

Irma Mahmutović-Dizdarević
Muamer Dizdar
Mirsada Salihović
Anesa Jerković-Mujkić

BILJKE

Izolacija i identifikacija
antimikrobnih spojeva



Sarajevo, 2022.

Irma Mahmutović-Dizdarević

Muamer Dizdar

Mirsada Salihović

Anesa Jerković-Mujkić

BILJKE

Izolacija i identifikacija antimikrobnih spojeva

Sarajevo, 2022.

dr. sc. Irma MAHMUTOVIĆ-DIZDAREVIĆ

dr. sc. Muamer DIZDAR

dr. sc. Mirsada SALIHOVIĆ

dr. sc. Anesa JERKOVIĆ-MUJKIĆ

BILJKE

Izolacija i identifikacija antimikrobnih spojeva

Izdavač:

Univerzitet u Sarajevu – Prirodno-matematički fakultet

Recenzenti:

dr. sc. Adisa PARIĆ, redovna profesorica
Univerzitet u Sarajevu – Prirodno-matematički fakultet

dr. sc. Samir ĐUG, redovni profesor
Univerzitet u Sarajevu – Prirodno-matematički fakultet

dr. sc. Asmir ALDŽIĆ, vanredni profesor
Univerzitet u Bihaću, Fakultet zdravstvenih studija

dr. sc. Melita HUREMOVIĆ, vanredna profesorica
Univerzitet u Tuzli, Prirodno-matematički fakultet

Tehničko uređenje i DTP:

Irma MAHMUTOVIĆ-DIZDAREVIĆ

Lektura:

Boris LALIĆ, mr. komparativne književnosti

Naslovna strana:

Elma NUKIĆ, bachelor likovne umjetnosti-grafički dizajn

ISBN 978-9926-453-56-5

CIP zapis dostupan u COBISS sistemu Nacionalne i univerzitetske biblioteke
BiH pod ID brojem 51558662

Našoj djeci
Benjaminu, Ameli i Maisi



PREDGOVOR

Mikrobne infekcije predstavljaju jedan od najvećih problema javnog zdravlja na globalnom nivou. Taksonomski i biološki diverzitet mikrobnih patogena je veliki i kreće se od oblika na margini života, kao što su acelularni patogeni – virusi, preko bakterija, gljivica do multicelularnih oblika – parazita. Poseban izazov predstavljaju zajednice mikroorganizama kakvi su biofilmovi, gdje su mikroorganizmi ujedinjeni specifičnim interakcijama, a što im gotovo daje svojstva viših oblika života. Sintetički lijekovi, u prvom redu antibiotici ali i antimikotici i antivirusni lijekovi jesu svojevrsan odgovor nauke u smislu prevencije infekcija, ali nažalost trendovi kojima svjedočimo ukazuju da će Čovječanstvo vrlo brzo biti u pre-antibiotskoj eri. Evolucija mikroba u najširem kontekstu ekoloških faktora dovela je do nastanka rezistentnih i multirezistentnih oblika koji su otporni na sintetičke lijekove, pa tretman infekcija postaje sve veći problem. S druge strane, biljke su kao sesilni organizmi suočeni sa različitim stresorima i upravo iz te njihove nužne vezanosti za podlogu, odgovaraju na biohemijom i fiziološkom nivou sintezom različitih spojeva. Biljke kroz svoj sekundarni metabolizam sintetiziraju široki spektar spojeva koji imaju dokazanu biološku aktivnost, između ostalog i antimikrobnu. Upotreba ljekovitih biljaka je poznata praksa od davnina, ali aktuelnost i kontinuirani interes za izučavanjem bioaktivnih svojstava biljaka doveo je do toga da danas govorimo o legitimnoj fitoterapijskoj praksi koja nadilazi okvire herbalistike. Antimikrobni potencijal potvrđen je za veliki broj biljaka, a pored nominalnog markiranja, jedan od osnovnih zadataka savremenih studija iz ove oblasti je izolacija i identifikacija konkretnih spojeva zaduženih za antimikrobno djelovanje. Takve informacije otvaraju vrata daljem ispitivanju antimikrobnih spojeva i njihovoj široj upotrebi. Ova Knjiga prezentira biljke kao izvore antimikrobnih spojeva, kroz prizmu botanike, mikrobiologije i organske hemije. Svaki od navedenih segmenata je jednako važan u razumijevanju složene dinamike odnosa između sinteze antimikrobnih spojeva u biljci, njihove odgovarajuće izolacije i identifikacije, te ispitivanja na odabranim mikroorganizmima. Knjiga je namijenjena studentima biologije, hemije, farmacije i drugih srodnih studija, ali i svim onima čiji profesionalni ili lični interes ulazi u predstavljeni sadržaj.

Sarajevo, 2022.

Autori

S A D R Ź A J

P O G L A V L J E 1

UVOD.....	1
1.1. Historijski pregled shvatanja i upotrebe ljekovitih biljaka.....	2
1.1.1. Pedanius Dioscorides, <i>De materia medica</i>	4
1.1.2. Srednji vijek i moderno doba.....	6
1.2. Definiranje osnovnih pojmova.....	11

P O G L A V L J E 2

INFEKTIVNE BOLESTI I NJIHOVI UZROČNICI.....	13
2.1. Mijazmatska teorija.....	13
2.2. Germinativna teorija.....	15
2.3. Lanac infekcije.....	16
2.4. Najčešće bakterijske infekcije.....	20
2.5. Specifičnosti virusne infekcije.....	21
2.6. Gljivične infekcije.....	22
2.7. Parazitske infekcije.....	23
2.8. Česte infektivne bolesti čovjeka.....	24

P O G L A V L J E 3

ANTIBIOTICI.....	30
3.1. Klase antibiotika.....	32
3.1.1. Inhibicija sinteze staničnog zida.....	32
3.1.1.1. β -laktami.....	32
3.1.1.2. Glikopeptidi.....	33
3.1.1.3. Epoksidi.....	34
3.1.2. Disrupcija integriteta stanične membrane.....	34
3.1.2.1. Lipopetidi.....	34
3.1.2.2. Polimiksini.....	34
3.1.3. Inhibicija sinteze proteina – 30S podjedinica ribosoma.....	34
3.1.3.1. Aminoglikozidi.....	34

3.1.3.2. Tetraciklini.....	35
3.1.3.3. Glicilciklini (derivati tetraciklina).....	35
3.1.4. Inhibicija sinteze proteina – 50S podjedinica ribosoma.....	35
3.1.4.1. Makrolidi i ketolidi.....	35
3.1.4.2. Linkozamidi.....	35
3.1.4.3. Streptogramini.....	36
3.1.4.4. Oksazolidinoni.....	36
3.1.4.5. Amfenikoli.....	36
3.1.5. Inhibicija DNK giraze.....	37
3.1.5.1. Fluorohinoloni.....	37
3.1.6. Disrupcija integriteta DNK.....	37
3.1.6.1. Nitroimidazoli.....	37
3.1.7. Inhibicija sinteze i redukcije folne kiseline.....	38
3.1.7.1. Sulfonamidi i diaminopirimidini.....	38
3.2. Antimikobakterijski lijekovi.....	38
3.2.1. Rifamicini.....	38
3.2.2. Hidrazidi.....	38
3.2.3. Nikotinamidi.....	39
3.2.4. Etilendiaminski derivati.....	39
3.2.5. Sulfoni.....	39
3.3. Ostali antibiotici.....	39
3.3.1. Nitrofurani.....	39
3.4. Rezistencija na antibiotike.....	40
3.4.1. Porijeklo rezistencije.....	40
3.4.1.1. Prirodna rezistencija.....	40
3.4.1.2. Stečena rezistencija.....	41
3.4.2. Rezistencija na antimikrobne produkte prirodnog porijekla.....	42

P O G L A V L J E 4

ANTIVIRUSNI LIJEKOVI.....	44
4.1. Infektivni ciklus virusa.....	45
4.2. Ciljna mjesta antivirusnih lijekova.....	47
4.2.1. Adsorpcija virusa.....	47
4.2.2. Prodiranje i skidanje kapside.....	47

4.2.3. Sinteza iRNK.....	47
4.2.4. Sinteza virusnih proteina.....	48
4.3. Razvoj i primjeri antivirusnih lijekova.....	48
4.3.1. Virus humane imunodeficijencije, HIV.....	50
4.3.2. Hepatitis C virus, HCV.....	52
4.3.3. Hepatitis B virus, HBV.....	53
4.3.4. Influenza.....	54
4.3.5. Herpes simplex virus, HSV.....	54
4.3.6. Varicella zoster virus, VZV.....	55
4.3.7. Humani citomegalovirus, HCMV.....	56
4.3.8. Humani papilomavirus, HPV.....	57
4.3.9. Respiratorni sincicijski virus, RSV.....	58

P O G L A V L J E 5

LJEKOVITE BILJKE.....	59
5.1. Klasifikacija ljekovitih i aromatičnih biljaka.....	60
5.2. Botanička klasifikacija ili taksonomija ljekovitih biljaka.....	66
5.2.1. Sistemi biljne klasifikacije.....	67
5.2.2. Klasifikacija ljekovitih biljaka na osnovu prirodnih produkata.....	68
5.3. Biljni organi i tkiva od interesa.....	68
5.4. Biljni pripravci.....	71
5.5. Sekundarni metaboliti biljaka.....	73
5.5.1. Sinteza sekundarnih metabolita u biljkama.....	75
5.5.2. Biosintetski put sekundarnih metabolita.....	76
5.5.2.1. Biosintetski put šikimske kiseline (Šikimski put).....	77
5.5.2.2. Biosintetski put mevalonske kiseline (Mevalonski put).....	79

P O G L A V L J E 6

HEMOKLASIFIKACIJA BILJNIH KONSTITUENATA.....	81
6.1. Fenolski spojevi.....	81
6.1.1. Jednostavni fenoli.....	82

6.1.2. Fenilpropanoidi.....	83
6.1.3. Flavonoidi.....	84
6.1.3.1. Fizičke i hemijske osobine flavonoida.....	86
6.1.3.2. Rasprostranjenost flavonoida u biljnom carstvu.....	87
6.1.3.3. Ekstrakcija i izolacija flavonoida.....	88
6.2. Alkaloidi.....	89
6.2.1. Karakterizacija, identifikacija i izolacija alkaloida.....	94
6.3. Terpeni.....	96

P O G L A V L J E 7

EKSTRAKCIJA I IDENTIFIKACIJA

ANTIMIKROBNIH SPOJEVA IZ BILJAKA.....	105
7.1. Metode ekstrakcije i izolacije.....	106
7.1.1. Biljni materijal.....	106
7.1.2. Ekstrakti i njihova podjela.....	108
7.1.3. Ekstrakcija.....	109
7.1.3.1. <i>Soxhlet</i> metoda.....	112
7.1.3.2. Ultrazvučna ekstrakcija.....	118
7.1.3.3. Maceracija.....	120
7.2. Metode razdvajanja.....	121
7.2.1. Papirna hromatografija (PC)	122
7.2.2. Tankoslojna hromatografija (TLC)	126
7.2.3. Gasna hromatografija.....	134
7.2.3.1. Osnovne komponente GC.....	134
7.2.4. Tečna hromatografija.....	147
7.2.4.1. Osnovne komponente HPLC sistema.....	150
7.2.4.2. Podjela hromatografije.....	154
7.3. Metode identifikacije.....	157
7.3.1. UV-Vis spektroskopija.....	158
7.3.1.1. Elektronski prelazi.....	158
7.3.1.2. Utjecaj otapala na UV-Vis spektar.....	161
7.3.1.3. Hromofori.....	163
7.3.1.4. Uticaj povećanja konjugacije na apsorpcijski spektar.....	164
7.3.1.5. Vis spektroskopija.....	165
7.3.1.6. Apsorpcijski spektri biljnih sastojaka.....	165
7.3.2. Infracrvena (IR) spektroskopija.....	167

7.3.2.1. Fourierova transformacija (FT) u IR spektroskopiji.....	171
7.3.2.2. Interpretacija infracrvenih spektrograma.....	172
7.3.3. Masena spektrometrija (MS)	176
7.3.3.1. Tehnike jonizacije.....	178
7.4.3.2. Analizatori mase.....	180
7.4.3.3. Interpretacija masenog spektrograma.....	183
7.3.4. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR)	186
7.3.4.1. Snimanje NMR spektra.....	189
7.3.4.2. Hemijski pomak i zasjenjenje.....	190
7.3.4.3. Spin-spin sprega.....	191
7.3.4.4. Konstanta sprege.....	193
7.3.4.5. Integracija.....	194
7.3.4.6. Priprema uzorka.....	194
7.3.4.7. Interpretacija ¹ H-NMR spektra.....	195
7.3.4.8. ¹³ C-NMR spektroskopija.....	196
7.3.5. Kriteriji za fitohemijsku identifikaciju.....	198

POGLAVLJE 8

MEHANIZMI ANTIMIKROBNOG DJELOVANJA

BILJNIH SUPSTANCI.....	200
8.1. Antimikrobna aktivnost biljnih ekstrakata.....	201
8.2. Mehanizmi antimikrobnog djelovanja supstanci biljnog porijekla.....	201
8.2.1. Alkaloidi.....	203
8.2.2. Organosumporni spojevi.....	207
8.2.3. Fenolne komponente.....	210
8.2.4. Kumarini.....	213
8.2.5. Terpeni i terpenoidi.....	215
8.3. Bakterijski biofilmovi i antibiofilm aktivnost ljekovitih biljaka.....	217
8.3.1. Formiranje biofilma i mikrobna patogenost.....	218
8.3.2. <i>Quorum sensing</i> , <i>QS</i>	220
8.3.2.1. <i>Quorum sensing</i> u terapijskom smislu.....	221
8.3.2.2. <i>Quorum sensing</i> inhibitori ljekovitih biljaka.....	222
8.4. Antivirusno djelovanje biljaka.....	228

8.5. Prisustvo antimikrobnih supstanci u biljnom svijetu – filogenetski pristup.....	237
8.5.1. Taksonomska distribucija vrsta sa zabilježenim antibakterijskim djelovanjem.....	241

P O G L A V L J E 9

ISPITIVANJE ANTIMIKROBNOG DJELOVANJA TVARI BILJNOG PORIJEKLA.....	244
9.1. Difuzione metode.....	245
9.1.1. Disk difuziona metoda.....	245
9.1.2. Agar difuziona metoda.....	246
9.1.3. Tehnika otrovane hrane (<i>Poisoned Food Technique</i>)	247
9.2. Dilucione metode.....	248
9.2.1. Mikrodiluciona metoda.....	248
9.2.2. Makrodiluciona metoda.....	250
9.2.3. Agar diluciona metoda.....	250

P O G L A V L J E 10

RACIONALNA UPOTREBA LJEKOVITIH BILJAKA I BIODIVERZITET.....	252
10.1. Destrukcija staništa.....	253
10.2. <i>Bioprospekting</i>, pronalaženje novih izvora aktivnih supstanci.....	253
10.3. Prekomjerna eksploatacija.....	253
10.4. Mjere zaštite.....	256
10.4.1. <i>In situ</i> konzervacija.....	256
10.4.2. <i>Ex situ</i> konzervacija.....	257
10.5. Kultivacijske prakse.....	258
10.6. Dobre agrikulturne prakse (engl. <i>Good Agricultural Practices</i>, GAP).....	258
10.7. Održivi razvoj.....	259
LITERATURA.....	260

POGLAVLJE 1

UVOD

Irma Mahmutović-Dizdarević



*Ne postoji neizlječiva bolest, postoji samo nedostatak volje.
Ne postoji beskorisna biljka, postoji samo nedostatak znanja.*

Ibn Sina

Ljekovite biljke su prepoznate i korištene u praksi tradicionalne medicine još u vremenu prahistorije. Biljke sintetiziraju na stotine hemijskih supstanci za potrebe vlastitog metabolizma, uključujući one komponente koje služe za odbranu od insekata, gljivica, bolesti i herbivora. Do sada su identificirane brojne fitohemikalije¹ sa potencijalnim ili dokazanim biološkim djelovanjem. Ipak, s obzirom na činjenicu da jedna biljka proizvodi ogroman broj različitih fitohemikalija, učinci korištenja cijele biljke kao lijeka, mogu biti sporni. Nadalje, fitohemijski sadržaj i farmakološka aktivnost mnogih biljaka sa ljekovitim potencijalom moraju biti praćeni opsežnim i detaljnim znanstvenim istraživanjima kako bi se definiralo njihovo djelovanje i sigurnost. Ljekovite biljke se često koriste u neindustrijaliziranim društvima, pretežno zbog svoje dostupnosti i niže cijene u odnosu na savremene sintetičke lijekove. U osiguranju sigurnosti i racionalnog korištenja ljekovitih biljaka, Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) je uključena u koordinaciju ovog procesa. Ljekovite biljke su danas izložene generalnim pritiscima antropogenog karaktera, među kojima su promjena globalne klime usljed ljudskog djelovanja i upravljanja resursima, destrukcija staništa i prekomjerna eksploatacija.

¹ Fitohemikalije, od izvorne riječi na engleskom jeziku: *phytochemicals*, pojam koji podrazumijeva hemijske supstance producirane od strane biljaka kroz primarni ili sekundarni metabolizam, a koje imaju biološku aktivnost.

1.1. Historijski pregled shvatanja i upotrebe ljekovitih biljaka

Biljke, među kojima su one koje su i danas u upotrebi kao jestive ili začinske, korištene su kao lijekovi, ne nužno učinkovito, ali još od vremena prahistorije. Brojne biljne vrste su korištene u cilju sprječavanja razvoja bakterija kvarenja hrane, osobito u vrelim klimatima, te kod pripreme mesnih jela. Uzorci biljaka sa prahistorijskih grobova predstavljaju svojevrsni dokaz da su ljudi još u paleolitu na neki način prakticirali biljnu medicinu. Tako npr. 60.000 godina stara neandertalska grobnica, otkrivena u mjestu Shanidar u sjevernom Iraku, sadrži velike količine polena iz osam vrsta biljaka, od čega je sedam i danas poznato kao biljni lijek. Neke od njih su: *Centaurea solstitialis* L., *Ephedra altissima* Desf., *Achillea* sp., *Althea* sp., *Muscari* sp., *Senecio* sp.

Najraniji navodi ljekovitih biljaka stari su preko 5000 godina, a zabilježeni su u drevnoj civilizaciji Sumeraca u Mesopotamiji, na glinenim pločicama koje sadrže popis stotine biljnih vrsta. *Papyrus Ebers*², čuveni dokument iz starog Egipta napisan oko 1550. godine prije nove ere, opisuje oko 850 biljnih lijekova. Naravno, zbog specifičnosti korištenog drevnog pisma, nikada se sa sigurnošću neće znati pouzdan prevod ovog papirusa, ali je izvjesno da se spominju ljekovite biljke kao što su: aloja, češnjak, kleka, mandragora, kanabis itd. Pomen ljekovitih biljaka postoji i u staroj Indiji, u Ayurvedskoj medicini³ koja je prakticirana oko 4000 godina prije nove ere. O tome svjedoče prastari dokumenti kao što su: Atharva Veda, Rig Veda i Sushruta Samhita.

Ayurveda je kao najstarija forma tradicionalne azijske medicine uticala na razvoj praktičnije i manje ezoterične forme lijekova, korištenih za rutinske ili manje ozbiljne bolesti u kućnim uslovima. Jedna od prvih preteča modernih farmakopeja datira iz stare kineske medicine, iz vremena Shang dinastije iz bronzanog doba, a navodi biljne lijekove kao što su: hidnokarpus, efedra, konoplja itd.

² Jedan od najstarijih i najvažnijih medicinskih papirusa starog Egipta. Pronašao ga je u Tebi 1873/1874. godine Georg Ebers, a danas se čuva u biblioteci Univerziteta u Leipzigu u Njemačkoj.

³ Ayurveda - medicinski sistem ili koncept, s korijenima na Indijskom subkontinentu. Globalizirana i modernizirana praksa izvedena iz Ayurvedske tradicije danas je vrsta alternativne medicine.

U drevnoj kineskoj medicini, najpoznatije djelo je *Shennong Bencaojing*, za koje se vjeruje da je pisano u periodu 220. do 206. godine p.n.e. Iako originalni tekst više ne postoji, smatra se da je cijelo djelo bilo načinjeno u tri toma i da je ukupno sadržavalo 365 navoda lijekova i njihove upotrebe. Osim toga, za svaku navedenu biljku bili su prezentirani podaci o geografskom porijeklu, optimalnom periodu sakupljanja, terapijskim odlikama, tipovima pripravaka i doza itd. Ovakvi drevni navodi su revitalizirani u 16. stoljeću, pa prvi sistematski tretman biljnih lijekova *Ben Cao Gang Mu* (*Compendium of Materia Medica*; Li Shizen) sadrži informacije o 1892 droge, organizirane kroz 52 poglavlja i u kontekstu više od 11.000 recepata. Do 1875. godine, kineski sistem je bio glavna forma medicinske prakse u Japanu, gdje je stigao preko Koreje i uklopljen je u nativnu medicinu. *Kampo* je pojam koji označava tradicionalnu japansku medicinu, koja se nakada tumači kao niskodozni oblik tradicionalne kineske medicine. Srodni tipovi medicinske prakse uključuju i *Jamu*, indonezijski sistem.

U staroj Grčkoj i Rimu dolazi do procvata herbalistike, pa brojni učenjaci i filozofi kontempliraju i zapisuju liječenje biljkama. Jedan od pionira je svakako Hipokrat, koji se i danas smatra ocem zapadnjačke medicine, sa svojim djelom *Hippocratic Corpus*.

Još jedan grčki liječnik koji je praksu obavljao u Rimu je Galen od Pergamona, poznat po svojoj dosljednosti da sva svoja medicinska znanja zapiše. Njegovo najpoznatije djelo je *Radovi iz terapeutike* (djelo iz tri toma o liječenju bolesti, lijekovima koji se lako pripremaju, te komentari na Hipokratove tretmane: *De Medendi Methodo, Seu de Morb Curandis; De Remediis Paratu Facillibus Libellus; In Hippocratis de Officina Medici*). Galenov iscrpni rad poslužio je brojnim kasnijim farmaceutima da kalibriraju lijekove na individualan način, respektirajući četiri osnovne osobine svakog pojedinca⁴ (Slika 1.1.).

⁴ Galen je razradio Hipokratovu humoralnu teoriju koja je zasnovana na ideji da je tijelo zdravo ukoliko su četiri životne tečnosti u balansu, dok njihovim disbalansom nastaju fiziološki poremećaji i psihička stanja. Četiri životna soka su: krv (lat. *sanguis*), žuta žuč (grč. *chole*), crna žuč (grč. *melaina chole*) i limfa (grč. *phlegma*). Prema ovim nazivima formulirana su i četiri temperamenta: sangvinik, kolerik, melankolik i flegmatik. Teorija, iako suštinski prevaziđena, i danas je vrlo popularna.



