуваат алкалоидите во слободен облик. Талогот се обработува со 96 % етанол во кој освен морфинот се раствораат и другите алкалоиди. Талогот се обработува со разредена оцетна киселина, морфинот се преобразува во растворлива сол во водено киселиот раствор. Со додавање на амониумова база (амониум хидроксид), морфинот се преведува во слободен облик, се исталожува и се прочистува.



Слика 8.8. Изолација на морфин од опиум (Gjorgjeska and Kostadinović Veličkovska, 2017)

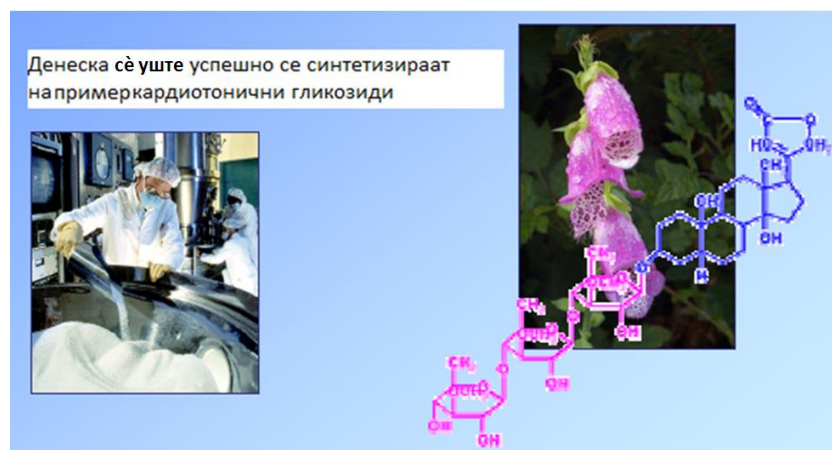
8.1.5. Изолација на гликозиди

Под терминот *гликозиди* се подразбираат молекули кои имаат шеќерна компонента врзана за агликонски дел. Имаат поларен карактер и претставуваат многу хетерогена група на соединенија во која спаѓаат фенолни гликозиди, флавоноидни гликозиди, сапонини, кардиотонични гликозиди, антацентски гликозиди и цијаногени гликозиди.



Слика 8.9. Хемиска структура на гликозиди (Gjorgjeska and Kostadinović Veličkovska, 2017)

Денес може да бидат синтетизирани многу природни гликозиди. Сепак, најчесто се добиваат со изолација од растителни дроги. Синтезата може да биде долготрајна и сложена, со слаба искористеност на растителните дроги.

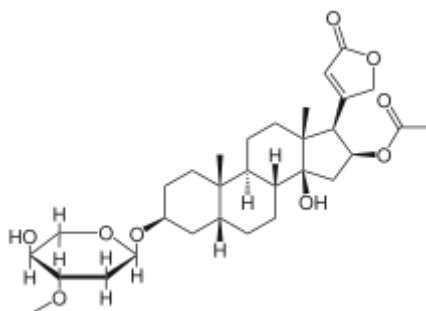


Слика 8.10. Хемиска структура на кардиотоничен гликозид (Gjorgjeska and Kostadinović Veličkovska, 2017)

Методите за изолација на гликозидите се многу различни поради нивната хетерогена структура. Процесите на изолација главно вклучуваат инхибиција на ензимите кои може да ги разградат биоактивните компоненти како, на пример, влијанието на загреан растворувач (алкохол, вода, водена пареа, алкохолни пареи или ацетон) или, пак, додаток на некои соли. **Екстракцијата на гликозиди најчесто се врши со 70 % етанол.** Потоа се врши отстранување на растворувачот и концентрирање на екстрактот. Понатамошните постапки зависат од својствата на гликозидите кои сакаме да ги изолираме: *физички* или *хемиски*. Постапките зависни од *физичките* својства се темелат на адсорпцијата или примената на селективни растворувачи, додека постапките зависни од *хемиските* својства вклучуваат отстранување на придружните компоненти или врзување на гликозидите во форми кои може лесно да се екстрахираат. Доколку гликозидите се слабо растворливи во вода, алкохолниот екстракт се става во поголемо количество студена вода па доаѓа до таложење. Доколку, пак, гликозидите се слабо растворливи во студен алкохол, екстрактот се раствора во врел алкохол и се остава на ладно за да се поттикне кристализацијата. Со ферментација се разградуваат шеќерите кои може да кристализираат со гликозидите, додека танините се отстрануваат со таложење со оловни соли.

- Изолација на кардиотонични гликозиди

Кај кардиотоничните гликозиди агликонската компонента претставува стероидна структура со 23 или 24 јаглеродни атоми, во положба C-17 врзан за петочлен или шесточлен лактонски прстен, додека шеќерната компонента главно е моносахарид врзан преку хидроксилна група во положба C-3.

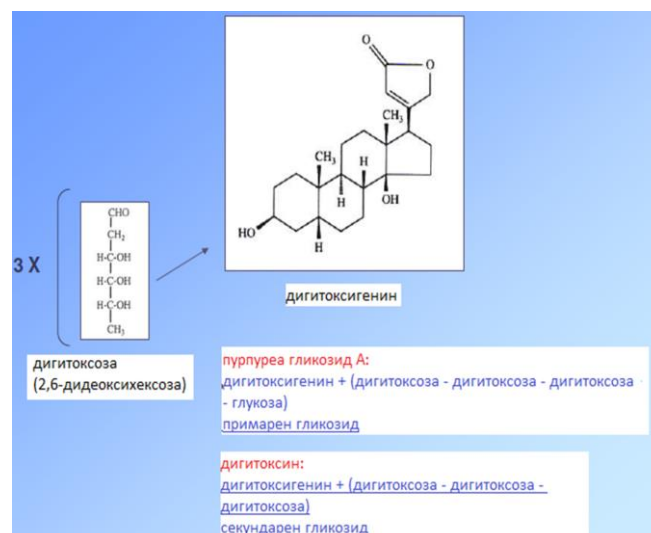


Слика 8.11. Хемиска структура на кардиотоничен гликозид (Gjorgjeska and Kostadinović Veličkovska, 2017)

Кардиотоничните гликозиди наоѓаат примена во терапијата на конгестивна срцева слабост и суправентрикуларна аритмија. Околу 30 кардиотонични гликозиди со удел од 0,3 % според агликонскиот дел се поделени во три групи и тоа: *дигитоксинска*, *гитоксигенинска* и *гиталоксигенинска*.



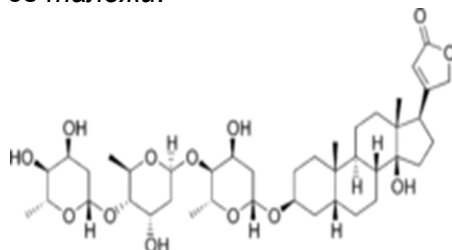
Слика 8.12. Црвен напрсток (*Digitalis purpurea* L.) (Gjorgjeska and Kostadinović Veličkovska, 2017)



Слика 8.13. Растителен материјал за изолација на дигитоксигенин (Gjorgjeska and Kostadinović Veličkovska, 2017)

Изолација на природни продукти

Основните чекори во изолација на дигитоксигенин се следните: *екстракција* (перколација; етанол - вода), *прочистување* (отстранување на баласните материји), *концентрирање* на екстрактот и *одделување на дигитоксинот* од смеса (екстракција со органски растворувач). Откако ќе се прочисти екстрактот се *концентрира* и на крај растворот на дигитоксинот се *таложува*.



Digitalis purpureae folium



Дрогата се навлажнува со смеса од етанол и вода (6:4 V/V), се внесува во перколатор и се перколира по 24 часовна мацерација

Суров алкохолно-воден екстракт



Со додавање на олово ацетат се исталожуваат баласните материји, а неговиот вишок се отстранува со заситен раствор на натриум хлорид и се филтрира.

Поради отстранување на заостанатото олово, во филтратот се воведува сулфурводород сè додека прекине создавањето на талог од олово сулфид и се филтрира.

Волуменот на филтратот се редуцира со испарување во ротациски вакуум испарувач (ротавапор) на **40°C**

Прочистен алкохолно-воден екстракт



Течниот екстракт се заситува со натриум хлорид за да се олесни екстракцијата со хлороформ - амилетер смеса во однос 2:3

Дигитоксин во органски растворувач



За да се отстранат трагите од гиталин (смеса од други кардиотонични гликозиди, фракција растворлива во вода), органската фаза се меша со раствор на натриум карбонат





Присутната вода во органската фаза се отстранува со додавање на безводен натриум сулфат; се филтрира; растворувачот се редуцира до мал волумен во ротавапор на 75-85 °C.

Во концентрираниот раствор се додава 4 пати поголем волумен на петролетер и се остава еден саат на собна температура; се филтрира и се **плакне** со петролетер (за да се отстранат лиофилните онечистувања)

Обоен аморфен талог **дигитоксин**

Талогот се **раствора** во смеса од етанол и вода (1:1), а нерастворениот дел се отстранува со филтрирање

Филтратот благо се алкализира со амониум **хидроксид** и со мешање се додава цврст олово ацетат; светлокафеастиот талог се центрифугира и се испира со разреден алкохол

Вишокот на олово ацетат се отстранува со воведување на сулфурводород во растворот се додека да прекине создавањето на олово сулфид, а потоа се филтрира. Волуменот се редуцира во ротавапор на **40°C**

Прочистен алкохолно-воден раствор

дигитоксин

Растворот се алкализира со амониум **хлорид** и суровиот дигитоксин се екстрахира со хлороформ, присутната вода се отстранува со безводен натриум сулфат а потоа се филтрира





Хлороформски раствор на **дигитоксин**



Хлороформот се отстранува со водена пареа, остатокот се **раствора** во топол етанол и се разредува со вода загреана на 60 °C. Се остава 24 часа да се исталожи и се филтрира

Жолтеникав аморфен талог од **дигитоксин**



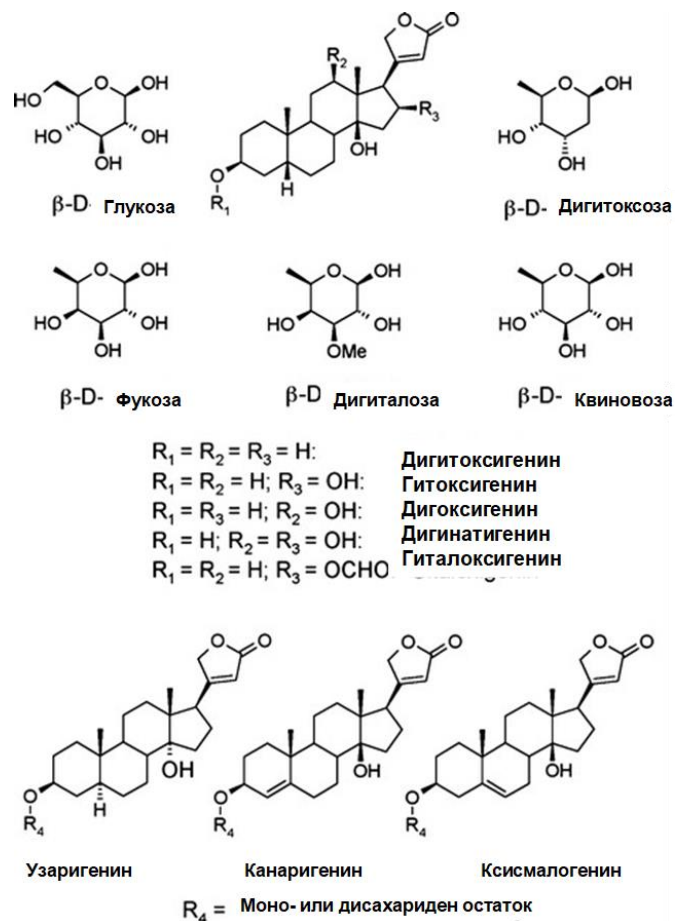
Талогот се суши во вакуум ексикатор и се раствара во безводен хлороформ и амилетер; се додава петролетер се исталожува дигитоксин и се остава 1 час. Талогот се филтрира, испира со петролетер и се суши во вакуум ексикатор. Сувиот талог се раствара на **водена бања** на 60°C во етанол (1ml за 25mg), а потоа се додава загреана вода на 60°C за да се разреди **концентрираниот** алкохол до 40%. Со стоење се излачуваат кристали од дигитоксин

Бели кристали од **дигитоксин**

Слика 8.14. Шематски приказ за изолација на дигитоксигенин (Gjorgjeska and Kostadinović Veličkovska, 2017)

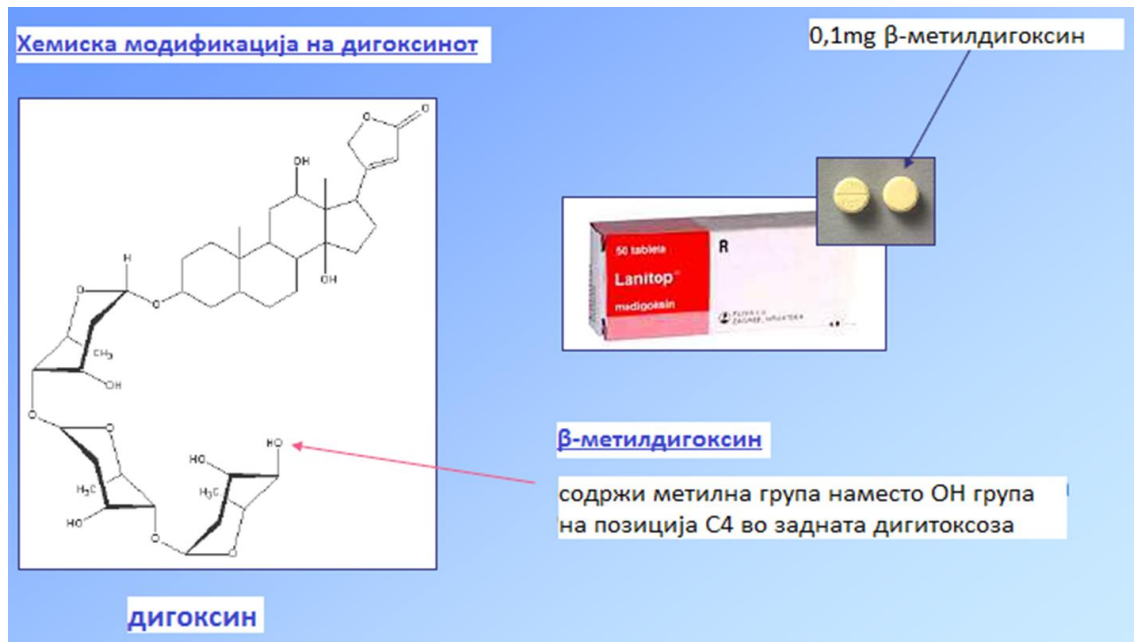
- **Изолација на кардиотонични гликозиди од *Digitalis lanatae folium***

Уделот на кардиотоничните гликозиди може да биде поголем од 1 %. Во оваа група спаѓаат лантанозиди А-Е. Посебно интересен е лантанозид С кој се состои од дигоксигенин + (дигитоксоза – дигитоксоза – ацетилдигитоксоза – глукоза). За добивање на 1 kg чист дигоксин потребни се околу 1.000 kg дрога.



Слика 8.15. Растителен материјал за изолација на дигиоксигенин (gobotany.nativeplanttrust.org/species/digitalis/lanata/ и Sales et al., 2011)

Дигоксинот се добива од ланатозид С со модификација на шеќерниот дел на молекулата и тоа со губење на една молекула глукоза на крајот на шеќерниот синџир и со отстранување на ацетилните групи од ацетилдигитоксозата на третата позиција на јаглехидратниот синџир.

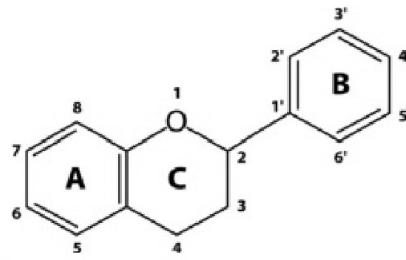


Слика 8.16. Хемиска структура на дигоксин (Gjorgjeska and Kostadinović Veličkovska, 2017)

Сепак, постојат потешкотии при изолатијата на кардиотонични гликозиди! Прв проблем е тоа што изолатијата на неутрални и поларни молекули од растителен материјал не е едноставна. Гликозидите со голема шеќерна компонента тешко кристализираат, додека растителните видови кои содржат кардиотонични гликозиди создаваат соединенија со многу мали структурни разлики во агликонската или шеќерната компонента, со што се отежнува нивната изолатија. Кардиотоничните гликозиди се структурно нестабилни соединенија. Со сушење на растителниот материјал, гликозидите богати со шеќери губат една или повеќе од своите шеќерни молекули поради ензимска хидролиза (настануваат секундарни гликозиди). За надминување на овие проблеми свежите листови се ситнати и се додава амониум сулфат (за да се инхибираат ензими). Екстракцијата се спроведува со смеса од етилацетат или хлороформ со етанол. Присутните фенолни гликозиди се отстрануваат со додавање на оловни соли (вишокот од оловни соли се отстранува со таложење во облик на сулфати или сулфиди). На крајот прочистениот екстракт се концентрира. Кардиотоничните гликозиди се одделуваат понатаму со хроматографски техники.

8.1.6. Изолатија на флавоноиди

Флавоноидите претставуваат широко распространета и разновидна група на полифеноли (флаволи, флавоноли, флавонони, флавононоли, изофлаволи итн.). Се појавуваат најчесто во гликозидна форма (C3 и C7 O-гликозиди). Структурата дадена во претходните поглавја од овој учебник е од типот C6-C3-C6 (две бензенски јадра поврзани со пропански синџир кои главно со атомите на кислородот создаваат хетероцикличен прстен).

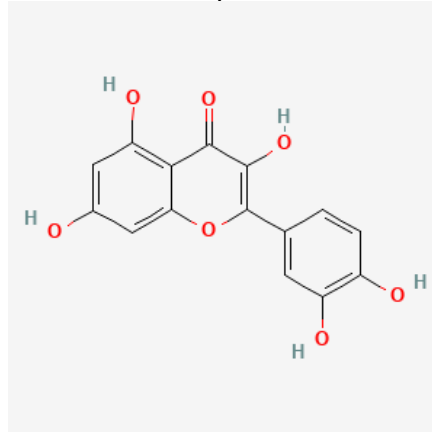


Слика 8.17. Хемиска структура на флавоноид (Deveoglu and Caradag, 2019)

Постојат бројни структурни варијанти на флавоноиди и тоа со различен степен на оксидација на хетероцикличниот прстен, различни супституенти на ароматичните прстени А и В и различни видови и положба на шеќерот во агликонската компонента.

- Изолација на рутин

Во групата на биофлавоноиди спаѓаат рутинот и кварцетинот познат уште како кварцетин – 3 – (α -L-рамнозид-6- β -D-глукозид) или кварцетин-3-рутинозид. Рутинот има бројни биолошки дејства како, на пример, антиоксидативно, антивоспалително, антиканцерогено, цитопротективно и вазопротективно.

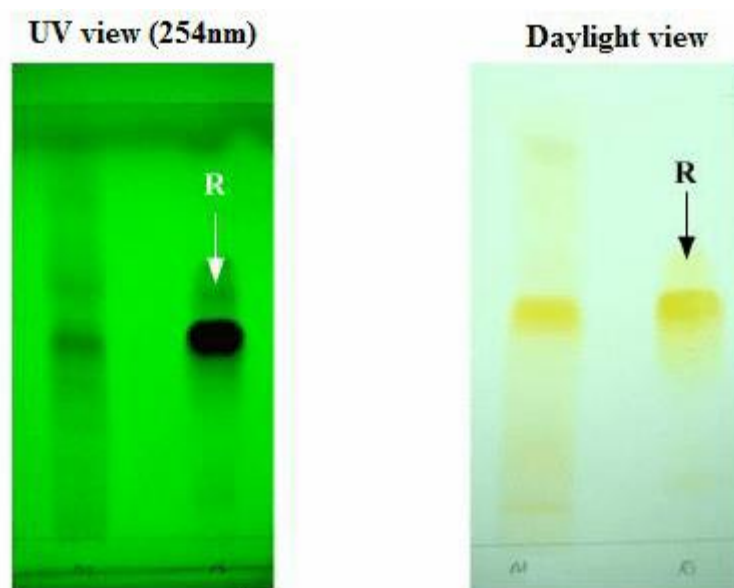


Слика 8.16. Хемиска структура на кварцетин (Kostadinović Veličkovska, 2021)

На следната шема е прикажана постапката за изолација на рутин од *Sambuci flos*.



Слика 8.17. Изолација на рутин од *Sambuci flos* (Gjorgjeska and Kostadinović Veličkovska, 2017)

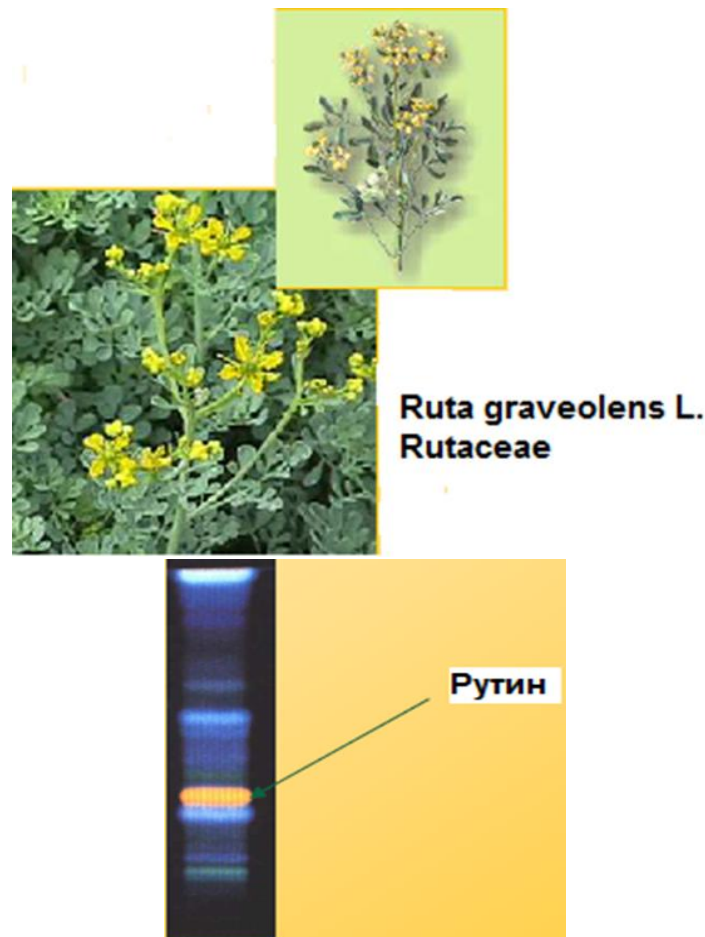


Слика 8.18. Изолација на рутин со тенкослојна хроматографија (Seow et al., 2013)

За да се потврди за кое соединение станува збор и колкава е чистотата на изолираното соединение, најпрвин се определува температурата на топење (215 °C) на соединението и се снима негов UV/VIS спектар.

- **Изолација на рутин од *Rutae herba***

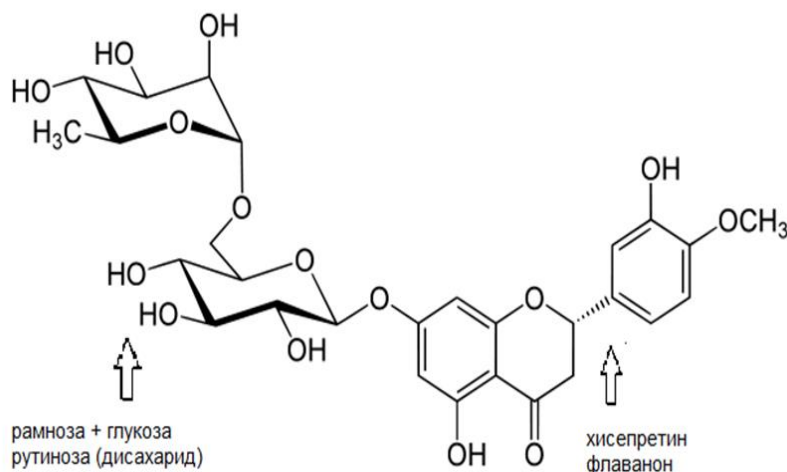
Рутинот од *Rutae herba* се изолира со тенкослојна хроматографија за која се дискутираше во разделот 5.3. од овој учебник. За таа цел се употребува стационарна фаза (Merck Kieselgel 60 F254) и мобилна фаза (етилацетат – мравја киселина – оцетна киселина – вода 100:11:11:27, v/v/v/v). Како реагенс за детекција се употребува NST/PEG. Процесот на изолација трае 2-3 дена. Липофилните составни компоненти се отстрануваат со предекстракција со дихлорметан (8 часа). Рутинот од сувиот метанолен екстракт се одделува во врела вода. Таложењето се поттикнува со ладење. Прочистувањето се спроведува со активен јаглен, а прекристализацијата со врела вода. Од 50 g дрога се изолира 100-200 mg чист рутин.