Slika 1.1. Četiri temperamenta: kolerik, flegmatik, melankolik i sangvinik

Prvi botanički sistematski tekst usko je vezan za detaljniju upotrebu ljekovitih biljaka, a napisao ga je Aristotelov učenik Teofrast u 4. st. prije nove ere, pod naslovom *Historia plantarum*.

1.1.1. Pedanius Dioscorides, *De materia medica*

De materia medica je kapitalno djelo koje je po svojoj strukturi farmakopeja o ljekovitim biljkama i lijekovima koji se od njih dobijaju. Djelo od pet tomova je napisano između 50-tih i 70-tih godina nove ere, od strane Pedanijusa Dioskoridesa (Slika 1.2.), grčkog ljekara u rimskoj armiji. Kontinuirano je čitano preko 1500 godina, dok nije zamijenjeno revidiranim herbalima u doba renesanse, što ga čini jednom od najtrajnijih prirodnjačkih knjiga svih vremena. Djelo opisuje mnoge lijekove dobijene od biljaka kao što su: akonitum, aloja, kolhikum, opijum itd. Sveukupno, pomenuto je oko 600 biljaka, te oko 1000 lijekova načinjenih od njih. *De materia medica* je ilustrirani rukopis, višestruko kopiran na grčkom, latinskom i arapskom jeziku za vrijeme srednjeg vijeka. Tokom 16. stoljeća Dioscoridesovi tekstovi su prevedeni na talijanski, njemački, španjolski i francuski jezik, a 1655. godine i na engleski.

Ovo djelo predstavlja temelj herbala koji su pisani na tim jezicima, a koji su postepeno uključivali sve više direktnih opservacija, suplementiranja i eventualnih izmjena klasičnog teksta. Nekoliko prepisa i ranih štampanih verzija *De materia medica* je preživjelo, uključujući ilustrirani rukopis *Vienna Dioscurides*, napisan na originalnom grčkom jeziku u šestom stoljeću u Konstantinopolju.

Tamo je dalje korišten od strane bizantinaca preko hiljadu godina. Knjiga je bila osnovna referenca u farmakologiji diljem Evrope i Bliskog Istoka kroz više od 1500 godina i svakako predstavlja preteču modernih farmakopeja.

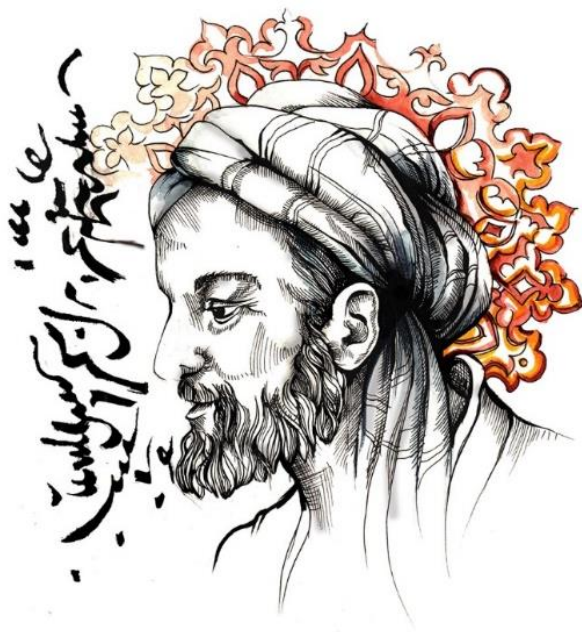


Slika 1.2. Pedanius Dioscorides (c. 40-90 Anno Domini)

Svaki unos u ovom djelu daje veliki broj detalja koji se odnose na pojedinu biljku ili supstancu, fokusirajući se na medicinsku upotrebu ali navodeći i drugu upotrebnu vrijednost, te čak naglašava detalje potrebne za determinaciju pojedinih vrsta. Djelo je podijeljeno u pet tomova: tom 1 - aromatične biljke (aromatična ulja, biljke koje ih proizvode i masti koje se iz njih dobijaju. Navedeni su: kardamon, valerijana, cimet, sena, hmelj, erika, dunja, jabuka, breskva, marelica, limun, kruška, šljiva itd.); tom 2 - od životinja do biljaka (navodi životinje, mliječne proizvode, žitarice. Od biljaka se pominju: cvekla, šparoga, češnjak, crveni luk, kapari i sl.); tom 3 - korjenje, sjeme i biljke (rabarbara, gencijana, gliciriza, kim, peršun, komorač itd.); tom 4 - korjenje i biljke, nastavak (čistac, poligonum, klematis, preslica, narcis itd.); tom 5 - loza, vino i minerali (vinova loza, grožđe, groždice, mandragora, kukurjek itd.).

1.1.2. Srednji vijek i moderno doba

Nakon okupacije južnih dijelova rimskog carstva od strane arapskih trupa, grčki medicinski tekstovi su prevedeni i prilagođeni na arapski jezik. U islamskom zlatnom dobu, učenjaci su prevodili brojne klasične grčke tekstove, uključujući Dioscoridesa, na arapski jezik, te su dodavali vlastite komentare. Herbalizam je procvjetao u islamskom svijetu, osobito u Bagdadu i Al-Andalusu. Među mnogim radovima o ljekovitim biljkama, ističu se djela Abulcasisa od Kordobe i Ibn al-Baitara. Također, Avicenna od Afshana (perz. *Ibn Sina*; 980-1037) (Slika 1.3.) je mnoge ljekovite biljke uključio u svoj monumentalni *Kanon medicine* (*Qanun fi'l tibb*) iz 1025. godine, a samo djelo je predstavljalo standardnu medicinsku referencu za arapski svijet.



Slika 1.3. Ibn Sina, autor čuvenog *Kanona medicine*

Kanon medicine, pisan pod velikim uticajem Galena, modificirao je skolastičke tradicije i na širem geografskom području, a osobito u južnoj Evropi. Abu-Rayhan Biruni, Ibn Zuhri, Peter od Španije i John od St. Amada su imena vezana za pisanje prvih farmakopeja.

U kršćanskoj Evropi tekstovi klasičnih grčkih i rimskih autora su kopirani iz arapskih zapisa i anotirani, često od strane svećenika. U ranom srednjem vijeku, benediktinski manastiri su sačuvali mnoga znanja iz Evrope i to prevođenjem i kopiranjem klasičnih tekstova, kao i održavanjem botaničkih vrtova. Od posebnog interesa je djelo *Capitulare de villis* Čarlsa Velikog (747-814), koji je nakon sadnje velikog broja ljekovitih biljaka u kraljevski botanički vrt, iste izučavao i opisivao. Walafrid Strabo (808-849), svećenik iz njemačkog manastira Reichenau napisao je dva kapitalna djela, *Liber de cultura horticulturna*, prvu knjigu medicinske botanike i *Hortulus*, latinsku poemu o ljekovitim lokalnim biljkama, koja se ističe kako po kvaliteti same poezije, tako i po živopisnoj deskripciji odlika ljekovitih biljaka.

Vrhunac srednjevjekovne medicinsko-botaničke literature je dostignut u 11. stoljeću sa djelom *De viribus herbarum* koje je sačinio Macer Floridus, a koje predstavlja poemu sa opisom 65 ljekovitih biljaka i začina⁵. Još jedno važno ime koje se veže za deskripciju ljekovitih odlika biljnih vrsta je benediktinska časna sestra, Hildegard od Bingena (1098-1179), te njena djela *Physica* i *Cause et curae*, u koja je uvrstila brojne lijekove popularne tokom 12. stoljeća.

Preko 1500 godina najuticajnije botaničko-medicinsko djelo na području Evrope je bila Dioscoridesova *De materia medica*. Šira distribucija informacija o ljekovitim biljkama u Evropi se veže za pojavu prvih herbala, koji su vrlo brzo stekli veliku popularnost i koji su učinili informacije dostupnim široj populaciji. Rani herbali su se i dalje ogledali veoma naglašenim uticajem grčko-rimskog koncepta, ali su bili pod uticajem i drugih izvora. Herbali su brzo postali dostupni na različitim evropskim jezicima, a zapravo su i brojni kasniji autori kopirali, prevodili i reinterpretirali ranije knjige.

⁵ Macer Floridus je navodni pseudonim francuskog klerika i liječnika po imenu Odo de Meung. Upotreba riječi *Macer* aludira na ime rimskog pjesnika Aemilijusa Macera. *De Viribus Herbarum* govori o ljekovitim osobinama biljaka, a pisan je na latinskom heksametru u rimama koje su srednjevjekovnim liječnicima i apotekarima olakšavali pamćenje recepata za biljne pripravke. Prva štampana verzija ovog djela obuhvatila je 77 ljekovitih biljaka, a objavljena je 9. maja 1477. godine.

Herbali su svakako promijenili ulogu evropske farmaceutske i medicinske prakse, jer je postojanje tekstova na različitim jezicima učinilo da skolastičke ideje i informacije postanu dostupne široj javnosti, te su tako pisane knjige postale nova pokretačka sila fitoterapije na području Evrope.

Fitoterapija se rapidno razvijala kroz naredna stoljeća, čemu je doprinijela i sve češća razmjena droga i otkriće ljekovitih biljaka sa novim svojstvima tokom okupacije i istraživanja američkog kopna i nekih regija Azije i Afrike (tzv. Novi svijet). Za ovo razdoblje vezuje se i fenomen Kolumbijske razmjene, koji je mnoge ljekovite biljke donio u Evropu, npr. češnjak, đumbir, kurkumu i sl. U Meksiku se u ovo vrijeme piše *Badianus Manuscript*, ilustrirani herbal na Nahuati i latinskom jeziku.

Prve farmakopeje su nastale prvenstveno s ciljem kreiranja reda u velikom broju tada dostupnih biljnih pripravaka i različitih kompozicija lijekova. Među prvim evropskim farmakopejama su: *Ricettario Fiorentino* (Firenca, Italija; 1498), *Pharmacopoeia of Nuremberg* ili *Pharmacorum omnium* (Frankonia, Njemačka; 1546), te *Pharmacopoeia Londiniensis* (Ujedinjeno Kraljevstvo; 1618). Rano moderno doba, tačnije period 16. vijeka bilježi procvat upotrebe ljekovitih biljaka diljem Evrope i pojavu prvog herbala na engleskom jeziku, anonimni *Grete Herball* iz 1526. godine. Za tim slijede dva najpoznatija herbala na engleskom jeziku, prvo *The Herball of General History of Plants* Johna Gerarda 1597. godine, a potom *The English Physician Enlarged* Nicholasa Culpepera iz 1653. godine. Tokom 17. i 18. stoljeća znanje o biljnim drogama je raslo, ali su svi zabilježeni pokušaji destiliranja aktivnih sastojaka ostali bezuspješni. Najvažniji ishod tokom ovog perioda je detaljna opservacija kliničke učinkovitosti ljekovitih produkata. Ipak, u 17. vijeku dolazi do polaganog opadanja važnosti koje su biljke imale u terapijskom smislu.

Na ovo je najviše uticala pojava epidemije kuge, tzv. Crne smrti ili Velike smrti, jer je postalo očigledno da se ovakva stanja ne mogu liječiti niti zaustaviti primjenom Galenove ideje o četiri dominantna elementa u tijelu. Kuga, bolest čiji je uzročnik bakterija *Yersinia pestis*, ostala je zabilježena kao pandemija najvećih razmjera u ljudskoj historiji, sa 75-200 miliona smrtnih slučajeva. Tadašnji ljekari su u cilju zaštite od zaraze nosili i danas čuvena crna odijela sa posebno izrađenim maskama u obliku kljuna, načinjenim tako da je u unutrašnji dio maske moguće staviti ljekovito bilje, s ciljem neke vrste filtriranja i pročišćavanja zraka prije nego uđe u nosnice i respiratorni trakt.

Biljni materijal korišten u te svrhe bio je dostupan u lokalnim apotekarskim trgovinama pod imenom *Theriac*⁶ (Slika 1.4.). U sastavu jednog *Theriac*-a preuzetog iz Amsterdamer Apotheek (1683) mogu se uočiti navodi brojnih biljaka. Svakako, imena su tentativna i predstavljaju dostupne prevode starih latinskih naziva. Tako na primjer kao korjenje su korištene biljke: *Iris* sp., *Balsamorhiza deltoidea*, *Potentilla reptans*, *Rheum rhabarbarum*, *Zingiber officinale*, *Angustifolia odorata*, *Gentiana* sp., *Meum athamanticum*, *Valeriana* sp., *Corydalis cava*, *Glycyrrhiza* sp. Kao grančice i kora navedeni su *Cinnamomum zeylanicum* i *C. aromaticum*, kao list *Teucrium scordium*, *Fraxinus excelsior*, *Clinopodium calamintha*, *Marrubium vulgare*, *Cymbopogon citratus*, *Teucrium chamaedrys*, *Laurus nobilis*, *Polium montanum*, *Cytinus hypocistis*. U pripravku je korišten cvijet od sljedećih biljaka: *Rosa* sp., *Crocus sativus*, *Lavandula stoechas*, *L. angustifolia*, *Centaurea minoris*; kao plod i sjeme: *Brassica napus*, *Petroselinum* sp., *Nigella sativa*, *Pimpinella anisum*, *Elettaria cardamomum*, *Foeniculum vulgare*, *Hypericum perforatum*, *Thlaspi* sp., *Daucus carota*, *Piper nigrum*, *P. longum*, *Juniperus* sp., *Syzygium aromaticum* itd. Pored biljnih, ovaj osobiti pripravak je redovno sadržavao i druge komponente kao što su gume, rezini, ulja, životinjski produkti, mineralne supstance itd.

Tokom narednih stotinu godina napisana su djela kao što su: Dodoenov *Novi Herbal* (1619), Buchanova *Domestic Medicine* (1769), Duncanov *Edinburški Novi Dispensatorij* (1818) i dr. Historijski gledano, najznačajniji prevrat u poimanju i korištenju ljekovitih biljaka se dogodio u ranom 19. stoljeću, kada je postalo jasno da ljekovite odlike biljaka potiču od posebnih molekula koje mogu biti izolirane i karakterizirane.

Ova saznanja su vodila ka razvoju posebnog istraživačkog polja nazvanog „hemija prirodnih produkata“ ili specifično za biljke, „fitohemija“.

⁶ *Theriac* je drevni multikomponentni pripravak, prvobitno napravljen kao lijek protiv ujeda zmije, psa ili divljih zvijeri, a kasnije je postao antidot svim poznatim otrovima. Sam naziv *theriac* potiče od grčke riječi *theriakos* (divlje zvijeri). Prvu formulaciju je načinio kralj Mitridat IV, a tokom prvog stoljeća je Neronov liječnik, čuveni Andromah radio na poboljšanju formulacije. Tokom srednjeg vijeka, *theriac* je ušao u zvanične dispensarije i farmakopeje, a najpoznatiji i najskuplji u Evropi je bio onaj u Veneciji. Tek u 18. stoljeću je *theriac* isključen iz medicinske upotrebe.

Mjesto biljaka u medicini je u ovom periodu drastično promijenjeno upravo zbog primjene hemijskih analiza koje su dovele do izolacije čistih hemijskih spojeva i determiniranja njihove strukture.



Slika 1.4. Drevna upotreba aromatičnog bilja u prevenciji kuge

Primjeri čistih supstanci i ljekovitih (i/ili otrovnih!) biljaka iz kojih su one izolirane su: morfin (*Papaver somniferum* L.), hinin (*Cinchona succirubra* Pav. ex Klotzch. i druge vrste), salicin (*Salix* sp.), atropin (*Atropa belladonna* L.), kofein (*Coffea arabica* L. i *C. canephora* Pierre ex A. Froehner), konin (*Conium maculatum* L.), emetin (*Cephaelis ipecacuanha* /Brot./A. Rich.), strihnin (*Strychnos* sp.) itd. Kako je hemijska znanost napredovala, otkrivene su nove klase farmakološki aktivnih supstanci u ljekovitim biljkama. Komercijalna ekstrakcija purificiranih alkaloida je počela 1826. godine u njemačkom Merck-u. Jedno od glavnih postignuća nauke na polju istraživanja ljekovitih biljaka tokom 19. stoljeća je upravo razvoj različitih metoda za istraživanje farmakoloških učinaka biljnih ekstrakata i njihovih pojedinih komponenata.

S tim ciljem, u navedenom periodu se dogodila svojevrsna integracija etnobotaničkih, farmakoloških i fitohemijskih istraživanja. Iako je ovaj kompleksni proces objektivno trajao decenijama, omogućio je definiranje pristupa istraživanju i farmaceutskoj upotrebi ljekovitih biljaka. Na koncu, biljni lijekovi su transformirani u hemijski definirane droge.

Tokom dvadesetog vijeka zabilježeni su važni događaji u svijetu nauke koji su itekako uticali na upotrebu ljekovitih biljaka u cilju liječenja bolesti. Jedan od takvih kapitalnih događaja je i otkriće antibiotika (penicilin 1928. godine; Fleming, Chain i Florey su podijelili Nobelovu nagradu iz fiziologije i medicine 1945. godine za „otkriće penicilina i njegove kurativne učinke u brojnim infektivnim bolestima“.). Upravo ovakvi produkti su zauvijek promijenili percepciju i same načine upotrebe biljnih pripravaka i njihovih metabolita kao lijekova. U drugoj polovini 20. vijeka dolazi do rapidne ekspanzije znanja o sekundarnim produktima, njihovoj biosintezi, te njihovim biološkim i farmakološkim učincima.

1.2. Definiranje osnovnih pojmova

Povijest *herbalizma*, tj. upotrebe ljekovitih biljaka je usko povezana sa poviješću medicine, gdje se gotovo paralelno razvijaju još od prahistorije. Također, pojam herbalistike veže se i za upotrebu hrane, osobito kada su u pitanju začini, korišteni često u antimikrobne svrhe. Iako su se u 19. stoljeću pojavile i prve prave naučne teorije o nastanku bolesti, koje su donekle izmijenile, pa i reducirale herbalistiku, korištenje ljekovitih biljaka aktuelno je i danas, u vidu tradicionalne ili alternativne medicine.

Farmakognozija po definiciji⁷ predstavlja studiju fizičkih, hemijskih, biohemijskih i bioloških osobina lijekova, ljekovitih supstanci ili potencijalnih lijekova i supstanci prirodnog porijekla, kao i potragu za novim lijekovima iz prirodnih izvora. Etimologija naziva dolazi od grčkih riječi *pharmakon* - lijek i *gnosis* - znanje ili latinskog glagola *cognosco* (doslovno: *sa znanjem*; u širem smislu: *konceptualizirati* ili *prepoznati*). Samu riječ farmakognozija su prvi put upotrijebili austrijski ljekar Schmidt 1811, te njemački botaničar Seydler 1815. godine u djelu *Analecta Pharmacognostica*.

⁷ Američko društvo za farmakognoziiju (engl. *American Society of Pharmacognosy*, ASP) je naučno društvo koje promovira razvoj farmakognoziije kroz prezentaciju važnih istraživačkih rezultata i publikacija iz ovog domena. Osnovano je 1959. godine i broji preko 1100 aktivnih i pridruženih članova širom svijeta.

Kraća definicija farmakognozijske mogla bi biti: upotreba biljaka u farmaciji. Početkom 20. vijeka dolazi do razvoja ove discipline mahom u botaničkom smislu, u pravcu deskripcije i identifikacije lijekova. Moderno vrijeme je značilo pravi procvat farmakognozijske, s obzirom da je njen konvencionalni botanički pristup proširen na molekularni i metabolički nivo. U determiniranju i razgraničavanju pojma farmakognozija često se navodi širi spektar pojmova kao što su: *etnobotanika*⁸ (tradicionalna upotreba biljaka u medicinske svrhe) i *etnofarmakologija*⁹ (istraživanje farmakoloških kvaliteta tradicionalnih medicinskih supstanci). Moglo bi se reći da se pojmovi etnobotanika i etnofarmakologija odnose na historijski aspekt upotrebe ljekovitih biljaka u različitim društvima. Također, literatura iz navedene oblasti često koristi izraz *fitoterapija*, koji predstavlja medicinsku upotrebu biljnih ekstrakata, odnosno kliničku upotrebu biljnih lijekova u širem smislu. Pojam fitoterapija je češće zastupljen na području kontinentalne Evrope, dok na tlu Ujedinjenog Kraljevstva dominira termin biljna medicina (engl. *herbal medicine*), koji praktično definira istu praksu. *Fitohemija* podrazumijeva istraživanje hemijskih supstanci iz biljaka i identifikaciju novih lijekova kandidata iz biljnih izvora. Biljni lijekovi se još označavaju kao biljni ljekoviti produkti ili fitomedikamenti.

Determinacija i razumijevanje ljekovitog i antimikrobnog djelovanja biljaka i njihovih produkata neizostavno obuhvata i interesne sfere, koncepte i metodologije drugih disciplina kakve su botanika, mikrobiologija, hemija, genetika, molekularna biologija, proteomika, genomika, biotehnologija, biomedicina, farmakologija, farmaceutika, klinička farmacija itd.

⁸ Pojam *etnobotanika* je skovao američki botaničar J. W. Harshberger (1869-1929) početkom 20. stoljeća. Etnobotanika izučava odnos između ljudi i biljaka u svojoj kompleksnosti i generalno je zasnovana na detaljnoj opservaciji i studiji upotrebe biljaka u društvu, uključujući vjerovanja i kulturološke prakse povezane s tom upotrebom.

⁹ Etnofarmakologija je specifično polje istraživanja sa relativno kratkom historijom. Termin je prvi put korišten 1967. godine u naslovu knjige o halucinogenima, a danas se šire definira kao opservacija, identifikacija, deskripcija i eksperimentalna studija sastojaka i njihovih učinaka, kao i učinaka kompletnih droga. Disciplina se uglavnom doživljava kao interdisciplinarno istraživanje biološki aktivnih agenasa tradicionalno korištenih ili opserviranih od strane čovjeka.

POGLAVLJE 2

INFEKTIVNE BOLESTI I NJIHOVI UZROČNICI

Irma Mahmutović-Dizdarević



Uloga beskonačno malog, u prirodi je beskonačno velika.

Louis Pasteur

Infektivna bolest se može definisati kao oboljenje uzrokovano patogenima ili njihovim toksinima, a koje nastaje putem transmisije od inficirane osobe, životinje ili kontaminiranih objekata do osjetljivog domaćina. U mikrobiologiji, pod infektivnim agensima smatraju se bakterije, virusi, gljivice, paraziti, te subviralni patogeni odnosno viroidi i prioni. Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije, infektivne bolesti izazivaju patogeni mikroorganizmi, a bolest se može širiti direktno ili indirektno, sa osobe na osobu. Infekcija doslovno predstavlja svojevrsnu invaziju tkiva domaćina od strane patogena, njihovu multiplikaciju i reakciju samog tkiva domaćina na infektivni agens i toksine koje produkuje. Znaci i simptomi infekcije ovise od tipa bolesti, a u određenim slučajevima infektivne bolesti mogu biti i asimptomatske. Infektivne bolesti su vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta u svijetu, osobito u siromašnim zemljama, te kod određenih skupina stanovništva.

2.1. Mijazmatska teorija

Mijazmatska teorija (engl. *miasma theory* ili *miasmatic theory*) je zastarjela medicinska teorija koja zastupa ideju da su bolesti uzrokovane mijazmama (grčka riječ za zarazu), škodljivom formom zraka poznatom i kao „loši zrak“ ili „noćni zrak“. Ovu teoriju je zastupao još Hipokrat u četvrtom vijeku prije nove ere i unatoč širokoj prihvaćenosti na prostoru drevne Evrope i Kine, teorija je postepeno napuštena nakon 1880. godine i zamijenjena tzv. germinativnom teorijom bolesti.

Mijazmatsku teoriju je među prvima testirao i ispitivao John Snow, sugerirajući da mora postojati neko sredstvo putem kojeg se bolest širi. Ipak, kako je mijazmatska teorija uglavnom zastupana od strane italijanskih naučnika, otkriće patogenih bacilusa (Filippo Pacini, 1854) je gotovo u potpunosti ignorirano. Otkriće bakterije *Bacillus anthracis*, uzročnika antraksa, od strane Roberta Kocha 1876. godine je označilo definitivni kraj mijazmatske teorije. U periodu od 1860. do 1864. godine Louis Pasteur je proveo brojne eksperimente koji su povezivali uzročnike bolesti i samu bolest, te je pokazao da se fermentacija i rast mikroorganizama u hranjivim podlogama ne odvijaju spontanom generacijom. Tokom 19. stoljeća mikroskopske tehnike su poboljšane, što je omogućilo većem broju ljudi da vide mikroorganizme. Slika 2.1. na satiričan način prikazuje zaprepaštenje stanovnice tadašnjeg Londona kada prvi put vidi groteskne mikroorganizme prisutne u vodi iz rijeke Temze¹⁰.



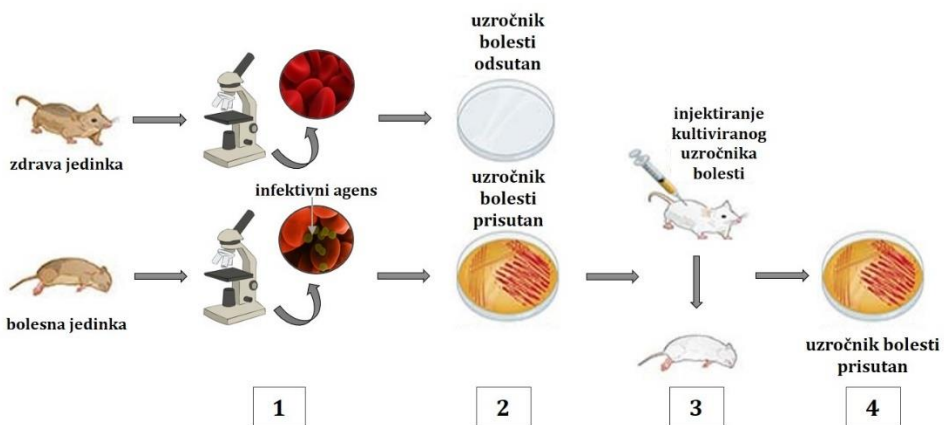
Slika 2.1. *Monster soup*, William Heath

¹⁰ Originalni naslov printa je: *Monster soup commonly called Thames water, being a correct representation of that precious stuff doled out to us!!!* Autor grafičkog prikaza je W. Heath, a godina nastanka je najvjerovatnije 1828. Print je publicirao Thomas McLean, a pohranjen je zbirku Britanskog muzeja 1935. godine pod brojem: 0522.4.121.

2.2. Germinativna teorija

Germinativna teorija bolesti (engl. *germ theory of disease*) je trenutno prihvaćena naučna teorija koja se odnosi na brojne bolesti. Ova teorija zastupa stav da patogeni mikroorganizmi (engl. *germs*) mogu dovesti do razvoja bolesti. Ovi organizmi, premali da bi se vidjeli golim okom, napadaju ljude, životinje i druge žive sisteme, a njihov rast i reprodukcija unutar domaćina uzrokuju bolest. Pojam *germ* ne odnosi se samo na bakterije, nego na bilo koji tip mikroba koji može uzrokovati bolest: protisti, fungi, virusi, prioni i viroidi. Bolest uzrokovana patogenom se označava kao infektivna bolest. Znanstveno objašnjenje činjenice da infektivnu bolest izaziva mikroorganizam datira iz 19. stoljeća i kondenzirano je u četiri osnovne tvrdnje poznate kao Kochovi postulati (Slika 2.2.):

1. Mikroorganizam mora biti detektovan u svim oboljelim organizmima, ali ne smije biti pronađen u zdravim.
2. Mikroorganizam mora biti izoliran iz oboljelog organizma i uzgojen u kulturi.
3. Kultivirani mikroorganizam treba izazvati bolest nakon introdukcije u zdrav organizam.
4. Mikroorganizam mora biti ponovno izoliran iz inokuliranog, oboljelog eksperimentalnog domaćina i identificiran kao identičan originalnom uzročniku bolesti.



Slika 2.2. Kochovi postulati - temelj naučnog pristupa u mikrobiologiji tokom 19. stoljeća

Napretkom naučnih disciplina iz polja medicine, mikrobiologije, genetike i molekularne biologije Kochovi postulati su bili pod čestim revizijama, a jedna od najpoznatijih je ona izvršena od strane Fredricksa i Relmana, koji su ih modificirali u skladu sa dostignućima nauke u 21. stoljeću. Čak i u Kochovo vrijeme, bilo je poznato da su neki infektivni agensi odgovorni za bolest iako ne zadovoljavaju sve navedene postulate. Pokušaji da se Kochovi postulati strogo primijene u dijagnostici virusnih bolesti u periodu kasnog 19. stoljeća (u vrijeme kada virusi nisu mogli biti niti viđeni niti izolirani u kulturi) čak su usporili razvoj virologije kao naučne discipline. Sam Koch je odbacio univerzalni zahtjev prvog postulata kada je otkrio asimptomatske nosioce kolere, te kasnije i tifusne groznice. Asimptomatski ili subklinički nosioci infekcije su česti kod brojnih infektivnih bolesti, osobito onih uzrokovanih virusima (npr. polio, herpes simplex, HIV, hepatitis C, SARS-CoV-2). Drugi postulat se također može napustiti kod određenih mikroorganizama ili entiteta koji se ne mogu uzgojiti u čistoj kulturi (npr. prioni). Treći postulat trebao bi svakako biti tumačen kao „treba“, umjesto „mora“, jer kao što je Koch i sam dokazao kod tuberkuloze i kolere, svi organizmi izloženi infektivnom agensu ne stižu infekciju, iz različitih razloga (generalno zdravstveno stanje, dobro funkcioniranje imunog sistema, stečeni imunitet ili urođeni tj. genetički imunitet). Trenutno, veliki broj infektivnih agenasa ne zadovoljava sve Kochove postulate, te stoga oni ne trebaju biti shvaćeni rigidno i isključivo, nego u kontekstu historijskog značaja i pristupa mikrobiološkoj dijagnostici. Zadovoljavanje sva četiri postulata nije nužno da se dokaže kauzalitet bolesti.

2.3. Lanac infekcije

Lanac infekcije je fundamentalan u prevenciji i kontroli infekcija. Sve komponente lanca infekcije moraju biti prisutne kako bi se infekcija desila, a ukoliko samo jedna karika lanca nedostaje ili je namjerno oslabljena, širenje bolesti može biti uspješno kontrolirano. Karike lanca infekcije su: infektivni agens, rezervoari, mjesto izlaska, transmisija (na različite načine), mjesto ulaska i osjetljivi domaćin (Slika 2.3.).

- *Infektivni agens*

Infektivni agens je mikroorganizam (ili mikrob, u širem smislu riječi koji podrazumijeva i acelularne infektivne agense) sa sposobnošću uzrokovanja infekcije.

Što je veća njegova virulencija (mogućnost rasta i multiplikacije), invazivnost (mogućnost prodiranja u tkiva) i patogenost (mogućnost uzrokovanja bolesti), veća je i mogućnost da će uzrokovati infekciju.

- *Rezervoari*

Rezervoari su mjesta unutar kojih mikroorganizmi opstaju i reproduciraju se.

- *Mjesto izlaska*

Mjesto izlaska (engl. *portal of exit*) se odnosi na način na koji mikroorganizam napušta rezervoar. Na primjer nos ili usta prilikom kihanja i kašljanja, putem fecesa itd.

- *Način transmisije*

Način transmisije je put (ruta) ili metod transfera putem kojih se infektivni agens prenosi iz jednog mjesta u drugo do novog domaćina. Osnovni načini su: kontakt (direktni i/ili indirektni), kapljični put, putem zraka (engl. *airborne*), putem vektora i vehikularni prenos. Transmisija direktnim kontaktom je najčešći način prenosa infektivnih agenasa i ostvaruje se direktnim fizičkim kontaktom sa inficiranom osobom. Primjeri bolesti ili infektivnih agenasa koji se na ovaj način prenose su: streptokokni impetigo (koža na kožu), gonoreja (sluznica na sluznicu), *Salmonella* (fekalno-oralno) itd. Transmisija indirektnim kontaktom podrazumijeva transfer infektivnih agenasa putem kontaminiranih predmeta i također je relativno česta.

Kapljična transmisija uključuje velike kapljice, $\geq 5\mu\text{m}$ u prečniku, a koje dolaze iz respiratornog trakta inficirane osobe za vrijeme kašljanja ili kihanja, te tokom izvođenja medicinskih procedura koje generiraju aerosol. Ove kapljice se ispuštaju na kratke udaljenosti ($<1\text{ m}$) kroz zrak, i ulaze u nazalnu ili oralnu sluznicu novog domaćina. Neki infektivni agensi kao što su respiratorni virusi, preživljavaju na objektima, pa se onda mogu dalje širiti direktnim ili indirektnim kontaktom. *Bordetella pertussis* (uzročnik velikog kašlja ili pertuzisa), meningokok i *Haemophilus influenzae* su neki primjeri mikroorganizama koji se prenose kapljično.

Respiratorna kapljica je mala vodena kap producirana izdisajem, koja se sastoji od mukusa tj. sluzi i drugih materija sa površina respiratornog trakta.

Respiratorne kapljice ljudi uključuju različite tipove stanica, fiziološke elektrolite prisutne u sluzi i potencijalno, različite patogene. Veličina kapljice varira od $< 5 \mu\text{m}$ do $1.000 \mu\text{m}$, pri čemu veće kapljice padaju na površine prije isušivanja, dok manje kapljice postaju aerosol. Kapljice koje se suše u zraku postaju kapljična jezgra koja plutaju kao aerosol i ostaju sesuspendovana u zraku značajan vremenski period. Istraživanja pokazuju da pri brzini vjetra od 4 do 15 km/h, respiratorne kapljice putuju i do 6 metara udaljenosti. Respiratorne kapljice u epidemiološkom smislu nastaju kao rezultat disanja, pričanja, kihanja, kašljanja ili povraćanja, a s obzirom da najčešće sadrže bakterije i viruse, veoma su važne u transmisiji respiratornih bolesti. Transmisija bolesti se dešava kada respiratorne kapljice dotaknu prijemčivu sluznicu, npr. očiju, usta ili nosa. Brojni virusi se šire kapljično, kao na primjer virusi gripe, rinovirusi, enterovirusi, norovirusi, morbilivirusi, koronavirusi itd., ali se kapljično šire i različite bakterije (*Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella* sp., *Coxiella burnetii* itd.) i gljivice. Temperatura prostorije i nivo vlažnosti utiču na preživljavanje bioaerosola, jer kapljice evaporiraju i postaju manje, pa je samim tim manja vjerovatnoća preživljavanja infektivnog agensa kojeg eventualno sadrže. Transmisija infektivnih agenasa putem zraka je vrlo problematična, teško ju je kontrolirati i zahtijeva kontrolu zračnog protoka posebnim ventilacijskim sistemima.

Vehikularni prenos označava širenje infektivnih agenasa kontaminiranim objektima: hranom, lijekovima, intravenskim tečnostima ili različitim drugim predmetima. Transmisija se može ostvariti na više novih osjetljivih domaćina i često rezultira pojavom bolesti na široj skali. *Campylobacter* (hranom), trahoma i sl. primjeri su infekcija koje se prenose vehikularno.

Transmisija vektorima se odnosi na infekcije posredovane insektima i drugim životinjama. Na ovaj način se prenosi veliki broj emergentnih i reemergentnih virusa. Pored toga, transmisija vektorima je karakteristična za: lajmsku bolest (krpeljima), *Shigella* (muhama), epidemijski tifus (vašima), bubonsku kugu (buhama) itd.

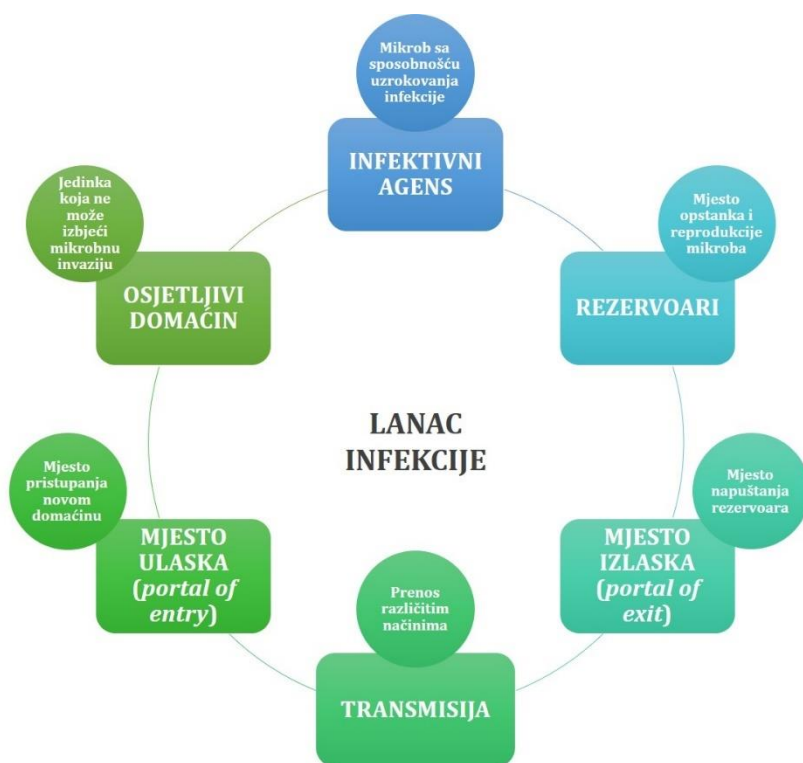
- *Mjesto ulaska* (engl. *portal of entry*)

Mjesto ulaska se odnosi na način na koji infektivni agens ostvaruje pristup do novog domaćina (npr. ingestija, disanje ili punkcija kože).

- *Osjetljivi domaćin*

Osjetljivi domaćin je osoba koja je osjetljiva na bolest, ne posjeduje imunitet ili fizičku rezistenciju da prevaziđe invaziju infektivnog agensa.

Transmisija bilo kojeg infektivnog agensa može biti učinkovito kontrolirana prekidanjem lanca infekcije, s tim da svaka bolest/infektivni agens predstavlja jedinstven problem. U ovom domenu primjenjuju se rutinske i specijalne mjere prevencije.



Slika 2.3. Osnovne karike lanca infekcije

2.4. Najčešće bakterijske infekcije

Bakterije su ubikvitarne¹¹ i igraju nezamjenjivu ulogu u svijetu u kojem živimo. Iako mali procenat poznatih bakterija uzrokuje infekciju i bolest - patogene bakterije, upravo ovi patogeni imaju ogroman uticaj na sveukupno javno zdravlje. Bakterijske i virusne infekcije mogu uzrokovati slične simptome, te ih stoga može biti teško razlikovati. Bakterijske infekcije tipično uključuju simptome kao što su lokalizirano crvenilo, toplinu, otok i bol¹².

Najmarkantnija odlika bakterijskih infekcija je lokalizirana bol u određenom dijelu tijela, dok su virusne infekcije mahom sistemične, odnosno uključuju različite sisteme organa istovremeno. Generalno je pravilo da su bakterijske infekcije lakše za liječenje u odnosu na virusne, s obzirom na opsežnost i dostupnost antibakterijskih lijekova, dominantno antibiotika. U tom smislu, najveći problem koji bi vremenom mogao imati ozbiljne posljedice je sve češća bakterijska rezistencija na sintetske antimikrobne lijekove.

Svi humani organi su podložni bakterijskoj infekciji, a svaka vrsta bakterija ima predispoziciju da inficira određeni organ, a ne inficira neki drugi. Bolest može biti uzrokovana ili destrukcijom stanica organizma ili poremećajem imunog odgovora. Antibiotici mogu biti od pomoći, ali u kojoj mjeri ovisi od mnogo faktora. Vanjsko okruženje je najčešće mjesto u kojem dolazi do interakcije domaćina i bakterija. Bakterije se mogu transmitovati putem vode, vazduha, hrane ili živih vektora. Veoma važnu ulogu u toku infekcije imaju i tzv. rezervoari, a rezervoar predstavlja bilo koje mjesto gdje patogen može preživjeti dok se ne transferira u domaćina. Često se patogeni i multipliciraju unutar svojih rezervoara, a neki od rezervoara su živi (ljudi ili životinje). Neživi rezervoari uključuju hranu, vazduh, zemljište i vodu.

Idealan antimikrobni agens djeluje na ciljnom mjestu patogena prisutnom u inficiranom organizmu, ali ne i u stanici domaćina.

¹¹ Merriam-Webster rječnik definira pojam ubikvitaran kao: *svuda prisutan istovremeno (sveprisutan)*.

¹² Rimski liječnik Aulus Cornelius Celsus je još u prvom stoljeću nove ere u svom djelu *De medicina* definirao osnovne simptome upale, koji se zbog asonacije i danas često navode kao lako pamtljiva grupa kliničkih simptoma: *calor* (toplina), *dolor* (bol), *rubor* (crvenilo) i *tumor* (otok).

U tom kontekstu, četiri ključna mjesta u bakterijskoj stanici mogu biti meta antibiotika jer se dovoljno razlikuju od humane stanice. To su: stanični zid (1), stanična membrana (2), sintetički put nukleinske kiseline (3) i ribosomi (4). Antibakterijski agensi ili antibiotici u prirodnom okruženju tipično nastaju produkcijom od strane drugih mikroorganizama (gljivica), zbog kompeticije za prostor i resurse. Danas je farmaceutska industrija itekako usmjerena na proizvodnju, modifikaciju i prilagodbu sintetičkih antibiotika.

Antibakterijske supstance se mogu klasificirati na različite načine, ali najčešće na osnovu toga da li ubijaju bakterije (baktericidi) ili inhibiraju njihov rast (bakteriostatici); po hemijskoj strukturi; te po ciljnom mjestu djelovanja. Bakterije mogu biti rezistentne na određene klase antibiotika ili zbog toga što im nedostaje ciljno mjesto za djelovanje lijeka ili jer su jednostavno nepropusne za lijek. Druge su opet senzitivne, ali vremenom mogu razviti rezistenciju putem brojnih mehanizama. Rezistentni soj bakterije ima selektivnu prednost, preživljava u prisustvu antibiotika i može se širiti u domaćinu pa čak i transferirati na drugog domaćina. Ovaj fenomen je veoma važan, osobito na mjestima gdje se antibiotici često koriste, kao što su npr. bolničke sredine ili starački domovi.

Kada jedna individua uzima antibiotik, svi mikrobi u organizmu su izloženi djelovanju lijeka, ne samo patogeni. Uzevši sve navedeno u obzir, jasno je da se antibiotici moraju koristiti s velikim oprezom. Nažalost, širom svijeta je primjetan trend prekomjernog, neracionalnog i često pogrešnog korištenja antibiotika. Upravo pojava multirezistentnih sojeva bakterija dovodi do sve izraženije potrebe za pronalaskom alternativnih antimikrobnih lijekova prirodnog, tj. predominantno biljnog porijekla.

2.5. Specifičnosti virusne infekcije

Virusna infekcija predstavlja proliferaciju virusa u zaraženom organizmu. S obzirom na odsustvo stanične građe, poznato je da se virusi ne mogu reproducirati bez domaćina, oni ga inficiraju introdukcijom vlastitog genetičkog materijala, pa kompletna stanična mašinerija bude praktično pretvorena u tvornicu novih virusnih partikula. Virusni se zbog toga označavaju kao molekularni paraziti, a uzevši u obzir put nastanka virusnih proteina (strukturnih i funkcionalnih) i molekularne puteve s kojima interferiraju, često im se pripisuje naziv „paraziti translacije“.

Pojam kontagioznost se odnosi na mogućnost virusa da se transmituje od jednog do drugog domaćina. U kliničkom i terapijskom smislu važna je činjenica da virusi unutar iste porodice načelno dijele osnovne strukturne karakteristike, kao što su: tip genoma, oblik viriona i specifičnost replikacijskog mjesta. Virusna oboljenja se detektuju kliničkom prezentacijom, npr. bol u mišićima ili zglobovima, povišena tjelesna temperatura, osip na koži ili otečene limfne žlijezde. Testiranje na virusnu infekciju može uključivati brojne testove, serološke, molekularne i mnoge druge. Virusne infekcije su najčešće ograničenog trajanja, tako da se tretman uglavnom sastoji u ublažavanju simptoma, te primjeni antipiretika i analgetika. Antivirusni lijekovi su posebna istraživačka oblast interesa s obzirom na specifičnosti infekcije. Nadalje, virusi ne poznaju oštre granice sistematske pripadnosti domaćina, pa se ne može napraviti kategorična podjela između animalnih i humanih virusa. Donedavno se smatralo da biljni virusi ne mogu uzrokovati infekciju i bolest životinja i ljudi, ali je takav način razmišljanja odbačen nakon slučaja u kome je kod osobe sa kliničkim simptomima bolesti i specifičnim imunim odgovorom dokazana vrsta roda *Tobamovirus* (virus blagog šarenila paprike, *Pepper mild mottle virus*) u uzorku stolice.

Ovo je prvi poznati slučaj bolesti uzrokovane virusom koji je ranije smatran isključivo biljnim patogenom, ali je s jedne strane ohrabrujući jer su danas brojna istraživanja usmjerena na pronalazak antitoviralnih supstanci, koje očigledno mogu imati i širu upotrebu.