Слика 8.19. Изолација на рутин од *Rutae herba* (Gjorgjeska and Kostadinović Veličkovska, 2017)

- Изолација на хисперидин

Хисперидин или хисперидин 7-(β -L-рамнозидо-6- β -D-глукозид) и хисепридин-7-рутинозид се главните флавоноиди во плодовите на фамилијата *Citrus*. Хисперидинот има бројни биолошки дејства како, на пример, антиоксидативно, антивоспалително, хиполипидемично, вазопротективно и хипохолестеролемично.



Слика 8.20. Хемиска структура на флавон (Gjorgjeska and Kostadinović Veličkovska, 2017)

- Изолација на хисперидин од *Aurantii pericarpium*

Постапката започнува со отстранување на липофилните составни компоненти со предекстракција со петроетер. Екстракцијата се спроведува со метанол. Хисперидинот се одделува од метанолниот екстракт со помош на разредена оцетна киселина и се прочистува со прекристализација. Потоа се врши предекстракција на иситнетата дрога со петролетер и екстракција на „обезмастената“ дрога со метанол во Саксхлетова (Soxhlet) апаратура. Згуснатиот метанолен екстракт се воведува во 6 % оцетна киселина и се постигнува таложење на „суровиот хисперидин“. Прочистувањето на хисперидинот со прекристализација најпрво се врши со диметилсулфоксид, а потоа со врела вода. Од 120 g дрога се изолира 400 mg чист хисперидин. За да се потврди структурата на соединението (за да се идентификува) се определува температурата на топење на изолираното соединение, со тенкослојна хроматографија се определува неговата чистота и се снимаат UV-VIS и IR спектри кои се споредуваат со референтни спектри за хисперидинот (како што беше објаснето во деветтото поглавје за инфрацрвена спектроскопија во овој учебник). Процесот на изолација трае 2-3 дена.



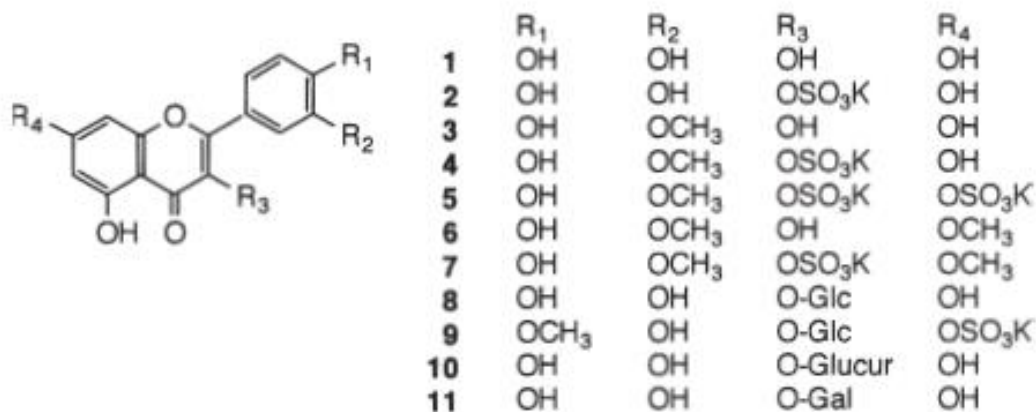
Слика 8.21. Растителен материјал за изолација на хисперидин (Gjorgjeska and Kostadinović Veličkovska, 2017)

9. Антиоксидативен потенцијал на биоактивни компоненти изолирани од растителни дроги

• Флавоноиди

Флавоноидите спаѓаат во група на полифеноли кои се широко распространети во различни растенија во високи концентрации и вообичаено се внесуваат во организмот преку зеленчуци, овошје и напитки (чај и вино). Проучувањето на антиоксидантната активност на флавоноидите (Das и Ramanathan, 1992) и нивната реакција со слободни радикали (Bors et al., 1990) се многу публикувани. Во јапонска литература, сулфатизирани, метилатни и гликозидни флавоноиди се изолирани од Водената пиперка (*Polygonum hydropiper*) (Haraguchi et al., 1992, 1996a; Yagi et al., 1994), лековита билка која се користи како зачин во Јапонската кујна. Гореспоменатите флавоноиди биле делотворни во инхибирањето на пероксидацијата на линолеинска киселина и во превенција на создавањето на супероксиден анјон. Меѓу нив, кверцетинот (1), изорамнетинот (3) и рамназинот (6) (Слика 9.1), покажале силна инхибиција против пероксидација на микрозомните липиди предизвикана од Fe(III)-ADP/NADPH.

Пероксидацијата на полинезаситенитените масни киселини може да продолжи преку не-емзински авто-оксидирачки видови или преку процеси кои се ензимски катализирани (Slater, 1984). Почетниот чекор на липидната пероксидација започнува со издвојување на водородот од полинезаситената масна киселина (LH) која предизвикува формирање на слободен радикал со јаглероден атом во центарот на радикалот (L·).

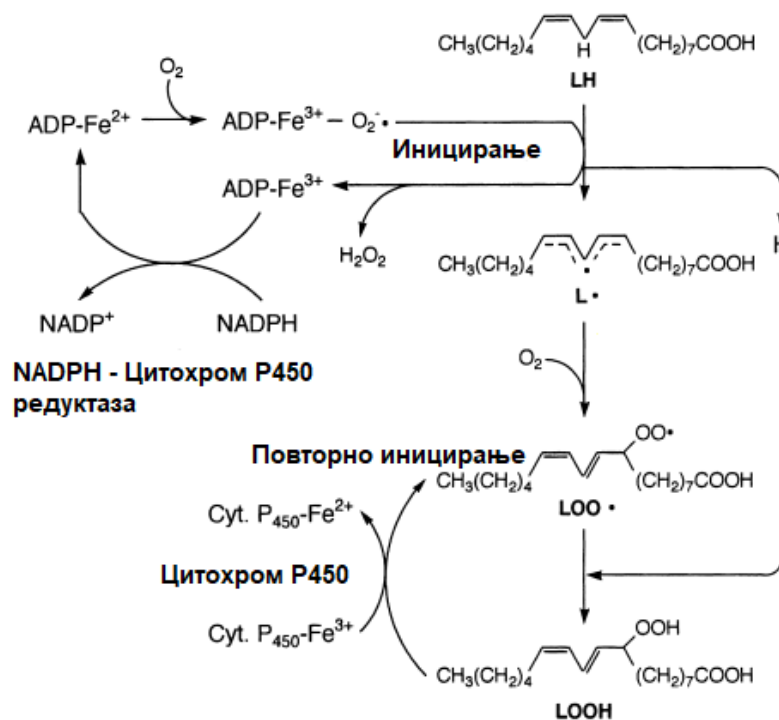


Слика 9.1: Антиоксидантни флавоноиди изолирани од *Polygonum hydropiper* (Haragashi, 2001)

Прераспределувањето на конјугирани диени понатаму е проследено од интеракција со молекула на кислород за да се формира перокси-радикал (LOO·). Ова може да издвои водороден атом од соседната масна киселина, што резултира со формирање на липиден хидропероксид (LOOH) (Ernster, 1993). Клеточната локација

која најлесно подлегнува на липидна пероксидација е микрозомот (Karrus, 1985). Микрозомите, посебно ендоплазматичниот ретикулум со мазна површина, лесно продуцираат липидни пероксиди, и се смета дека ги доставуваат продуктите од пероксидацијата во други ткива (Rodgers, 1978). NADPH-цитохромот П-450 редуктаза е вклучен во ензимската липидна пероксидација во микрозомите зависна од NADPH (Aust и Svingen, 1982).

Во последно време излорани се различни типови на флавоноиди (флавонол, флаванол, флаванон, флаванон и така натаму) кои имаат 5, 7, 3', 4'-хидроксигрупи (тип кверцетин) од растенија кои се користат во секојдневната исхрана: лутеолин (12) од Рузмаринот (*Rosmarinus officinalis*) (Okamura et al., 1994), таксифолинот (13) од *Engelhardtia chrysolepis* (Haraguchi et al., 1996c). Нивното инхибиторно влијание врз липидната пероксидација најчесто се јавува кога микрозомите од црниот дроб на експериментален стаорец се инкубираат со Fe(III)-ADP/NADPH (Pederson et al., 1973). (Табела 9.1). Сите прикажани типови на флавоноиди демонстрираат силна инхибиција на липидната пероксидација зависна од NADPH во микрозомите на црниот дроб. Хидроксилните групи во С-3' и С-4' положба на Б-прстените на флавоноидите се најважни во структурата на антиоксидантните активности во не-ензимската липидна пероксидација (Ratty и Das, 1988) (Слика 9.2).

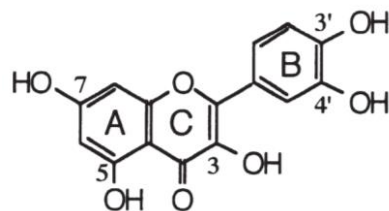


Слика 9.2. Липидна пероксидација во микрозомите зависна од NADPH (Haragashi, 2001)

Илустрацијата на сликата 9.2. прикажува формирање на 9-*trans*, *cis*-LOOH на линолеинската киселина. Исто така, се формираат и други хидропероксиди (13-*trans*, *trans*-LOOH, 13-*trans*, *cis*-LOOH и 9-*trans*, *trans*-LOOH).

ТАБЕЛА 9.1

Инхибиција на липидна пероксидација во микрозомите и генерирање на супероксиден анјон од различни флавоноиди кои имаат исти хидроксилни замени (групи).



Структура на С-прстенот	Соединение	IC ₅₀ (μ M) ^a		
		микрозомска ^b липидна пероксидација	O ₂ ⁻ генерирање ^c во микросоми	O ₂ ⁻ генерирање ^d од ксантин Оксидаза
	1 кверцетин (флавонол)	20.7	2.5	53.8
	12 лутеолин (флавонол)	7.3	>100	3.3
	13 таксифолин (флаванол)	13.1	>100	5.9
	14 ериодиктиол (флаванон)	7.3	>100	8.8
	15 катехин (флаван-3-ол)	14.5	>100	0.8

^a Изразена како средна вредност од 50% инхибиторна концентрација со трикратна определба, добиена со нтерполација на кривата концентрациј/инхибиција.

^b Липидната пероксидација зависна од NADPH е определена со метод на тиобарбитурна киселина.

^c Определена со мерење на стапката на редукција на цитохром c.

^d Детектирана од редукцијата на азотно-синиот тетразолиум.

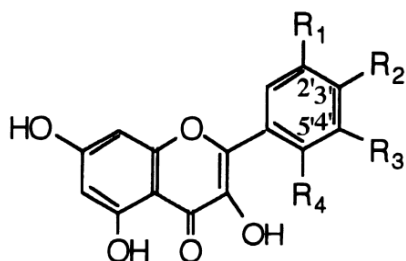
Добро познато е дека липидната пероксидација е една од реакциите кои се предизвикани како резултат од формирањето на слободни радикали во клетките и ткивата. Продуктите на O_2 со еден електрон, супероксидниот анјон (O_2^-), водородниот пероксид (H_2O_2) и хидрокси-радикалот ($OH\cdot$) земаат активно учество во иницирањето на липидната пероксидација (Maumi et al., 1993). Неколку ензими кои предизвикуваат оксидација, како ксантин оксидазата, го даваат O_2^- радикалот како нормален продукт од редукцијата на еден електрон кај кислородот, што резултира со оштетувања на ткивото (Maumi et al., 1993). Посочено е дека, при висока активност на прибирање на супероксиди во ксантин-ксантин оксидаза систем, од суштинска важност се хидроксилна група во C-3' во В-прстенот и во C-3 во С-прстенот (Cos et al., 1998). Ефектот на различните типови на флавоноиди врз создавањето на супероксиден анјон од ксантин оксидаза системот е прикажан во Табела 9.2. Лутеолинол (12) и ериодиктиолол (14) немаат хидроксилна група на C-3 во С-прстенот, но сепак, и тие се покажале делотворни во одземањето на супероксидниот анјон.

Извор на супероксиден анјон во клетките од цицачите е и синцирот за трансфер на микрозомски електрони, предизвикувајќи бавен трансфер на електрони во O_2 преку NADPH-цитохромот P-450 и NADPH-цитохром b_5 редуктазата (Cadenas, 1995a). Супероксидните анјони создадени при инкубацијата на микросоми со NADPH можат да се детектираат по редукцијата на цитохром C (Kuthan и Ullrich, 1982). Како што е прикажано во Табела 9.2. кверцетинот (1) бил ефикасен во неутрализација на супероксидниот анјон во микросомите, додека другите флавоноиди немале никаков ефект врз создавањето на O_2^- во микросомите.

Посочено е дека слободните хидроксилни групи во А-прстенот (C-5 и C-7) учествуваат во инхибирањето на липидна пероксидација, додека присуството на хидроксили во В-прстенот не е неопходно, иако го подига нивото на активност, со некои разлики во зависност од типот на структурата (Cholbi et al., 1991). Табелата 9.3 ги прикажува антиоксидантните активности на флавонолите со 5,7-дихидрокси замена во А-прстенот. Кемферолол (16), кверцетинот (1), моринот (17) и мирицетинот (18) се делотворни во превенцијата на липидната пероксидација зависна од NADPH кај микросомите.

Антиоксидантните соединенија кои се ефективни во превенцијата на липидна пероксидација зависна од NADPH можат да инхибираат ензимска редукција на Fe^{3+} -ADP. Натаму, додавањето на NADPH на микросомите го активира цитохромот P-450, па додадените антиоксиданти можат да бидат - преку метаболички процес - рекомбинирани во помалку активни во инхибиција на пероксидацијата (Halliwell, 1995). Но, при липидната пероксидација започната од Fe^{3+} / аскорбат се избегнува овие проблеми (Halliwell, 1995). Табелата 9.3 исто така, ги прикажува ефектите на флавонолите врз липидна пероксидација во микросомите предизвикана од аскорбат (Slater, 1984). Овие флавоноли, исто така, покажале силна инхибиција на без-ензимската липидна пероксидација во микросомите, како што е прикажано во Табела 9.3. Се појавила мала разлика во ефикасноста на антиоксидантната активност на овие флавоноли во однос на други употребени стандарди при пероксидација. Независно од начинот на предизвикување на липидната пероксидација, локализацијата на центрите на формирање на радикалите во мембраната може да биде различна. Оттука, ефикасноста на инхибиторите на пероксидација, исто така, може да се менува (Kagan et al., 1990)

Табела 9.2



	Замена				IC ₅₀ (μ M) ^a			
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Зависно од индуциран NADPH ^b	индуциран аскорбат ^c	индуциран CCl ₄ ^d	индуциран t-BuOOH ^e
16	H	OH	H	H	9.0	3.8	6.6	8.4
1	H	OH	OH	H	21.8	1.9	5.7	7.8
17	H	OH	H	OH	19.0	3.2	11.2	12.3
18	OH	OH	OH	H	47.6	1.5	7.0	7.2

^a Определена со метод на тиобарбитурна киселина, и изразена како средна вредност од 50% инхибиторна концентрација со трикратна определба, добиена со нтерполација на кривата концентрациј/инхибиција.

^b Липидната пероксидација била предизвикана со Fe(III)-ADP/NADPH.

^c Липидната пероксидација била предизвикана со Fe(III)-аскорбат.

^d Липидната пероксидација била предизвикана со CCl₄/NADPH систем за генерирање.

^e Липидната пероксидација била предизвикана со терцијарен бутил водороден пероксид.

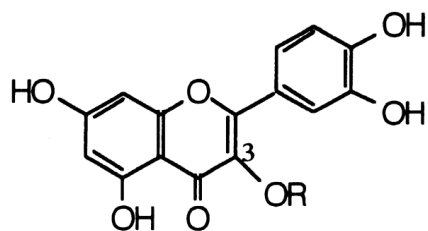
Различни ксенобиотици, вклучувајќи хемотераписки агенси, пестициди и загадувачи на животната средина се одговорни за продукцијата на реактивни кислородни видови и за започнување на липидна пероксидација. Попрецизно, многу ксенобиотици кои се рстворливи во липидите можат да влезат во директна интеракција, и во неметаболизирана состојба значително да ја изменат пермеабилноста на мембраната, да ја зголемат нејзината пропустливост и да ја сменат хомеостазата на калциумот (Stohs, 1995). Халогенизираните соединенија, кои се во широка употреба за индустриски и земјоделски цели, се највообичаените ксенобиотици на кои се изложени луѓето денес. Голем број халогенизирани соединенија се покажале како силни предизвикувачи на липидна пероксидација (Fraga et al, 1987). Посебно, метаболитите на јаглородниот тетрахлорид (CCl₄) покренуваат липидна пероксидација во мембраната која резултира со клеточна некроза (Orrenius et al., 1992). Редуктивната дехалогенизација на CCl₄, катализирана од цитохромот P-450 во микрозомите, генерира радикали на трихлорметил и трихлорметилпероксид, кои покренуваат липидна пероксидација во мембраната (Recknagel et al., 1989). Органските водородни пероксиди, како терцијарниот бутил хидропероксид (*t*-BuOOH), исто така, ослободуваат реактивни кислородни видови со реакција катализирана од цитохром P-450, и покренуваат липидна пероксидација во микрозомите (Minotti, 1989). Оваа липидна пероксидација кај микрозомите зависна од цитохромот P-450 била исто така инхибирана од флавонолите.

Липидната пероксидација се иницира од страна на активни кислородни видови кои ги напаѓаат незаситените масни киселини, и започнува како циклус на верижна реакција која вклучува липиди, перокси радикали и липидни водородни пероксиди (Witting, 1980). Супероксидниот анјон (O₂⁻), водород пероксидот (H₂O₂) и хидроксидниот радикалот (OH[·]), активно учествуваат во започнувањето на липидната пероксидација

(Mayumi et al., 1883). Супероксидните анјони најчесто се формираат ензимски во систем ксантин-ксантин оксидаза и без-ензимски во систем феназин метосулфат-NADH, и се анализираат со редукција на азотно-син тетразолиум. Истражувањата покажале дека флавоноидите ја намалуваат концентрацијата на супероксидниот анјон и во ензимскиот, и во без-ензимскиот систем (Robak и Gryglewski, 1988). Флавоноидите најчесто егзистираат како гликозиди во растенијата (Macheix et al., 1990), и се смета дека се абсорбираат како гликозиди во дигестивниот тракт кај луѓето (Holman et al., 1996). Табелата 9.5 ја прикажува активноста на одземање на супероксидниот анјон од гликозидите на кверцетин (1), изокверцитрин (8), кверцитрин (19) и рутин (20). Овие флавоноидни гликозиди се делотворни во одземањето и на ензимски, и на без-ензимски генерирани супероксидни анјони. Липидната пероксидација е типична оксидација со слободни радикали и продолжува преку циклична верижна реакција (Witting, 1980). Во понови истражувања од оваа област била испитувана активноста на одземање на радикали, која може да се мери преку губењето на боја која следи по елиминирање на неспарениот електрон од радикали со центриран азот како дифенил-*p*-пикрилхидразил (DPPH) радикалот. Овие флавоноиди делотворно го неутрализирале DPPH-радикалот, како што е прикажано во Табела 9.5.

Табела 9.3.

Активност на неутрализација на радикали на флавонол гликозиди од кверцетински тип.



	R	IC ₅₀ (μM) ^a		
		супероксиден анјон ^b		DPPH ^e Радикал
		ензимски ^c генерирани	без-ензимски ^d генерирани	
1	H	53.8	18.2	3.0
8	Glc	11.4	8.8	4.1
19	Rha	16.8	17.5	5.2
20	Glc-Rha	11.7	8.6	4.0

^a Иразена како средна вредност од 50% инхибиторна концентрација со трикратна определба, добиена со интерполација на кривите на концентрациј/инхибиција.

^b Детектирана преку редукција на азотно-син тетразолиум.

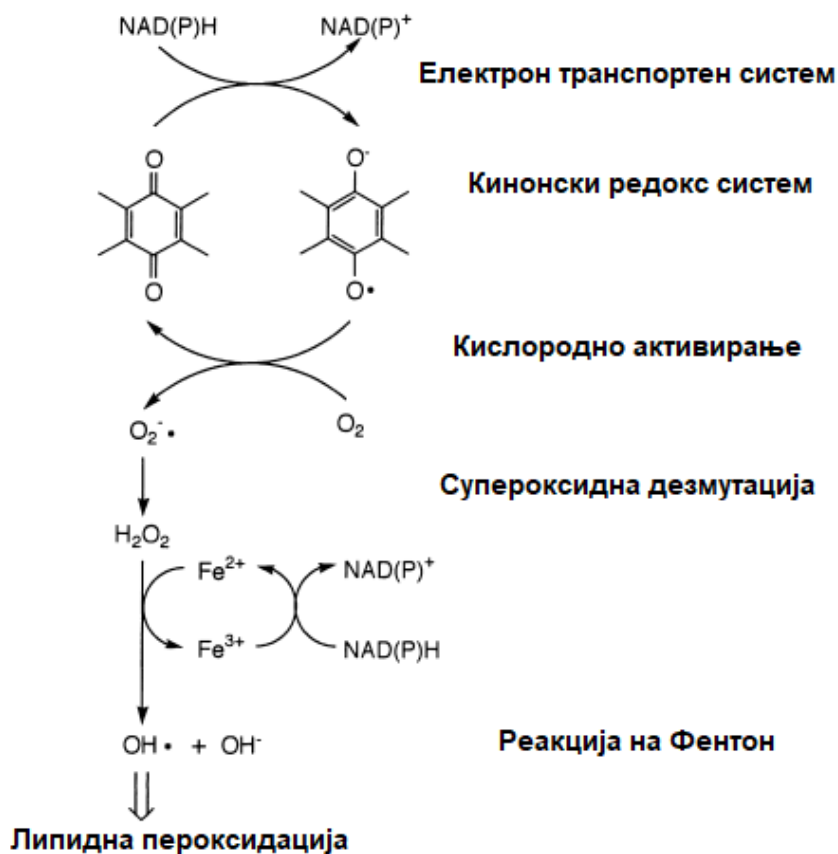
^c Супероксидните анјони биле генерирани од систем ксантин-ксантин оксидаза

^d Супероксидните анјони биле генерирани од феназин метосулфат и NADH.

^e Активноста на фаќање на радикалот на дифенил-*p*-пикрилхидразилот била измерена колорометриски.

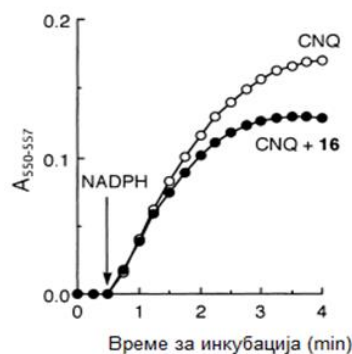
Широко е прифатено дека егзогените кинонски соедининеија ја пројавуваат својата цитотоксичност преку формирање на реактивни кислородни видови (Atanasev et al., 1990). Редукцијата на електрон на кинонските деривативи во полу-кинонски

слободни радикали е катализиран од неколку флавоензими, вклучувајќи ја микрозомската NADPH-цитохром P-450 редуктаза и митохондриската NADH-убикинон оксиредуктаза (Powis и Apple, 1980; Thor et al., 1982) (Слика 9.6).



Слика 9.3. Циклирање на редокс процес по еден електрон кај кинонските соединенија и подоцнежното генерирање на токсични кислородни видови

2,3 дихлоро-1,4-нафтокинон (CNQ), семенски фунгицид кој се користи за заштита на лисјата на растенијата, посредува во генерирањето на супероксиден анјон и водороден пероксид (Pritsos et al., 1982). Кога микрозомите од црниот дроб на експериментален стаорец биле инкубирани со CNQ, додавањето на NADPH индуцирало создавање на супероксиден анјон (Слика 9.6). Кемпферолот (16), моќен антиоксидантен флавонол (Табела 9.5) го сузбил создавањето на супероксид поттикнато од кинолот, како што е прикажано на Слика 9.7 и 9.8. Овој ефект исто бил забележан кога во реактивната смеса била додадена супероксид дисмутаза (SOD).



Слика 9.4. Ефект од флавонолот (16) врз продукција на супероксиден анјон поттикната од кинон во митохондриите на црниот дроб од експериментален стаорец (Haragashi, 2001)



Слика 9.5. Ефектот на флавонолот (16), во комбинација со каталаза, на потрошувачката на кислород предизвикана од кинон во митохондриите на црниот дроб од експериментален стаорец (Haragashi, 2001)

Продукцијата и регенерацијата на супероксидниот анјон поттикнат од кинонските соединенија води кон стимулација на потрошувачката на кислород (Haraguchi et al., 1986d, 1997a). Нафтазаринот (5,8-дихидрокси-1,4-нафтокинон) е основната единица на тетрацикличните антитуморски антибиотици, како Даунорубицин, Адриамицин и Карминомицин (Cadenas, 1995b). Кога овој кинон бил додаден во раствор со митохондрии, била поттикната потрошувачката на кислород. Со додавањето на SOD и каталаза, обете ја намалиле стапката на потрошувачка на кислород индуцирана од некои органски ксенобиотици (Hodnick et al., 1994).

Калконите се група фенолни соединенија кои припаѓаат на семејството флавоноиди, кои се широко распространети во природата како пигменти. Ликокалконот А (21), В (22), С (23), D (24) и ехинатинот (25) биле изолирани од корењата на *Glycyrrhiza inflata*. Тие биле ефективни во спречување на липидна пероксидација на митохондриите покрената од Fe(III)-ADP/NADPH (Haraguchi et al., 1998a). Посебно, ликокалконите В и D покажале силна антиоксидантна активност. Овие две соединенија силно ја поттикнале продукцијата на супероксидниот анјон во системот ксантин-ксантин оксидаза и демонстрирале силна активност на одземање од DPPH радикалот (Слика 9.9 и 9.10).