2.6. Gljivične infekcije

Gljivične infekcije postaju sve veći problem javnog zdravstva. Najčešći fungalni patogeni podrazumijevaju kvasce, vrste roda *Candida* (uglavnom *C. albicans* i *C. glabrata*) i *Cryptococcus*, filamentozne funge iz rodova *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. i *Rhizopus* sp., te dermatofite iz rodova *Trychophyton*, *Microsporium* i *Epidermophyton*. U posljednjih nekoliko decenija, različiti faktori su doveli do veće incidence gljivičnih infekcija, a među najvažnijima su:

1. povećan broj imunokompromitiranih pacijenata koji često razvijaju oportunističke superficijalne i sistemske gljivične infekcije,
2. invazivne medicinske procedure u bolnicama (upotreba katetera, peritonealna dijaliza, hemodijaliza, parenteralna ishrana),
3. emergencija novih i nepoznatih virulentnih sojeva gljivica.

Evolucija gljivičnih infekcija je dodatno usložnjena činjenicom da ih je najčešće teško dijagnosticirati, pa se prepoznaju tek u poodmakloj fazi. Trenutno postoji veliki broj različitih antifungalnih lijekova sa različitim mehanizmima djelovanja, ali im je učinkovitost ograničena zbog faktora kao što su: fungistatični način djelovanja, nedostatak oralnih i intravenskih preparata zbog slabog rastvaranja, toksičnost lijeka i razvoj rezistencije. Zbog navedenog, jasna je potreba za pronalaskom novih antifungalnih agenasa koji bi posjedovali nove mehanizme djelovanja, širok spektar aktivnosti, smanjene kontraefekte i koji bi na koncu bili i ekonomski prihvatljivi. U prirodi postoji veliki potencijal u smislu antimikrobnih lijekova, a neki od antifungalnih agenasa prirodnog porijekla su već u kliničkoj praksi (ehinokandini i sordarini).

2.7. Parazitske infekcije

Paraziti su organizmi koji žive na drugim organizmima, tj. domaćinima, kako bi preživjeli. Neki paraziti ne afektiraju vidljivo svog domaćina, dok drugi mogu rasti, reproducirati se ili invadirati sisteme organa, što dovodi do razvoja parazitske infekcije domaćina. Parazitske infekcije predstavljaju veliki problem u tropskim i subtropskim regijama svijeta, gdje treba istaknuti npr. malariju, koja je prepoznata kao jedna od najsmrtonosnijih parazitskih bolesti. Među poznate parazitske infekcije spadaju i trihomonijaza, giardiaz, kriptosporidioza, toksoplazmoza.

Parazitske bolesti uzrokuju tri ključna tipa organizama: protozoe (1), helminti (2) i ektoparaziti (3), a sama infekcija se širi na razne načine: preko kontaminirane vode, hrane, otpada, zemljišta, krvi, putem seksualnog kontakta ili vektorima.

Tretman parazitske infekcije zavisi od biologije uzročnika i kliničke slike koju razvija pacijent. Vakcinacija u slučaju parazitskih infekcija najčešće nije učinkovita, a paraziti mogu postati rezistentni na dostupne sintetičke lijekove, pa je stoga veoma važno pronaći alternativne izvore antiparazitika. Dokazano je da sekundarni metaboliti biljaka sa naglašenim bioaktivnim djelovanjem mogu interferirati sa centralnim metama u organizmu parazita, kao što su DNK (interkalacijom, alkilacijom), integritet membrane, mikrotubuli i transdukcija signala neuronima. Ove činjenice otvaraju nove mogućnosti za dodatno istraživanje i kliničko testiranje biljnih antiparazitskih lijekova.

2.8. Česte infektivne bolesti čovjeka

Infektivne bolesti su uglavnom karakterizirane po dominantnom sistemu organa koji uključuju, a takav vid klasifikacije je koristan jer predstavlja svojevrsno uputstvo pristupa pacijentu. U Tabelama 2.1.-2.8. prezentirane su česte infektivne bolesti čovjeka, te njihovi najčešći uzročnici.

Tabela 2.1. Najčešći uzročnici infektivnih bolesti na nivou centralnog nervnog sistema

Infekcija	Uzročnik/ci
Akutni bakterijski meningitis	<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Klebsiella</i> spp. <i>Staphylococcus aureus</i>
Virusni meningitis i encefalitis	Enterovirusi Arbovirusi Mumps (<i>Orthorubulavirus</i>) Herpes simplex virus HIV Rabies virus
Granulomatozni meningitis	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Cryptococcus neoformans</i>
Kičmena moždina	<i>Clostridium tetani</i> Polio virus

Tabela 2.2. Najčešće infekcije kože i njihovi uzročnici

Infekcija	Uzročnik/ci
Česte bakterijske infekcije	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Propionibacterium acne</i>
Česte virusne infekcije	Herpes simplex 1 i 2 virusi Papiloma virusi Česti osipi kod djece: Cocksackie virusi, Echovirusi, Erythrovirus B19, HHV 6B, HHV-7, Varicella-Zoster virus, Measles virus (<i>Morbillivirus</i>), Rubella virus (<i>Rubivirus</i>).
Česte gljivične infekcije	<i>Malassezia furfur</i> <i>Candida albicans</i> Dermatofiti: <i>Microsporum</i> , <i>Trichophyton</i> i <i>Epidermophyton</i> .

Tabela 2.3. Najčešće infekcije uha i oka¹³ te njihovi uzročnici

Infekcija	Uzročnik/ci
<i>Otitis media</i> (upala srednjeg uha)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Otitis externa</i> (upala vanjskog uha)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Konjunktivitis</i>	Adenovirusi, Herpes Simplex virusi tipa 1 i 2 <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> i <i>N. meningitidis</i> <i>Chlamydia trachomatis</i>
<i>Keratitis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. viridans</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> Enterokoki <i>Peptostreptococcus</i> <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Bacillus</i> i <i>Clostridium</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> . <i>Neisseria gonorrhoeae</i> i <i>N. meningitidis</i> <i>Moraxella</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Chlamydia trachomatis</i> Herpes simplex 1 i 2 Adenovirusi Varicella Zoster virus

¹³ U infekcije oka spadaju i *blepharitis anterior*, *hordeola*, *periorbitalni (preseptalni) celulitis*, *orbitalni (postseptalni) celulitis* i *dacryocystitis*, ali u ovom tekstu nisu tretirani zbog značajno manje incidence u odnosu na konjunktivitis i keratitis. Uglavnom ih uzrokuju bakterije.

Tabela 2.4. Najčešće infekcije respiratornog trakta i uzročnici

Infekcija	Uzročnik/ci
<i>Akutni rinosinusitis</i>	Brojni respiratorni virusi
<i>Akutni bakterijski rinosinusitis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Rinitis</i>	Rhinovirusi Koronavirusi
<i>Faringitis</i>	Adenovirus Herpes simplex virus Epstein Barr Virus Coxsackie viruses <i>Streptococcus pyogenes</i> grupe A
<i>Virusni krup (krupica)</i>	Parainfluenza virus Influenza virus Respiratorni sincicijski virus
<i>Bakterijski traheitis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Bronhitis</i>	Influenza virusi A i B, Parainfluenza virusi Adenovirus Respiratorni sincicijski virus Herpes simplex virus Rhinovirus Coxsackie virus A i B Echovirus <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Chlamydophila pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Bronhiolitis</i>	Respiratorni sincicijski virus
<i>Pneumonia (upala pluća)</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> (grupe B) <i>Chlamydia trachomatis</i> Respiratorni sincicijski virus Parainfluenza virus <i>Mycoplasma pneumoniae</i> Influenza virus tip A <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i>

Tabela 2.5. Najčešće infekcije gastrointestinalnog trakta te njihovi uzročnici

Infekcija	Uzročnik/ci
Infekcije usta i jezika	Herpes Simplex virusi 1 i 2 <i>Candida albicans</i>
Parotitis	Mumps virus (<i>Orthorubulavirus</i>) <i>Staphylococcus aureus</i>
Esofagitis	<i>Candida albicans</i> Cytomegalovirus, Herpes simplex virus, HIV, Varicella Zoster virus
Peptički ulcer (čir na želucu)	<i>Helicobacter pylori</i>
	<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>S. typhi</i> <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>S. sonnei/flexneri</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Clostridium difficile</i> <i>Vibrio cholerae</i>
Upale crijeva	Parazitske upale crijeva: <i>Giardia lamblia</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Cyclospora cayetanensis</i> <i>Enterobius vermicularis</i> <i>Taenia saginata</i> , <i>T. solium</i> <i>Hymenolepis nana</i> <i>Ascaris lumbricoides</i> <i>Necator americanus</i> <i>Strongyloides stercoralis</i>
Virusni gastroenteritis	Norovirus, Rotavirus, Adenovirusi, Astrovirusi
Virusni hepatitis	Hepatitis virusi A, B, C, D, E

Tabela 2.6. Najčešće infekcije kostiju, zglobova i srca

Infekcija	Uzročnik/ci
Osteomijelitis	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus</i> sp. Enterobacteriaceae
Septični artritis	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Perikarditis	Enterovirusi <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

Miokarditis	Enterovirusi
Endokarditis	<i>Streptococcus</i> sp.
Reumatska bolest srca	<i>Streptococcus pyogenes</i>

Tabela 2.7. Najčešće hematopoetske/limforetikularne infekcije

Infekcija	Uzročnik/ci
Infekcije limfocita	HIV/AIDS Infektivna mononukleza (EBV) Citomegalovirus
Infekcije fagocitnih stanica	<i>Bartonella henselae</i> <i>Francisella tularensis</i> <i>Ehrlichia chaffeensis</i> , <i>E. ewingii</i> <i>Anaplasma phagocytophilum</i> <i>Coxiella burnetii</i> <i>Brucella</i> sp. <i>Yersinia pestis</i>
Infekcije eritrocita	<i>Babesia microti</i> <i>Plasmodium</i> sp.
Infekcije endotelijalnih stanica	<i>Bartonella henselae</i> ili <i>B. quintana</i> <i>Borrelia</i> sp. Hantavirus <i>Rickettsia rickettsii</i>
Bakterijska sepsa	<i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>

Tabela 2.8. Najčešće infekcije urogenitalnog trakta

Infekcija	Uzročnik/ci
Cistitis, pijelonefritis, prostatitis	<i>Escherichia coli</i>
Vaginitis	<i>Gardnerella vaginalis</i> <i>Atopobium vaginae</i> <i>Mycoplasma hominis</i> <i>Mobiluncus</i> sp. <i>Prevotella</i> sp. <i>Candida albicans</i> <i>Trichomonas vaginalis</i>
Spolno prenosive bolesti urogenitalnog trakta	
Genitalne ulceracije	Genitalni Herpes - HSV-2 <i>Treponema pallidum</i> <i>Haemophilus ducreyi</i> <i>Klebsiella granulomatis</i> <i>Chlamydia trachomatis</i>

<i>Urethritis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Cervicitis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Druge spolno prenosive infekcije	
<i>Akutna inflamatorna bolest pelvisa</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Genitalne bradavice</i>	Humani papiloma virus
<i>Epididimitis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>

POGLAVLJE 3

ANTIBIOTICI

Irma Mahmutović-Dizdarević



*Ne znate šta ćete pronaći. Možda počnete tražiti jednu stvar,
a otkrijete nešto potpuno drugačije.*

Alexander Fleming

Antibiotici su klasa lijekova namijenjena uglavnom za liječenje bakterijskih infekcija, ali se određeni antibiotici mogu koristiti i protiv parazita. Antibiotici mogu imati bakteriostatsko djelovanje (zaustavljaju reprodukciju bakterija), baktericidno djelovanje (ubijaju bakterije) ili ispoljavaju oba mehanizma djelovanja. Učinkovitost antibiotika se između ostalog procjenjuje u odnosu na spektar bakterija protiv kojih djeluju, i u tom smislu razlikuju se antibiotici uskog spektra (djelotvorni protiv manjeg broja bakterija) i antibiotici širokog spektra (djeluju na široki raspon patogena). Većina antibiotika djeluje putem inhibicije sinteze staničnog zida bakterija, inhibicije sinteze proteina ili određenih bakterijskih enzima (npr. tetrahidrofolne kiseline¹⁴ engl. *tetrahydrofolic acid* -THF; RNK-polimeraze itd.).

Česti neželjeni efekti liječenja antibioticima uključuju reakcije preosjetljivosti, ali i nefrotoksične i hepatotoksične učinke. Brojni antibiotici su kontraindicirani kod određenih grupa pacijenata (npr. djeca, trudnice, dojilje). U slučaju ozbiljnih infekcija, moguće je ordinirati jedan ili više antibiotika bez čekanja mikrobiološke potvrde (empirijska antibiotska terapija), a koji spektrom svog djelovanja obuhvata najčešće patogene.

¹⁴ THF: Folatni derivat koji nastaje djelovanjem dihidrofolat reduktaze na dihidrofolnu kiselinu; služi kao kofaktor u sintezi aminokiselina i nukleinskih kiselina.

Antibiotici se često koriste, ali njihova upotreba bez validnih indikacija i u neprimjerenim dozama dovela je do emergencije multirezistentnih patogena kao što su MRSA (meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*), VRSA (vankomicin rezistentni *S. aureus*), ESBL (Gram-negativne bakterije koje produciraju β -laktamaze širokog spektra; engl. *extended spectrum beta-lactamase producing*) sojevi, KPC *Klebsiella pneumoniae* (sojevi koji produciraju karbapenemaze; engl. *carbapenemase producing*) itd.

Kao što je navedeno, antibiotici mogu imati bakteriostatsko ili/i baktericidno djelovanje. U tom smislu, može se istaknuti sljedeće:

Baktericidni lijekovi su supstance koje ubijaju bakterije (npr. β -laktami, glikopeptidi, epoksidi). Ipak, određeni antibiotici su učinkoviti jedino ukoliko se koriste:

- a) u kombinaciji (npr. sulfonamidi kombinirani sa diaminopirimidinom; streptogramin A kombiniran sa streptograminom B),
- b) protiv određenih patogena (npr. oksazolidinoni su baktericidni jedino protiv streptokoka),
- c) u velikim koncentracijama (npr. amfenikoli).

S druge strane, bakteriostatski lijekovi su supstance koje usporavaju rast bakterija ili njihovu reprodukciju (npr. tetraciklini, glicilciklini, makrolidi).

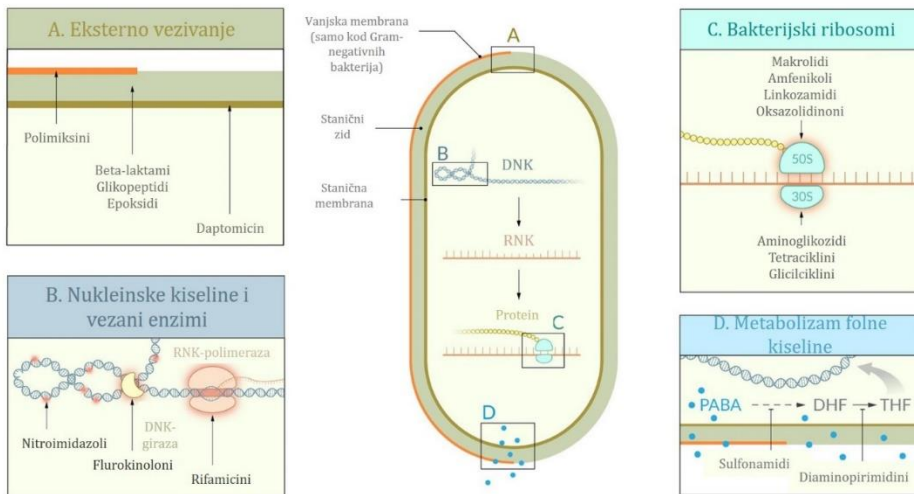
S tim u vezi stoji i da:

- a) neki antibiotici su bakteriostatski samo protiv određenih patogena (npr. glikopeptidi protiv *Clostridioides difficile*),
- b) neki antibiotici mogu biti baktericidni i bakteriostatski (npr. dapsoni),
- c) antibiotici koji interferiraju sa sintezom proteina bakterija ciljaju na podjedinice (30S i 50S) bakterijskih ribosoma (70S) i ne utiču na humane ribosome (80S).

Kao generalno pravilo, agensi koji inhibiraju sintezu staničnog zida su baktericidni (osim etambutola), dok su oni koji inhibiraju sintezu proteina bakteriostatski (osim tigeciklina, rifamicina i aminoglikozida).

3.1. Klase antibiotika

Antibiotici se po načinu svog djelovanja mogu podijeliti na nekoliko klasa. Različiti antibiotici utiču na različite metaboličke procese bakterije kao što su: inhibicija sinteze staničnog zida, disrupcija integriteta stanične membrane, inhibicija sinteze proteina (30S ili 50S podjedinica ribosoma), inhibicija DNK giraze, disrupcija integriteta DNK, inhibicija sinteze i redukcija folne kiseline, antimikobakterijski lijekovi, te ostali (Slika 3.1.).



Slika 3.1. Različite mete antibiotika u bakterijskoj stanici

3.1.1. Inhibicija sinteze staničnog zida

3.1.1.1. β -laktami

β -laktami predstavljaju grupu antibiotika koja posjeduje beta-laktamski prsten u svojoj molekularnoj strukturi. Radi se o antibioticima širokog spektra koji djeluju baktericidno. Mehanizam djelovanja im se zasniva na vezivanju za penicilin-vezujuće proteine (engl. *penicillin-binding proteins*, PBPs), odnosno umrežavanju sa peptidoglikanskim slojem.

Beta-laktami obuhvataju peniciline, cefalosporine, karbapeneme i monobaktame.

Penicilini

- **Primjer:** prirodni penicilini (penicilin G i penicilin V), anti-stafilokokni penicilini (oksacilin, nafcilin, dikloksacilin), aminopenicilini (amoksisilin, ampicilin), antipseudomonalni penicilini (piperacilin, tikarcilin).
- **Mehanizam rezistencije:** cijepanje β -laktamskog prstena posredstvom β -laktamaza (penicilinaza); PBP mutacije (MRSA).

Cefalosporini

- **Primjer:** 1. generacija (cefaleksin), 2. generacija (cefaklor), 3. generacija (cefiksime), 4. generacija (cefepim), 5. generacija (ceftarolin).
- **Mehanizam rezistencije:** cijepanje β -laktamskog prstena posredstvom β -laktamaza (cefalosporinaza); PBP mutacije.

Karbapenemi

- **Primjer:** imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem.
- **Mehanizam rezistencije:** cijepanje β -laktamskog prstena posredstvom β -laktamaza (karbapenemaza).

Monobaktami

- **Primjer:** Aztreonam
- **Mehanizam rezistencije:** cijepanje β -laktamazama (manje osjetljivi u odnosu na ostale β -laktame).

3.1.1.2. Glikopeptidi

Glikopeptidi su baktericidni antibiotici čiji mehanizam djelovanja se zasniva na vezivanju za D-alanil-D-alanin sekciju peptidoglikanskog prekursora, što posljedično uzrokuje inhibiranu sintezu peptidoglikana. Mogu djelovati i bakteriostatski na *C. difficile*. U ovu skupinu antibiotika spadaju: vankomicin, bacitracin, telavancin, dalbavancin, oritavancin. Mehanizmi rezistencije bakterija na glikopeptide obuhvataju reduciranu penetraciju kod Gram-negativnih bakterija, a zabilježene su i promjene u strukturi prekursora peptidoglikana (D-alanil-D-alanin do D-alanil-D-laktat), čime glikopeptidi gube mogućnost vezivanja za izmijenjeni prekursor.

3.1.1.3. Epoksidi

Epoksidi su baktericidni antibiotici koji djeluju inaktivacijom enolpiruvat tranferaze (MurA), što remeti nastanak N-acetilmuraminske kiseline i u konačnici dovodi do potpune disrupcije sinteze peptidoglikana. Primjer epoksidnog antibiotika je fosfomicin. Rezistencija na epoksidge je posljedica reducirane penetracije lijeka, prekomjerne ekspresija enzimatskih gena i/ili enzimatske inaktivacije.

3.1.2. Disrupcija integriteta stanične membrane

Među antibioticima koji uzrokuju narušavanje integriteta stanične membrane izdvojeni su lipopeptidi i polimiksini.

3.1.2.1. Lipopeptidi

Lipopeptidi su baktericidni antibiotici koji djeluju posredstvom lipidnog segmenta koji se vezuje za plazma membranu bakterija, utiče na stvaranje jonskih kanala i dolazi do intracelularnog efluksa kalija i na kraju depolarizacije membrane. Primjer ovakvog antibiotika je daptomicin, a mehanizmi nastanka rezistencije na lipopeptide nisu dovoljno poznati. Smatra se da se ostvaruju kroz izmjenu potencijala plazma membrane bakterija.

3.1.2.2. Polimiksini

Polimiksini, kao što su polimiksin E (kolistin) i polimiksin B djeluju baktericidno putem povećanja permeabilnosti bakterijske membrane, što u konačnici dovodi do lize stanice. Smatra se da su mehanizmi rezistencije zasnovani na izmjeni lipidnog A dijela lipopolisaharida (LPS), te na efluks pumpama.

3.1.3. Inhibicija sinteze proteina - 30S podjedinica ribosoma

Iz ove skupine, najistaknutiji antibiotici su aminoglikozidi, tetraciklini i glicilciklini. Mehanizam njihovog djelovanja shematski je prikazan na Slici 3.2.

3.1.3.1. Aminoglikozidi

Aminoglikozidni antibiotici djeluju baktericidno inhibiranjem inicijacijskog kompleksa, što rezultira netačnom translacijom. Primjeri antibiotika iz ove skupine su: gentamicin, amikacin, tobramicin, streptomycin i neomicin.

Mehanizmi rezistencije na aminoglikozide podrazumijevaju inaktivaciju enzima (posredstvom acetilacije, fosforilacije, adenilacije), zatim odstranjivanje lijeka efluks pumpama, mutacije vezujućeg mjesta na bakterijskom ribosomu, reduciranu penetraciju itd.

3.1.3.2. Tetraciklini

U pitanju su antibiotici koji djeluju bakteriostatski tako što blokiraju nadolazeće aminoacil-tRNK sa aminokiselinama, a to dovodi do smanjenja sinteze proteina. U tetracikline spadaju: tetraciklin, doksiciklin, minociklin, eravaciklin, sareciklin, omadaciklin. Zabilježena je bakterijska rezistencija na tetracikline, koja je osigurana smanjenom penetracijom lijeka kroz stanični zid, njegovo odstranjivanje putem efluks pumpi (kodiranih plazmidima), te produkcijom posebnih proteina koji štite ribosome.

3.1.3.3. Glicilciklini (derivati tetraciklina)

Ovi antibiotici su dizajnirani prije svega da se premosti rezistencija bakterija na tetracikline. Bakteriostatski su i djeluju na sličan način kao tetraciklini. Primjer glicilciklina je tigeciklin.

3.1.4. Inhibicija sinteze proteina - 50S podjedinica ribosoma

Od inhibitora na nivou 50S podjedinice ribosoma, najpoznatiji antibiotici su iz grupe makrolida i ketolida, linkozamida, streptogramina, oksazolidinona i amfenikola.

3.1.4.1. Makrolidi i ketolidi

U ovu skupinu spadaju eritromicin, klaritromicin i azitromicin. Mehanizam djelovanja je vezivanje za 23S rRNK, što dovodi do inhibicije transpeptidacije, translokacije i elongacije lanca, te smanjenja sinteze proteina. Okarakterisani su kao bakteriostatski antibiotici. Rezistencija se ostvaruje redukcijom penetracije lijeka, djelovanjem putem efluks-pumpi, metilacijom 23S rRNK vezujućeg mjesta, što inhibira vezivanje makrolida. Također, zabilježena je i unakrsna rezistencija sa klindamicinom i streptograminima, te mutacije vezujućeg mjesta bakterijskog ribosoma.

3.1.4.2. Linkozamidi

Linkozamidi djeluju bakteriostatski smanjenjem transpeptidacije, što uzrokuje inhibiciju elongacije lanca i smanjenje sinteze proteina.

Ustanovljeni mehanizmi djelovanja su i pojačana opsonizacija i fagocitoza, te inhibicija ekspresije alfa toksina. Kao primjer linkozamida može se navesti klindamicin. Mehanizmi rezistencije su reducirana penetracija i mutacija vezujućeg mjesta bakterijskog ribosoma.

3.1.4.3. Streptogramini

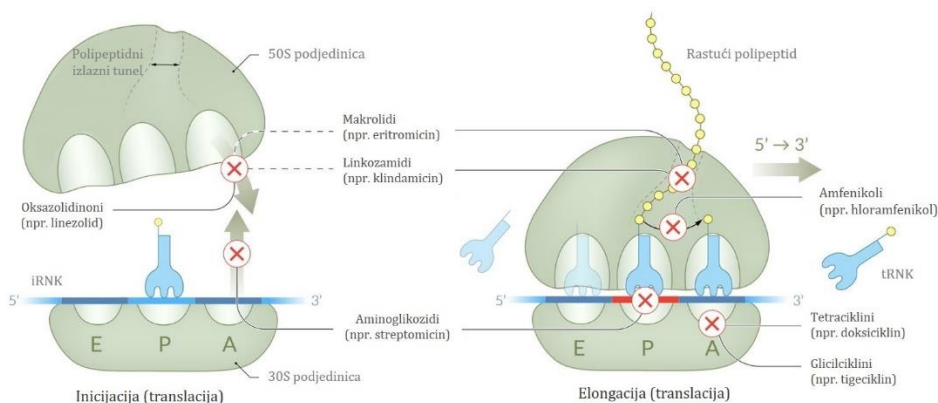
Streptogramini su specifična skupina antibiotika koji djeluju baktericidno ako se koriste u kombinaciji, a bakteriostatski ukoliko se koriste odvojeno. Primjeri su kvinupristin i dalfopristin. Dalfopristin se vezuje sa 23S segment 50S podjedinice i uzrokuje konformacijske promjene i olakšano vezivanje kvinupristina; kvinupristin se vezuje i blokira 50S podjedinicu, što dovodi do inhibicije elongacije polipeptida i smanjenje sinteze proteina. Rezistencija bakterija na ovu skupinu antibiotika počiva na alteraciji vezujućeg mjesta na bakterijskom ribosomu, enzimski posredovanoj metilaciji i djelovanju efluks pumpi.

3.1.4.4. Oksazolidinoni

Ova skupina antibiotika obuhvata bakteriostatske supstance koje djeluju preveniranjem povezivanja 50S sa 30S podjedinicom ribosoma, potom smanjenjem formiranja inicijacijskog kompleksa i ranim prekidanjem sinteze proteina. Njihovo baktericidno djelovanje je ograničeno na streptokoke. Linezolid je antibiotik koji spada u ovu skupinu. Ipak, i na ove antibiotike uočena je rezistencija bakterija, zasnovana na tačkastim mutacijama na 23S rRNK.

3.1.4.5. Amfenikoli

Amfenikoli, kakav je hloramfenikol, djeluju bakteriostatski sprečavanjem vezivanja aminokiselina koje sadrže aminoacil-tRNK, dovode do inhibicije peptidil transferaze i smanjenja proteinske sinteze. U većim koncentracijama, mogu djelovati i baktericidno. Mehanizmi rezistencije su zasnovani na reduciranoj penetraciji, te enzimatskoj inaktivaciji aciltransferazom (kodiranom plazmidima).



Slika 3.2. Mehanizam djelovanja antibiotika koji inhibiraju sintezu proteina

3.1.5. Inhibicija DNK giraze

Najpoznatiji inhibitori DNK giraze su fluorohinoloni.

3.1.5.1. Fluorohinoloni

Antibiotici koji inhibiraju DNK girazu su po svom djelovanju i bakteriostatski i baktericidni. Fluorohinoloni obuhvataju: norfloksacin, moksifloksacin, gemifloksacin, ciprofloksacin, ofloksacin i enoksacin. Inhibiraju prokariotsku topoizomerazu II (DNK girazu) i topoizomeraze IV, a to uzrokuje inhibiciju sinteze DNK. Mutacije u DNK girazi i topoizomerazi IV, smanjenje permeabilитета staničnog zida i efluks-pumpe su osnova bakterijske rezistencije na ovu skupinu.

3.1.6. Disrupcija integriteta DNK

Posebna skupina antibiotika koji utiču na disrupciju integriteta DNK su nitroimidazoli.

3.1.6.1. Nitroimidazoli

Nitroimidazoli su baktericidne (i antiprotozoalne) supstance koje djeluju kao prolijekovi. Utiču na formiranje slobodnih radikala i nastanak lomova u jednom od lanaca DNK molekule. Ipak, rezistencija se ostvaruje i to putem reducirane aktivacije usljed smanjene enzimatske aktivnosti. Primjeri antibiotika iz ove skupine su metronidazol i tinidazol.

3.1.7. Inhibicija sinteze i redukcije folne kiseline

Antibiotici koji djeluju na nivou sinteze folne kiseline spadaju u skupinu sulfonamida i diaminopirimidina.

3.1.7.1. Sulfonamidi i diaminopirimidini

Najbolji primjeri su trimetoprim-sulfametoksazol, sulfadiazin i pirimetamin i sulfisozaksol. Neki od njih, kao što je sulfametoksazol, djeluju baktericidno, dok trimetoprim djeluje bakteriostatski. Ova skupina antibiotika generalno prevenira nastanak bakterijske THF, što dovodi do smanjenja DNK metilacije. Supstance ispoljavaju sinergistički efekti: sulfametoksazol inhibira THF, a trimetoprim inhibira dihidrofolat reduktazu. Rezistencija bakterija na ovu klasu antibiotika uključuje prekomjernu produkciju paraaminobenzojeve kiseline (engl. *para-aminobenzoic acid*, PABA), strukturne promjene ciljanih enzima (npr. dihidropteroat sintaze), i djelovanje efluks pumpi.

3.2. Antimikobakterijski lijekovi

Ova skupina lijekova koristi se za liječenje infekcija uzrokovanih *Mycobacterium* vrstama.

3.2.1. Rifamicini

Osnovni mehanizam djelovanja rifamicina je blokiranje iRNK sinteze putem inhibicije DNK-ovisne RNK-polimeraze. Ovo za posljedicu ima smanjenu sintezu proteina. Antibiotici iz ove skupine djeluju bakteriostatski i baktericidno, a poznatiji primjeri su: rifampin, rifabutin i rifaksim. Rezistencija se ostvaruje mutiranjem RNK-polimeraze i smanjenjem vezivanja rifamicina.

3.2.2. Hidrazidi

Hidrazidi, npr. izoniazid, predstavljaju baktericidne antibiotike koji djeluju kao prolijekovi, inhibiraju sintezu mikotične kiseline, što ima za posljedicu smanjeno formiranje staničnog zida.

Mehanizam rezistencije bakterija ostvaren je kroz mutacije KatG¹⁵, što dovodi do smanjene ekspresije katalaze.

3.2.3. Nikotinamidi

Nikotinamidi su bakteriostatici koji djeluju kao prolijekovi. Njihov mehanizam djelovanja još uvijek nije u potpunosti poznat. Primjer nikotinamidskog antibiotika je pirazinamin. Rezistencija se ostvaruje mutacijama u RpsA genu koji kodira ribosomalni S1 protein

3.2.4. Etilendiaminski derivati

Ovi antibiotici djeluju bakteriostatski inhibicijom arabinoziltransferaze, što uzrokuje smanjenu sintezu na nivou staničnog zida bakterija. Kao primjer se može navesti etambutol. Mehanizam rezistencije su mutacije u EmbCAB genu koji kodira arabinozil-transferazu, što uzrokuje nemogućnost droge da inhibira enzim.

3.2.5. Sulfoni

Sulfoni, npr. dapson, djeluju kao kompetitivni antagonisti *para*-aminobenzojevoj kiselini, te dolazi do inhibicije sinteze dihidrofolne kiseline. Po načinu djelovanja mogu biti bakteriostatski i baktericidni. Bakterije postaju rezistentne na ovu klasu antibiotika posredstvom mutacija u folP1 genu koji kodira dihidropteroat sintazu.

3.3. Ostali antibiotici

Posebna klasa antimikrobnih lijekova koji interferiraju sa sintezom i funkcijom proteina i DNK su nitrofurani.

3.3.1. Nitrofurani

Nitrofurani su prolijekovi. Vezuju se na bakterijske ribosome, te uzrokuju inhibiciju sinteze proteina i nukleinskih kiselina. Djeluju bakteriostatski i/ili baktericidno u većim koncentracijama.

¹⁵ Gen koji kodira enzim katalazu koja konvertuje izoniazid u njegov aktivni metabolit. Mutacije u ovom genu mogu rezultirati smanjenom aktivnošću enzima i osigurati rezistenciju na izoniazid.

Rezistencija bakterija se zasniva na enzimski posredovanoj redukciji i djelovanjem na efluks pumpe. Primjer nitrofurana je nitrofurantoin.

3.4. Rezistencija na antibiotike

U kontekstu bakterijske otpornosti na lijekove potrebno je napraviti razliku između pojmova perzistencija i rezistencija. Ukoliko je mikroorganizam rezistentan na određeni antimikrobni agens, sve stanice kćeri će također biti rezistente (osim ukoliko se u međuvremenu ne dogode dodatne mutacije). Perzistencija s druge strane, opisuje bakterijske stanice koje nisu osjetljive na lijek, ali ne posjeduju gene za rezistenciju. Perzistencija je nesumnjivo rezultat činjenice da su određene stanice u populaciji bakterija u stacionarnoj fazi (tj. dormantne) i da većina antimikrobnih agenasa nema učinka na stanice koje se aktivno ne dijele ili ne rastu. Ove perzistentne stanice se pojavljuju u stopi od oko 1% u kulturi koja je u stacionarnoj fazi.

Antimikrobna rezistencija je prepoznata kao ozbiljan izazov konceptu globalnog zdravlja u 21. stoljeću, od strane svih velikih regulatornih, ekonomskih i političkih tijela, uključujući Međunarodni monetarni fond, Svjetsku zdravstvenu organizaciju i Svjetsku banku. Antibiotika rezistencija je ubrzana sve češćom neopravdanom i prekomjernom upotrebom antibiotika.

3.4.1. Porijeklo rezistencije

Bakterije kao skupina različitih vrsta nisu nužno uniformno osjetljive ili rezistente na pojedine antimikrobne agense. Nivo rezistencije može veoma mnogo varirati unutar srodnih bakterijskih skupina. Također, bakterije mogu sticati gene za rezistenciju od drugih srodnih organizama, a nivo rezistencije će varirati u ovisnosti od vrste i gena koji su stečeni.

3.4.1.1. Prirodna rezistencija

Prirodna rezistencija može biti intrinzična (uvijek se pojavljuje kod određene vrste), ili inducirana (geni se prirodno pojavljuju kod bakterija, ali se eksprimiraju do nivoa rezistencije tek nakon izlaganja antibiotiku). Intrinzična rezistencija može se definirati kao osobina koja se univerzalno dijeli unutar bakterijske vrste, neovisna je od ranijeg izlaganja antibiotiku i nije povezana sa horizontalnim transferom gena.

Najčešći mehanizmi uključeni u intrinzičnu rezistenciju su smanjena permeabilnost vanjske membrane (specifično lipopolisaharidnog sloja, LPS kod Gram-negativnih bakterija) i prirodna aktivnost efluks pumpi.

3.4.1.2. Stečena rezistencija

Sticanje genetičkog materijala koji osigurava rezistenciju je moguće putem svih glavnih puteva u kojima bakterije inače stiču genetički materijal: transformacija, transpozicija i konjugacija (svi su tipovi horizontalnog transfera gena). Nadalje, bakterija može doživjeti mutacije u svojoj vlastitoj genomskoj DNK. Sticanje ovih elemenata može biti privremeno ili trajno. Plazmidima-posredovana transmisija gena za rezistenciju je najčešći put sticanja vanjskog genetičkog materijala, dok je transmisija putem bakteriofaga prilično rijetka.

Mehanizmi antimikrobne rezistencije mogu se podijeliti u četiri osnovne kategorije: ograničeno uzimanje lijeka (1), modificiranje mete lijeka (2), inaktiviranje lijeka (3) i aktivno izbacivanje lijeka (engl. *efflux*) (4). Intrinzična rezistencija uglavnom počiva na ograničenom uzimanju lijeka, njegovoj inaktivaciji i izbacivanju, dok stečena rezistencija podrazumijeva modifikaciju mete lijeka, inaktivaciju i efluks. Zbog razlika u strukturi, Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije koriste različite mehanizme rezistencije.

Na osnovu podataka Centra za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Center for Disease Control and Prevention*, CDC), na teritoriji se SAD-a svake godine zabilježi oko 2.8 miliona slučajeva infekcije bakterijama i gljivicama rezistentnim na antibiotike, te kao posljedica toga, preko 35.000 smrtnih slučajeva. Svjetska zdravstvena organizacija smatra antibiotsku rezistenciju veoma ozbiljnim problemom u svim dijelovima svijeta. Novi mehanizmi rezistencije emergiraju i šire se globalno, što onemogućava liječenje čestih infektivnih bolesti. Bez urgentnog djelovanja koje bi spriječilo sve širu pojavu rezistencije, čovječanstvo će neminovno ući u post-antibiotsku eru u kojoj će postati moguće da pacijenti podlegnu usljed komplikacija vrlo čestih infekcija ili blažih povreda.

Društvo za infektivne bolesti SAD-a (engl. *The Infectious Disease Society of America*) definiralo je grupu bakterija pod akronimom **ESKAPE**, koje su osobito opasne zbog svoje virulencije i potencijalne antimikrobne rezistencije.

To su: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* vrste. Ovi oportunistički patogeni su ubrzali potragu za novim antimikrobnim agensima. U navedenim bakterijama je prisutan p-glikoprotein koji je odgovoran za rapidni efluks antibiotika čime se postiže rezistencija. Određene biljne komponente imaju mogućnost kontrole regulacije p-glikoproteina i sprečavaju nastanak rezistencije.

3.4.2. Rezistencija na antimikrobne produkte prirodnog porijekla

Sposobnost bakterija da razviju mehanizme rezistencije na prirodne antimikrobne produkte u većoj mjeri nije dokumentirana. Razlog otežanog ispoljavanja rezistencije na prirodne antimikrobne produkte je najvjerojatnije njihov veliki hemijski i strukturni diverzitet. Iako recentnije studije navode da postoje slučajevi rezistencije na biljne antimikrobne komponente, osobito kod enterobakterija, takvih situacija je značajno manje u odnosu na zabilježenu stopu rezistencije različitih mikroorganizama na sintetske antimikrobne lijekove. Razumijevanje mehanizama rezistencije je ključno kod razvoja učinkovite i dugotrajne antimikrobne terapije, a kao što je već navedeno, poznati su različiti fenomeni putem kojih mikroorganizmi umanjuju ili poništavaju djelovanje antimikrobika: alteracija veznih mjesta, ekspulzija i/ili modifikacija antibiotika, inaktivacija, promjene permeabilnosti, formiranje biofilmova itd. Navedeni mehanizmi se mogu razviti spontano (ukoliko su posljedica mutacija) ili mogu biti stečeni.

U zavisnosti od fizičko-hemijskih, bioloških i metaboličkih osobina, različiti biljni antimikrobni produkti ulaze u drugačiji tip dinamike sa datim mikroorganizmom (ili mikrobom), pa je i odgovor domaćina različit u kontekstu mogućnosti razvijanja i ispoljavanja rezistencije. Biljni antimikrobni produkti usmjereni na esencijalne faktore integriteta i metabolizma mikroba, koji su uglavnom evolutivno visoko konzervirani (membrana, stanični zid, putevi biosinteze proteina), često su dosta učinkoviti. S obzirom da bi nastanak rezistencije kroz pomenute fundamentalne faktore neminovno značio mutaciju (ili drugu vrstu promjene) i narušavanje vitalnih funkcija mikrobne individue, te u konačnici stvorilo prevelik selekcionni pritisak na mikrobnu populaciju, takav vid odgovora se najčešće i ne dešava. S druge strane, biljni antimikrobni produkti čije su mete evolutivno manje konzervirane, mogu vremenom postati slabije učinkoviti jer je veća vjerovatnoća nastanka rezistencije.

Ovakva dinamika je logična jer mikrobi lakše mogu premostiti modifikacije onih elemenata koji nisu ključni za život. Zbog te fleksibilnosti, kompletna populacija mikroba se relativno brzo može adaptirati na promjenu i ne prijeti joj vitalna opasnost.

Molekularna raznolikost prirodnih antimikrobnih komponenti ima multifaktorsku prirodu i s tim u vezi predstavlja veliki izazov za stanicu i populaciju mikroorganizama, koji su zbog toga često izloženi istovremenim izmjenama različitih elemenata svog metabolizma. Takve paralelne promjene na različitim molekularnim metama biljnih antimikrobnih produkata uglavnom predstavljaju prevelik selekциони pritisak, što se implementira u kreiranju i doziranju biljnih antimikrobnih pripravaka, te utiliziranju sinergističkog odnosa među pojedinim komponentama. Strategija preveniranja ili usporavanja razvoja rezistencije mikroorganizama definitivno je kombinirana upotreba različitih agenasa koji djeluju na različite mete u mikrobnjoj stanici. Ova hipoteza podržava upotrebu biljnih pripravaka koji po svojoj prirodi predstavljaju kompleksne smjese brojnih fitohemikalija sa različitim mehanizmima antimikrobnog djelovanja i koji su upravo zbog navedenog sinergističkog djelovanja svojih konstituenata terapijski vrlo učinkoviti.

POGLAVLJE 4

ANTIVIRUSNI LIJEKOVI

Irma Mahmutović-Dizdarević



Neefikasan virus ubija svog domaćina. Pametan ostaje s njim.

James Lovelock

Interes za antiviralnom terapijom datira još od 1950-ih godina, kada se intenzivno izučavao mehanizam inhibicije sinteze DNK u kontekstu antitumorskih agenasa, te je pronađen veliki broj komponenti koje inhibiraju sintezu viralne DNK. Antiviralni agensi su prvi put uspješno plasirani pacijentima 1960-tih, Bauerovim postignućem prevencije bolesti davanjem tiosemikarbazona pacijentima izloženim virusu velikih boginja, dok je Kaufman značajno poboljšao liječenje herpesnog keratitisa tretiranjem pacijenata idoksuridinom. Zvanično odobrenje prvog antivirusnog lijeka, idoksuridina, 1963. godine otvorilo je novu eru razvoja antivirusnih lijekova. Progres je bio vrlo spor zbog poteškoća u pronalaženju komponenata sposobnih za inhibiciju virusa, i istovremeno održavanje staničnih funkcija intaktnim. U kasnim 1970-tim i ranim 1980-tim razvijen je aciklovir, prvi antivirusni agens netoksičan u značajnoj mjeri, a usmjeren prvenstveno na herpesvirusne infekcije. U kasnim 1980-tim i ranim 1990-tim došlo je do ekspanzije antivirusnih preparata, dijelom i zbog pojave AIDS epidemije.

Antivirusni lijekovi su klasa lijekova namijenjenih za liječenje virusnih infekcija. Za razliku od antibiotika, antivirusni lijekovi ne uništavaju ciljnog patogena, već radije inhibiraju njegov razvoj. Kao što je i ranije navedeno, virusi za svoj infektivni ciklus koriste molekularne mehanizme stanice domaćina i stoga je kreiranje učinkovitog ali ujedno i bezbjednog antivirusnog lijeka veoma teško.

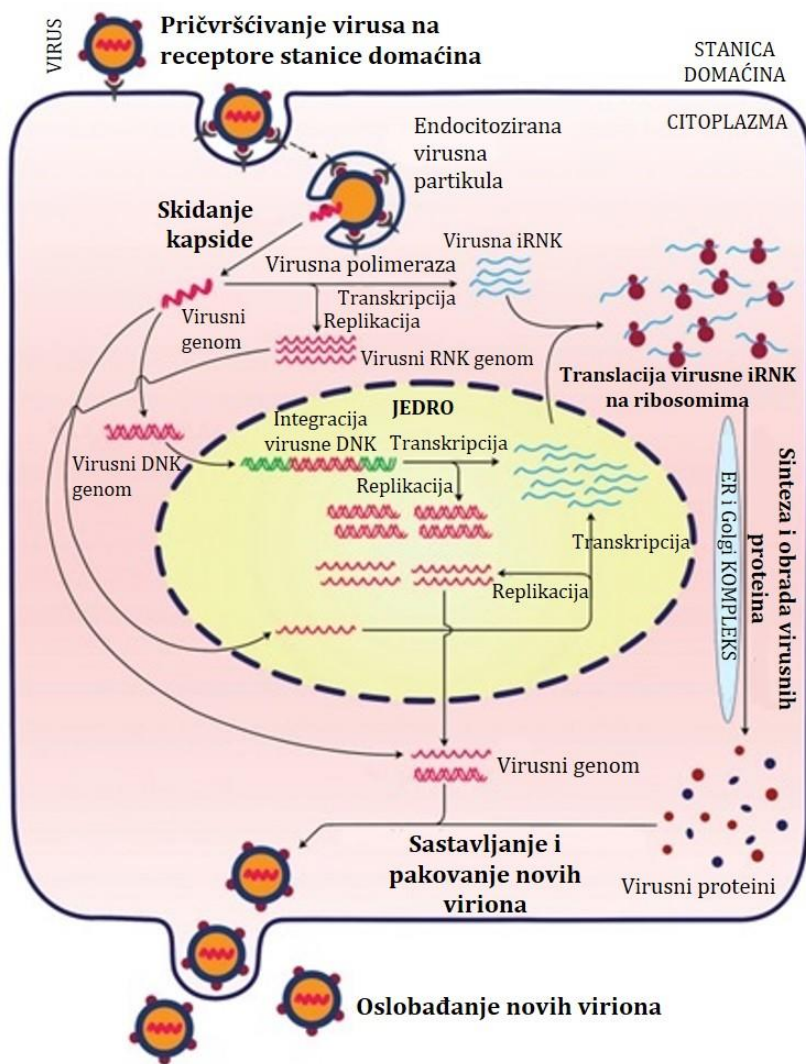
Upravo zbog intracelularne reprodukcije virusa, dugo vremena se postizanje specifične interferencije sa viralnom replikacijom smatralo nemogućim. Kao i antibakterijski agensi, učinkovit antiviralni preparat mora imati određene karakteristike. Antivirusni lijekovi moraju doći do ciljnog organa, biti aktivni intracelularno i ekstracelularno, te imati metaboličku stabilnost. Najvažnije od svega je da moraju biti u stanju da inhibiraju virusnu replikaciju bez ometanja funkcije stanice domaćina.