Понатаму, ликокалконите В и D го врзувале супероксидниот анјон во митохондриите. Катехолот е општо земено многу чувствителен на оксидација, посебно на онаа со посредства на слободни радикали, и може да се формира релативно стабилен орто-семикинонски радикал.

Изолација на природни продукти

Најверојатно, силната антипероксидатвна активност од ликокалконите В и D би се базирала на овој механизам, иако *орто*-дихидрокси групата може да ја наруши пероксидацијата преку заробување на јон од железо, кој е важен ко-фактор на процесот на пероксидација, преку способноста за дивалентна хелација.

ТАБЕЛА 9.4.

Антиоксидантна активност на ретрокалконите во *G. inflata*

Соединение	IC ₅₀ (μM) ^a		
	Липидна пероксидација ^b	DPPH радикал ^c	Генерирање на O ₂ ^{-d}
21	18.1	44 .1	64 .8
22	2.5	6 .5	7 .0
23	44.1	>100	71 .2
24	2.0	5 .7	9 .9
25	61.0	>100	>100

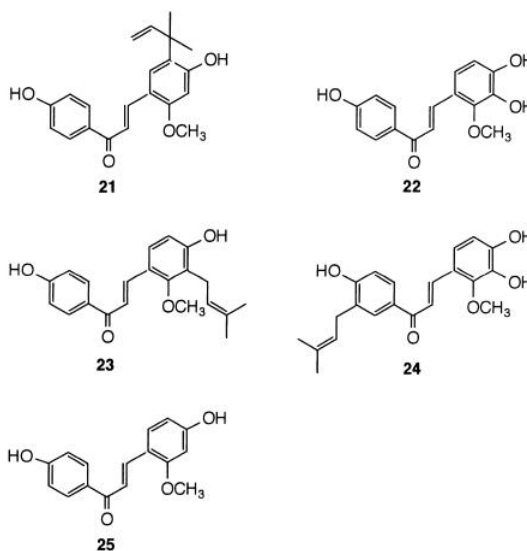
^a Иразена како средна вредност од 50% инхибиторна концентрација со трикратна определба, добиена со нтерполација на кривите на концентрациј/инхибиција.

^b Микрозомската липидна пероксидација била предизвикана со Fe(III)-ADP/NADPH

^c Супероксидните анјони биле генерирани од систем ксантин-ксантин оксидаза

^d Активноста на фаќање на радикалот на дифенил-*p*-пикрилхидразилот била измерена колорометриски.

^e Супероксидниот анјон бил генериран од ксантин-ксантин оксидаза.



Слика 9.6: Антиоксидантни ретрохалкони изолирани од *Glycyrrhiza inflata* (Haragashi, 2001)

Најсилната активност била забележана во соединенија кои имаат слободна катехолна група на позициите 3' и 4' од флаволниот скелет (Mora et al., 1990). Во случајот на ликокалконите В и D, каде се појавува *орто*-дихидрокси група во В-прстенот, нивната антипероксидна активност зачудувачки пораснала за еден ред во јачина во споредба со другите калкони кои немаат таква функционална група. Присуството на метоксил

орто до 3',4'-дихидрокси во овие два ретрокалкони најмногу ќе придонесе за раст во антипероксидантата активност, бидејќи групата има силна способност на донирање на електрон и уште повеќе ќе ги стабилизира прилично стабилните орто-семикинонски радикали. Овие структурни одлики ќе бидат основа за силна инхибиторна активност на ликокалконите В и D врз липидната пероксидација и способноста на одземање на радикали.

Некои природни полихидроксифлавоноиди се докажале како ефективни инхибитори на липидната пероксидација. Сепак, нивната потенцијална ефикасност како терапевтски агенси сè уште не е потврдена, бидејќи тие не се доволно хидрофобни за да продрат во клетката и да стигнат до ткивата, каде од нив се очекува да генерираат неактивни слободни радикали кои се предизвикувачи на некои болести. Ликокалконите во *G. inflata* се похидрофобни отколку хидроксифлавоноидите како кверцетинот. Посебно, ликокалконите А, С и D имаат пренилна група (C₅ јаглеродни единици) или во А- или во В- прстенот. Внесувањето на липофобна група во овие молекули ќе ја подигне нивната хидрофобност, што овозможува да се подобрат нивните биохемиски и фармаколошки карактеристики преку зголемен афинитет кон мембраната. Овој липофилен дел се смета дека е многу битен за правилната ориентација на молекулот во мембраната (Kagan and Quinn, 1988).

Изофлавоноидите се исто така, важни членови на флавоноидите кои се широко распространети. Изофлаванските деривативи, глабридин (26), хиспаглабридин А (27), хиспаглабридин В (28, 4'-О-метилглабридинот (29), 3'-хидрокси-4'-О-метилглабридинот (30) биле изолирани од *Glycyrrhiza glabra*. Тие имале способност да ја инхибираат липидната пероксидација во митохондриите на црниот дроб од експериментален стаорец (Haraguchi et al., 1997b). Посебно хиспаглабридинот А (27) покажал силна антиоксидантна активност против пероксидацијата предизвикана од Fe-аскорбат (Табела 9.5 и Слика 9.7).

ТАБЕЛА 9.5

Антиоксидантна активност на изофлаваните од *G. glabra* во митохондриите од црниот дроб на експериментален стаорец

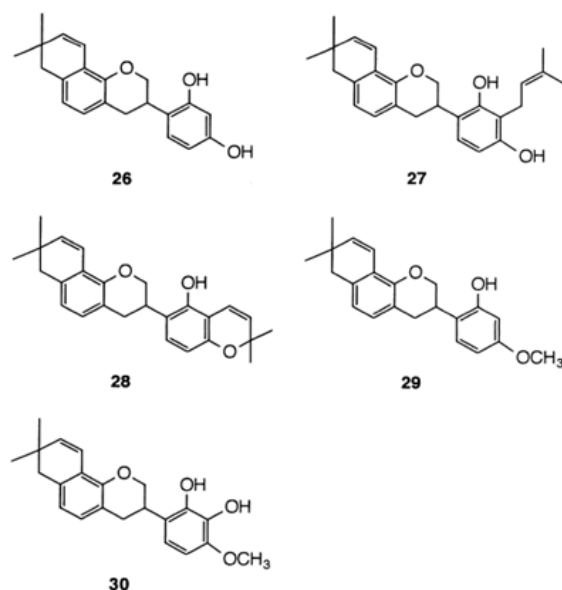
Соединение	IC ₅₀ (μM) ^a	
	зависно од NADPH ^b	индуцирана од аскорбат ^c
26	8.4	24 .5
27	3.5	2 .0
28	21.6	>1 00
29	10.8	21 .2
30	0.4	11 .2

^a Иразена како средна вредност од 50% инхибиторна концентрација со трикратна определба, добиена со нтерполација на кривите на концентрациј/инхибиција.

^b Липидна пероксидација била предизвикана со Fe(III)-ADP/NADPH

^c Липидна пероксидација била предизвикана со Fe(III) – аскорбинска киселина

Исто така, ова соединение има пренилна група помеѓу двата хидроксили, што би обезбедило афинитет за овој флаван во хидрофобната средина. 3'-хидрокси-4'- О-метилглабридинот (30) силно ја инхибирал липидната перксидација зависна од Fe-ADP/NADPH. Овој изофлаван има метокси-група која донира електрон во орто-позицијата на една фенолна хидрокси група, што би придонело кон стабилноста на фенокси радикалите генерирани во антипероксидациониот процес (слика 9.8).

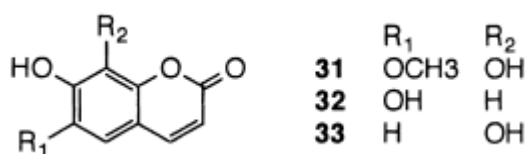


Слика 9.7: Антиоксидантните изофлавоноиди изолирани од *Glycyrrhiza glabra* (Haragashi, 2001)

- **Кумарини и ксантони**

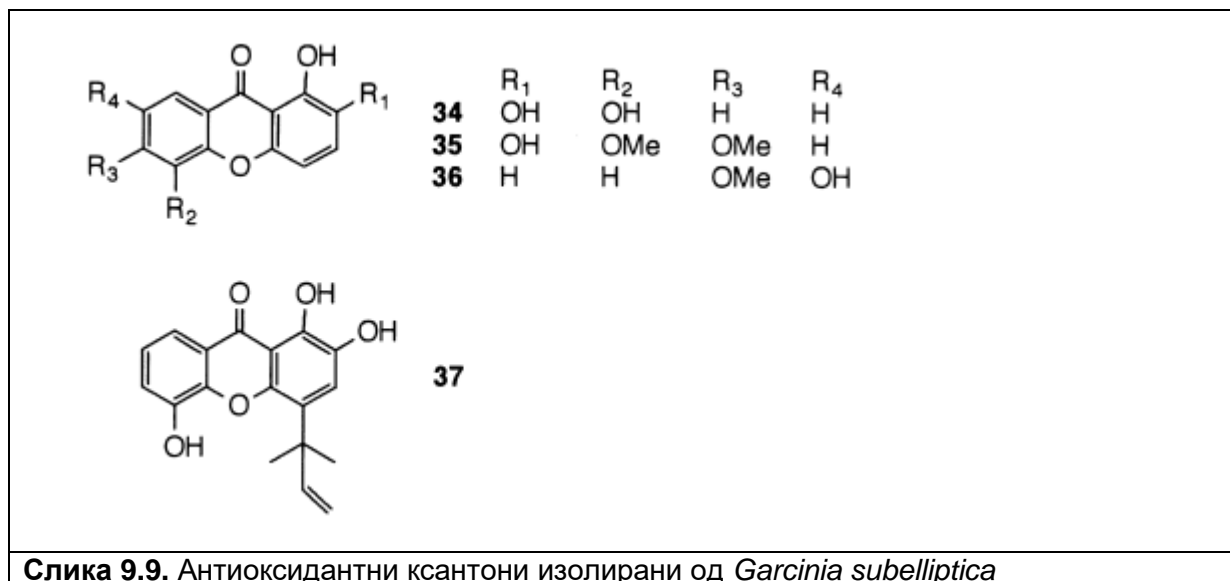
Кумарините се бензопирони (α -пирон), кои формираат голема класа на фенолни соединенија широко распространети во растенијата. Паја и неговите соработници (Paşa et al., 1992) ги истражувале ефектите од кумарините со различни хидроксилни и други супституции врз липидната пероксидација и некои кислородни радикали. Меѓу кумаринските деривати од растенија, како фраксетинот (**31**), ескулетинот (**32**) и дафнетинот (**33**) биле ефективни инхибитори на липидна пероксидација во микрозомите индуцирана од Fe^{3+} - аскорбатот (Слика 9.13).

Ксантоните се состојат од флавоноиди слични на γ -пирон и покажуваат широк спектар на биолошки активности. Минами и неговите соработници (Minami et al., 1994) изолирале хидроксиксантони



Слика 9.8. Природни антиоксидантни кумарини

од *Garcinia subelliptica* и ги евалуирале нивните пероксидни својства. Меѓу нив, 1,2-дихидрокси-5,6-диметоксиксантонот (**35**) и 1,8-дихидрокси-6-диметоксиксантонот (**36**) биле ефективни во превенцијата на липидната пероксидација. 1,2,5-трихидроксиксантонот (**34**) се покажал како моќен неутрализатор на DPPH радикалот и O_2^- издвоен од ксантин-ксантин оксидаза системот. Глобуксантонот (**37**), исто така, бил ефективен во одземањето на O_2^- и превенцијата на липидната пероксидација (Слика 9.9).



Слика 9.9. Антиоксидантни ксантони изолирани од *Garcinia subelliptica*

- **Фенилпропаноиди**

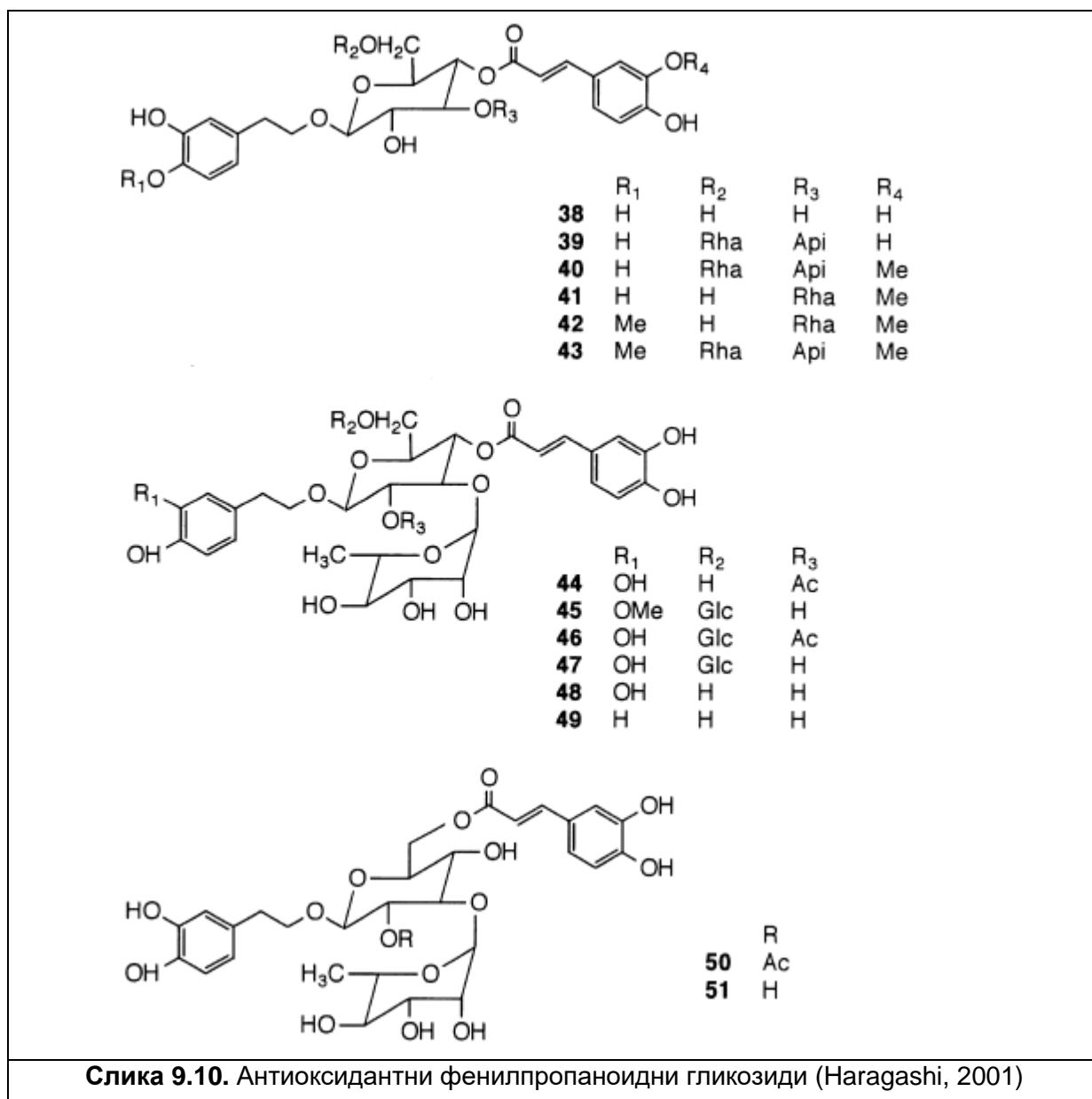
Фенилпропаноидите се, исто така, широко распространети во растенија кои се користат во исхраната на луѓето. Неодамна, Ванг и неговите соработници (Wang et al., 1996) ги проучувале активностите на одземање на фенил-пропаноидните гликозиди, вербаскозидот (42), педикулариозидот А (39), М (40), N (43), леукоскептозидот А (41) и мартинозидот (42) изолирани од *Pedicularis* растенијата врз супероксидниот анјон и хидроксилните радикали (Слика 9.15). Резултатите покажале дека бројот на фенолни хидроксилни групи во структурите е поврзан со нивната способност за неутрализација на радикалите. Ксионг и неговите соработници (Xiong et al., 1996) исто така, изолирале фенилпропаноидни гликозиди, 2'-ацетилецтозид (44), цистанозид (46), ехинакозид (47), ацетозид (48), синргалид А - 3'- α -рамнопиранозид (49), тубулозид В (50) и изоацетозид (51) од *Cistanche deserticola*, и ги испитале нивните антиоксидантни активности. Овие соединенија покажале значителна инхибиција врз двата типа на липидна пероксидација индуцирана и од аскорбат-Fe²⁺, и од Fe³⁺-ADP/NADPH во микрозомите на црниот дроб на експериментален стаорец (Слика 9.15).

За нивната антиоксидантна активност исто било утврдено дека е засилена со порастот на бројот на хидроксилните групи во молекулата.

Фенилпропаноидите се деривирани од *транс*-цинаминска киселина (52) и *p*-кумарна киселина (53). Натомошната оксидација на *p*-кумарната киселина генерира кофеинска киселина (54), и нејзината метилација доведува до ферулична киселина (55). Меѓу најраспространетите фенилпропаноиди во растителните ткива се хидроксицинаминските киселини. (Rice-Evans, 1996). Тода и неговите соработници (Toda et al., 1991) ги испитувале ефектите на овие фенолкарбоксилни киселини врз генерирањето на супероксидниот анјони како и продукцијата на липиден пероксид покренат од супероксидниот анјон. Феруличната киселина (55) го одземала супероксидниот анјон, а кофеинската киселина (54) и феруличната киселина (55) ја инхибирале липидната пероксидација.

Карбоксилните киселини на фенилпропаноидите се редуцираат за да формираат соодветните алдехиди, алкохоли и олефини. Еуенолот (56) е еден од редуцирани фенилпропаноиди, важна состојка на маслото од каранфилче. Еуенолот (56) ја намалува липидната пероксидација индуцирана од CCl₄ во микрозомите (Kumaravelu et al., 1995). Ова соединение, исто така, ја инхибира липидната

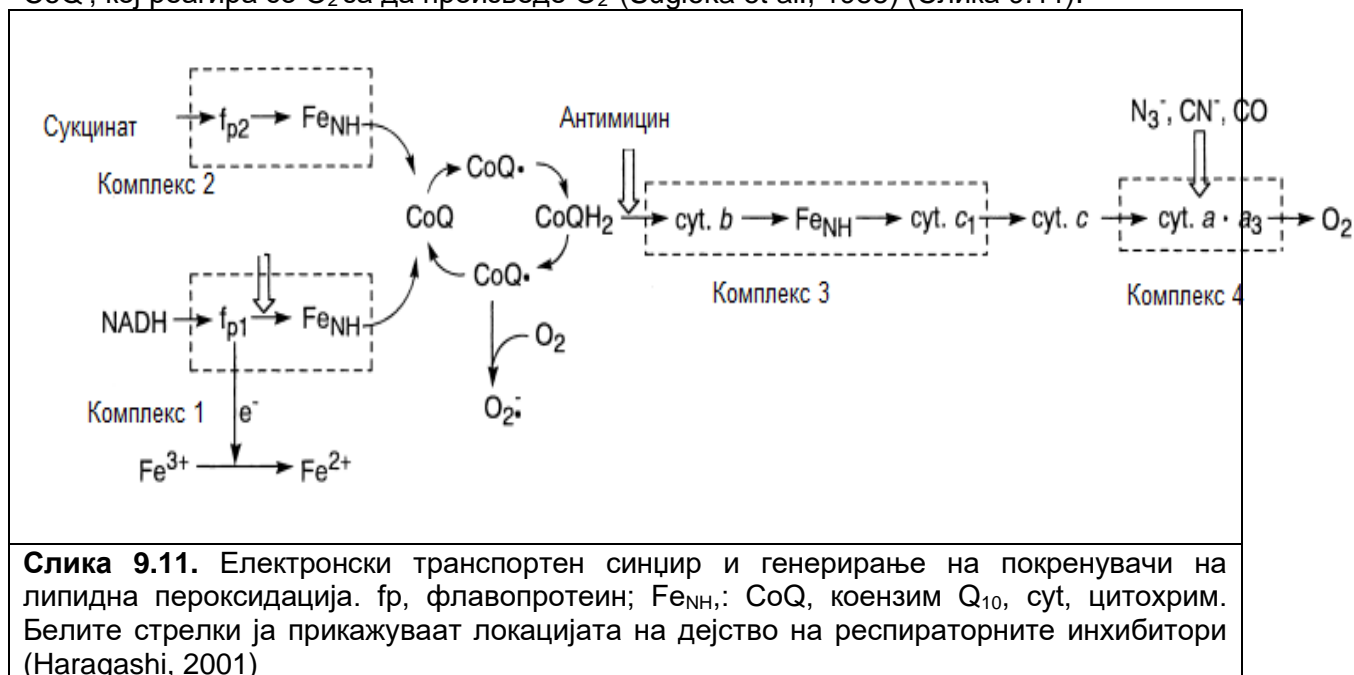
пероксидација во митохондриите на црниот дроб на експериментален стаорец предизвикана од Fe^{2+} -аскорбат и Fe^{2+} - H_2O_2 (Nagababu and Lakshmaiah, 1992).



Слика 9.10. Антиоксидантни фенилпропаноидни гликозиди (Haragashi, 2001)

Редокс реакциите често се јавуваат во митохондриите, кои се константно подложни на оксидантен стрес (Wiswedel et al., 1989). Внатрешните мембрани на митохондриите се посебно изложени на ризик од липидна пероксидација, зашто митохондриите користат кислород во висока стапка и внатрешните мембрани имаат висока содржина на полинезаситени масни киселини, заедно со пероксидажни катализатори како железо и бакар (Hingh et al., 1995). Во мембраните на митохондриите транспортниот синџир на електрони учествува во ензимската липидна пероксидација (Karrus, 1985). Познато е дека NAD(P)H ја поддржува ензимската липидна пероксидација во суб-митохондриските честички во присуство на железен хелат (Glynn et al., 1991). Електроните се пренесуваат од NADH во Fe^{3+} , конвертираниот Fe^{2+} создава додаток на O_2 , и потоа комплексот $Fe-O_2$ покренува липидна пероксидација (Takayanagi et al.,

1980). Дополнително, донаторите на електрони како NADH и сукцинатот генерираат CoQ, кој реагира со O₂ за да произведе O₂⁻ (Sugioka et al., 1988) (Слика 9.11).

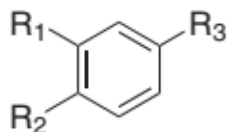


Слика 9.11. Електронски транспортен синџир и генерирање на покренувачи на липидна пероксидација. fp, флавопротеин; Fe_{NH}, CoQ, коензим Q₁₀, cyt, цитохрим. Белите стрелки ја прикажуваат локацијата на дејство на респираторните инхибитори (Haragashi, 2001)

Во табелата 9.6 се прикажани антиоксидантните активности на фенолпропаноидите врз микрозомската и митохондриската липидна пероксидација. Посебно еугенолот (**56**) и изоэугенолот (**57**) биле моќни антиоксиданти против липидната пероксидација во митохондриите покрената од Fe(III)-ADP/NADH.

ТАБЕЛА 9.6

Антиоксидантни активности на фенолпропаноидите во микрозомите и митохондриите



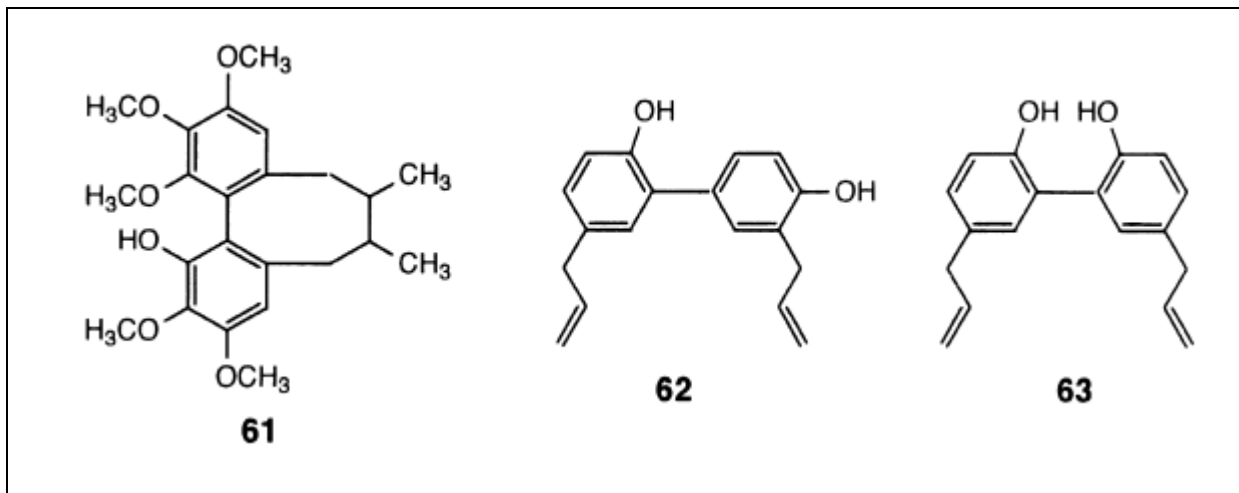
	Супституција			IC ₅₀ (μM) ^a	
	R ₁	R ₂	R ₃	микрозомска липидна пероксидација ^b	микрозомска липидна пероксидација ^c
52	H	H		>100	>100
53	H	OH		>100	>100
54	OH	OH		58 .8	>100
55	OCH ₃	OH		>100	>100
56	OCH ₃	OH		11 .6	7 .6
57	OCH ₃	OH		14 .8	3 .2
58	H	OCH ₃		72 .5	93 .0
59	-O-CH ₂ -O-			54 .5	82 .5
60	-O-CH ₂ -O-			29 .2	52 .0

^aОпределена со метод на тиобарбитурна киселина, и изразена како средна вредност од 50% инхибиторна концентрација со трикратна определба, добиена со интерполација на кривите концентрациј-инхибиција.