Do kasnih '70-tih se znalo da većina humanih virusa posjeduje enzime kodirane virusnim genomom, koji se ne pojavljuju u neinficiranim stanicama. Mnogi od ovih enzima su uključeni u sintezu virusne nukleinske kiseline. Njihovo otkriće je predstavljalo veliki korak u antiviralnoj terapiji, čineći mogućim direktno pronalaženje specifičnih inhibitora viralnog rasta u staničnim kulturama.

4.1. Infektivni ciklus virusa

Infektivni ciklus virusa obuhvata nekoliko ključnih koraka: adsorpcija (1), penetracija tj. prodiranje (2), skidanje kapside, tj. ogoljavanje genoma (engl. *uncoating*) (3), transkripcija i translacija ranih proteina (4), sastavljanje zrelih viriona (engl. *assembly*) (5) i na koncu, njihovo oslobađanje iz stanice domaćina (6) (Slika 4.1.). U prvom koraku, glikoproteini virusne ovojnice se prihvataju na receptorske (koreceptorske) molekule na membrani stanice domaćina, što olakšava ulazak virusa u stanicu putem endocitoze. U narednom koraku kapsida se degradira posredstvom enzima stanice i virusne komponente (genetički materijal i proteini) se oslobađaju u citoplazmu. Kod replikacije i transkripcije virusnog genoma, virusni DNK ili RNK genom se transportuje do jedra stanice, gdje se odvijaju replikacija i transkripcija, te nastaju višestruke kopije genoma i molekule iRNK. Dinamika procesa replikacije varira u odnosu na tip virusnog genoma.

Kod sinteze proteina, virusna iRNK se translatira u strukturne i regulatorne proteine u citoplazmi korištenjem molekularne mašinerije stanice domaćina. Sljedeći korak je sastavljanje novih viriona koji se zasniva na uspješnoj replikaciji i ekspresiji virusnog genoma, što produkuje esencijalne komponente za preživljavanje novonastalih viriona nakon oslobađanja iz stanice domaćina. Stoga se pakuju sve neophodne komponente za produkciju novih viriona. Sastavljeni novi virioni se oslobađaju u ekstracelularnu tečnost putem lize stanice domaćina ili pupanjem. Liza uzrokuje smrt stanice domaćina, a pupanje ne.



Slika 4.1. Pojedine faze infektivnog ciklusa virusa

Svaki od ovih koraka je potencijalna meta za interferenciju, s tim da ti procesi nalikuju normalnim staničnim procesima i odvijaju se zahvaljujući djelovanju staničnih enzima. Mnogi antiviralni agensi su nukleozidni analozi, strukture koje nalikuju prirodnim nukleozidima korištenim kao gradivni blokovi za DNK sintezu.

Kao takvi, ovi lijekovi su fosforilirani staničnim nukleozidnim kinazama i inkorporirani u rastući DNK lanac DNK-polimerazom, čime dolazi do kompeticije sa prirodnim nukleozidima kao supstratima za oba enzima. Iako je sa inhibitorima sinteze nukleinskih kiselina kao antiviralnim agensima postignut veliki uspjeh, za ciklus viralne replikacije potrebni su i drugi enzimi, koji bi morali biti inhibirani putativnim antiviralnim agensima.

4.2. Ciljna mjesta antivirusnih lijekova

Antivirusni lijekovi djeluju ciljano, poput biohemijskih inhibitora, na virusne enzime i virusne strukture koje su nužne za umnožavanje virusa. Noviji pristupi antivirusnoj terapiji usmjereni su prema inhibitorima aktivnosti virusnog genoma, te supstancama koje potiču imunološki sistem na suzbijanje virusne infekcije. Potencijalni ciljevi antivirusnih lijekova su uglavnom određeni dijelovi virusne građe, enzimi ili biomehanizmi umnožavanja virusa.

4.2.1. Adsorpcija virusa

Adsorpcija ili prihvatanje virusa na stanicu je prvi stadij umnožavanja. Interakcija virusa i stanice može se spriječiti neutralizacijskim antitijelima ili receptorskim antagonistima. Antagonisti receptora su peptidi, analozi šećernih komponenata staničnih receptora ili virusnih proteina spajanja, koji međusobnim natjecanjem blokiraju interakcije virusa i stanice.

4.2.2. Prodiranje i skidanje kapside

Ulazak virusa u stanicu i skidanje kapside su preduvjeti za oslobađanje virusne nukleinske kiseline u citoplazmu stanice domaćina. Budući da se mnogi virusi koriste kiselom sredinom u endocitnoj vezikuli za početno skidanje kapside, neutralizacijom tih dijelova amantadinom, rimantadinom i sličnim spojevima inhibira se dalje skidanje kapside.

4.2.3. Sinteza iRNK

Sinteza iRNK je nužna za nastanak virusa. Teško je inhibirati samo sintezu virusne, a ne i stanične iRNK. DNK virusi koriste transkriptaze stanice domaćina za sintezu vlastitih iRNK, pa je zbog toga to ciljno mjesto nepovoljan izbor. Upotreba antivirusnih lijekova može biti ograničena zbog sličnosti između virusnih RNK-polimeraza i staničnih transkriptaza.

U novije vrijeme se istražuju mehanizmi tzv. neosjetljivih nukleotida za inhibiciju virusnih iRNK. To su kratki nizovi oligomera koji su komplementarni specifičnim nizovima virusnog genoma. Ti oligoneukleotidi se spajaju na novonastale iRNK i sprječavaju njihovo iskorištavanje.

Dalji razvoj iRNK u jedru je zaustavljen, izostaje njihov prenos iz jedra u citoplazmu i spajanje na ribosome. Većinu antivirusnih lijekova čine analozi nukleozida koji inhibiraju virusne polimeraze, važne za umnožavanje virusa. Nukleozidi se uzastopno fosforiliziraju do trifosfatnih spojeva pomoću virusnih i staničnih enzima. Virusne su polimeraze manje specifične za supstrat od staničnih enzima; virusne polimeraze stotinu puta bolje vežu analogne nukleotide od staničnih enzima. Rezultat tog vezanja očituje se preinakama baza i/ili šećera. Popratne su posljedice izostanak elongacije lanca, pogrešna prepoznavanja i sjedinjenja baza.

4.2.4. Sinteza virusnih proteina

Ova faza nije najpovoljnija meta za antivirusne lijekove. Virusi za sintezu proteina koriste stanične mehanizme i ribosome. Ipak, inhibicijom dodatne obrade virusnih proteina nakon prevođenja, npr. proteolize virusnih poliproteina, tvorbe glikoproteina ili fosforilacije, moguće je smanjiti i omesti umnožavanje virusa.

4.3. Razvoj i primjeri antivirusnih lijekova

Razvoj antivirusnog lijeka je dugotrajan proces koji podrazumijeva faze identifikacije ciljnog mjesta (mete djelovanja lijeka), skrining, generiranje, optimizaciju, kliničko testiranje, registraciju lijeka itd. Istovremeno, ovaj proces je pod stalnim pritiskom koji proizilazi iz miliona smrtnih slučajeva usljed infekcija uzrokovanih virusima. Faktor koji dodatno otežava razvoj antivirusnih lijekova je i varijacija virusa. Za razliku od bakterija, virusi nemaju veliki broj mehanizama za razvijanje rezistencije na hemiterapeutske agense. Oni su genetički jednostavni i metabolički inertni, a promjene poput onih kod bakterija nisu ustanovljene. Ipak, virusi imaju dvije osobine koje im omogućavaju izbjegavanje potencijalnih inhibitora: mogućnost replikacije u visokom titru u stanici domaćina (1) i mogućnost veoma brzog mutiranja (2). Posljedica toga je činjenica da viralna rezistencija proizilazi iz genetske mutacije, što je osnova za promjene na nivou enzima ili strukturalnih komponenti viriona.

Uspjeh ovog mehanizma može se vidjeti u kulturama stanica, gdje virus razvija rezistenciju nakon svega nekoliko ciklusa u prisustvu inhibitornog agensa. Još jedan važan problem je unakrsna rezistencija između antiviralnih lijekova. Otpornost na jedan spoj je obično praćena smanjenjem osjetljivosti na ostale lijekove iz iste klase. Unakrsna rezistencija između različitih klasa lijekova je takođe pronađena i ukazuje na preklapanje veznih mjesta lijekova.

U razvoju antivirusnih lijekova, naučna zajednica je u neprestanoj borbi sa globalnim fenomenima kontinuirane emergencije novih virusa (i/ili reemergencije poznatih!) i to ubrzanom stopom, čemu doprinose nepredvidive klimatske promjene i tokovi globalizacije. Emergencija hroničnih virusnih bolesti koje uzrokuju HIV, HCV, HBV i sl., te (re)emergencija virusa kao što je SARS koronavirus (engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome*) ističe potrebu za novim strategijama u razvoju antivirusnih agenasa.

FDA (engl. *Food and Drug Administration*, Američka agencija za hranu i lijekove) je odobrila korištenje pojedinih antivirusnih komponenti, među kojima su najbrojnije male molekule sa različitim ulogom u kliničkoj praksi. Velike molekule koje su odobrene za liječenje virusnih infekcija podrazumijevaju proteine (interferone, monoklonska antitijela), peptide i oligonukleotide. Većina odobrenih antivirusnih lijekova targetira staničnu molekularnu mašineriju koju koristi virus, dok samo neki ciljaju isključivo na stanične molekularne mehanizme i/ili samu stanicu domaćina. Antivirusni lijekovi se mogu primjenjivati kao monoterapija ili kao kombinirana terapija.

Odobreni agensi imaju različite mehanizme antivirusnog djelovanja i na osnovu svoje strukture i/ili funkcije mogu biti podijeljeni u strukturne analoge (nukleozidne analoge, ne-nukleozidne pirofosfatne analoge, 5-supstituirane 2'-deoksiuridinske analoge, aciklične nukleozidne fosfonatne analoge, aciklične guanozinske analoge), inhibitore ulaska virusa u stanicu, inhibitore integreze, inhibitore nukleozidne reverzne transkriptaze, inhibitore proteaze, inhibitore specifične za pojedine viruse (inhibitori Influenza virusa i inhibitori virusnih struktura Hepatitis C virusa kao što su NS5A protein i NS5B polimeraza), interferone, imunomodulatore, antimitotičke inhibitore i oligonukleotide.

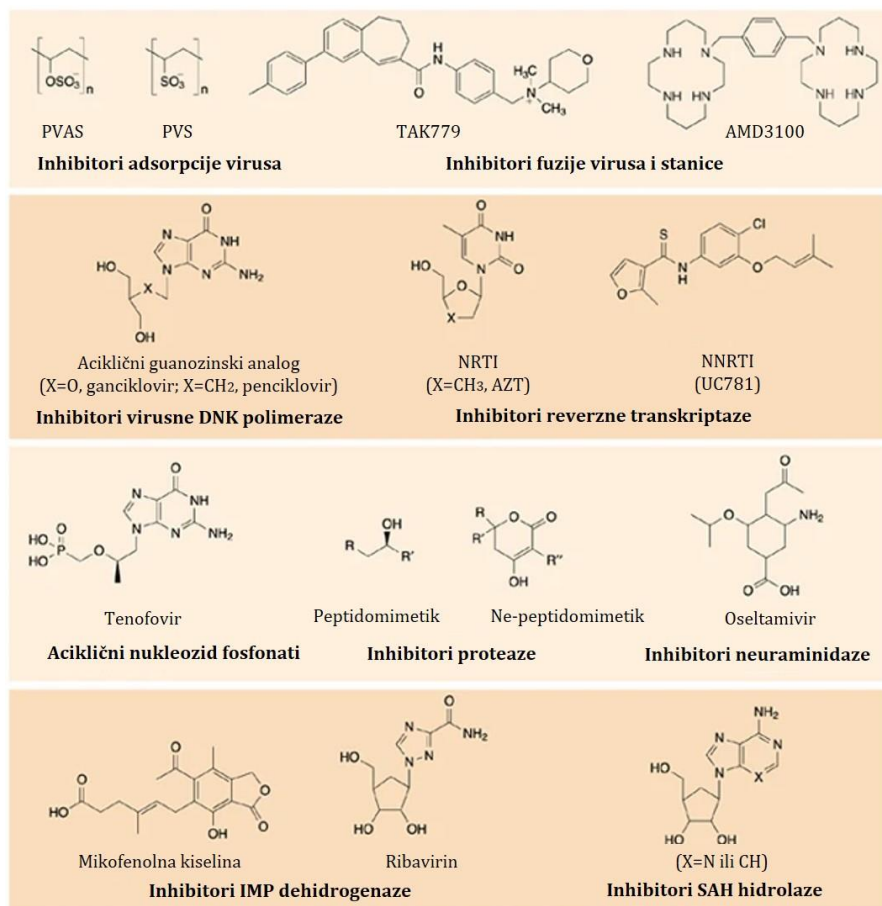
Unatoč savremenim tehnikama, alatima i mjerama kontrole kvaliteta, ograničen broj antivirusnih lijekova je odobren za ljudsku upotrebu, čemu doprinosi potencijalno veliki broj različitih nuspojava, te pojava rezistencije. Na listi antivirusnih lijekova koju je odobrila FDA nalaze se agensi sa različitim mehanizmima antivirusnog djelovanja, a u tekstu koji slijedi navedeni su oni koji se u ljudskoj populaciji najčešće koriste jer su usmjereni na viruse koji su frekventni i uzrokuju potencijalno fatalne infekcije.

4.3.1. Virus humane imunodeficijencije, HIV

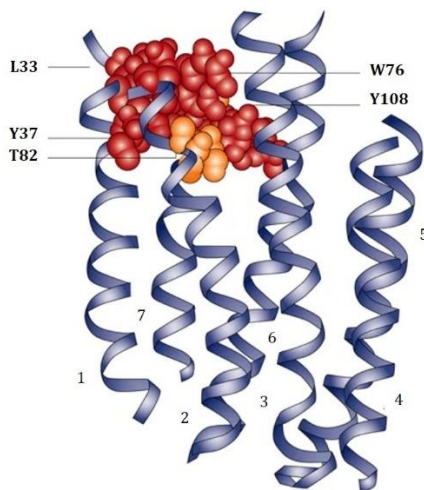
HIV, retrovirus koji uzrokuje AIDS je otkriven 1983. godine. Pripada porodici *Retroviridae* i posjeduje linearni jednolančani RNK genom. Postoje dva tipa virusa HIV, HIV-1 (češći) i HIV-2 (rijedak i manje infektivan), a visoka genetička varijabilnost genoma čini HIV jednim od bioloških sistema sa najbržom stopom evolucije. HIV se prenosi putem kontaminirane krvi ili drugih tjelesnih tečnosti, a pandemija HIV virusom spada u najveće pandemije bihevioralnog tipa u povijesti čovječanstva. Statističke procjene navode da HIV/AIDS uzrokuju oko jedan milion smrtnih slučajeva svake godine na globalnom nivou. Brojne polianionske komponente dokazano inhibiraju replikaciju virusa HIV tako što preveniraju adsorpciju virusa na površinu stanice domaćina. Neke od njih prikazane su na Slici 4.2.

Zidovudin je prvi lijek razvijen protiv HIV-a, a odobren je za upotrebu 1987. godine. Predstavlja pirimidinski analog i inhibira nukleozidnu reverznu transkriptaznu aktivnost te replikaciju virusnog genoma. Za tretman HIV uzrokovane infekcije naknadno su razvijeni i drugi inhibitori reverzne transkriptaze kao što su: didanozin, zalcitabin, stavudin, lamivudin, abacavir sulfat itd. Sakvinavir mezilat je prvi odobreni proteazni inhibitor koji blokira aktivnost HIV proteaze vezivanjem za aktivno mjesto, što rezultira neprocesiranim virusnim proteinima, a stoga se i onemogućava multiplikacija virusa. 2007. godine odobren je prvi inhibitor integraze raltegravir, lijek koji blokira integraciju virusnog genoma u genom domaćina. Prva kombinirana terapija je odobrena 1997. godine, a bila je usmjerena tako da stopira ili uspori razvoj rezistencije interferiranjem sa replikacijom i/ili drugim ključnim staničnim procesima. Enfuvirtid je prvi peptidni HIV inhibitor, odobren za upotrebu 2003. godine, a blokira fuziju virusa sa membranom stanice domaćina i usmjeren je na virusni glikoprotein 41 (GP41). Maraviroc je prvi antagonist koji se veže za stanični hemokinski receptor (CCR5) lociran na površini T-limfocita i fagocitnih makrofaga, te prevenira fuziju HIV-a sa stanicom domaćina (Slika 4.3.).

Imalizumab je monoklonsko antitijelo, odobreno 2018. godine, a veže se za CD4 receptore na površini T stanica i prevenira ulazak i reprodukciju HIV-a. Na FDA listi lijekova protiv HIV/AIDS se nalaze i drugi lijekovi pod različitim generičkim nazivima, a koji se kao mono- ili kombinirana terapija apliciraju u različitim stadijima infekcije uzrokovane različitim tipovima HIV virusa.



Slika 4.2. Farmakofore ili prototipi komponenata određenih antivirusnih agenasa (AZT, azidotimidin; IMP, inozin monofosfat; NNRTI, ne-nukleozidni inhibitor reverzne transkriptaze; NRTI, nukleozidni inhibitor reverzne transkriptaze; PVAS, polivinilalkohol sulfat; PVS, polivinil sulfonat; SAH, S-adenozilhomocistein)

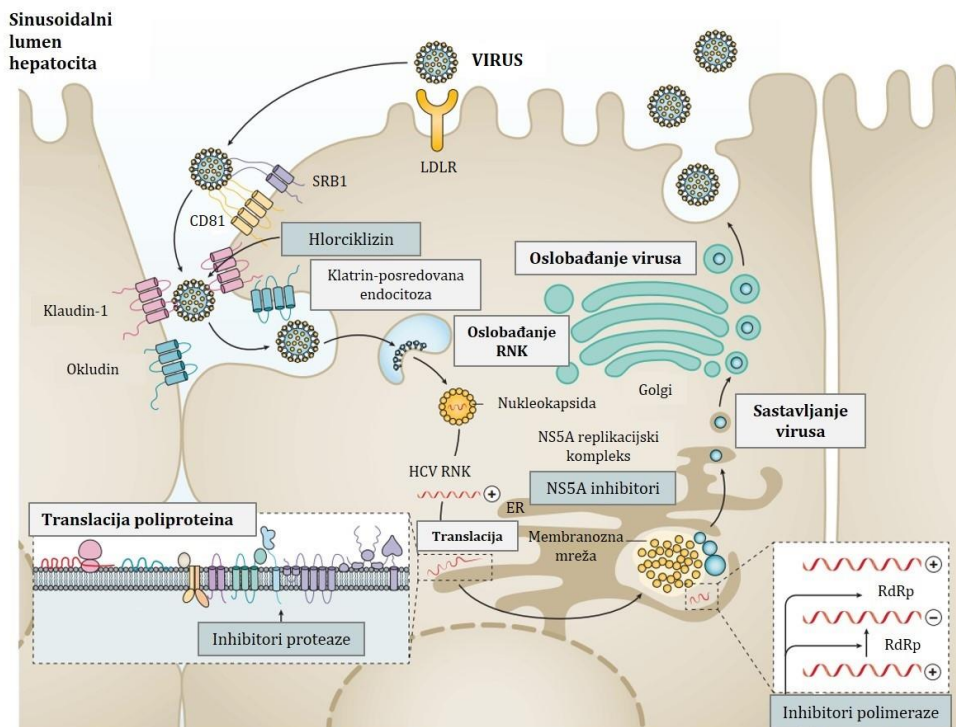


Slika 4.3. Interakcija CCR5 sa TAK779, antagonistom hemokinskog receptora (Klasteri aminokiselina u TAK779 veznom mjestu uključuju nekoliko aromatičnih rezidua: Y37, W86, Y108 koje mogu formirati interakciju sa aromatičnim prstenom TAK779)

4.3.2. Hepatitis C virus, HCV

HCV je otkriven 1989. godine. Posjeduje linearni, jednolančani, pozitivno orijentirani RNK genom. Spada u porodicu *Flaviviridae* i klasificiran je u sedam osnovnih genotipova među kojima su genotipovi 1 i 2 najprevalentniji u humanoj populaciji. Transmisija HCV se dešava kroz transfuziju inficiranom krvi ili krvnim produktima, dijeljenjem nesterilnog hirurškog pribora, seksualnim putem itd. Prema navodima Svjetske zdravstvene organizacije, preko 70 miliona ljudi na svijetu ima hroničnu HCV infekciju, a od posljedica infekcije godišnje umre na stotine hiljada ljudi u svijetu.

HCV koristi serinske proteaze da procesira prekursore poliproteina. Na Slici 4.4. prikazana su ciljna mjesta infektivnog ciklusa HCV sa kojima interferiraju antivirusni lijekovi. Ulazak virusa u stanicu je olakšan serijom događaja koji uključuju vezivanje virusa na površinu stanice, interakciju sa proteinima na međustaničnim vezama i receptorima-posredovanu endocitozu. Oslobođeni RNK genom se translatira u pojedinačni poliprotein koji se procesira staničnim i virusnim proteazama. Inhibitori proteaza ciljaju na virusni NS3 enzim. Replikacija RNK se dešava na membranoznoj mreži. NS5A i NS5B inhibitori interferiraju sa replikacijom na različitim stadijima, a NS5A inhibitori ometaju i proces sastavljanja. Trenutno postoji nekoliko antivirusnih lijekova, inhibitora HCV proteaza, odobrenih za kliničku upotrebu, među kojima su većina kombinirani lijekovi.



Slika 4.4. Infektivni ciklus HCV i djelovanje antivirusnih agenasa

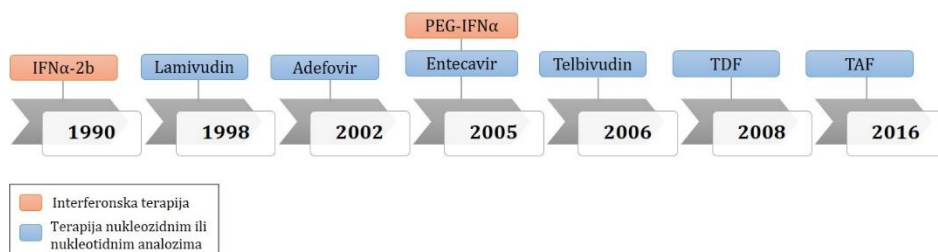
(ER, endoplazmatski retikulum; LDLR, *low-density lipoprotein receptor*, lipoproteinski receptor male gustoće; RdRp, RNK ovisna RNK polimeraza; SRB1, *scavenger receptor*, stanični receptor klase B član 1)

FDA je odobrila male molekule, glecaprevir, grazoprevir, vaniprevir, asunaprevir, paritaprevir, simeprevir, boceprevir, telaprevir i voxilaprevir koji inhibiraju HCV NS3/4A proteaznu aktivnost. Neki od lijekova protiv HCV su i diskontinuirani sa tržišta u prethodnim godinama. 2013. godine, novi direktni lijek sofosbuvir je odobren za tretman infekcija uzrokovanih genotipovima 1, 2, 3 i 4, a ovaj lijek se veže za nestrukturnu NS5B polimerazu i inhibira HCV replikaciju. Brojni anti-HCV agensi se primjenjuju u kombiniranoj terapiji.

4.3.3. Hepatitis B virus, HBV

Ovaj virus pripada porodici *Hepadnaviridae*, posjeduje dvolančani cirkularni DNK genom i egzistira kroz osam glavnih genotipova. Prenosi se direktnim kontaktom sa inficiranom krvi ili drugim tjelesnim tečnostima, upotrebom kontaminiranog hirurškog pribora, seksualnim kontaktom, te postoji mogućnost vertikalnog prenosa sa majke na dijete.

Svjetska zdravstvena organizacija je 2016. godine navela podatak da skoro 30 miliona ljudi širom svijeta živi sa hepatitis B infekcijom. U tretmanu infekcija koje uzrokuje HBV odobreni su pegilirani interferoni, adefovir dipivoxil, entecavir, telbivudin, lamivudin, tenofovir disoproxil fumarat i tenofovir alafenamid fumarat. Na Slici 4.5. prikazani su odobreni lijekovi za tretman hronične HBV infekcije.



Slika 4.5. Međunarodno priznati lijekovi za hroničnu HBV infekciju (IFN, interferon; PEG-IFN, pegilirani interferon, TDF, tenofovir disoproksil fumarat; TAF, tenofovir alafenamid)

4.3.4. Influenza

Virus influenze (gripe) pripada porodici *Orthomyxoviridae*. Posjeduje linearni, jednolančani, negativno orijentirani RNK genom i dijeli se u tri tipa A, B i C. Pandemije kao što su Španska gripa (1918), Azijska gripa (1957), Hongkonška gripa (1968) i Svinjska gripa (2009) su uzrokovane Influenza A virusima. Zaključno sa 2020. godinom, FDA je odobrila devet antivirusnih lijekova za tretman influenza-uzrokovanih infekcija, a koji uključuju inhibitore jonskih kanala, neuraminidazne inhibitore, inhibitore polimeraza i endonukleazne inhibitore. Oseltamivir, jedan od najpoznatijih antivirusnih lijekova uopšte, upravo je namijenjen za prevenciju i tretman Influenza A i Influenza B virusa. Oseltamivir je kompetitivni inhibitor neuraminidaze (Slika 4.6.), enzima koji siječe sijalinsku kiselinu na glikoproteinima površine stanica domaćina, što omogućava oslobađanje novih viriona. Na taj način oseltamivir sprječava oslobađanje novih virusnih partikula.

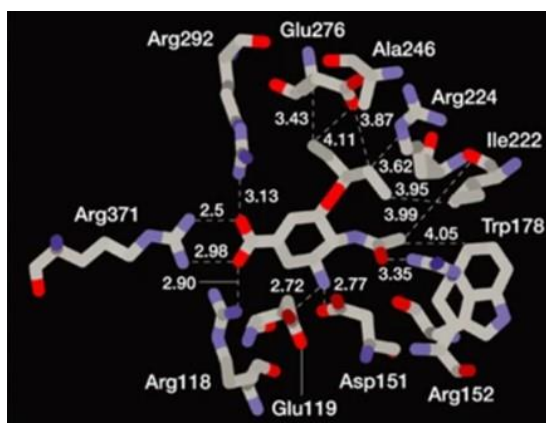
4.3.5. Herpes simplex virus, HSV

HSV pripada porodici *Herpesviridae*, posjeduje linearni dvolančani DNK genom i klasificiran je u HSV-1 i HSV-2. HSV-1 je visoko zastupljen patogen koji uzrokuje oralne herpes infekcije, dok se HSV-2 prenosi seksualnim putem i uzrokuje genitalne herpesse.

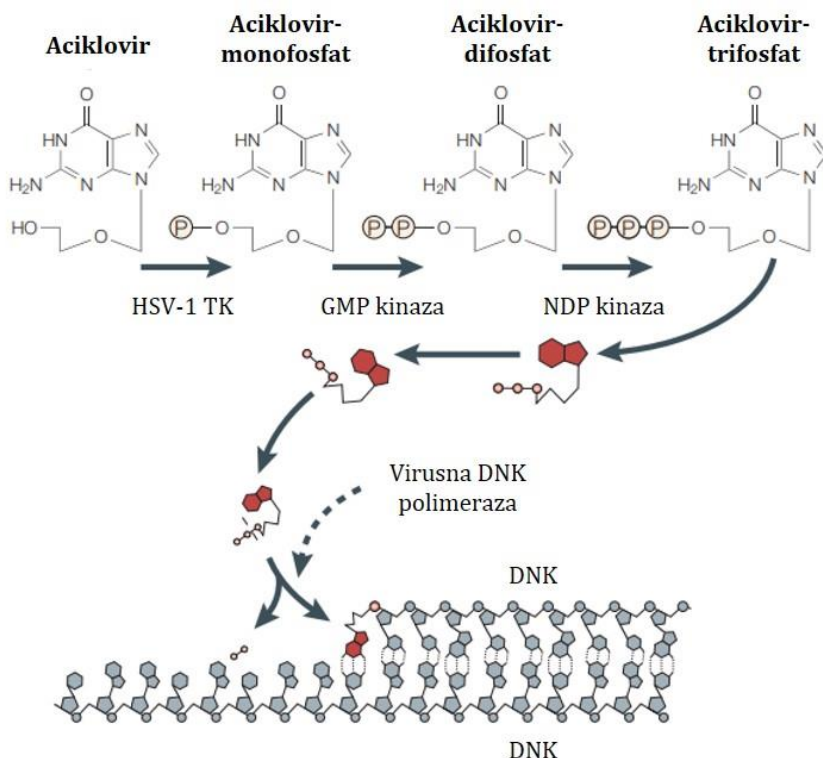
Prema navodima Svjetske zdravstvene organizacije iz 2017. godine, 3.7 milijardi ljudi ispod 50 godina starosti i 417 miliona ljudi u dobi od 15 i 49 godina živi sa infekcijom uzrokovanom sa HSV-1 i HSV-2. Za ovaj virus veže se i otkriće prvog antivirusnog lijeka, idoksuridina. Fosforilirane forme idoksuridin analoga inhibiraju DNK replikaciju i multiplikaciju HSV. Nakon 20 godina od tada odobren je brivudin, timidinski analog sa visoko specifičnom aktivnosti protiv HSV-1. Veliki broj antivirusnih lijekova se koristi protiv HSV-1 i HSV-2, a sa izuzetkom foscarneta i cidofovira, svi su nukleozidni analozi. Aciklovir, lijek prve linije za tretman herpesvirusnih infekcija je svojevrsan prototip antivirusnog lijeka. Njegova bezbjednost je zasnovana na inicijalnoj aktivaciji virusno-induciranim enzimom timidin kinazom. Po svojoj prirodi, aciklovir je deoksiguanozinski analog sa acikličnim bočnim lancem kojem nedostaje 3'-hidroksilna grupa prirodnih nukleozida. Aciklovir se konvertuje u trifosfatnu formu, aciklovir trifosfat, koji kompetitivno inhibira virusnu DNK polimerazu, i to na način da se inkorporira u rastući DNK lanac i dolazi do terminacije (Slika 4.7.).

4.3.6. Varicella zoster virus, VZV

VZV pripada porodici *Herpesviridae*. Posjeduje linearni, dvolančani DNK genom i klasificiran je u pet klada (1-5), koje obuhvataju devet genotipova. Transmisija virusa je *airborne*, najčešće putem aerosola i kapljica ili lezija (tzv. *cell-free airborne virus*). VZV primarno uzrokuje vodene kozice (varičele), ali sa padom imuniteta i ponovnim izlaganjem uzrokuje herpes zoster. Među najčešćim lijekovima je brivudin, odobren 2000. godine, koji je po mehanizmu djelovanja inhibitor DNK polimeraze.



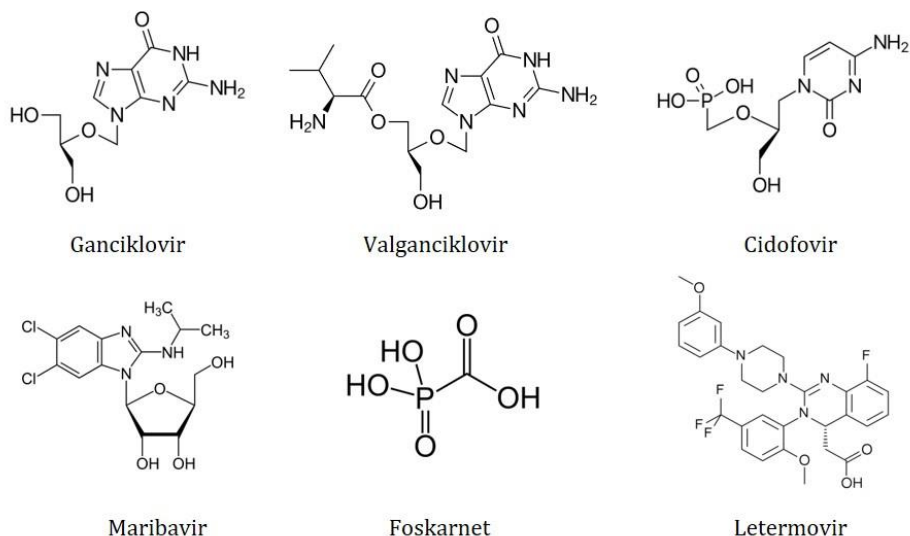
Slika 4.6. Interakcija vezivanja oseltamivira sa neuraminidazama Influenza virusa izvedena iz kristalne strukture



Slika 4.7. Aciklovir kao primjer nukleozidnog analoga čiji mehanizam antivirusnog djelovanja je terminacija lanca
(HSV-1 TK, HSV kodirana timidin kinaza; GMP, guanozin monofosfat; NDP, nukleozid 5'-difosfat)

4.3.7. Humani citomegalovirus, HCMV

HCMV spada u porodicu *Herpesviridae*. Genom je linearna dvolančana DNK, a postoje četiri genotipa, izdvojena na osnovu varijacije u sekvenci gena UL55 koji kodira glikoprotein B. Ganciklovir je prvi odobreni lijek za tretman infekcija uzrokovanih ovim virusom, a na listi se nalaze i brojni drugi agensi koji su usmjereni na inhibiranje infekcije putem blokiranja sinteze DNK, odnosno inhibicijom DNK polimeraze. Formivirsen je jedini antivirusni oligonukleotid odobren za tretman HCMV induciranog retinitisa kod AIDS pacijenata. Na Slici 4.8. prikazana je hemijska struktura najpoznatijih lijekova koji se koriste u tretmanu HCMV uzrokovanih infekcija.

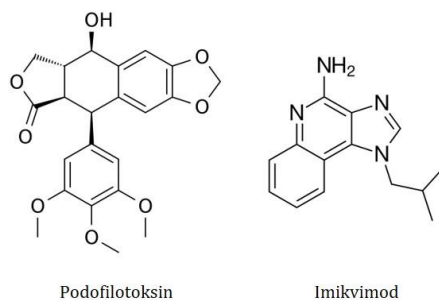


Slika 4.8. Odobreni antivirusni agensi za tretman HCMV uzrokovanih infekcija

4.3.8. Humani papilomavirus, HPV

HPV pripada porodici *Papillomaviridae* i posjeduje cirkularni dvolančani DNK genom. HPV je klasificiran u preko 100 tipova baziranih na varijaciji sekvence L1 proteina. HPV infekcije su odgovorne za oko 5% kancera kod ljudi uključujući karcinom grlića maternice. Procjene sugeriraju da je oko 71% globalnih slučajeva cervikalnog kancera uzrokovano sojevima HPV-16 i HPV-18.

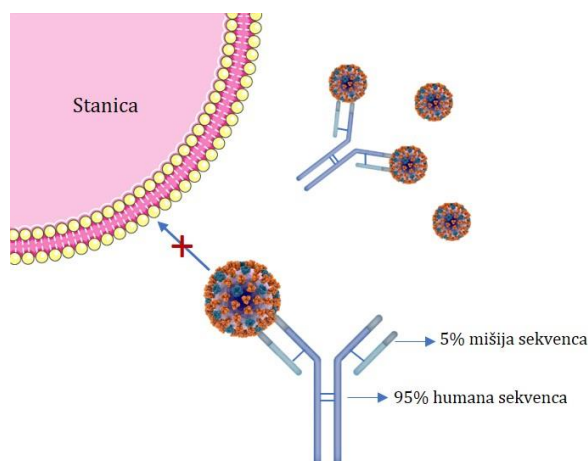
Od anti-HPV lijekova, interferon alfa-2b je prva odobrena velika molekula. Rekombinantni interferon alfa N3 je predložen za tretman HPV infekcije 1997. godine. Nažalost, unatoč ozbiljnosti HPV infekcija i visokoj prevalenciji virusa u populaciji ne postoji potpuno učinkovit specifični lijek za virus *per se*. Postoje farmaceutici koji ublažavaju pojedine simptome HPV infekcije, ali se moraju koristiti pod strogim liječničkim nadzorom jer nisu indicirani u svim slučajevima. Antimitotička komponenta *Podofilox* se koristi za liječenje genitalnih bradavica i predstavlja citotoksični lijek koji uzurpira dijeljenje viroznih stanica inhbiranjem formiranja diobenog vretena u metafazi. Aktivna komponenta lijeka je podofilotoksin (Slika 4.9.) i djeluje putem destabilizacije mikrotubula. Neki njegovi derivati imaju afinitet vezivanja za enzim topoizomerazu II tokom kasne S i rane G2 faze staničnog ciklusa. Podofilotoksin je biljnog porijekla i izolira se iz korijena i rizoma biljaka iz roda *Podophyllum*. Neki lijekovi kao imikvimod (Slika 4.9.) induciraju makrofage da sekretiraju citokine.



Slika 4.9. Hemijska struktura često korištenih anti-HPV agenasa

4.3.9. Respiratorni sincicijski virus, RSV

RSV pripada porodici *Paramyxoviridae*. Genom je linearna, jednolančana, negativno orijentirana RNK, a izdvojena su dva antigenska podtipa, A i B. FDA je 1996. godine za tretman RSV infekcija odobrila imunoglobulinski agens. Ova antitijela koja preveniraju vezivanje RSV partikula na stanice domaćina inhibiranjem virusnih glikoproteina G i F su naknadno diskontinuirana u praksi. Dvije godine kasnije odobreno je monoklonsko antitijelo palivizumab, koji cilja na epitope A antigenkog mjesta za RSV fuzijski protein i tako prevenira vezivanje za stanicu domaćina (Slika 4.10.). Ovaj lijek je indiciran za prevenciju teških infekcija respiratornog trakta koje uzrokuje RSV. Za upotrebu je odobren i širok spektar antivirusnih agenasa koji ciljaju aktivnost RNK polimeraze inhibiranjem inozin-5'-monofosfat dehidrogenaze.



Slika 4.10. Palivizumab je inhibitor F proteina RSV-a i vezivanjem za njega blokira kritični korak fuzije virusa i stanice domaćina

POGLAVLJE 5

LJEKOVITE BILJKE

Irma Mahmutović-Dizdarević



Neka hrana bude tvoj lijek, a lijek neka bude tvoja hrana.

Hipokrat

Prema zvaničnom podatku iz 2000. godine, na globalnom nivou je opisano oko 280.000 vrsta vaskularnih biljaka, od čega velika većina, oko 250.000 vrsta otpada na sjemenjače (Spermatophyta). Tokom zadnje dvije decenije, taj broj se gotovo udvostručio, pa je dostupan podatak o približno 391.000 opisanih vrsta vaskularnih biljaka, od čega oko 369.000 vrsta sjemenjača. Ovaj rapidni skok biodiverziteta biljnih vrsta na Planeti ohrabruje u mnogo čemu. Sa aplikativnog stanovišta, među opisanim vrstama, veliki broj njih ima potencijalnu biološku aktivnost i može biti korišten u svrhu liječenja bolesti. Ovo je osobito zanimljivo i važno u kontekstu liječenja infektivnih bolesti, gdje se susrećemo sa sve većim ograničenjima upotrebe sintetičkih lijekova.

Organizacija za hranu i agrikulturu (engl. *Food and Agriculture Organization*, FAO) je još tokom 2002. godine procijenila da se preko 50.000 biljnih vrsta koristi širom svijeta u medicinske svrhe. *Royal Botanical Gardens - Kew*, 2016. godine nešto konzervativnije procjenjuje da 17.810 biljnih vrsta ima medicinsku upotrebu, od ukupnog broja od oko 30.000 vrsta za koje je dokumentirana bilo kakva upotrebna vrijednost. Nekoliko godina kasnije, MPNS (*Medicinal Plant Name Services, Kew Gardens*) prezentira drugačije podatke, pa 2020. izdvaja čak 28.187 ljekovitih biljnih vrsta (što je oko 7.5% svih biljnih vrsta na Zemlji), od čega je skoro 4.500 citirano u medicinskim regulatornim publikacijama. Ovo potvrđuje trend otkrivanja novih ljekovitih i potencijalno ljekovitih biljnih vrsta.

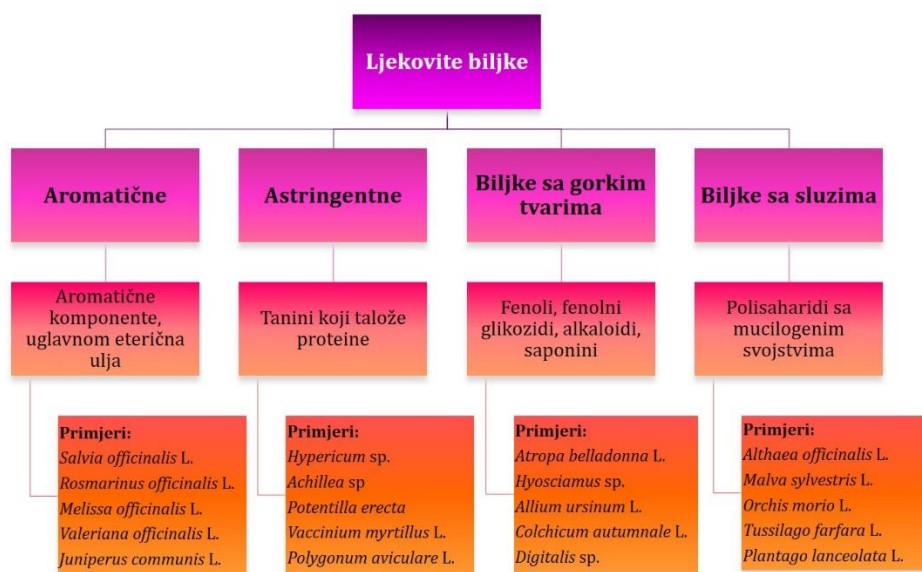
Svjetska zdravstvena organizacija navodi preko 20.000 vrsta ljekovitih biljaka i prepoznaje ih kao potencijalne izvore novih lijekova. S tim u vezi, danas više od 100 zemalja širom svijeta razvija ili je razvilo zakonske regulative u vezi sa upotrebom ljekovitih biljaka. Prema najnovijim podacima, preko 1.340 biljnih vrsta posjeduje definiranu antimikrobnu aktivnost, te je istovremeno iz biljaka izolirano preko 30.000 pojedinačnih antimikrobnih spojeva. U savremenoj medicini, četvrtina lijekova koja se pacijentima prepisuje izvedena je iz ljekovitih biljaka i podliježe rigoroznom testiranju. U drugim, alternativnim sistemima liječenja, ljekovite biljke čine glavninu tretmana, pa tako Svjetska zdravstvena organizacija procjenjuje da se oko 80% svjetske populacije oslanja isključivo na tradicionalnu medicinu, što je otprilike blizu dvije milijarde ljudi koji se u potpunosti liječe ljekovitim biljkama.

5.1. Klasifikacija ljekovitih i aromatičnih biljaka

Ljekovite biljke mogu biti klasificirane na različite načine, na osnovu: njihove upotrebe (npr. ljekovite u užem smislu, jestive, začinske, ukrasne biljke i sl.) (1), aktivnih konstituenata koje sadrže (npr. gorke supstance, tanini, isparljiva ulja itd.) (2), perioda života (tj. dužine trajanja života, ili u užem smislu, životne forme) (3) i pripadajuće botaničke taksonomije (4).

Ljekovite biljke, kako im i samo ime sugerira, koriste se u svrhe liječenja zbog svojih istaknutih terapijskih svojstava. Jestive biljke se koriste u ishrani, a ovdje se često svrstavaju i razne začinske biljke. Jestive biljke imaju nutritivne vrijednosti, a pored toga što su hrana, imaju i neka ljekovita svojstva što je ilustrirano kroz prisustvo vlakana, sluzi i njihovog diuretskog djelovanja. Indirektno su i ljekovite, zbog prisustva vitamina i minerala koji obezbjeđuju adekvatnu nutriciju i ponašaju se kao imunomodulatori. Ukrasne biljke imaju dekorativnu vrijednost zbog specifične morfologije svojih pojedinih dijelova itd.

Načelno postoji nekoliko osnovnih kategorija aktivnih konstituenata ljekovitih biljaka, kao što su: isparljiva (eterična) ulja, tanini (astringenti), komponente poput fenola, saponina, alkaloida (goraka tvar), te polisaharida (mucilogene tvari, sluzi), koje su u različitom omjeru prisutne u biljkama i na osnovu toga, moguća je klasifikacija u sljedeće grupe: aromatične biljke, astringentne biljke, biljke koje posjeduju gorke tvari i biljke koje posjeduju mucilogene tvari (Slika 5.1.).