^b Липидната пероксидација била индуцирана од Fe(III)-ADP/NADPH.

^c Липидната пероксидација била индуцирана од Fe(III)-ADP/NADH.

Оксидационото спарување на фенолпропаноид (C₆-C₃ единица) резултира со лигнан и неолигнан. Лу и Лиу (Lu and Liu, 1992) ја испитале антиоксидантната активност на дибензициклооктенските лигнани изолирани од растенијата *Schisandra* (*Шизандра*). Меѓу нив, шизаненолот (**61**) изолиран од *S. rubriflora* бил најактивниот лигнан, кој ја инхибирал липидната пероксидација покрената од железо/цистеин кај микрозомите во црниот дроб на експериментален стаорец и го спречил опаѓањето на флуидноста на микрозомите во мембраната индуцирана од железо/цистеин (Слика 9.12).



Слика 9.12. Хемиска структура на хонокиол и магнолол (Haragashi, 2001)

Хонокиолот (**62**) и магнололот (**63**) се составните елементи на кората на *Magnolia obovata*. Овие неолигнани покажале активност на одземање на слободни радикали од DPPH (Lo et al., 1994) и спречување на микрозомската и митохондриската липидна пероксидација (Haraguchi et al., 1997c) (Слика 9.12).

10. Изолација на алкалоиди од дроги и бактерии

Активни природни продукти се оние хемиски соединенија произведени од живи организми кои предизвикуваат биолошки ефект врз други организми. Со изолација и соодветен третман на овие активни природни продукти, истите понатаму може да се користат за терапевтски цели, односно за превенција и лекување на одредени болести кај луѓето и животните.

Во истражувањата и развојот на активните природни продукти неопходен е мултидисциплинарен пристап, со цел соединување на знаењата од различни области и добивање на квалитетен производ.

Употребата на билни и други природни лекови има долга историја. Сепак, користењето на цели растенија или други сурови препарати поради терапевтски или експериментални причини, поседува извесни недостатоци:

- Варијација на количината на активната компонента во зависност од географската област, делот од растението кое се користи, климатските и еколошките услови;
- Присуство на несакани компоненти кои предизвикуваат синергистички, антагонистички, а можеби и непредвидливи модуляции во поглед на биоактивноста;
- Делумна или целосна загуба на биоактивноста поради варијабилноста при собирањето, складирањето и подготовката на суровините.

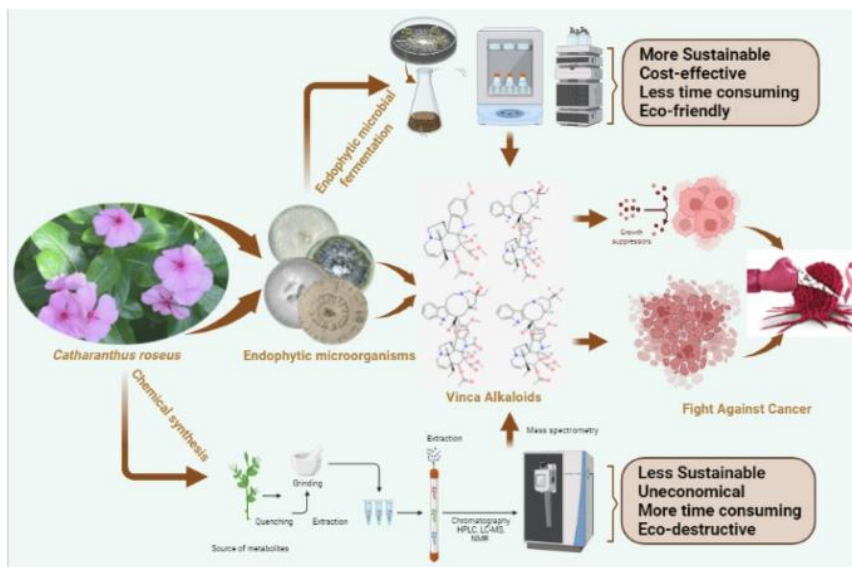
Употребата на природни дроги датира уште во далечното минато. Имено, во секојдневниот живот користиме: зачини, средства за ароматизација, парфеме, козметика, обоени супстанции за контрола и излекување од одредени болести, пестициди и инсектициди.

Во денешно време лековите најчесто се добиваат по синтетички пат, но сепак, употребата на активни природни продукти сè уште е актуелна. Природните активни продукти поседуваат комплементарни карактеристики со синтетските соединенија во поглед на: составот, масата, големината, функционалните групи, архитектонската и стехеометриската комплексност. Својата активност ја манифестираат преку инхибиција или активирање на функциите на протеините за кои тие се врзуваат.

Интересен податок е дека 61% од лековите кои се употребувале во периодот од 1981 – 2002 година биле природни продукти, деривати или имитација на природен продукт. Факт е дека светот денес не може да се замисли без активни природни продукти, па затоа, неопходна е нивна соодветна изолација, но и развој на нови активни природни продукти.

- **Винка алкалоиди**

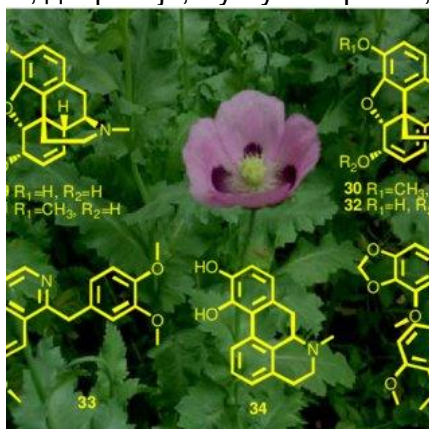
Винбластинот и **винкрестинот** претставуваат алкалоиди кои се изолирани од растението *Catharanthus roseus*. Екстракцијата на овие алкалоиди е прилично скапа, особено ако се земе во предвид дека се добиваат мали приноси од алкалоидите. Во последните неколку години најчесто се применува енантиселективна синтеза, при која се синтетизира само биоактивниот енантиомер (Слика 10.1).



Слика 10.1. Шематски приказ на изолација на винка алкалоиди (Bilir et al., 2010)

Винбластин и винкрестин може да се употребуваат за третман на дијабетес, односно тие претставувале првиот пример за алкалоиди кои потенцијално би можеле да се користат како орални хипогликемици. Овие алкалоиди претставуваат и составен дел од хемотерапијата при Хочкинов лимфом, белодробен канцер, тумор на мозокот, канцер на мочниот меур, канцер на тестисите и меланома.

Сепак, при употребата на винбластин и винкрестин треба да се внимава на дозата и на времетраењето на терапијата бидејќи може да дојде до голем број на несакани ефекти, освен во случаите кога нивната примена во зголемена доза или подолг временски период е повеќе оправдана, отколку манифестацијата на нивните несакани ефекти, како на пример, при појава на различните видови на канцер. Како и да е, несаканите ефекти ги вклучуваат вообичаените нарушувања на гастроинтестиналниот тракт (гадење, повраќање, дијареа), губење на косата, намалување на бројот на леукоцити и тромбоцити во крвта, зголемување на крвниот притисок, прекумерно потење, депресија, мускулни грчеви, вртоглавица и главоболки.



Слика 10.2. Структурна формула на винбластин и винкрестин (Li et al., 2010)

10.1. Полусинтетски аналози на винка алкалоиди

Винорелбинот и **виндесинот** претставуваат полусинтетски аналози на винка алкалоидите, односно винкрестинот и винбластинот.

Фармаколошка активност и употреба. Овие соединенија вршат инхибиција на тубулинската полимеризација, па како резултат на тоа, примарно се користат во комбинација со други хемотерапевтски агенси за третман на: леукемија, лимфоми, напреден карцином на тестисите, канцер на дојка, белодробен канцер и Капоши сарком.

Несакани ефекти. Со оглед на фактот што станува збор за полусинтетски аналози на винка алкалоидите, несаканите ефекти ќе бидат помалку изразени во однос на винка алкалоидите, но сепак треба да се внимава при употребата на овие соединенија.



Слика 10.3. Винорелбин инјекции (m.indiamart.com/proddetail/vinorelbine-injection-12190696591.html)

Паклитаксел (Таксол)

Паклитакселот е изолиран од кората на *Taxus brevifolia*.

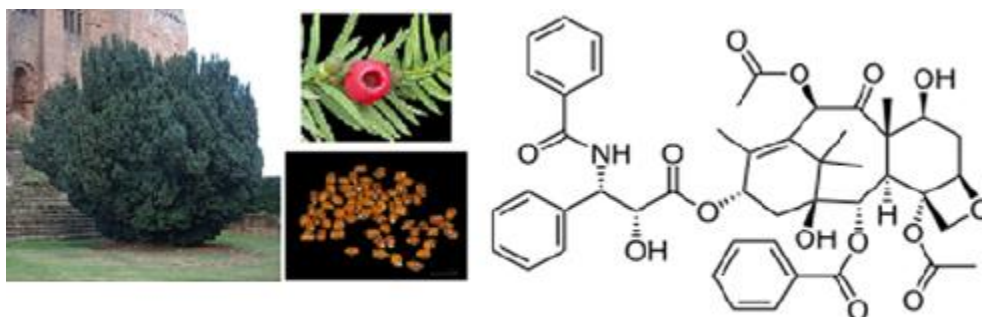


Figure 1. Chemical formula of Paclitaxel
(Source: Wikipedia)

Слика 10.4. Изолација на паклитаксел од *Taxus brevifolia* (Zhang et al., 2012)

Фармаколошка активност и употреба

Паклитакселот делува инхибиторно врз митотичката делба, па поради тоа може да се користи како хемотерапевтски агенс.

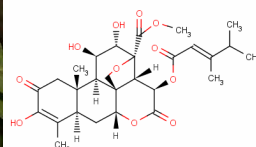
Несакани ефекти Најчести несакани ефекти на паклитаксел се: хипотензија, гадење и повраќање, артралгија, миалгија, алопеција, дијареа, хиперсензитивност, мукозитис, осип на кожата, абнормалност на ЕКГ, зголемена серумска алкална фосфатаза, зголемена серумска аспартатна аминотрансфераза, реакција на местото на инфузија, периферна невропатија и црвенило.

10.2. Растителни дроги во предклинички развој

Бруцеантин

Бруцеантин претставува соединение кое за првпат било изолирано од растението *Brucea antidysenterica*, дрво со голема распространетост во Етиопија. Во претклинички студии е докажана активност на ова соединение кај животински модели со голем број на тумори, но поради недостатокот на објективен одговор, клиничките студии и понатамошниот развој на бруцеантинот биле прекинати.

Во последно време повторно се јавува интерес за овој природен продукт поради фактот што предизвикува намалување на регулацијата на клучниот онкопротеин (с-тус), па според тоа, бруцеантинот би можел да се користи како средство за третман на хематолошки малигноми.

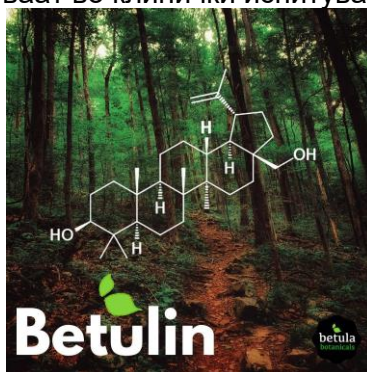


Слика 10.5. *Brucea antidysenterica* и структурна формула на бруцеантин (www.malawiflora.com/speciesdata/image-display.php?species_id=194270&image_id=3)

Бетулинска киселина

Бетулинската киселина претставува тритерпен од растително потекло, кој може да се изолира од голем број на растенија. Сепак, главен извор на бетулинската киселина е брезата (*Betula* spp.).

Ефикасното цитотоксично дејство врз клеточни линии од канцер и *in vivo* активност кај животински модели со хуман меланомен ксенографт биле одлучувачките моменти кои поттикнале развој на системски и топикални формулации со бетулинска киселина кои би можеле да се употребуваат во клинички испитувања.



Слика 10.6. *Betula* spp. и структурна формула на бетулинска киселина (www.betulabotanicals.com)

Дополнително, бетулинската киселина покажала антибактериски, антиинфламаторни и антимааларични ефекти, но најважниот ефект се однесувал на инхибиција на репликацијата на соеви на HIV вирусот.

10.2. Анти-канцерни агенси кои се користат во медицински цели, добиени од микробни извори

10.3.1. Микробни дроги во клиничка употреба

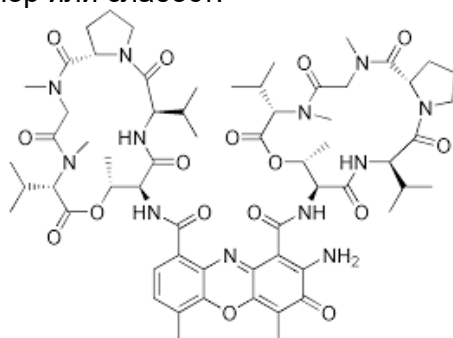
Актиномицин Д

Првиот агенс што се добива од микробни супстанции и што се користел во клинички цели е **актиномицин Д**, познат и како **дактиномицин**.

Претставен е во 1960-тите години, се добива од бактеријата *Streptomyces parvullus*. Се администрира интравенски за лекување на голем број видови на ракцер.

Фармаколошка активност и употреба. **Актиномицин Д** претставува лек за хемотерапија кој се користи за лекување на голем број видови на рак, вклучувајќи ги Вилм тумор, рабдомиосаркома, Јуинг саркома, трофобластна неоплазма и одредени видови рак на јајниците.

Несакани ефекти. После подолготрајна употреба, освен посакуваните ефекти може да се јават и несакани ефекти, вклучувајќи ги: црна и таложена столица, крв во урината или столицата, кашлица или засипнатост придружена со треска, дијареа, потешкотии со голтањето, треска, металоиди, болки во долниот дел на грбот, болно или тешко мокрење, црвени дамки на кожата, рани во устата и на усните, болка во стомакот, невообичаен замор или слабост.



Слика 10.7. Структурна формула на актиномицин Д (дактиномицин)

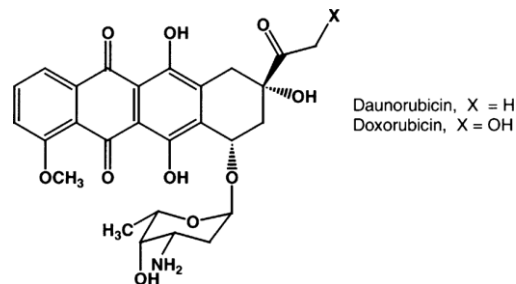
Даунорубицин и доксорубицин

Една од најважните класи на микробиолошки агенси е **антрациклините**, каде припаѓаат **даунорубицин** и неговиот дериват **доксорубицин**. Механизмот на делување на овие молекули е преку инхибиција на топоизомеразата II, еден од важните ензими во реплицирачкиот пат на ДНК за време на клеточното циклусирање.

Фармаколошка активност и употреба. Овие молекули се употребуваат во хемотерапија во третман на ракцер. Се користат во третман на: рак на дојка, рак на мочниот меур, Капоши сарком, акутна лимфоцитна леукемија. Се администрира интравенски.

Несакани ефекти. Заедно со потребните ефекти, овие молекули можат да предизвикаат и несакани ефекти, од кои најчести се: кашлица или засипнатост, треска, нередовно отчукување на срцето, болки во долниот дел на грбот, болка на местото на инјектирање, болно или тешко мокрење, скратен здив, оток на нозете.

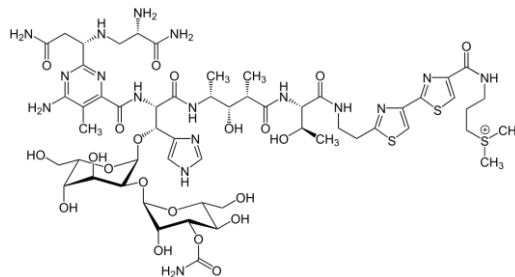
Покрај овие несакани ефекти исто така можат да се појават и одложени несакани ефекти, кои се јавуваат после неколку месеци или години. Одложените несакани ефекти може да вклучуваат одредени видови на карциноми.



Слика 10.8. Структурна формула на даунорубицин и доксорубицин

Блеомицин

Блеомицин припаѓа во групата на гликопептолидни антибиотици. Се добива од бактеријата *Streptomyces verticillus*. Се смета дека првично делува преку расцепување на ДНК, но неодамнешните студии укажуваат на тоа дека главен механизам на дејство може да биде инхибиција на т-РНК.



Слика 10.9. Структурна формула на блеомицин

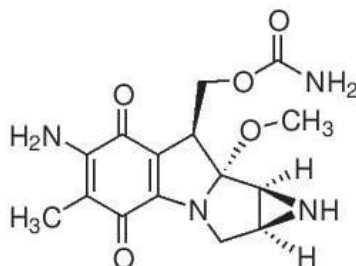
Фармаколошка активност и употреба. Блеомицин е лек кој се користи за третман на рак. Се користи во хемотерапија за Хочкинов лимфом, не-Хочкинов лимфом, рак на тестиси, рак на јајници, рак на грлото на матката. Вообичаено се користи со други лекови. Се администрира интравенски, со инјекција во мускул или под кожата. Исто така може да се администрира во градите за да се спречи повторување на течност околу белите дробови поради рак.

Несакани ефекти. Заедно со потребните ефекти, овие молекули можат да предизвикаат и несакани ефекти, од кои најчести се: треска, кашлица, скратен здив, рани во уста и на усни, збунетост, слабост.

Покрај овие несакани ефекти исто така можат да се појават и одложени несакани ефекти, кои се јавуваат после неколку месеци или години. Одложените несакани ефекти може да вклучуваат одредени видови на рак, како леукемија.

Митомицин Ц

Митомицин Ц се изолира од бактеријата *Streptomyces caespitosus*. Се користи како хемотерапевтски агенс врз основа на неговата антитуморска активност. Се администрира интравенски.



Слика 10.10. Структурна формула на митомицин Ц

Фармаколошка активност и употреба. Се употребува за лекување на рак на горниот гастроинтестинален тракт (пример. езофагеален карцином), анален карцином, рак на дојка, површински тумори на мочниот меур.

Несакани ефекти. Најчести несакани ефекти се: црна и таложена столица, крв во урината или столицата, кашлица или засипнатост, треска, болки во долниот дел на грбот, болно или тешко мокрење, црвени дамки на кожата.

Исто така, поради начинот на кој лековите за рак делуваат на телото, постои можност тие да предизвикуваат други несакани ефекти кои може да се јават после неколку месеци или години по употребата на лекот.

10.4. Антитуморни лекови добиени од секундарни метаболити на виши растенија

Камптотехин (Camptothecin) е пирано-изохинолински алкалоид примарно изолиран од кора и дрво од *Camptotheca acuminata* и други делови од истото растение, а подоцна во поголем процент изолиран е и од други растенија. Антиканцерната активност на екстракт од лист од *C. acuminata* е откриена многу одамна. **Камптотехин** (Camptothecin) и неколку од неговите полусинтетски аналози се применуваат како клинички антиканцерни лекови (Chari et al., 1992).

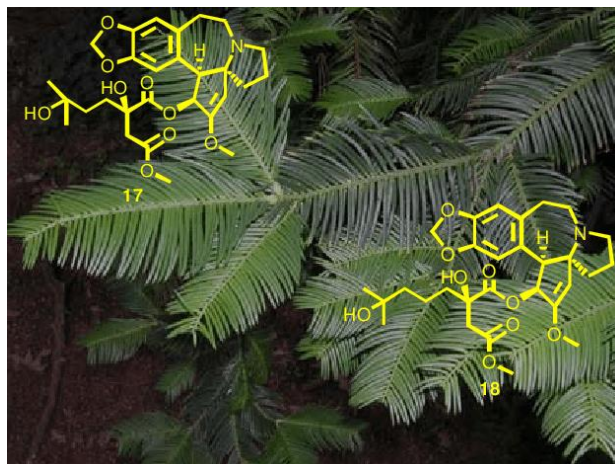


Слика 10.11. Хемиска структура на камптотехин (Changxing et al., 2020)

Елиптицин (Elipticin) е антинеопластичен алкалоид кој поседува карактеристично својство на зелена флуоресценција, за кое е пријавено дека е присутно кај многу растенија од фамилија *Apocinaceae*.

Индицин и индицин N-оксид (Indicin и Indicin N-oxide) се пиролизидински алкалоиди изолирани од *Heliotropium indicum* и се причина за неговата хепатотоксичност. Индицин N-оксид покажал висока активност против различни анимални тумори поради што бил избран за кандидат за клинички испитувања. **Хомохарингтонин и харингтонин** (Homoharringtonine и harringtonine) се антитуморни алкалоиди чиј што

основен механизам на дејство е инхибиција на ДНА и протеинска синтеза и инхибиција на клеточен раст (Chen and Liu, 1994).



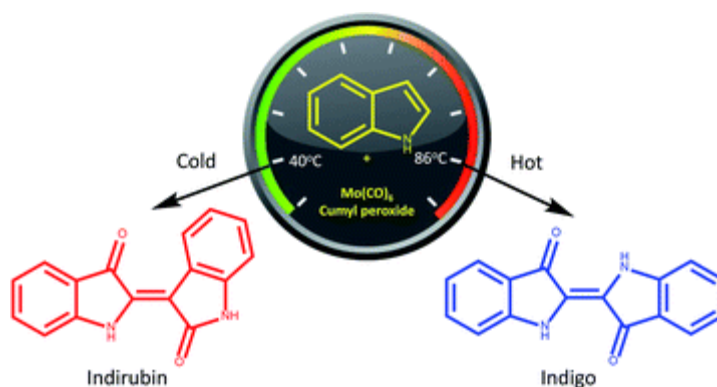
Слика 10.12. Хемиска структура на херингтонин и хомохарингтонин (Li et al., 2010)

(+)-Тетрандин (+)-Tetrandrine е бисбензилизохинолински алкалоид кој покажува антиканцерна активност против клетки отпорни на лекови, преку модулација на Р-гликопротеинот. Покрај антиканцерогено дејство поседува и антиинфламаторни, имunosупресивни, хипотензивни и кардиоваскуларни ефекти. **Еметин** (Emetine) е бензилизохинолин-изохинолински димерен алкалоид кој претставува корисен системски амебицид за третман на тешка инвазивна интестинална и екстраинтестинална амебијаза. Докажано е дека има неспецифичен антигрануломатозен ефект. **Колхицин** (Colchicine) е одамна познат по неговата антитуморна активност меѓутоа клинички не се употребува за оваа намена поради неговата висока токсичност. Во канцер истражувањата наоѓа примена како референтен стандард за проценка дали другите лекови имаат слична анти-микротубуларна активност. **Акроницин** (Acronycine) е хемитерпен акридонски алкалоид кој поседува способност да инхибира вметнување на уридин, цитидин и други нуклеозиди, што води до инхибиција на нуклеозидниот транспорт низ клеточната мембрана (Chalandre et al., 1986). **Мејтанзин** (Maytansine) е исклучително интересен антинеопластичен агенс со многу широк спектар на делување. Резултатите од клиничките испитувања на Maytansine не биле многу ветувачки, меѓутоа за комплексот Folate-maytansinoid било пријавено дека покажува висока цитотоксичност и извонредна селективност кон одреден фолатен рецептор. Исто така за коњугатот антиген-Maytansine било утврдено дека покажува висока антиген-специфична цитотоксичност кон култивирани човечки канцер клетки. **Подофилотоксин** (Podophyllotoxin) претставува димерен фенилпропаноиден лиганд изолиран од *Podophyllum peltatum* L. (Berberidaceae). Смолата добиена со преципитација од алкохолан екстракт на сурова кора со додавање на вода се нарекува podophyllin. Механизмот на дејство на подофилотоксинот е сличен на оној на колхицин, имајќи способност да го наруши соборот на микротубулите и на тој начин да ја прекине метафазата при делба на клетка. **Епиподофилотоксин** (Epidodophyllotoxin) дериватите VP-16 (**132**) and VM-26 (**133**) како резултат на нивната помала токсичност во однос на подофилотоксин биле одобрени за третман на канцер на мали клетки во бели дробови, рак на тестиси, меланом, акутна леукемија, карцином на желудник, рак на дојка и овариуми (Boyd, 1997). **Курзеренон**, **курдион** и **куркумол** (Curzerenone, curdione и curcumol) се главни состојки во есенцијалното масло кое се добива од *Zingiberis rhizoma*. Растението поседува скелет на бензофурански сесквитерпен, кој покажува инхибиторно активност за Ehrlich карцином и други видови на тумори. Се

употребувал како клиничка дрога за третман на карцином на цервикс и карцином на кожа (Voit, 1961).

Госипол (Gossypol) бил изолиран од памучни растенија, како *Gossypium hirsutum*, *G. barbadense* и *Hibiscus tiliaceus*. Gossypol е познат како ефективна орално контрацептивна дрога. Фармаколошки, има антисперматоген ефект така што го спречуваат навлегувањето на сперматозоидите во ооцитите. Клинички се употребува при бенигни гинеколошки состојби и кај пациенти со канцер, вклучувајќи stomачен, езофагијален, црно дробен, како и тумор на мочен меур и дојка. Показува минимални несакани ефекти и нема миелосупресивна токсичност. Било истакнато дека L-енантиомерот на Gossypol индуцира дозно-зависен ефект на клеточно убивање кај меланоми и туморни клетки кај бели дробови, дојка, цервикс, леукемија *in vitro*.

Индирубин (Indirubin) изолиран од *Indigo naturalis Adans*, *Indigofera tinctoria L.* (*Leguminosae*), and *Baphicacanthus cusia Bremek* биле долго користени во традиционалната кинеска медицина.



Слика 10.13. Разлика во хемиска структура на индирубин и индиго при промена на температура (Shriver et al., 2022)

После системска анализа бил изолиран и било откриено дека покажува инхибиторни ефекти кај хронична гранулоцитна леукемија после клиничка употреба.



Слика 10.14. Антиоксидативен потенцијал на деривати на индирубин (Lei et al., 2017)

Ликобетаин (Lycobetaine) е семисинтетски дериват добиен од природен lycogine, кој бил изолиран од растенија од фамилија *Amaryllidaceae*. Показал антитуморни ефекти против неколку анимални тумори, како Ehrlich карцином, сарком 180, Yoshida сарком. Покрај тоа, *in vitro* тестот за цитотоксичност покажал дела инхибира неколку хумани линии на туморски клетки, вклучувајќи карцином на дојка, фибросаркома, канцер на бели дробови, како и винбластин-резистентни KB клетки. Клиничките извештаии покажуваат дека оваа дрога е ефикасна при карцином на

желудник и карцином на овариуми. Lycobetaine не се врзува ковалентно за DNA и не предизвикува DNA алкилација.

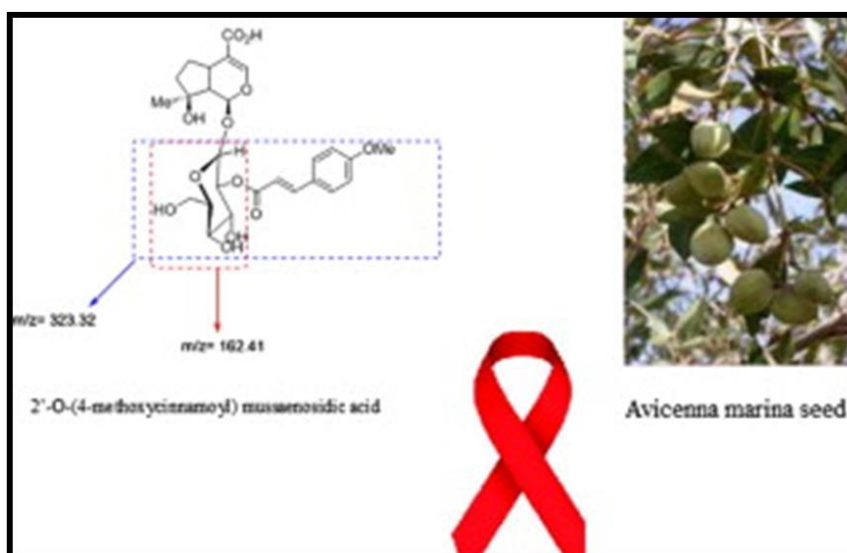
Монокроталин (Monocrotaline) е изолиран од *Crotalaria species*. Иако е пријавено дека дрогата се користи за карцином на матка и кожа, најновите истражувања покажале дека дрогата има токсичен ефект односно дека предизвикува вено-оклузија на црн дроб, пулмонарна артериска хипертензија и вентрикуларна хипертрофија, поради што денес се користи само за карцином на кожа. *Rabdosia rubens* Hamst се користел во народната медицина за лекување на рак на хранопровод и стомак. Oridonin е изолиран од ова растение и покажува антитуморни ефекти за сарком 180, а клиничките истражувања покажале дека овој антитуморен лек има активност врз доцен езофагијален карцином. Студиите покажале дека алфа-метилен циклопентанон и спиронолактон-алдехидните компоненти се одговорни за неговото фармаколошко дејство.

Триптолид и трипдиолид (Triptolide и triptidiolide) претставуваат два активни дитерпени кои покажале инхибиторен ефект врз L-1210 леукемија. Овие соединенија се изолирани од *Tripterygium wilfordii* Hook f. (Celastraceae) за кое неодамна е пријавено дека има антиревматски, имуносупресивен ефект и дека предизвикува неплодност.

11. Природни продукти како анти-ХИВ агенси

Природните продукти претставуваат богат и голем извор на фитохемикални кои кои се вредни за испитување како можни анти-ХИВ агенси. Бројни протеини и полисахариди изолирани од растенијата е докажано дека имаат потентна инхибиторна активност против ХИВ инфекцијата *in vitro*. За жал, овие макромолекули не се идеални терапевтски агенси бидејќи не се апсорбираат соодветно земени орално и лесно предизвикуваат алергиски реакции аплицирани интравенски. Оттука, акцентот во овој учебник ќе биде ставен на анти-виралните карактеристики на ароматичните компоненти кои се најмногу застапени во многу лековити растенија и имаат различни биолошки карактеристики.

Од *Avicenna marina* семе се екстрахира **2'-O-(4-метоксицинамоил) музаенозидна киселина**.



Слика 11.1. Структурна формула на 2'-O-(4-метоксицинамоил) музаенозидна киселина изолирана од Авицена марина семе (Farshid et al., 2023)

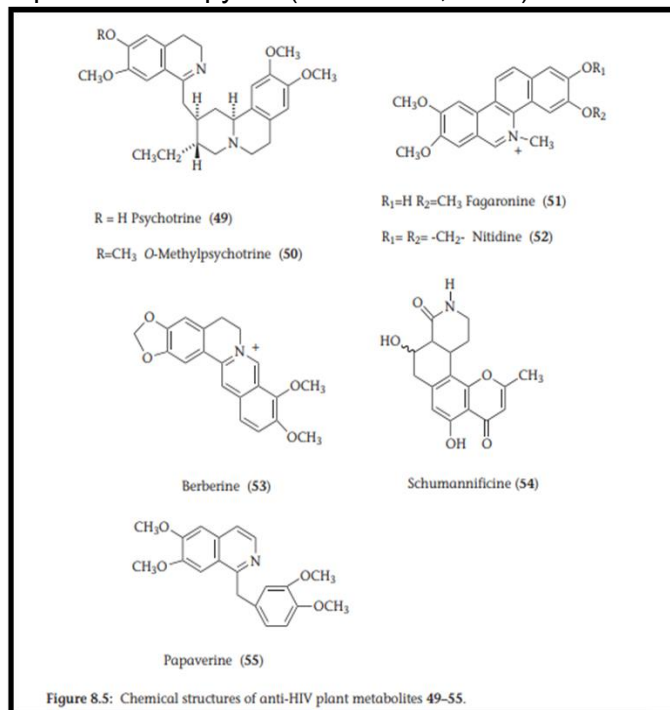
Од сите тестирани флавоноиди, мирицитин, каемферол (тетрахидроксифлавоноид) и неговите 3-O-гликозиди, предизвикаа значителна инхибиција на ХИВ-1 инфекција кај нетоксична концентрација. **Механизмот на дејство** на флавоноиди 17, 20, 22, 23 и флаванани 37, 38 и 40 е слична на онаа на флавоноиди кои ја инхибираат интеракцијата

со gp120 / CD4 во зависност од дозата начин. Сепак, **кверцетин** (23), **мирицитин** (17), **таксифолин** (40) и флавани се помалку специфични и инхибираат протеаза на вирусни ензими додека RT се мери со специфични методи со користење на вирусни ензими. Спротивно на тоа, **кемферолот** (19) е многу специфичен за инхибиција на протеазата, само во концентрации кои се не токсични за клетките. Исто така ја инхибира вирусната инфективност од хронично инфицирани Н9 клетки. **Кверцетин** (23) и сродни **пентахидроксифлавонони** исто така, се индикативни за инхибиција на ензим интегразата, но хризин, дихидроксифлавононот бил неактивен (Houghton et al., 1994).

Флавоноидите структурно наликуваат на нуклеозиди и фолна киселина. Тие имаат силен афинитет за врзување на протеини и тешки метали и се способни да ослободат радикали. Флавоноидите се прочистени од голем број лековити растенија и биле детално проучени нивните инхибиторни својства против ХИВ-инфекцијата на клетките на С8166 и исто така во хронично инфицирани Н9 клетки. Било пронајдено дека малите разлики во нивните структури имале големо влијание врз нивните инхибиторни својства и специфичност. **Флаваните покажуваат најселективна анти-ХИВ активност** (Kashiwada et al., 1995).

• Алкалоиди

Психотриндихидроген оксалат (49) и **хепатихидрат на О-метилпсихотрин сулфат** (50), соли на изохинолинските алкалоиди се покажа дека се потентни инхибитори на активноста на ДНК-полимеразата на хуман имунодефициентен вирус-1 реверзна транскриптаза (ХИВ-1 RT). Растенијата од семејства *Rutaceae* и *Paravogaseae* се добро познати за поседување на интересна класа на изохинолински алкалоиди со забележливи биолошки својства. **Фагаронин хлорид** (51), **нитидин хлорид** (52) и **берберин хлорид** (53) типичен претставник на протекберберин алкалоиди го инхибираат ХИВ вирусот (Lavie et al., 1989).



Слика 11.2. Хемиска структура на анти-ХИВ метаболити (Gordon et al., 2010)

Михеламини А (56), В (57) и С (58), димерни нафтилизохинолински алкалоиди од *Ancistrocladus korupensis* биле испитувани на ХИВ-1, вклучувајќи AZT-резистентни соеви и ХИВ-2. Биохемиски студии на механизмот на дејствување од најмоќните и изобилни членови на серијата, **Михеламин Б (Michellamine B) (57)** (Boyd et al., 1994), покажаа дека овој алкалоид дејствува, и во рана фаза од ХИВ-животниот циклус со инхибиција на реверзна транскриптаза (РТ), како и во подоцнежните фази со инхибиција на клеточната фузија и формирање на синцитиум.

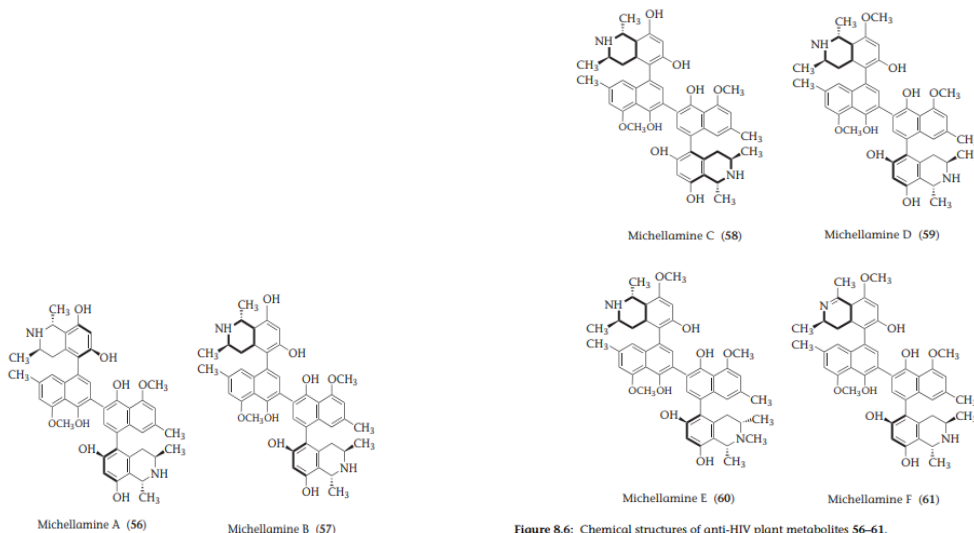


Figure 8.6: Chemical structures of anti-HIV plant metabolites 56–61.

Слика 11.3. Хемиска структура на Михеламин А и Б (Gordon et al., 2010)

Хиперицин и псевдохиперицин се полициклични хинони, кои се присутни во растенијата од родот *Hypericum*, од кои најпознат е *Hypericum perforatum*. Овие соединенија интерферираат со вирусните клетки. Сончевата светлина е од суштинско значење за сите антивирусни ефекти на двете соединенија. По осветлувањето, хиперицинонот и псевдохиперицинонот ги деактивираат сите вируси, кои дејствуваат како вирусисни агенси и ја деактивираат активноста и на реверзната транскриптаза на интактните вируси. Разликата во активностите помеѓу хиперицин и псевдохиперицин е важна дополнителна опсервација. Со главна заедничка структурна карактеристика на јадрото на осум слични ароматични прстени опкружени со шест фенолни хидроксиди, супституцијата за седмата хидроксилна група која се јавува кај псевдохиперицин јасно ја намалува антиретровирусната активност. Тие исто така се потентни инхибитори на ензим протеин киназата С. Неодамна, тримерниот **нафтохинон, кококурвонот**, изолиран од екстракт од вид *Canospermum spp.*, се покажал како анти-ХИВ-агенс кој делува преку спречување на репликацијата на ХИВ во хуманите Т-лимфобластични клетки.

• Кумарини

Дериватите на кумарин се друга класа на полициклични соединенија за кои е потврдено дека имаат анти-ХИВ својства *in vitro*. Инофилите екстрахирани од *Calophyllum inophyllum*, се инхибитори на РТ и ХИВ репликација во клеточните култури. **Каланолиди А и Б** изолирани од листовите на *Calophyllum lanigerum* ја инхибираат *in vitro* репликацијата на ХИВ-1 кај лимфобластичните клетки, но се неактивни против ХИВ-2.

- **Лигнани**

Два лигнанолиди од типот на **добензилбутиролактон** од типот- арктигенин и - трахелогенин изолирани од *Forsythia intermedia* и *Ipomea cairica*, покажале дека ја инхибираат репликацијата на ХИВ-1 кај инфицираните човечки клеточни системи. Директна фракција на етанолен раствор од *Kadsura interior* овозможила изолација на 12 лигнани и сите соединенија биле евалуирани според нивната инхибиторна активност ХИВ-1 репликацијата во инфицираните Н9 клетки. Активните природни **лигнани** содржат циклооктански прстен кој ги поврзува бифенилниот прстенест систем, кој е заменет со метокси и или метилендиокси групи. За да се одреди оптималниот модел на бифенил замена, биле евалуирани пет изомерни бифенилни соединенија. Активноста на бромирани деривати била исто така евалуирана. **Гомизин-Г** има најголема анти ХИВ активност **Шизантерин-Д**, **кадсуранин** и **шизандрин-Ц**.

Во некои случаи, анти-ХИВ-активноста на суровиот екстракт се чини дека се должи на комбинирани ефекти на голем број на соединенија со различни специфичности. Меѓу природните алкалоиди кои понатаму се испитуваат како потенцијал во систематска терапија и профилакса на ХИВ инфекции се - **каланолид А**, инхибитор на реверзна транскриптаза и **мишеламин Б**, инхибитор на клеточна фузија и **кастаноспермин**.

12. Антималарични и антиоксидантни природни продукти

При инфекција со маларија, хемот кој останува од хемоглобинот е отровен за паразитите, можеби затоа што е зголемена редуцирачката моќ на железо. За да се избегнат некои токсичните ефекти настанати од маларијата, паразитите ќе го претвораат хемот во полимерен **хемозоин** или така познат како **β -хематин** или **маларија-пигмент**. Познати се некои хинолинските антималарици како што е **хлорокин (1)**, **хинин (2)**, **мефлокин (3)** и **халофантрин (4)**. **Артемисинин** се чини дека можат да ја инхибираат полимеризацијата со алкилирање на хем групата. Пероксидните антималарици имаат многу малку несакани ефекти. Артемисинин често се користат во комбинација со други антималарици како што се мефлокин или тетрациклини. Причината поради која повеќе се употребува мефлокин и халофантрин е поради тоа што хинолинкарбиноламин хининот има мала терапевтска ширина, тоа значи дека разликата помеѓу терапевтската доза и токсичната доза е многу мала, што го отежнува одредувањето на доза. Друг недостаток на кинин е развој на отпорност кај паразитите. Се верува дека лекот дејствува со инхибиција на хемиска полимеризација. Пронајдени се други хинолинкарбиноламини во кората *cinchona*, особено квинидин. **Квинидин** е диастереоизомер на кинин во кој јаглерод и соседниот стерожен јаглерод има спротивна конфигурација (Chen et al., 1994).

Неколку видови на родот *Alstonia*, исто така се користат во традиционалната медицина за третман на маларија. Главниот алкалоид, **Ехитамин** покажал само слаба антималарична активност, додека другите два минорни хинолински алкалоиди, **Кориалстонин** и **Кориалстонидин** покажуваат активност против маларија *in vitro*. Освен алкалоидите присутни во традиционалната медицина, хинолинкарбиноламините, се единствените алкалоиди кои се уште се користат клинички (Christensen et al., 1994).

Декоктите на *Strychnos myrtiloides* се користат како адјуванти во традиционалната медицина за третман на маларија. Силниот ефект на *strychnos* алкалоидите на централниот нервен системот, сепак, ја ограничува нивната употреба како антималарични лекови.

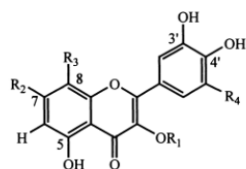
Chorizantho diffusa

Chorizantho diffusa Benth. (Polygonaceae), претставува еден од првичните растителни екстракти кои биле откриени дека покажуваат биолошка активност со *in vitro* анализи. Ратворлив екстракт од етил ацетат од целото растение покажал значајна антиоксидантна активност врз основа на активноста на чистење на стабилните слободни радикали на 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил (DPPH) и инхибиција на 12-О-тетрадеканоиловорбол 13-ацетат, што резултира со формирање на слободни радикали со култивирани HL-60 клетки. Фракционирањето на активниот екстракт од *C. diffusa*, водено со биоесеј, со користење на антиоксидантната анализа на DPPH довело до изолација на еден нов (19) и четири познати (15, 20-22) флавоноиди (Cragg et al., 1997). Податоците од UV и ¹H- и ¹³C-NMR сугерираат дека 19 е флавон Било очигледно дека 19 содржи пет хидроксилни групи и две OMe групи. Релативните локации на овие функционалности биле утврдени од набљудувањата кои ги дале NMR спектрите како и UV спектрите. Познатите флавоноиди, 5,7,3,4-тетрахидрокси-3-метоксифлавонон (20), 5,8,3,4-тетрахидрокси-3,7-диметоксифлавонон (21), кверцетинот (15) и 3-О-ацетилкверцитрин (22) исто така се изолирани од *Chorizantho diffusa*.



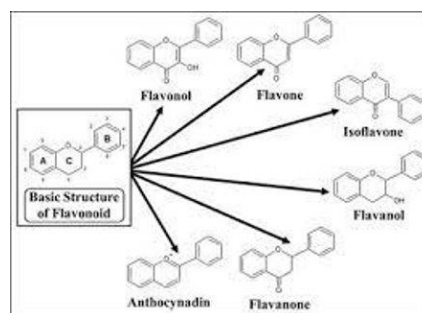
Слика 12.1. *Chorizanthe diffusa* (www.calflora.org/entry/occdetail.html?seq_num=io67976)

Флавоноидите 15, 19 и 22 биле споредувани во активноста како чистачи на слободните радикали во анализата на DPPH, кога ќе се споредат со кофеинска киселина, гална киселина, соодветно. Соединенијата 20 и 21 биле само умерено активни во оваа анализа, како и во анализата за гаснење на слободните радикали. Три од изолатите исто така биле евалуирани за антимураген потенцијал во анализа на напредна мутација со *Salmonella typhimurium* сојот и било откриено дека соединенијата 19 и 20 биле многу активни во овој поглед. Понатаму, соединенијата 15 и 19-22 биле евалуирани за нивниот потенцијал да ги инхибираат пренеопластичните лезии со млечни жлезди на глувци во органска култура. 5,7,3,4-тетрахидрокси-3-метоксифлавонон (20) и кверцетин (15) посредувале значајна инхибиторна активност и на тој начин биле оценети како добри кандидати за целосна евалуација во експерименталниот модел на карциногенеза.



- 19 $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{OCH}_3, R_3 = \text{OH}, R_4 = \text{OH}$
 20 $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}, R_4 = \text{H}$
 21 $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{OCH}_3, R_3 = \text{OH}, R_4 = \text{H}$
 22 $R_1 = \text{rha-3-Ac}, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}, R_4 = \text{H}$

Figure 5.2: Flavonoids isolated from *Chorizanthe diffusa*. (Rha = *l*-rhamnopyranosyl.)



Слика 12.2. Изолација на биоактивни компоненти од *Chorizanthe diffusa* (Sarker and Nahar, 2012)

Daphniphyllum calycinum

Daphniphyllum calycinum Benth. (*Daphniphyllaceae*) е растение кое било избрано за фракционирање, каде било откриено дека неговиот екстракт растворлив во етил ацетат значително го инхибира формирањето на пренеопластични лезии предизвикани од DMBA во културата на органот на млечната жлезда на глувчето. Сепак, во различните *in vitro* анализи достапни за проектот, единствената прикажана активност била *in vitro* антиоксидантната активност во анализа на слободните радикали на 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил.



Слика 12.3. *Daphniphyllum calycinum* (Yang et al., 2021)

Фракционирањето управувано со биоанализа довело до изолација на нови соединенија, рутинозид (23), и позната состојка, кемпферол (24). Се чини дека слабата активност на овие состојки е одговорна за оригиналната антиоксидантна активност на екстрактот од *D. Calycinum*. Прелиминарните анализи на рутинозидните UV, IR, NMR податоци покажале дека се работи за флавоноид гликозид. Флавоноидниот дел од молекулата 23 била лесно воспоставена како кемпферол. Исто така, била предложена 1 → 6 поврзаност помеѓу рамнозилната група и глукозилната единица, во согласност со структурата на рутинозид. Поради нивната ниска моќ како антиоксиданси, не биле планирани дополнителни студии (Cohen et al., 1997).

Mundulea sericea

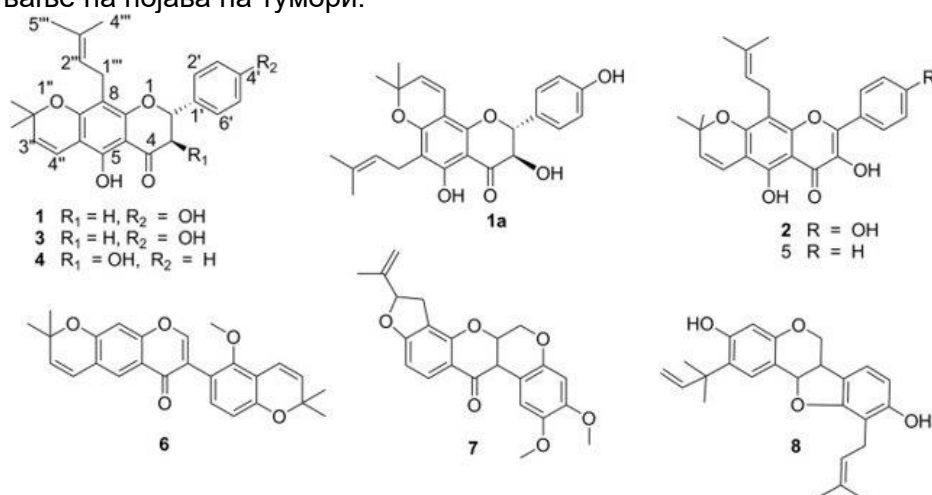
Mundulea sericea (Willd.) A. Chev. (Syn. *M. suberosa* Benth.) (Fabaceae) е растение кое имало широка етноботаничка употреба како афродизијак, отров за риби и инсектицид. Биле направени неколку фитохемиски студии на овој вид што довеле до изолација на халкони, флавонони, изофлавонони, ротеноиди и дериват на имидазол. Етил ацетатниот екстракт од кората на *M. sericea* покажал многу силни инхибиторни ефекти против активноста на орнитин декарбоксилаза (ODC) индуцирана од форбол естер во клеточна култура. Самото истражување довело до изолација и спектроскопска карактеризација на дванаесет активни флавоноиди (25-36), кои содржат два халкони, два флаванони, два флаваноли, два изофлавонони и четири ротеноиди.



Слика 12.4. *Mundulea sericea* (lifestyleseeds.co.za/product/mundulea-sericea/)

Мунсеричин (26), е всушност новиот халкон кој бил изолиран од кората на *M. sericea* во истражувањето. Прелиминарната анализа на спектрални податоци покажале дека

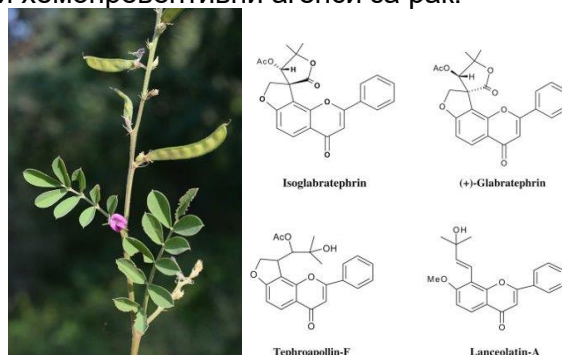
соединението 35 е дериват на C-13 хидроксилиран дегулин (Слика 12.6). Била потврдија стереохемијата на *cis* В/С прстенот на ова ново соединение. Соединението 36 структурно бил воспоставен како 13-хидрокситефросин на сличен начин како дегулинот. Помеѓу изолатите добиени од *M. sericea*, ротеноидите дегулин и тефрозин покажале исклучително моќна активност во анализата додека хидроксилираните соединенија 35 и 36 биле помалку активни од нивните соодветни матични соединенија во оваа анализа. Мунетонот (32), друг претставник од флавоноидите има потенцијал да служи како хемопревентивен агенс за рак со спречување на појава на тумори.



Слика 12.5. Хемиски структури на најзастапени флавоноиди во *Mundulea sericea*

Tephrosia purpurea

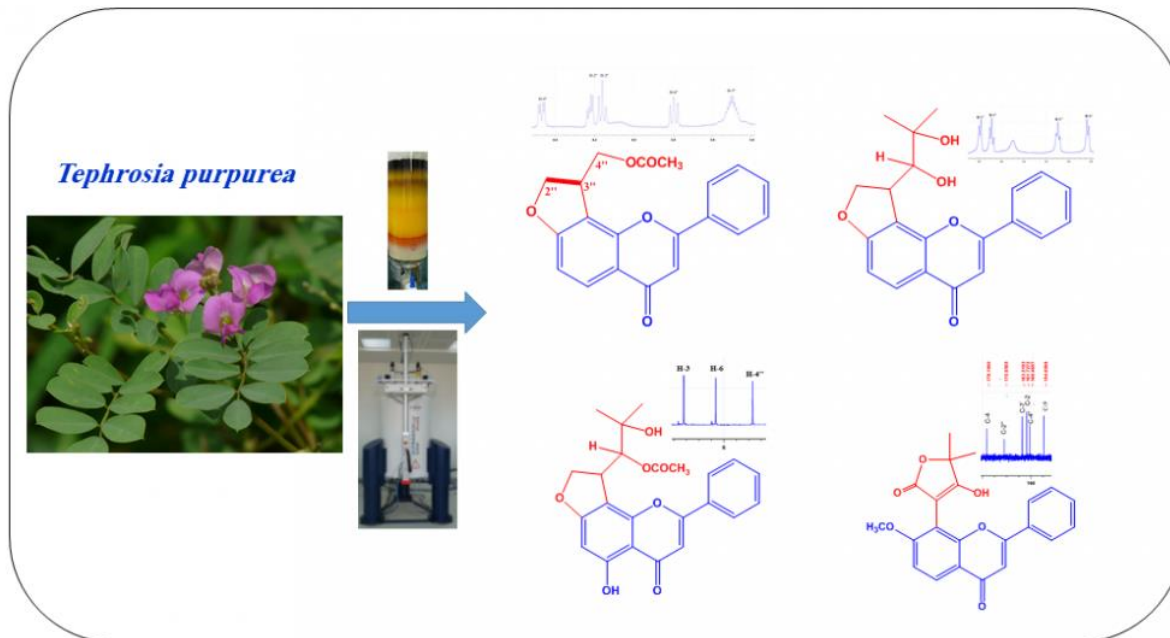
Ова растение има многу медицински намени, вклучително и како антхелминтик и прочистувач на крвта, како и во третман на астма, дијабетес, дијареа, диспепсија, едем, гонореја, ревматизам и уринарна болест. Покрај тоа, растението се употребува како инсектицид и отров за риби. Претходните фитохемиски испитувања резултирале со изолација на кумарини, флаванони и ротеноиди. Во прелиминарниот скрининг, екстрактот од етил ацетат од целото растение прикажало позитивни резултати во една од ин витро анализите, имено, индукција на активност на хинон редуктаза (QR) со култивирани клетки од хепатом на глвчето. Индукција на ензими од фаза II, како што се NAD(P) хинон редуктаза и глутатион S-трансфераза, е важен механизам на одредени хемопревентивни агенси за рак.



Слика 12.6. *Tephrosia purpurea* и активни компоненти (Youssef et al., 2023)

Фракционирањето на екстрактите следено со биоанализа довело до изолација на осум биолошки активни соединенија со системот за анализа на QR, вклучително и два

нови флавоноиди, имено, (+)-тефропурпурин (37) и 7,4-дихидрокси-3,5-диметокси - изофлавоон (38) и шест познати флавоноиди, понгамол (39), (+)-пурпурин (40), ланцеолатин Б (41), (-)-макиаин (42), (-)-4-метоксимакиаин (43), и (-)-медикарпин (44).



Слика 12.7. Хемиска структура на биоактивни компоненти од *Tephrosia purpurea* (Abdel-Kader et al., 2021)

13. Изолација и карактеризација на биоактивни компоненти на цвет и лист од трника (црн трн, дива слива)

Црн Трн (*Prunus spinosa* L.) е повеќегодишно растение кое расте како трнлива, листопадна грмушка на падини, на диви необработени површини. Формира густа крошна со сложени гранки и може да порасне до 5 метри во висина. Трнливите пупки се глобуларно-овални со црвено-кафеава боја со повеќе или помалку влакна, а кората е темно сива. Листовите се наизменично долги 2–5 и 1–2 cm, зелена боја, превртена јајцевидна или елипсовидна форма, со ситно назабени рабови и со влакна обично на долната страна на листот. Стеблата долги 0,2–1 cm и исто така содржат влакна. Стипулите се издолжени и назабени и обично се подолги од ливчињата. Цветовите се бели, широки 1-1,7 cm и обично се осамени и се појавуваат на стебленца долги околу 0,5 cm. Ливчињата се триаголно-овалести и често назабени. Секој цвет содржи околу 20 прашници жолти или црвени долги до 0,5 cm. Плодот е со големина од 1–1,5 cm, кружен и со виолетова боја.



Слика 13.1. Црн Трн (*Prunus spinosa* L.) (Vulić, 2017)

Цветовите и лисјата од трње содржат значителни концентрации на флавоноиди, од кои некои се најчестите деривати на флавонол (камферол, кверцетин и нивните гликозиди со арабиноза, рамноза и ксилоза). Исто така, цветовите содржат проантоцијанидини тип А, додека во листовите може да се најдат концентрации на каротеноиди и норизопреноиди. Двата дела на растението содржат фенолни киселини. Освен флавоноиди, цветовите и листовите содржат и стероли и тритерпени. Во цветоите има концентрации на тритерпен алкохол од кои се идентификувани α - и β -амирини, од кои повеќе β -амирин. Исто така, олеинската и урсолната киселина беа идентификувани од мешавината на тритерпенични киселини, со повисока концентрација на последната киселина. Од стеролите, β -ситостеролот беше идентификуван во најголема концентрација, а присуството на γ -ситостерол, стигмастерол и стерол гликозиди исто така е потврдено во мали количини. Плодовите содржат значителни количини на фенолни антиоксиданси. Најистакнати се флавонолните гликозиди (кверцетин, камферол), фенолните киселини (деривати на неохлорогените и кофеински киселини), деривати на кумарин, антоцијани и проантоцијанидини тип А.

Фенолните киселини се нефлавоноидни полифенолни соединенија кои поради својата структура може да се подели во две главни класи: хидроксibenзоични деривати (C1-C6) и хидроксицинамични (C3-C6) киселини [9]. Дериватите на хидроксibenзоева киселина вклучуваат галска, *p*-хидроксibenзоева, сиригична и *o*-ванилна киселина и во хидроксицинамичните деривати *p*-кумарин, кофеински, ферулин и синапин киселина. Дериватите на хидроксицинамична киселина покажуваат поголем антиоксидативен капацитет од дериватите хидроксibenзоева киселина бидејќи групата $\text{CH} = \text{CH}-\text{COOH}$ придонесува за подобра стабилизација слободните радикали за разлика од COOH групата во

хидроксibenзоевата киселина. Во цветот од трње во повисоки концентрации може да се најдат р-кумарна и хлорогена киселина, од кои вториот естер на кофеинска и кининска киселина.

Најпрво се мерат 3 грами од цветот и листот од трнина и потоа се ставаат во апаратот на Soxhlet, поставени на памучна волна. Во тиквичка се додава 150 мл 70% етанол кој се загрева до температура на рефлукс и доаѓа до екстракција спроведена за околу 1 час. Потоа се оставаат 10 милилитри екстракт за да се одредат вкупните феноли, флавоноли и хидроксицинамидни киселини, а остатокот од добиениот екстракт од етанол испарува на ротационен испарувач до жолт мрсен остаток со тежина од 840 mg. Добиениот сув остаток се раствара во вода при што треба да се добие темно зелена цврста материја од сувиот остаток, а водениот слој испарува и се добива темно кафеава вискозна супстанција. На крај со помош на IR спектарот се снима за да се карактеризираат најзастапените функционални групи.



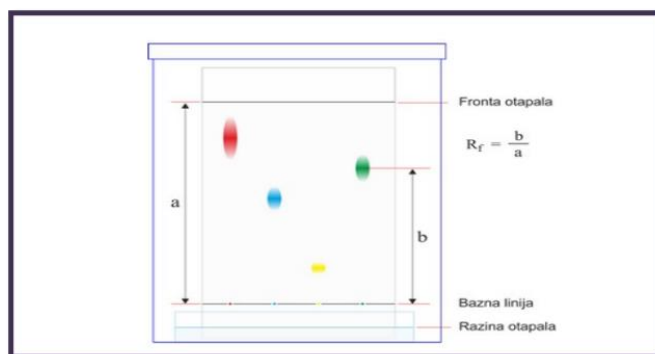
Слика 13.2. Суров екстракт од трника (Vulić, 2017)

Прочистување на добиениот екстракт од етил ацетат

Прочистување на фенолните соединенија од лист и цвет од трнина добиени со екстракција на Сокслет се изведува со препаративна тенкослојна хроматографија и карактеризирање со IR спектроскопија и течна хроматографија со високи перформанси.

Тенкослојна хроматографија

Пред прочистување на екстрактот од етил ацетат со тенкослојна хроматографија потребно е да се најде елуент кој успешно ќе ги одвои компонентите на смесата. Етил ацетат се покажа како добар елуент во процесот на тенкослојна хроматографија и се користи во понатамошниот процес прочистување. Супстанцијата се раствора во минимална количина на етил ацетат и капиларно се наноси на почетната линија која е 1,5–2 cm оддалечено од работ на плочката и се суши. Плочката се става во бања која содржи соодветен елуент (мобилна фаза) која се издига по плочката поради капиларните сили и ги елуира компонентите на смесата.



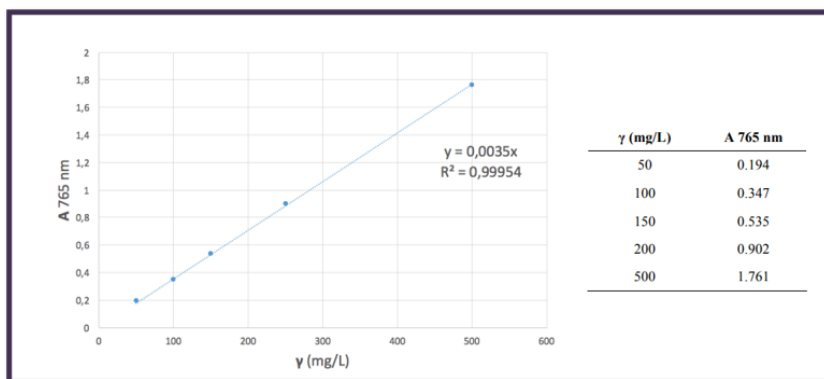
Слика 13.3. Фракционирање на суров екстракт од трника со тенко-слојна хроматографија (Vulić, 2017)

Инфрацрвена спектроскопија

IR спектри на добиените фракции се снимаат како раствори на дихлорометан или KBr пастили на Bohemian Спектрометар.

Одредување на концентрацијата на вкупните феноли

Фенолните соединенија може да се анализираат со помош на спектрофотометриски и хроматографски метод. за определување на вкупните феноли најшироко се користи методот на определување со Folin-Ciocalteu реагенс. Реагенсот Folin-Ciocalteu е мешавина од фосфотангстична и фосфомолибдинска киселина, и на оксидација на фенолни материи во малку алкални услови овие киселини се редуцираат до волфрам оксид и молибден оксид кои се сино обоени. При што по мерењето се добило дека концентрацијата на вкупните феноли е 46,68 милиграми



Слика 13.4. Одредување на концентрација на вкупни феноли (Vulić, 2017)

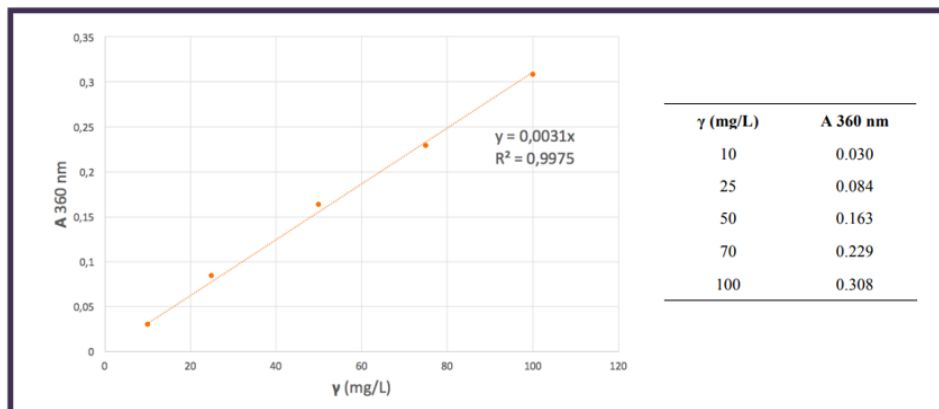
Одредување на концентрацијата на вкупните флавоноли

Одредувањето на концентрацијата на вкупните флавоноли се врши во метанолниот екстракт од примерокот користејќи спектрофотометриски метод каде што интензитетот на добиеното бојење се мери на 360 nm. Концентрацијата на вкупните флавоноли се добило дека е 28,79mg.

Одредување на концентрацијата на вкупните хидроксицинамични киселини

Одредувањето на концентрацијата на вкупните хидроксицинамини киселини се врши во етанолни или екстракт од метанол од примерокот со помош на спектрофотометриски метод каде што интензитетот на добиената бојење измерено

на 320 nm. Вкупната концентрација на хидроксицинаминска коселина се добило дека е 2,89 мг.



Слика 13.5. Одредување на концентрација на хидроксицинаминска коселина (Vulić, 2017)

Врз основа на добиените ленти за апсорпција, може да се потврди присуството на функционални групи кои се карактеристични за фенолните соединенија присутни во листот и цветот на трнот, а тоа првенствено се однесува на флавонолни гликозиди и деривати на хидроксицинаминска киселина присутни во материјалот за испитување.

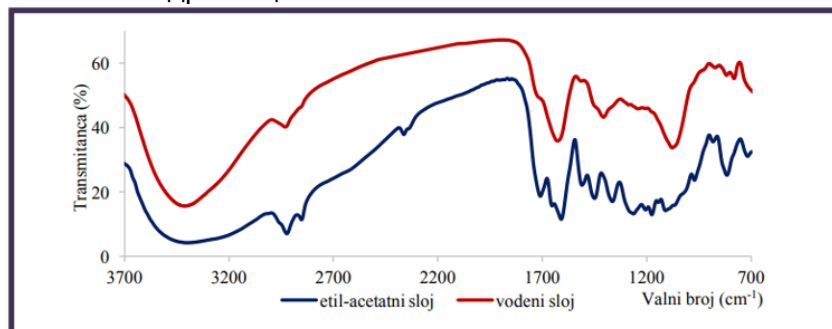
Вкупната концентрација на фенол, флавонол и хидроксициметни киселини

Откако ќе се екстрахира растителниот материјал според Soxhlet со 70% етанол како растворувач, вкупната концентрација на феноли изнесува 46,68 mg GAE / g, флавоноли 28,79 mg QE / g и хидроксициметни киселини 2,89 mg CAE / g.

Спроведена е и класична екстракција на лисја и цветови со 70% етанол и вредностите на масената концентрација за вкупните феноли изнесува 57,14 mg GAE / g, за флавонолите 26,93 mg QE / g, и хидроксицинаминска киселина 2,79 mg CAE / g.

Течна хроматографија со високи перформанси

По течната хроматографија со високи перформанси, се потврдува следното: од фенолните киселини, најзастапени се дериватите на хидроксицинаминска киселина (најголем удел има хлорогената киселина), високи концентрации на процијанидини од типот A1 и A2 и најголема концентрација на фенолни соединенија припаѓа на флавонолните гликозиди што е во согласност со спроведената мерења на вкупните феноли, флавоноли и хидроксициминамини киселини.



Слика 13.6. Инфрацрвен спектар на изолирани чисти компоненти од трника (Vulić, 2017)

14. Биоактивни секундарни метаболити изолирани од Мексикански медицински растенија

Во однос на растителната разновидност, проценките сугерираат дека Мексико е трета земја во светот по мегаразновидност на растителниот свет, по Бразил и Колумбија, со флора и од умерена и од тропска клима. Според едно неодамнешно истражување на национално ниво, во Мексико има околу 21.600 видови васкуларни растенија, а повеќе од 3.350 од овој фонд се дел од медицинската флора. Без оглед на богатството и разновидноста, само мал процент од мексиканската медицинска флора е истражен од фитохемиска или фармаколошка гледна точка (Alali et al., 1999). Така, потенцијалот на мексиканските лековити растенија како извор на биоактивни соединенија останува во голема мера истражен. Од медицински аспект, фокусот е на растенија кои содржат активни принципи корисни за третман на гастроинтестинални нарушувања, кои се голем проблем во Мексико. Во однос на растенијата кои се користат како пестициди, истражувањата се во насока на откривање на хербицидни агенси кои, во главно, влијаат на фотосинтезата, како и на нови инсектициди од фамилијата *Meliaceae*.

Scaphyglottis livida (Lindley) Schltr. (Сл. 14.1.) е епифитина орхидеја широко распространета долж тропската шума на државата Веракруз (Мексико). Доморотците ја нарекувале орхидејата „*parasita*“ и го користат целото растение во медицински цели.



Слика 14.1. *Scaphyglottis livida* (Lindl.) Schltr.
(www.orchidroots.com/detail/186764/species/?tab=sum)

Хербата се применува локално на телото на луѓето за да се елиминираат ектопаразитите. Од друга страна, лушпата се користи за лекување на болки во stomакот (Varet et al., 1979). Овие популарни намени укажуваат на присуство на агенси во растението кои предизвикуваат релаксација на мазните мускули. Оттука, за да се потврди оваа хипотеза со фармаколошки тест, користен е моделот на илеум на стаорци. Фармаколошкото испитување користејќи илеум од стаорци било изведено користејќи два различни типа на експерименти. Во првиот, користен е сиров екстракт, од кој примарните фракции и изолираните соединенија се проценети за нивната способност да ги релаксираат спонтаните контракции на илеумот. Во втората, бил испитуван ефектот на чистите соединенија врз холинергичните, хистаминергичните, нитрергичните и јон-индуцираните контракциите на мазните мускули. Целта на последниот сет експерименти била да се добијат информации за начинот на дејство на активните соединенија (Estrada et al., 1999).

Во прелиминарната фармаколошка евалуација, било откриено дека $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (1:1) екстрактот од *S. livida* покажал значителна инхибиција на тонусот и амплитудата на спонтаните контракции на илеумот кај стаорци.

Ефектот бил зависен од концентрацијата и пресметаната IC50 (вредноста на концентрација која произведува 50% инхибиција) била 6,06 g/ml. Фракционирањето водено од биоактивност на активниот екстракт со колонска хроматографија преку силика гел дало единаесет примарни фракции (F1 до F11) (Gu et al., 1995). Притоа, се покажало дека две фракции (F5 и F6) ги намалуваат

спонтаните контракции на илеумот кај стаорци кога се тестирани на IC50 од оригиналниот екстракт (Слика 2). HPLC сепарацијата (силика гел, хексан-PrOH-MeOH 94:3:3) на активните фракции F5 и F6 довело до изолација на пет активни ароматични соединенија, два бибензили -3,4-дихидрокси-5,5-диметоксибибензил (бибензил 1) и бататазин III] и три деривати на фенантен[коелонин, 3,7-дихидрокси-2,4-диметоксифенантрен и 3,7-дихидрокси-2,4,8-триметоксифенантрен] (Hoyle et al., 1994).

Се покажало дека петте фитохемикалии се познати природни продукти и нивната структура е определена со спектроскопски и спектрометриски методи. Соединенијата предизвикале забележителна инхибиција зависна од концентрација на спонтаните контракции на илеумот кај стаорци. Највисоките инхибиторни активности биле забележани за соединенијата: **бататазин III, коелонин и 3,7-дихидрокси-2,4-диметоксифенантрен**, кои биле посилни од **папаверинот** што се користел како позитивна контрола. Во вториот сет на експерименти, било докажано дека релаксаторската активност предизвикана од изолатите е посредувана, барем делумно, со невронско ослободување на азот оксид (NO). NO предизвикува релаксација на мазните мускули со врзување за железото во хемот што е дел од растворливата гванилил циклаза, стимулирајќи го формирањето на cGMP, секундарен месинџер. cGMP, пак, стимулира протеинска киназа, која го фосфорилира лесниот ланец на миозин, предизвикувајќи релаксација. За да се воспостави патеката за сигнализација која посредува во релаксирачкиот ефект, главниот изолиран активен принцип, 3,4-дихидрокси-5,5-диметоксибибензил, провоцира формирање на NO/cGMP од целиот илеум кај стаорци, што било измерено со употреба на радио-имунолошка анализа. Резултатите открија дека соединението предизвикува генерирање на cGMP зависен од концентрација (Isman et al., 1997).

Понатаму, кога прстените на илеумот биле стимулирани со една концентрација на бисбензил 1 (100 µg/ml) во присуство на L-NAME или 1H-[1,2,4]-оксадиазоло-[4,3,-a]-хиноксалин-1-он (ODQ), моќен селективен инхибитор на растворливата гванилил циклаза, бисбензил 1-индуцираното производство на cGMP било прекинато. Овие експерименти јасно посочуваат дека **бисбензил 1** го остварува своето релаксирачко дејство преку стимулација на синтеза на азот оксид и генерирање на cGMP. Стимулацијата на формирање на cGMP индуцирано од бисбензил 1 било речиси целосно зависно од присуството на екстрацелуларен калциум. Отстранувањето на овој катјон од медиумот и истовременото додавање на вишок EGTA резултирало со блокада на акумулација на cGMP индуцирана од бисбензил 1.

Важно е да се истакне дека ефектот на релаксирање на изолатите не вклучува директен антихолинергичен начин на дејствување или мешање во приливот на калциум во мазните мускулни клетки. Сепак, соединенијата покажале умерен антихистаминергичен ефект, бидејќи тие значително ги антагонизирале контракциите предизвикани од хистамин (1×10^{-3} M).

Фармаколошкото испитување покажало дека производството на азот оксид во илеалното ткиво е вклучено во спазмолитичкиот ефект. Во случај на бисбензил 1, формирањето на азот оксид/cGMP претставува сигнален пат во спазмолитичкото дејство. Умерениот антихистаминергичен ефект прикажан од сите соединенија, исто така, може да биде поврзан со антиспазмодичниот одговор на овие соединенија. На

крај, важно е да се посочи дека ароматичните соединенија претставуваат нов начин за развој на агенци од терапевтски интерес, наменети за релаксирање на мазните мускули.

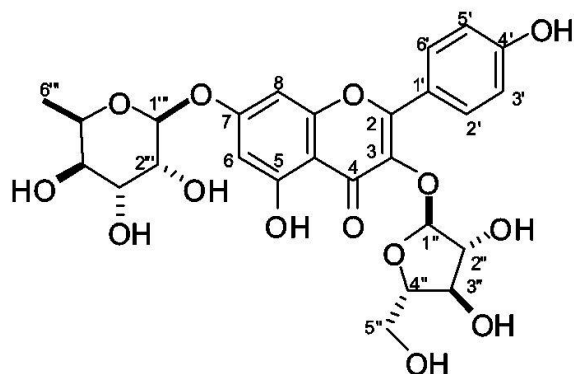
14.1. Антипротозоични проантоцијанидини од *Geranium niveum*, *Geraniaceae*

Geranium niveum S. Watson (*Geraniaceae*) (Сл. 14.2.), е растение со стаклено-сребреникави листови, кое расте долж бреговите на сувите потоци и тревни ливади на борови и дабови шуми во високите планини во западниот дел на Чивава, Мексико. Индијците Тарахумара ја нарекуваат оваа трајна билка „makiki“ и ја користат лушпа од корените како антифебрилен, прочистувачки лек и како лек за болки во бубрезите и гастроинтестинални заболувања.



Слика 14.2. *Geranium niveum* S. Watson
(powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:327764-2)

Во прелиминарниот скрининг спроведен за проценка на „ин вумпо“ антипротозоичната активност против аксенично израснати трофозоити *Giardia lamblia* и *Entamoeba histolytica* на некои мексикански лековити растенија, *G. niveum* било растение кое било избрано за фракционирање. По првичното истражување на значајната антипротозоична активност предизвикана од CHCl_3 -MeOH (1:1) екстрактот, подготвен од корените на *G. Niveum*, била направена екстракција и фракционирање. Сировиот активен екстракт бил суспендиран во вода и подложен на консекутивно (последователно) партиционирање со растворувачи CHCl_3 и EtOAc. Добиените фракции биле тестирани за нивната способност да го инхибираат растот на трофозоитите на *G. lamblia* и *E. histolytica*. Највисокото ниво на активност е пронајдено во EtOAc фракцијата (IC_{50} 6,6 и 18,7 $\mu\text{g/ml}$ за *E. histolytica* и *G. lamblia*, соодветно). Активната фракција била одделена со колонска хроматографија користејќи силика гел со зголемен поларитет на растворувачот, гел пермеација (Sephadex LH-20) и HPLC (Spherisorb S5ODS2), за да се добијат два нови антипротозоични А-тип проантоцијанидини, заедно со неколку познати соединенија кои биле неактивни. Новите проантоцијанидини се карактеризирани како ери-афзелехин-(4 β →8, 2 β →O→7)-афзелехин, ери-катехин-(4 β →8, 2 β →O→7)-афзелехин (7) и им биле дадени тривијални имиња - **геранини А и В**, соодветно (Сл.14.3.). Било откриено дека геранин А има молекулска формула на $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$ базирано на HRFABMS методологија (Jiménez et al., 1998).



Слика 14.3. Структура на антипротозоалните проантоцијанидини А-тип од *Geranium niveum* (*Geraniaceae*)

Геранините А и В покажуваат умерени антипротозоични својства, во споредба со стандардните, против *G. lamblia* и *E. Histolytica* (Слика 14.3).

14.2. Цитотоксични ацетогенини од *Rollinia mucosa* и *Annona purpurea*, *Annoniaceae*

Annonaceus ацетогенините се моќни антитуморни и пестицидни производи кои се наоѓаат само во растителната фамилија *Annonaceae*. Овие соединенија ја покажуваат својата моќна биоактивност преку намалување на нивото на АТФ преку инхибиција на комплексот I на митохондриите и инхибиција на NADH оксидазата во плазматските мембрани на туморските клетки. Апликациите како пестициди и антитуморни агенси имаат одличен потенцијал, особено во спречувањето на механизмите на отпор, за кои е потребен ефлукс зависен од АТФ.⁹ Фамилијата *Annonaceae* многу е распространета во Мексико, главно во тропските низини, меѓутоа, потенцијалот на мексиканските видови како извор на нови ацетогенини останува неистражен. Затоа, користејќи го т.н. тест за смртност на ракчиња „brine shrimp lethality test (BST)“, сигурен биолошки тест за откривање на ацетогенини од оваа фамилија, започнат е скрининг на семиња, листови и примероци од кора од сите достапни челнови на оваа фамилија од регионот на Лос Тукстлас, држава Веракруз, и соодветно се избрани *Rollinia mucosa* (Jacquin) Baillon и *Annona purpurea*, Moc.&Sessé ex Dunal (*Annonaceae*) за фракционирање.

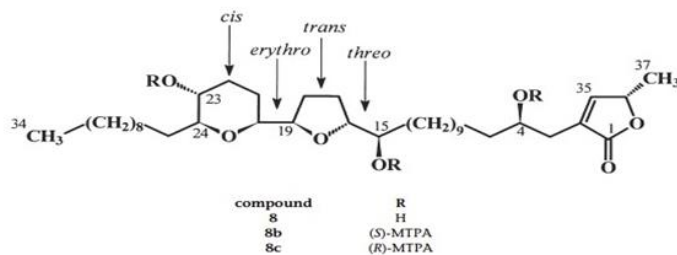
14.2.1. Хемиски состав на *Rollinia mucosa*

Rollinia mucosa (Слика 14.4.) е дрво широко распространето во тропска Америка. Плодот на ова растение, најчесто познато во Мексико како „anonillo“, „anonita del monte“ и „cherimoya“, се јаде и се користи во народната медицина за третман на рак и гастроинтестинални нарушувања.



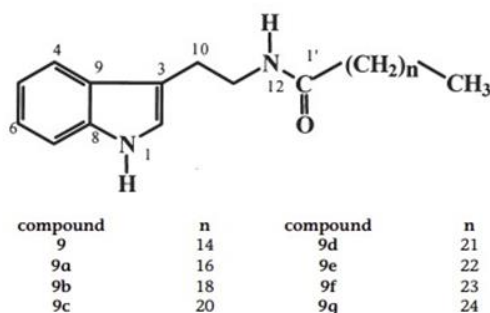
Слика 14.4. Плод на *Rollinia mucosa* (www.etsy.com/in-en/listing/1191563207/annona-rollinia-mucosa-live-plant-tree-5)

Претходните хемиски испитувања на овошјето, листовите, кората и семињата на *R. mucosa* довеле до изолација и идентификација на голем број цитотоксични и инсектицидни ацетогенини, а од семето на ова растение, изолиран е нов цитотоксичен ацетогенин - хименезин (Сл. 14.5.), како и осум нови амиди со потекло од триптамин, N-палмитоилтриптамин, N-стеароилтриптамин, N-арахидоилтриптамин, N-бехеноилтриптамин, N-трикосин, N-лигноцериолтриптамин, N-пентакосаноилтриптамин и N-церотоилтриптамин.



Слика 14.5. Структура на изолирани ацетогени

Исушените семиња на *R. mucosa* биле екстрахирани со CH_2Cl_2 -MeOH (1:1). Добиениот сиров екстракт прикажал моќна активност при BST тестот и кон турмори и метастази на пациенти болни од карцином.



Слика 14.6. Новите триптамин амидни деривати од *Rollinia mucosa*

Активниот екстракт (LC50 0,41 $\mu\text{g/ml}$) бил екстрахиран со растворувач - хексан и 10% H_2O во MeOH . Најактивната фракција, како што била оценета во BST тестот, била метанолната. Оваа фракција била дополнително одделена со хроматографија со отворена колона користејќи силика гел со зголемување на поларитетот на растворувачот за да се добијат 14 секундарни фракции (F1-F14). Со примена на HPLC метода, [силика гел, хексан-*i*PrOH- MeOH , (92:4:5)], од најактивната фракција F6 (според BST тестот, LC50 $7 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$), најзастапено соединение било химезезин. HPLC сепарацијата на помалку активната фракција F4 (според BST тестот, LC50 41.9 $\mu\text{g/ml}$), покажала најголема застапеност на сите амиди. Конечно, прочистувањето со HPLC на преостанатите активни фракции F5 и F7 (BST LC50 2,2 $\mu\text{g/ml}$ и $4,5 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$, соодветно), дало неколку познати ацетогенини (мембранацин, десацетиљуварацин, ролинијастатин 1, булатацин, сквамоцин и моторилин). Химезезин, кој поседува нов скелет, припаѓа на реткиот тип на ацетогенини кои содржат прстен тетрахидропиран (THP). Разрешувањето на неговата структура било спроведено со спектроскопски, хироптички и хемиски методи. Утврдената молекулската формула била $\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_7$ од HRFABMS. IR спектарот содржел апсорпции за хидроксил (3418 cm^{-1}) и α, β -незаситен лактон (1715 cm^{-1}). Секвенцијалните загуби на три молекули H_2O од MH^+ во FABMS, како и формирање на три-TMSi дериватот, го потврдиле постоењето на три хидроксилни групи во соединението химезезин.

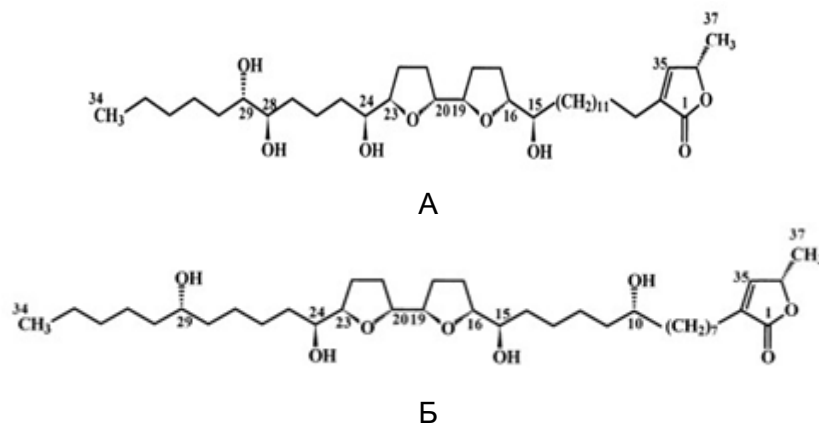
14.2.2. Хемиски состав на *Annona purpurea*

Annona purpurea Мок. & Sessé ex Dunal (Annonaceae) (Сл. 14.7.) е мало дрво високо до 7 метри. Плодот на ова растение, најчесто познато како „ilama“ во Мексико, се користи како храна. Исто така, се користи во народната медицина како лек за треска и настинки.



Слика 14.7. *Annona purpurea* Мок. & Sessé ex Dunal (Tringali, 2012)

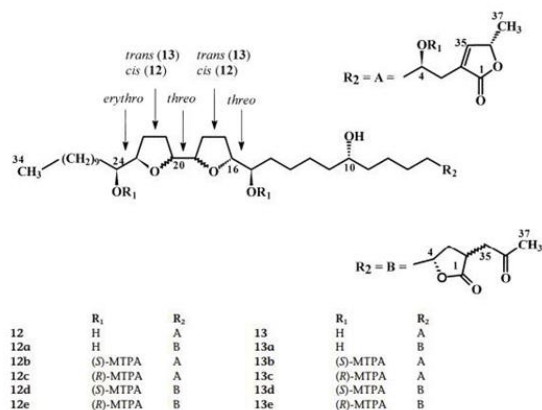
Од листовите на овој вид, добиени се шест ацетогенини, имено, булатацин, ролинијастатин 1, пурпуреацин 2, херимолин, силватицин и пурпуреацин.¹⁵ По истата постапка за изолација како и за *R. mucosa*, добиени се три нови соединенија, од семето, како bis-THF ацетогенини, пурпуредиолин, пурпуренин и пурпураценин (Сл. 14.8.). Покрај тоа, познатите соединенија булатацин, сквамоцин, мотрилин, аноглауцин, ксиломатенин и анонацин А, исто така, се присутни и кај ова растение.



Слика 14.8. Структури на пурпуридиолин (А) и пурпуренин (Б) од *Annona purpurea*

Новите ацетогенини се разликуваат во локацијата на хидроксилните групи долж алифатичниот синџир и во стереохемијата околу прстените на bis-THF. Структурата на новите соединенија била одредена по стандардните пристапи за идентификување на овој тип на ацетогенини. Со примена на естерскиот Mosher метод и CD мерењата, дефинирана е апсолутната стереохемија на стереогените центри во соединенијата. Апсолутната конфигурација на C-10 во ацетогенините пурпуренин и пурпураценин не можела да се одреди со спектрална анализа на (S)-и (R)-per-Mosher естерските деривати на природните производи, бидејќи хемиските поместувањата на протоните на C-9 и C-11 не се разликуваат. Затоа, двете соединенија биле

преведени во нивните соодветни кетолактони. Трансактонизацијата била постигната со третирање на ацетогенините со диетиламин. Анализата на ΔiR-S на (S)-и (R)-per-Mosher естер дериватите на добиените C-2/C-4 cis и trans трансактонизирани изомери, покажала позитивни разлики за H-4. Според тоа, стереохемијата на C-10 е R.



Слика 14.9. Структури на пурпураценин (12), аноглауцин (13) и деривати (Tringali, 2012)

14.3. Цитотоксични ефекти на ацетогенините од *Rollinia mucosa* и *Annona purpurea*

Новите ацетогенини, како и аноглауцин биле значајно активни во BST тестот и исто така, биле цитотоксични за шест човечки цврсти туморски клетки во 7-дневен МТТ тест користејќи адријамицин како позитивна контрола. Нивото на активност прикажано со ацетогенините е споредливо со она што претходно било опишано за слични соединенија. Пурпуреодиолин и аноглауцин покажале висока селективност во однос на HT-29 (аденокарцином на дебело црево). Стереохемијата околу bis-THF прави значајна разлика во цитотоксичните активности на соединенијата. Пурпураценин со стереохемиска конфигурација threo/cis/threo/trans/erythro покажува селективност кон A-549, A-498 и клеточни линии PC-3, додека аноглауцин со threo/trans/threo/trans/erythro конфигурација покажува селективност во однос на HT-29. Дериватите на триптамин амид биле неактивни наспроти тестираните шест типа на човечки туморски клетки (ED50 од 10 µg/ml) и биле нетоксични за *Artemia salina* (LC50 500 µg/ml).

14.4. Пестицидни лимоноиди од *Swietenia humilis*, *Meliaceae*

Фамилијата *Meliaceae* се карактеризира со присуство на лимоноидни тритерпени, од кои многу се биолошки активни против инсекти. Од азиските видови *Azadirachta indica* (Слика 14.10.) и *Melia azederach*, два лимоноиди се комерцијализирани: azadirachtin во САД и toosendanin во Кина



Слика 14.10. *Azadirachta indica* (Tringali, 2012)

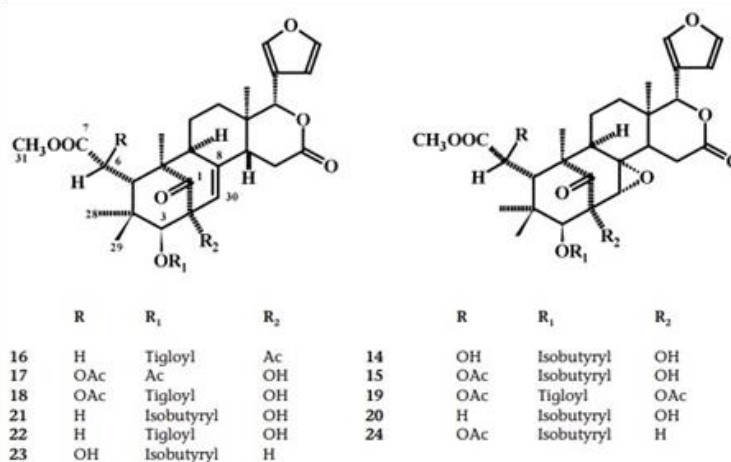
Во обид да пронајдат практични инсектициди, направени се истражувања за ефектите на мексинаските членови на фамилијата *Meliaceae* врз штетникот што ја напаѓа пченката во Европа *Ostrinia nubilalis*, високо полифагусен вид, кој напаѓа важни економски култури како што се, пченка, слатка пиперка, репка, грав, компир, овес, соја и пченица. Значително концентрирани и активни екстракти вклучуваат соединенија екстрахирани од *Swietenia humilis* Zucc. *S. Humilis* (Сл. 14.11.), локално познато растение како „zopilote“, „cóbano“, „flor de venadillo“ и „саоба“, дрво високо до 20 метри кое расте во тропските области на Мексико. Лушпите или инфузиите од мелените семиња на ова растение се високо ценети за третман на заболувања предизвикани од различни црви, амебијаза, третман на рак, болки во градите и кашлање.



Слика 14.11. *Swietenia humilis* Zucc. (Cornelius et al., 2004)

Хроматографското фракционирање на CHCl_3 екстрактот, подготвен од суви семиња на *S. humilis* овозможил изолација на шест нови лимоноиди, хумилинолиди АФ, кои поседуваат мексиканолиден скелет. Покрај тоа, добиени се и познатите лимоноиди хумилин Б, метил-2-хидрокси-3- β -изобутироксид-1-оксомелијак-8(30)-енат, метил-2-хидрокси-3- β -тиглоилокси-1-оксомелијак-8(30)-енат, светиенин С и светимахонин С (Сл.14.12).

Соединенијата светиенин С и светимахонин С биле нови за овој вид, додека останатите соединенија биле претходно изолирани од семето на *S. humilis* во 1971 година. Во тоа време, мексиканолидите метил-2-хидрокси-3- β -изобутироксид-1-оксомелијак-8(30)-енат и метил-2-хидрокси-3- β -тиглоилокси-1-оксомелијак-8(30)-енат биле добиени како смеса која била многу тешка да се оддели и нивните структури биле предложени врз основа на $^1\text{H NMR}$ и MS анализи на смесата. Подоцна, тие биле одвоени со примена на HPLC на реверзно-фазен силика гел.



Слика 14.12. Лимониоди од *Swietenia humilis* (Meliaceae) (Tringali, 2012)

Мексиканолидите од *S. humilis* може да се категоризираат во две структурни поткласи со земање во предвид на степенот на оксидација на C-8/C30 од основното јадро на метил-1-оксомелијак. Соединенијата во првата група имаат двојна врска 8,30 додека оние во втората поседуваат 8,30-епоксидна функција. Соединенијата во секоја подкласа се разликуваат по бројот и положбата на супституентите со кислород, но сите се карактеризираат со присуство на естерска група на C-3. Остатоците од киселина што ја естерифицираат хидроксилната група на C-3 се променливи.

Основната стратегија за разјаснување на молекулските структури на новите лимониоди од *S. humilis* вклучувала, прво, анализа на IR, MS и едноразмерни спектри на NMR. Овие класични методи овозможиле да се разреши основниот скелет на мексиканолидот и природата на киселинските остатоци што ги естерифицираат хидроксилните групи присутни во основното јадро. Лимониодите биле оценети врз основа на нивниот ефект врз параметрите за раст и развој на ECB во споредба со тоосенданин, комерцијален инсектицид. Хумилинолидите A-D предизвикале значително намалување на растот кај ларвите на ECB кога се инкорпорирани во концентрација од 50 ppm во храната со која се хранат ларвите (Слика 18). Највисокото намалување на растот било предизвикано од хумилинолид С, што произведува ефект сличен на оној на тоосенданин. Меѓутоа, концентрација од 5 ppm на само хумилинолид С и тоосенданин покажала значителна инхибиција на растот. Тоосенданин во концентрација од 50 ppm предизвика само умерена смртност на ларвите (<37%), но, хумилинолидите A-D предизвикуваат повисока смртност (>50%). Процентот на ларви кои достигнале пупација е намален во споредба со контролната група за сите испитувани соединенија. Најважниот ефект бил забележан кај хумилинолидите D и С, што во концентрација од 50 ppm резултирало со само 10 и 13% од пупацијата, соодветно. Преживувањето во фаза на возрасни

единки, во споредба со фазата на пупација, не покажла дополнителни намалувања на ефектот на тоосенданин; сепак, хумилинолидите A-D создале дополнителна смртност и помало преживување во напредна фаза. Оттука, тестираните соединенија предизвикуваат значителни одложувања во средното време до развој во возрасната фаза на ларвите.

Употребата на семето на *S. humilis* за третман на карцином и амебична дизентерија во народната медицина поттикнала проценка на цитотоксичниот и антипротозоалниот потенцијал на екстрактот и изолираните соединенија. Овие евалуации биле извршени со користење на истите системи за биоанализа како и за *G. niveum*. Ниту екстрактите, ниту фитохемикалиите немале значителна цитотоксична активност против тестираната антипротозоална активност против *G. lamblia* и *E. histolytica*.

Сумирано, лимонидите на *S. humilis* предизвикуваат смртност на ларви, како и намалување на растот и го зголемуваат времето на развој на преживеаните кога се вклучени во вештачката исхрана на ларви во почетен стадиум од *O. nubilalis* во концентрација од 50 ppm. Нивото на активност прикажано со овие соединенија во концентрација од 50 ppm сугерира дека тие се моќна природна заштита од инсекти, присутни во семето на *S. humilis*, каде што може да се најдат во концентрации од 299 до 470 ppm. Имајќи предвид дека хумилинолидите A-D покажуваат споредлива активност со тоосенданин и дека соединенијата се биосинтетизираат во големи количини во семето на *S. humilis*, постои верување дека овој вид е ветувачки извор за производство на практичен инсектициден стандардизиран екстракт.

Библиографија

Abdel-Kader, M., Alqarni, M. Foudah, A. (2021). New Flavonoids from Saudi collection of *Tephrosia purpurea* L. (Pers.). *Rec. Nat. Prod.* 15,(4) 293 – 300.

Alali, F.Q., Liu, X.-X. and Mclaughlin, J.L. (1999). Annonaceous acetogenins: Recent progress. *J. Nat. Prod.*, 62, 504–540

Al-Zouabi I., Stogner J.M., Miller B.L., Lane E.S. (2018). Butane hash oil and dabbing: insights into use, amateur production techniques, and potential harm mitigation. *Subst Abuse Rehabil.* 9:91-101.

Andre C.M., Hausman J.F., Guerriero G. (2016). *Cannabis sativa*: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Front Plant Sci.* 4, (7-19).

Aust, S.D. and Svingen, B.A. (1982). The role of iron in enzymatic lipid peroxidation. In: PRYOR, W.A. (ed.), *Free Radicals in Biology*, Vol. 5. New York, Academic Press, 1–28

Barret, Maria W., Klyne, W., Scopes, M., Fletcher, A., Porter, L. and Haslam, E. (1979). Plant proanthocyanidins. Part 6. Chiroptical studies. Part 95. Circular dichroism of procyanidins. *J. Chem. Soc. Perkin I* 1979, 2375–2377

Bilir, A., Erguven, M., Yazihan, N. (2010). Enhancement of vinorelbine-induced cytotoxicity and apoptosis by clomipramine and lithium chloride in human neuroblastoma cancer cell line SH-SY5Y. *J Neurooncol.* 100, 385–395. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0209-6>.

Boit, H.G. (1961). *Ergebnisse der Alkaloid-Chemie*. Berlin, Akademie-Verlag, 28–49.

Bors, W., Heller, W., Michel, C. and Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. In: PACKER, L. and GLAZER, A.N. (eds), *Methods in Enzymology*, Vol. 186. New York, Academic Press, 343–355

Boyd, M.R. (1993). The future of new drug development. In: NIEDER HUBER, J.E. (ed.), *Current Therapy in Oncology*. N.Y., 11–22.

Boyd, M.R. (1997). The NCI in vitro anticancer drug discovery screen concept, implementation, and operation, 1985–1995. In: TEICHER, B. (ed.), *Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening Trials, and Approval*. NJ, Humana Press Inc., 23–41.

Brannon, D.R. and Neuss, N. (1975). Microbial N-demethylation of vindoline and vinblastine *Ger. Affen.* 2,440,931. (CF. Chem. Aster. 83, 7184K.)

Bredenkamp, M.W. and Wiechersl, A. (1987). NMR-SPI: a reliable method for determining the mode of ester attachment in pyrrolizidine alkaloids. *Tetrahedron Lett.*, 28, 3729–3732

Cadenas, E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.*, 58, 79–110.

Cadenas, E. (1995a). Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. In: AHMAD, S. (ed.), *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. New York, Chapman & Hall, 1–61.

Cadenas, E. (1995b). Antioxidant and prooxidant functions of DT-diaphorase in quinone metabolism. *Biochem. Pharmacol.*, 49, 127–140.

Chalandre, M.C., Bruneton, J., Cabalion, P. and Guinaudeau, H. (1986). Etude des hernandiacees. XII. Dimers aporphine-benzylisoquinoleine originanux isole's de *Hernandia peltata*. *Can. J. Chem.*, 64, 123–126.

Changxing, L., Galani, S., Hassan, F.U., Rashid, Z., Naveed, M., Fang, D., Ashraf, A., Qi, W., Arif, A., Saeed, M., Chishti, A.A, Jianhua, L. (2020). Biotechnological approaches to the production of plant-derived promising anticancer agents: An update and overview. *Biomed Pharmacother.* 132:110918.

Chari, R.V., Martell, B.A., Gross, J.L., Cook, S.B., Shah, S.A., Blattler, W.A., Mckenzie, S.J. and Goldmacher, V.S. (1992). Immunoconjugates containing novel maytansinoids: promising anticancer drugs. *Cancer Res.*, 52, 127–131.

Chen, A.Y. and Liu, L.F. (1994). Design of topoisomerase inhibitors to overcome MDR1-mediated drug resistance. *Advances in Pharmacol.*, (N.Y.) 29B, 245–256.

Chen, M., Theander, T.G., Christensen, S.B., Hviid, L., Zhai, L. and Kharazmi, A. (1994a). Licochalcone A, a new antimalarial agent, inhibits in vitro growth of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and protects mice from *P. yoelii* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38, 1470–1475.

Chin Y-W, Balunas M.J., Chai H.B., Kinghorn A.D. (2006). Drug discovery from natural sources. *AAPS J.* 8:239–253.

Cholbi, M.R., Paya, M. and Alcaraz, M.J. (1991). Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl₄-induced microsomal lipid peroxidation. *Experientia*, 47, 195–199.

Christensen, S.B., Ming, C., Andersen, L., Hjerne, U., Olsen, C.E., Cornett, C., Theander, T.G. and Kharazmi, A. (1994). An antileishmanial chalcone from Chinese licorice roots. *Planta Med.*, 60, 121–123.

Cimanga, K., De Bruyne, T., Pieters, L., Vlietinck, A.J. and Turger, C.A. (1997). In Vitro and in Vivo Antiplasmodial Activity of Cryptolepine and Related Alkaloids from *Cryptolepis sanguinolenta*. *J. Nat. Prod.*, 60, 688–691.

Cohen, F.E., Mckerrow, J.H., Li, Z., Chen, X. and Gong, B. (1997). Inhibitors of Metazoan Parasite Proteases. US Patent. PCY/US96/03445, 1–23. 1997. USA. Ref Type: Patent

Colegate, S.M., Molyneux R.J. (1993). *Bioactive Natural Products Detection, Isolation, and Structural Determination*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Poel, B.V., Pieters, L., Vlietinck, A.J. and Berghe, D.V. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.*, 61, 71–78

Cornelius, J.P., Wightman, K.E., Grogan, J.E., Ward, S.E. (2004). Tropical Ecosystems, *Swietenia* (American Mahogany), *Encyclopedia of Forest Sciences*, Elsevier, 1720-1726.

Cragg, G.M., Newmann, D.J. and Snader, K.M. (1997). Natural Products in Drug Discovery and Development. *J. Nat. Prod.* 60, 52–60

Das, N.P. and Ramanathan, L. (1992). Studies on flavonoids and related compounds as antioxidants in food. In: ONG, A.S.H. and PACKER, L. (eds), *Lipid-Soluble Antioxidants: Biochemistry and Clinical Applications*. Switzerland, Birkhäuser Verlag, 295–306.

Delazer, A., Nahar, L., Hamedeyazdan, S., Sarker, S.D. (2012). Microwave-Assisted Extraction in Natural Products Isolation. In: Sarker, S., Nahar, L. (eds) *Natural Products*

Isolation. *Methods in Molecular Biology*, vol 864. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_5.

Deveoglu, O., Karadag, R. (2019). A Review on the Flavonoids – A Dye Sourc *Int. J. Adv. Eng. Pure Sci.* 3, 188-200.

DeFrancesco, J. V. (2021). *J Forensic Sci Educ.* 3(1).

El Alaoui M.A., Melloul M., Alaoui Amine S., Stambouli H., El Bouri A., Soulaymani A., El Fahime E. (2013) Extraction of high-quality DNA from seized Moroccan cannabis resin (Hashish). *PLoS One.* 8(10), e74714.

Ernster, L. (1993). Lipid peroxidation in biological membranes: mechanisms and implications. In: YAGI, K. (ed.), *Active Oxygen, Lipid Peroxides, and Antioxidants*. Tokyo, *Japan Sci. Soc. Press*, 1–38.

Estrada, S., Rojas, A., Mathison, Y., Israel, A. and Mata, R. (1999). Nitric oxide/cGMP mediates the spasmolytic action of 3,4-dihydroxy-5,5-dimethoxybibenzyl from *Scaphyglottis livida*. *Planta Med.*, 65, 109–114.

Farshid, Z., Moradi Balef, R., Zendeheboudi, T. (2023). Reforestation of grey mangroves (*Avicennia marina*) along the northern coasts of the Persian Gulf. *Wetlands Ecol Manage.* 31, 115–128. <https://doi.org/10.1007/s11273-022-09904-1>

Fraga, C.G., Leibovitz, B.E. and Tappel, A.L. (1987). Halogenated compounds as inducers of lipid peroxidation in tissue slices. *Free Rad. Biol. Med.*, 3, 119–123.

Ghalat P.S., Kalra M.L. (1985). Charas (cannabis) cardiomyopathy. *J Indian Med Assoc.* 83(5):158-9. PMID: 3877120.

Glin, M., Ernster, L. and Lee, C.P. (1991). Initiation of lipid peroxidation in submitochondrial particles: effect of respiratory inhibitors. *Arch. Biochem. Biophys.* 290, 57–66.

Cragg, G.M., Newman, D.J., Kingston D.G.I. (2010). Terrestrial Plants as a Source of Novel Pharmaceutical Agents, *Comprehensive Natural Products II*, Elsevier, 5-39.

Gu, Z.M., Zhao, G.-X., Oberlies, N.H., Zeng, L.U and Mclaughlin, J. (1995) Annonaceous acetogenins. In: ARNASON, J.T., ROMEO, J.T. and MATA, R. (eds), *Phytochemistry of Medicinal Plants. Recent Advances in Phytochemistry*, Vol. 29. New York, Plenum Press, 249–310.

Gutzeit, D., Winterhalter, P., Jerz, G. (2007). Application of preparative high-speed counter-current chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for a fast screening and fractionation of polyphenols. *J Chromatogr A.* 1172(1):40-6. doi: 10.1016/j.chroma.2007.09.066. Epub 2007 Oct 2. PMID: 17942106.

Hallmann-Mikołajczak A. (2004). Papyrus Ebersa. Księga wiedzy medycznej egipcjan z XVI w P.N.E [Ebers Papyrus. The book of medical knowledge of the 16th century B.C. Egyptians]. *Arch Hist Filoz Med.* 67(1), 5-14.

Halliwell, B. (1995). Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol.*, 49, 1341–1348.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1990a). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. In: PACKER, L. and GLAZER, A.N. (eds), *Methods in Enzymology*, Vol. 186. New York, Academic Press, 1–85.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1990b). The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* 280, 1–8

Haraguchi, H., Abo, T., Fukuda, A., Okamura, N. and Yagi, A. (1996d). Mode of phytotoxic action of altersolanols. *Phytochemistry*, 43, 989–992.

Haraguchi, H., Ishikawa, H., Sakai, S., Ying, B.-P. and Kubo, I. (1996f). Inhibition of lipid peroxidation by diterpenoid from *Podocarpus nagi*. *Experientia*, 52, 573–576.

Haraguchi, H., Mochida, Y., Sakai, S., Masuda, H., Tamura, Y., Mizutani, K., Tanaka, O. and Chou, W.-H. (1996b). Protection against oxidative damage by dihydroflavonols in *Engelhardtia chrysolepis*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 945–948.

Haraguchi, H., Ohmi, I., Fukuda, A., Toihara, Y., Okamura, N. and Yagi, A. (1996a). Effect of *Polygonum hydropiper* sulfated flavonoids on lens aldose reductase and related enzymes. *J. Nat. Prod.*, 59, 443–445.

Haraguchi, H., Ohmi, I., Masuda, H., Tamura, Y., Mizutani, K., Tanaka, O. and Chou, W.-H. (1996g). Inhibition of aldose reductase by dihydroflavonols in *Engelhardtia chrysolepis* and effects on other enzymes. *Experientia*, 52, 564–567

Haraguchi, H., Saito, T., Ishikawa, H. Sanchez, Y., Ogura T. and Kubo, I. (1996e). Inhibition of lipid peroxidation by sesquiterpenoid in *Heterotheca inuloides*. *J. Pharm. Pharmacol.* 48, 441–443.

Haraguchi, H., Saito, T., Ishikawa, H., Date, H., Tamura, Y. and Mizutani, K. (1996c). Antiperoxidative components in *Thymus vulgaris*. *Planta Med.* 62, 217–221.

Heftmann, E. *Chromatography*, 3rd ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1975.

Hingh, Y.M.C., Meyer, J., Fische, J.C., Berger, R., Smeitink, J.A.M. and Op Den Kamp, J.A.F. (1995). Direct measurement of lipid peroxidation in submitochondrial particles. *Biochemistry*, 34, 12755–12760.

Hollman, P.C.H., Gaag, M.V.D., Mengelers, M.J.B., Van Trijp, J.M.P., De Vries, J.H.M. and Katan, M.B. (1996). Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Rad. Biol. Chem.*, 21, 703–707

Houghton, P.J., Woldemariam, T.Z., Khan, A.I., Burke, A. and Mahmood, N. (1994). Antiviral activity of natural and semi-synthetic chromone alkaloids. *Antiviral Res.*, 25, 235–244.

Hoye, T.R., Hanson, P.R., Hasenwinkel, L.E., Ramírez, E.A. and Zhuang, Z. (1994). Stereostructural studies on the 4-hydroxylated Annonaceous acetogenins: A novel use of Mosher ester data determining relative configuration [between C(4) and C(36)]. *Tetrahedron Lett.*, 35, 8529–8532.

Hussain T., Jeena G., Pitakbut T., Vasilev N., Kayser O. (2021). *Cannabis sativa* research trends, challenges, and new-age perspectives. *iScience*. 24(12):103391

Isman, M.B., Gunning, P.J. and Spollen, K.M. (1997). Tropical timber species as sources of botanical insecticides. In: HEIDEN, P.A., HOLLINGWORTH, R.M., MASLER, E.P., MIYAMOTO, J. and THOMPSON, D.G. (eds), *Phytochemicals for Pest Control*. ACS Symposium Series 658. Washington, D.C., American Chemical Society, 27–37.

Jiménez, A., Mata, R., Lotina-Hennsen, B. and Anaya, A. L. (1998a). Interference of 1,2,3,4,- tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene with photosynthetic electron transport. *Z. naturforsch.*, 53C, 55–59.

Jiménez, A., Mata, R., Lotina-Henssen, B., Anaya, A.L. and Velasco-Ibarra, L. (1996). Phytochemical-Inhibitory compounds from *Malmea depressa*. *J. Nat. Prod.*, 59, 202–204.

Kagan, V.E. and Quinn, P.J. (1988). The interaction of α -tocopherol and homologues with shorter hydrocarbon chains with phospholipid bilayer dispersions. A fluorescence probe study. *Eur. J. Biochem.*, 171, 661–667.

Kagan, V.E., Serbinova, E.A., Bakalova, R.A., Stoytchev, T.S., Erin, A.N., Prilipko, L.L. and Evstigneeva, R.P. (1990). Mechanisms of stabilization of biomembranes by alpha-tocopherol. *Biochem. Pharmacol.*, 40, 2403–2413.

Kappus, H. (1985). Lipid peroxidation: mechanism, analysis, enzymology and biological relevance. In: SIES, H. (ed.), *Oxidative Stress*. New York, Academic Press, 273–310.

Kashiwada, Y., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Tanaka, T., Nonaka, G., Cosentino, L.M., Snider, J.V. and Lee, K. (1995). Anti-AIDS agents, 18. Sodium and potassium salts of caffeic acid tetramers from *Arnebia euchroma*. *J. Nat. Prod.*, 58, 392–400.

Kashman, Y., Gustafson, K.R., Fuller, R.W., Cardellina, J.H., McMahon, J.B., Currens, M.J., Buckheit, R.W., Hughes, S.H., Crag, G.M. and Boyd, M.R. (1992). The calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rain forest tree *Callophyllum lanigerum*. *J. Med. Chem.*, 35, 2735–2742.

Kohl, N.R., Emini, E.A., Schleif, W.A., Davis, L.J., Heimbach, J.C., Dixon, R.A., Scolnick, E.M. and Sigal, I.S. (1988) Active HIV protease is required for viral infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 4686–4690.

Kolegate S.M. and Molyneux, R.J., *Bioactive natural products, detection, isolation and structural identification*, 2008 by Taylor & Francis Group, 11 New Fetter Lane, London EC4P 4EE.

Kostadinovic Velickovska S, Mirhosseini H, Bogeveva E. Isolation of Anthocyanins by High-Speed Countercurrent Chromatography and Application of the Color Activity Concept to Different Varieties of Red Grape Pomace from Macedonia, *J. Nutrit. Food Sci.*, 2013, 3(6).

Kostadinovic Velickovska S. 2012. Polyphenolic and volatile profile of Macedonian wines and by-products. PhD thesis, Technical University of Braunschweig, Institute of Food Chemistry.

Kostka, T.; Ostberg-Potthoff, J.J.; Stärke, J.; Guigas, C.; Matsugo, S.; Mirčeski, V.; Stojanov, L.; Veličkovska, S.K.; Winterhalter, P.; Esatbeyoglu, T. Bioactive Phenolic Compounds from Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.): Extraction, Chemical Characterization, Fractionation and Cellular Antioxidant Activity. (2022). *Antioxidants*, 11, 467. <https://doi.org/10.3390/antiox11030467>.

Latif, Z., Sarker, S.D. (2012). Isolation of Natural Products by Preparative High Performance Liquid Chromatography (Prep-HPLC). In: Sarker, S., Nahar, L. (eds) *Natural Products Isolation. Methods in Molecular Biology*, vol 864. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_10

Lavie, G.F., Valentine, B., Levin, Y., Marur, G., Gallo, G., Lavie, D., Weiner, D. and Meruelo, D. (1989). Studies of the Mechanism of Action of the Antiretroviral Agents Hypericin and Pseudohypericin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 5963–5967

Lazarjani M.P., Young O., Kebede L., Seyfoddin A. (2021). Processing and extraction methods of medicinal cannabis: a narrative review. *J Cannabis Res.* 3(1):32.

Lei, Z., Lai, L., Chengyue, Z., Yang, W., Jing, W., Qizheng, Y. (2017). Synthesis of Novel Iridubin Derivatives and Their Effects on the Proliferation, Cell Cycle and Apoptosis in Acute Myeloblastic Leukemia HL-60 Cells. *Chin. J. Org. Chem.* 37(6), 1523-1529.

Li, S., Yuan, W., Yang, P., Antoun, D.M., Balick, J.M., Gordon M. Cragg, G.M. (2010). Pharmaceutical crops: an overview. *Pharm. Crops.* 1(1), 1-17.

Lu, H. and Liu, G.-T. (1992). Anti-oxidant activity of dibenzocyclooctane lignans isolated from Schisandraceae. *Planta Med.*, 58, 311–313

Mayumi, T., Schiller, H.J. and Bulkley, G.B. (1993). Pharmaceutical intervention for the prevention of post-ischemic reperfusion injury. In: POLI, G., ALBAMO, E. and DIANZNI, M.U. (eds), *Free Radical: From Basic Science to Medicine*. Switzerland, Birkhäuser Verlag, 438–457

Mcalpine, J.B., Friesen, J.B., Pauli, G.F. (2012). Separation of Natural Products by Countercurrent Chromatography. In: Sarker, S., Nahar, L. (eds) *Natural Products Isolation. Methods in Molecular Biology*, vol 864. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_9

Mora, A., Paya, M., Rios, J.L. and Alcaraz, M.J. (1990). Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, 40, 793–797

Nagababu, E. and Lakshmaiah, N. (1992). Inhibitory effect of eugenol on non-enzymatic lipid peroxidation in rat liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.*, 43, 2393–2400

Nahar L, Sarker S.D. (2011). *Steroid dimers: chemistry and applications in drug design and delivery*. John Wiley & Sons, London

Nahar, L., Sarker, S.D. (2012). Supercritical Fluid Extraction in Natural Products Analyses. In: Sarker, S., Nahar, L. (eds) *Natural Products Isolation. Methods in Molecular Biology*, vol 864. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_3

Nahas G.G., Zeidenberg P., Lefebure C. (1975). Kif in Morocco. *Int J Addict.* 10(6):977-93.

Okamura, N., HaraguchiARAGUCHI, H., HASHIMOTO, K. and YAGI, A. (1994). Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry*, 37, 1463–1466

Pavia, D.L., Lampman G.M., Kriz G.S., Engel R.G., *A small scale approach to Organic Laboratoric Techniques*, 3th ed.;Brooks/Cole Cengage Learning, Belmont, USA, 2013.

Payá, M., Halliwell, B. and Hout, J.R.S. (1992). Interaction of a series of coumarins with reactive oxygen species. *Biochem. Pharmacol.* 44, 205–214

Powis, G. and Apple, P.L. (1980). Relationship of single-electron potential of quinones to their reduction by flavoproteins. *Biochem. Pharmacol.*, 29, 2567–2572

Pritsos, C.A., Jensen, D.E., Pisani, D. and Pardini, R.S. (1982). Involvement in superoxide in the interaction of 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone with mitochondrial membranes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 217, 98–109

Ratty, A.K. and Das, N.P. (1988). Effect of flavonoids on noenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochem. Med. Metabol. Biol.*, 39, 69–79

Recknagel, R.O., Glende, E.A. and Dolak, J.A. (1989). Mechanism of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmac. Therap.* 43, 1

Rice-Evans, C. (1996). The role of antioxidants in biological systems and human studies of disease prevention. In: PADLEY, F.B. (ed.), *Advances in Applied Lipid Research*, Vol. 2. London, JAI Press Inc, 183–211

Robak, J. and Gryglewski R.J. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.*, 37, 837–841

Roders, M.K. (1978). NADPH-dependent microsomal lipid peroxidation and the problem of pathological action at a distance: new data on induction of red cell damage. *Biochem. Pharmacol.*, 27, 437–443.

Roig Celma C., Palazón J., Cusidó R.M., Piñol M.T., Keil M. (2001). Decreased scopolamine yield in field-grown *Duboisia* plants regenerated from hairy roots. *Planta Med.* 67(3), 249-53.

Sarker SD, Latif Z, Gray AI (2005). Natural products isolation: an overview. In: Sarker SD, Latif Z, Gray AI (eds) *Natural products isolation*, 2nd edn. Humana Press, New Jersey

Sarker, S.D. and Nahar L. (2012). *An Introduction to Natural Products Isolation, Natural products isolation*. Springer Third Edition. *Methods in Molecular Biology*, vol 864. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_1.

Sales, E., Müller-Uri, F., Nebauer, S.G., Segura, J., Kreis, W., Arrillaga, I. (2011). Digitalis. In: Kole, C. (eds) *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-21201-7_5

Shriver, J.A., Kaller, K.S., Kinsey, A.L., Wang, K.R., Sterrenberg, S.R., Van Vors, M.K., Cheek, J.T., Horner, J.S. (2022). A tunable synthesis of indigoids: targeting indirubin through temperature. *RSC Adv.* 12(9), 5407-5414.

Seidel, V. (2012). Initial and Bulk Extraction of Natural Products Isolation. In: Sarker, S., Nahar, L. (eds) *Natural Products Isolation. Methods in Molecular Biology*, vol 864. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_2

Seow, L.J., Beh, H. K., Sadikun, A., Asmawi, M.Z. (2013). Preliminary Phytochemical and Physicochemical Characterization of *Gynura segetum* (Lour) Merr (Compositae) Leaf. *Trop J Pharm Res.*, 12, 777-782.

Slater, A. (1984) Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. In: PACKER, L. (ed.), *Methods in Enzymology*, Vol. 105. New York, Academic Press, 283–293.

Slater, T.F. and Cheeseman, K.H. (1988). Free radical mechanisms of tissue injury and mechanisms of protection. In: QUINTANILHA, A. (ed.), *Reactive Oxygen Species in Chemistry, Biology, and Medicine*. New York, Plenum Press, 1–14.

Stohs, S.J. (1995). Synthetic pro-oxidants: drugs, pesticides and other environmental pollutants. In: AHMAD, S. (ed.), *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. New York, Chapman & Hall, 117–180.

Sugioka, K., Nakano, M., Totsune-Nakano, M., Minakami, H., Tero-Kubota, S. and Ikegami, Y. (1988). Mechanism of O₂ in reduction and oxidation cycles of ubiquinones in a model of mitochondrial electron transport systems. *Biochim. Biophys. Acta*, 936, 377–385.

Takayanagi, R., Takeshige, K. and Minakami, S. (1980). NADH- and NADPH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. Dependence on the rate of electron flow in the respiratory chain and antioxidant role of ubiquinol. *Biochem. J.*, 192, 853–860.

Thor, H., Smith, M.T., Hartzell, P., Bellomo, G., Jewell, S.A. and Orrenius, S. (1982). The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 257, 12419–12425

Toda, S., Kumura, M. and Ohnishi, M. (1991) Effect of phenolcarboxylic acids on superoxide anion and lipid peroxidation induced by superoxide anion. *Planta Med.*, 57, 8–10

Tringali C. (2001). Bioactive compounds from natural sources, isolation, characterization and biological properties, by Taylor & Francis Group, 11 New Fetter Lane, London EC4P 4EE.

Tringali, C. (Ed.). (2012). Bioactive Compounds from Natural Sources: Natural Products as Lead Compounds in Drug Discovery (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b11196>.

Vulić, T. (2017). Izolacija i karakterizacija fenolnih spojeva iz ploda trnine. University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet. Diplomski trud.

Wang, P., Kang, J., Zheng, R., Yang, Z., Lu, J., Gao, J. and Jia, Z. (1996). Scavenging effects of phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis* on superoxide anion and hydroxy radical by the spin trapping method. *Biochem. Pharmacol.*, 51, 687–691

Wiswedel, I., Ulbricht, O. and Augustin, W. (1989). Studies of lipid peroxidation in isolated rat heart mitochondria. *Biomed. Biochim. Acta*, 2, 73–76.

Witting, L.A. (1980). Vitamin E and lipid antioxidants in free-radical-initiated reactions. In: PRYOR, W.A. (ed.), Free Radicals in Biology, Vol. 4. New York, Academic Press, 295–319

Xiong, Q., Kadota, S., Tani, T. and Namba, T. (1996). Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Biol. Pharm. Bull.* 19, 1580–1585.

Yang, J., Liu, X., Fu, J., Lyu, H.Y., Bai, L.P., Jiang, Z.H., Zhu, G.Y. (2021). Calycindaphines A–J, Daphniphyllum alkaloids from the roots of *Daphniphyllum calycinum*. *RSC Adv.* 11, 9057.

Youssef, A.M.M., Maaty, D.A.M., Y.M. (2023). Phytochemical Analysis and Profiling of Antioxidants and anticancer compounds from *Tephrosia purpurea* (L.) subsp. *apollinea* Family Fabaceae. *Molecules* 28,(9), 3939.

Zhang, Y., Wiese, L., Fang, H., Alseekh, S., Perez de Souza, L., Scossa, F., Molloy, J.J., Christmann, M., Fernie, A.R. (2023). Synthetic biology identifies the minimal gene set required for paclitaxel biosynthesis in a plant chassis. *Mol. Plant.* 16(12), 1951-1961

Костадиновиќ Величковска С. (2021). Екстракција на растителни масла. Е-библиотека на УГД (прво издание).

Ѓорѓеска Б и Костадиновиќ Величковска С. (2017). Изолација на природни продукти. Е-библиотека на УГД (прво издание).

ЗАКОН за изменување и дополнување на Законот за контрола на опојни дроги и психотропни супстанции објавен во Службен весник на РМ, бр. 37 од 26.2.2016 година

www.historyofinformation.com/detail.php?id=2154

www.linkedin.com/pulse/future-horticulture-sciences-engineering-leds-sativa-l-w-moore

www.fda.gov/consumers/consumer-updates/what-you-need-know-and-what-were-working-find-out-about-products-containing-cannabis-or-cannabis

www.researchgate.net/figure/Left-hand-heated-block-of-Hashish-Right-hand-unheated-block-of-Hashish_fig1_257757104

www.geaseeds.com/blog/en/charas

www.jasco-global.com/principle/principles-of-supercritical-fluid-systems-1-what-is-a-supercritical-state

www.ats-scientific.com/products/ethos-ex-microwave-extraction

www.cmca.uwa.edu.au/facilities/nmr2/varian-400

www.static.hindawi.com/articles/ecam/volume-2022/7299778/figures/7299778.fig.007.jpg

www.sadnja.com/lekovito-bilje/velebilje-biljka-atropa-belladonna-prepoznavanje-upotreba-uzgoj

www.researchgate.net/figure/Basic-chemical-structure-of-flavonoids_fig1_335991086

www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quercetin

www.researchgate.net/figure/TLC-profiles-of-the-crude-methanol-leaf-extract-of-G-segetum-and-reference-standard_fig1_262937000

www.pharmasaat.de/onlineshop/herb-seeds/Ruta-graveolensGardenRue::154.html

www.ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0378874117329367-fx1_lrg.jpg

www.link.springer.com/article/10.1007/s13205-023-03636-6

www.researchgate.net/figure/Fig-4-Vinblastine-13-and-vincristine-14-two-natural-vinca-alkaloids-isolated_fig16_260311482

www.m.indiamart.com/proddetail/vinorelbine-injection-12190696591.html

www.malawiflora.com/speciesdata/image-display.php?species_id=194270&image_id=3

[Birch Bark Extract Supplements and Chaga - Betula Botanicals](#)

БИОГРАФСКИ ПОДАТОЦИ



Д-р сци. Биљана Ѓорѓеска е редовен професор на Факултетот за медицински науки. Таа работи на Универзитетот „Гоце Делчев“ во Штип од неговото основање во 2007 година. Како шеф на Катедрата за аналитика на лекови таа е лидер и наставник на повеќе предмети на додипломските студии на студиската програма за фармација: аналитика на лекови, биохемија, добра лабораториска практика, регистрација на лекови и стабилност на лекови. На постдипломските студии професорката е ментор на специјализацијата „Испитување и контрола на лекови“ и наставник на специјалистичките стручни студии за лаборанти на предметите: биохемија на имунолошкиот систем, законска регулатива и безбедност на квалитетот, микробиолошка контрола на лекови и на предметот дезинфициенси и антисептици за специјализирани медицински сестри. Истражувачките интереси на професорката Биљана Ѓорѓеска се во областа на фармацевтската анализа, медицинска хемија и QSAR, обезбедување на квалитетот на лековите и биохемијата.



Проф. д-р Сања Костадиновиќ Величковска е родена на 28.03. 1979 година во Куманово. По завршувањето на докторските студии на Техничкиот универзитет во Брауншвеиг, Германија 2012 година, работи како редовен професор на Земјоделскиот Факултет при Универзитетот „Гоце Делчев“ во Штип. Има објавено научни статии и учебни помагала од областа на хемија на храна, изолација, структурна идентификација и антиоксидативен потенцијал на биоактивни компоненти и природни продукти.