Slika 5.1. Jedan od mogućih načina klasifikacije ljekovitih biljaka

Aromatične biljke posjeduju široku upotrebnju vrijednost, zbog ugodnog mirisa svojih cvjetova i/ili listova, a njihova ulja su poznati sastojci parfema i drugih mirisa. Aromatične biljke su vjerovatno najčešće korištene u ljekovite svrhe, te imaju naglašena antiseptična i antimikrobna svojstva. Poznati primjeri su: *Salvia officinalis* L. (kadulja) (Slika 5.2.A), *Rosmarinus officinalis* L. (ružmarin), *Mentha* sp. (menta, nana), *Lavandula* sp. (lavanda), *Thymus* sp. (majčina dušica), *Melissa officinalis* L. (matičnjak), *Valeriana officinalis* L. (valerijana) (Slika 5.2.D), *Matricaria chamomilla* L. (kamilica) (Slika 5.2.B), *Juniperus communis* L. (kleka, smreka, borovica) (Slika 5.2.C).

Astringentne biljke posjeduju tanine koji talože proteine, čime dolazi do suženja, kontrakcije ili promjene tonusa tkiva, čime se olakšava izbacivanje toksina. Ove supstance utiču na digestivni, urinarni i cirkulatorni sistem, a veće doze mogu biti hepatotoksične. Po svojoj prirodi, smatraju se analgeticima (ublažavaju bol), antisepticima (djeluju antiseptično), antiabortivima (sprječavaju pobačaj), emenagogima (stimuliraju protok krvi u karlici i uterusu), hemostaticima i stipticima (zaustavljaju krvarenje).

Neke od poznatih taninskih biljaka su: *Hypericum* sp. (kantaron) (Slika 5.3.A), *Achillea* sp. (kunica, stolisnik, hajdučka trava) (Slika 5.3.B), *Potentilla erecta* (L.) Räusch. (uspravna petoprsta), *Vaccinium myrtillus* L. (borovnica) (Slika 5.3.C), *Polygonum aviculare* L. (ptičja trava, oputina, troskot).



Slika 5.2. Često korištene aromatične biljke

A, *Salvia officinalis*; B, *Matricaria chamomilla*; C, *Juniperus communis*;
D, *Valeriana officinalis*

Određene biljke posjeduju gorke supstance, kao što su fenoli, fenolni glikozidi, alkaloidi i saponini, te se dalje dijele na laksative (stimuliraju peristaltiku), diuretike (poboljšavaju ekskreciju tečnosti), saponinske i alkaloidne biljke.

Laksativne gorke biljke uključuju alterative (postupno poboljšavaju opće stanje organizma), antikatarale (olakšavaju izbacivanje viška sluzi), antipiretike (snižavaju temperaturu), holagoge (stimuliraju rad žuči), purgative (izazivaju potpuno pražnjenje crijeva), hipotonike (snižavaju krvni pritisak), sialogoge (stimuliraju produkciju pljuvačke), vermifuge (eliminiraju intestinalne parazite) i čistače krvi.



Slika 5.3. Taninske biljke sa čestom upotrebom u tradicionalnoj medicini
A, *Hypericum perforatum*; B, *Achillea millefolium*; C, *Vaccinium myrtillus*

Diuretske biljke induciraju gubitak tečnosti iz tijela putem urinarnog sistema, čime se čiste vaskularni sistem, bubrezi i jetra. One su alterativi, antibiotici, antikatarali, antipiretici, antiseptici, litotriperi (pomažu kod kamenca) i čistači krvi, po svojoj prirodi. Saponinske biljke su poznate po svojoj mogućnosti da produciraju pjenu u otopini sa vodom. One u digestivnom traktu emulgiraju molekule rastvorljive u mastima i njihova najvažnija osobina je poboljšavanje mogućnosti tijela da apsorbuje druge aktivne komponente. Saponini mogu učinkovito otapati membrane crvenih krvnih stanica i uzrokovati njihovu disrupciju. U ovoj grupi prepoznati su alterativi, antikatarali, antispazmodici (ublažavaju grčeve) i afrodizijaci (stimuliraju seksualnu želju), emenagogi i kardio-stimulanti. Kada su u pitanju alkaloidne biljke, često ih nalazimo u porodici pomoćnica, Solanaceae, a neki primjeri su: *Atropa belladonna* L. (velebilje) (Slika 5.4.A), *Nicotiana* sp. (duhan), *Hyoscyamus* sp. (bunika) (Slika 5.4.C) itd. Kod monokotiledonih biljaka, alkaloidne vrste se česte u porodici Liliaceae, na primjer: *Colchicum autumnale* L. (mrazovac) (Slika 5.4.D) ili *Veratrum* sp. (čemerika) (Slika 5.4.B). Od glikozidnih biljaka, kao primjer se mogu navesti: *Allium ursinum* L., medvjedi luk ili srijemuš (Slika 5.5.C) (sumporni glikozidi), *Melilotus officinalis* (L.) Pall., žuti kokotac (Slika 5.5.D) (kumarin), *Rhamnus frangula* L., krušina (antrahinonski glikozid), *Convallaria majalis* L., đurđevak (Slika 5.5.B) i vrste roda *Digitalis* sp., naprstak (Slika 5.5.A) (kardiotonični glikozidi).

Mucilogeni svojstva biljaka su posljedica prisustva polisaharida koji proizvode sluzav i najčešće blag okus kada se otope u vodi. Većina sluzavih supstanci se ne razgrađuje u ljudskom probavnom sustavu, već apsorbiraju toksine iz crijeva i daju oblik stolici. Vrlo često imaju topijsku primjenu. Eliminiraju toksine iz probavnog sustava, a kada se koriste kao ekstrakti mogu blagotvorno djelovati na grlo. Oni su antibiotici, antacidi (preveniraju kiselost), demulcenti (olakšavaju upale i iritacije), emolienti (umiruju i omekšavaju kožu), i detoksifikatori (eliminiraju toksine) po svojoj prirodi. Neki od primjera biljaka koje sadrže sluzi, gume i pektine su: *Althaea officinalis* L. (bijeli sljez) (Slika 5.6.A), *Malva sylvestris* L. (crni sljez), *Orchis morio* L. (mali kačun), *Tussilago farfara* L. (podbjel) (Slika 5.6.C), *Plantago lanceolata* L. (uskolisna bokvica) (Slika 5.6.B).



Slika 5.4. Poznate alkaloidne biljke

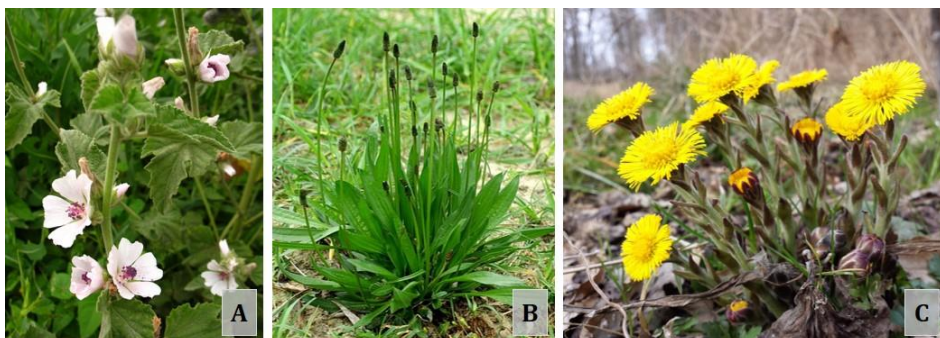
A, *Atropa belladonna*; B, *Veratrum album*; C, *Hyoscyamus niger*;
D, *Colchicum autumnale*

Prema dužini trajanja životnog ciklusa, ljekovite biljke su klasificirane kao jednogodišnje, dvogodišnje, i višegodišnje. U smislu razlikovanja životnih formi, ljekovite biljke nalaze se unutar gotovo svih poznatih kategorija životnih formi (zeljaste biljke, grmovi, drveće, penjačice itd.), pri čemu je najveći procenat ljekovitih biljaka iz skupine zeljastih biljaka, potom iz grupe grmova, te penjačica i ostalih poznatih formi. Ljekovite biljke naseljavaju najrazličitije tipove staništa (hidrofite, mezofite, kserofite, litofite, epifite, heliofite, sciofite, halofite itd.) i koriste različite životne strategije u ishrani (autotrofi, heterotrofi, simbionti itd.).



Slika 5.5. Primjeri glikozidnih biljaka

A, *Digitalis lanata*; B, *Convallaria majalis*; C, *Allium ursinum*; D, *Melilotus officinalis*



Slika 5.6. Neke biljke koje posjeduju mucilogene tvari
A, *Althaea officinalis*; B, *Plantago lanceolata*; C, *Tussilago farfara*

5.2. Botanička klasifikacija ili taksonomija ljekovitih biljaka

Sve ljekovite biljke proizvode hemijske komponente kao što su sekundarni metaboliti (npr. alkaloidi, fenoli, terpeni, antocijanini, karotenoidi). Ove hemijske komponente čine aktivnu terapijsku osnovu sirovog lijeka. Botanički ili taksonomski identitet ljekovite biljke je neophodan za procjenu njene učinkovite terapijske upotrebe. Determinacija botaničkog identiteta je fundamentalni korak u znanstvenoj studiji ljekovitih biljaka. Biljna klasifikacija, taksonomija, filogenija i sistematika su povezani termini, pri čemu klasifikacija opisuje proces svrstavanja organizama u grupe, taksonomija se bavi principima i procedurama klasifikacije biljaka (davanju imena koja reflektiraju njihovu klasifikaciju), filogenija predstavlja evolucijsku hijerarhijsku strukturu putem koje je svaka životna forma povezana sa svakom drugom životnom formom, dok se sistematika (klasifikacija na osnovu filogenije) bavi studijom komparativnih i evolutivnih odnosa biljaka, na osnovu njihove anatomije, fiziologije i biohemije.

Sistematika je važan alat u farmakološkoj praksi, te istraživanje i poznavanje sistematske pozicije određene biljke može biti veoma korisno u procjeni potencijalnog prisustva sekundarnih metabolita (npr. mnoge vrste porodice Apiaceae posjeduju eterična ulja, visoko aromatične komponente su prisutne kod predstavnika porodice Lamiaceae, alkaloidi se nerijetko nalaze kod Solanaceae i Papaveraceae vrsta, tanini kod Sapindaceae itd.). Taksoni derivirani iz „liliacealnog“ pretka (porodice Liliaceae, Juncaceae, Cyperaceae, Poaceae) posjeduju flavonoide u listovima.

Deset porodica reda Caryophyllales (Aizoaceae, Amaranthaceae, Basellaceae, Cartophyllaceae, Chenopodiaceae, Didieraceae, Molluginaceae, Nyctaginaceae, Phytolacaceae i Portulacaceae) posjeduju betalaine (nitrogenske antocijanine). Terpenoidi su široko zastupljeni kod porodica Apiaceae, Rutaceae i kod golosjemenjača. Mnoge takse iz porodica Araceae, Poaceae, Juncaceae, Juncaginaceae i Scheuzeriaceae su cijanogene. Farmakognozija je uključena u studiju ljekovitih produkata izvedenih iz prirodnih izvora. Uzevši u obzir veliki diverzitet biljnih vrsta, klasifikacija je preduslov za izučavanje različitih aspekata biljnog diverziteta u smislu njegove aplikacije. Sljedeći Internacionalni kodeks botaničke nomenklature (engl. *International Code of Botanical Nomenclature*, Voss 1983), takse korištene u klasifikaciji imaju sljedeću rastuću hijerarhiju: vrsta, rod, porodica, red, nadred, podrazred, razred, pododjeljak, odjeljak i carstvo.

Takson je taksonomska jedinica koja se koristi za indikaciju taksonomskog ranga. Prema binomnom sistemu nomenklature (Linnaeus, 1753), ime biljke se sastoji od dva dijela, imena roda i atributa vrste, za čim slijede inicijali autora koji je pružio prvu znanstvenu deskripciju vrste i dodijelio joj botaničko ime. Imenovanje biljaka i razumijevanje specijskih odnosa sa drugim vrstama je esencijalno za botaničare, ali i za farmakognostičare, fitohemičare i druge stručnjake koji se bave istraživanjima u domenu biljnih znanosti. Taksonomski identitet čini osnovu za tačnu identifikaciju i autentikaciju sirovog lijeka i njegovih glavnih komponenti. Dokumentacija ljekovitih biljaka zahtijeva i tačno identificiran vaučer primjerak biljke, koji se pohranjuje u prepoznate herbarske zbirke. Nedostatak vaučera, pogrešno navedeno ime ili bilo koji drugi vid navođenja botaničkog imena koji ne odgovara navedenom Kodeksu, može dovesti do zabune i posljedično nemogućnosti ponavljanja istraživanja. Vaučer primjerak je trajni trag znanstvenog istraživanja.

5.2.1. Sistemi biljne klasifikacije

Postoje tri tipa klasifikacije biljaka: (1) arteficijelni (umjetni ili mehanički), (2) prirodni i (3) filogenetski sistem. Kod arteficijelnog sistema, koristi se samo jedan ili nekoliko karaktera za grupiranje taksi; za prirodni sistem klasifikacije koristi se mnogo različitih karaktera, dok se kod filogenetskog sistema, evolutivni odnosi među taksama smatraju dodatnim informacijama za sve moguće morfološke karaktere, anatomiju, citologiju, biohemiju i fiziologiju određene grupe biljaka.

Sistemi klasifikacije koji su važili u prošlosti, vezani su za djelovanje istaknutih prirodnjaka i botaničara. Od perioda Teofrasta do Linea, uglavnom je bio zastupljen mehanički ili umjetni sistem klasifikacije. Na taj period se naslanjaju istraživanja de Candola, Benhtama i Hookera koji su zastupali prirodni sistem, a od vremena naučnog djelovanja Englera i Prantla, Bessey, Hutchinsona, te poslije Takhtajana, Cronquista, Dahlgrena i Thorna, sve je zastupljeniji filogenetski sistem klasifikacije viših biljaka. Danas postoji konsenzus da se carstvo biljaka (Plantae) može taksonomski podijeliti na sljedeće skupine: Thallophyta (alge), Bryophyta (mahovine), Pteridophyta (papratnjače), Gymnospermophyta (golosjemenjače) i Magnoliophyta (skrivenosjemenjače).

5.2.2. Klasifikacija ljekovitih biljaka na osnovu prirodnih produkata

Klasifikacija ljekovitih biljaka na osnovu prirodnih produkata može biti zasnovana na hemijskoj strukturi, tj. na karakteristikama hemijskog skeleta. Na taj način se razlikuju sljedeće komponente:

- alifatske i nealifatske masne komponente otvorenih lanaca: masne kiseline, šećeri i veliki broj aminokiselina,
- aciklične i cikloalifatske komponente: terpenoidi, steroidi i neki alkaloidi,
- aromatične i benzenske komponente: fenoli, hinoni itd.,
- heterociklične komponente: alkaloidi, flavonoidi i baze nukleinskih kiselina.

5.3. Biljni organi i tkiva od interesa

Statistički podaci sugeriraju da je dominantni biljni materijal u antibakterijskim studijama porijeklom od listova i/ili drugih vršnih dijelova biljke.

Biljke imaju mogućnost produkcije antimikrobnih produkata usljed napada mikroba, herbivora i insekata. Ovi sekundarni metaboliti se odlikuju brзом sintezom i poznati su pod imenom fitoaleksini. Biljke koriste sekundarne metabolite u svrhu različitog stepena interakcije sa mikroorganizmima na nivou svojih tkiva. To svakako donosi brojne koristi biljnom organizmu u smislu supresije patogena i najbolje se očituje u rizosferi tj. na nivou korjenovog sistema. Također, slični fenomeni se mogu uočiti i u drugim organima kakvi su listovi.

Ipak, kod hemijskog profiliranja vidljivo je da zastupljenost i sastav sekundarnih metabolita varira između biljnih tkiva, pa su određeni metaboliti koncentrirani u specifičnim tkivima. Kao što je navedeno, farmakognozija predstavlja studiju ljekovitih produkata izvedenih iz živog svijeta, osobito iz biljaka.

Sa botaničke tačke gledišta, prvi problem je definiranje farmaceutske (ili ljekovite) biljne droge. U kontekstu farmacije, botanička droga je produkt koji je ili izveden od biljaka i transformiran u lijek sušenjem određenih biljnih dijelova ili cijele biljke, ili može biti dobijen iz biljke, ali ne zadržava strukturu biljke ili njenih organa, te sadrži kompleksne mješavine biogenih komponenti. Pojam *droga*, etimološki vodi porijeklo od srednjevjekovne njemačke riječi *droge*, što znači suho. Botaničke droge su generalno derivirane iz specifičnih biljnih organa, odnosno tkiva. U tom smislu razlikujemo: vršne dijelove biljke (*herba*), list (*folia*), cvijet (*flos*), plod (*fructus*), koru (*cortex*), korijen (*radix*), rizom (*rhizoma*) i lukovicu (*bulbus*).

Cvijet i cvat

Iako cvjetovi i cvati imaju veliki biološki značaj za biljku kao individuu i evolutivno za biljnu populaciju, u smislu fitoterapije predstavljaju nešto skromniji izvor droga. Neki od primjera biljaka čiji cvijet ili cvat posjeduje veliki fitoterapijski značaj su: *Matricaria recucita* L. (kamilica), *Calendula officinalis* L. (neven), *Arnica montana* L. (arnika), i *Humulus lupulus* L. (hmelj).

Plod i sjeme

Reproduktivni dijelovi biljke kakvi su plod i sjeme, često predstavljaju važne nosioce fitoterapeutskih produkata. Biljke čiji plod se često koristi u farmaciji su *Carum carvi* L. (kim), *Foeniculum vulgare* Miller (komorač), *Serenoa repens* (Bartram) Small (sabal palma), *Schisandra chinensis* Baillon (kineska šisandra) itd.

Farmaceutska praksa pokazuje interes za sjemenom sljedećih biljaka: *Sinapis alba* L. (bijela gorušica), *Aesculus hippocastanum* L. (divlji kesten), *Plantago ovata* Forsskaol (indijski trputac, kolokvijalno psilijum) itd.

Listovi

Veliki broj droga je zasnovan na listu biljke kao glavnoj komponenti. Predstavnici koji se mogu istaći su: *Melissa officinalis* L. (matičnjak), *Atropa belladonna* L. (velebilje), *Ginkgo biloba* L. (ginko), *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (zeleni čaj), *Mentha × piperita* L. (paprena metvica), *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Sprengel (uva) itd.

Stabljika

Stabljika biljke je najčešće dio onih biljnih lijekova koji su izvedeni iz kompletnog nadzemnog dijela.

Kora

Biološki aktivni sastojci biljaka nekada su prepoznati i u kori, kao što je to slučaj kod vrsta: *Rhamnus frangula* L. (krušina), *Cinchona succirubra* Weddell, *C. calisaya* Weddell (kininovac, cinchona), *Quercus petraea* (Mattuschka) Lieblein (hrast kitnjak), *Q. robur* L. (hrast lužnjak), *Salix alba* L. (bijela vrba) itd.

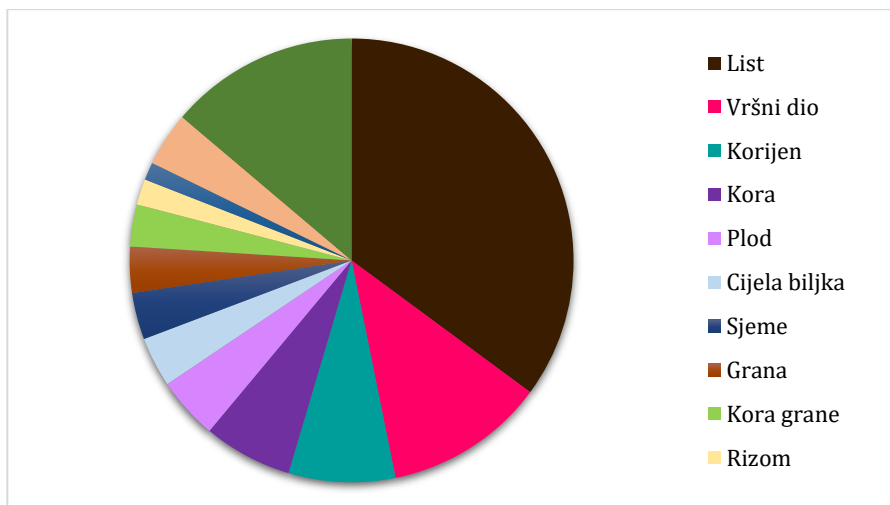
Nadzemni dijelovi (stabljika, listovi, cvijet/plod)

Kompletni nadzemni dijelovi biljke mogu biti korišteni u fitoterapiji, a primjer biljaka kod kojih je takav slučaj su: *Ephedra sinica* Stapf (efedra), *Crataegus monogyna* Jacquin (bijeli glog), *C. laevigata* (Poir.) DC. (crveni glog), *Passiflora incarnata* L. (pasiflora), *Artemisia absinthium* L. (pravi pelin), *A. annua* L. (slatki pelin) itd.

Korijen i rizom

Podzemni dijelovi biljaka također mogu imati farmaceutske odlike, kao npr. kod vrsta: *Harpagophytum procumbens* DC. ex Meissner (vražja kandža), *Panax ginseng* C.A. Meyer (azijski ginseng), *Eleutherococcus senticosus* Maximowicz (sibirski ginseng), *Potentilla erecta* (L.) Raeuschel (uspravna petoprsta), *Echinacea angustifolia* DC., *E. pallida* Nuttall, *E. purpurea* (L.) Moench (ehinacea), *Piper methysticum* Forster (kava), *Rehmannia glutinosa* Libosch (kineski naprstak), *Rheum palmatum* L., *R. officinale* Baillon (rabarbara), *Smilax regelii* Killip & Morton (tetivka).

Neke droge se dobijaju od cijele biljke ili pojedinih specijaliziranih organa. Takvi primjeri obuhvataju lukovice bijelog luka, *Allium sativum* L., eksudat aloje, *Aloe vera* (L.) Burman i sl. Rezultati velike studije antimikrobnog djelovanja biljnih produkata, koja je obuhvatila na hiljade pojedinačnih naučnih objava u vremenskom periodu od preko 70 godina, pokazuju da se u smislu antibakterijskog djelovanja najviše koristi list, potom nadzemni dijelovi biljke, korijen i kora (Slika 5.7.).



Slika 5.7. Grafički prikaz najzastupljenijih biljnih dijelova koji se istražuju u kontekstu antibakterijskog djelovanja

5.4. Biljni pripravci

Brojne biljne vrste se tradicionalno koriste u liječenju infekcija, a ta drevna praksa korištenja ljekovitih biljaka nastavljena je i danas, te je dodatno potkrijepljena naučnim nalazima o farmakološkom djelovanju biljnih preparata, tj. hemijskih konstituenata koje biljke sadrže. Biljni lijekovi mogu dolaziti u različitim formama, a svaka forma je striktno definirana. Najčešće korišteni tipovi ljekovitih biljnih pripravaka su:

- *Infuzija*: poseban tip biljnog produkta koji praktično predstavlja jaki ljekoviti čaj. Za ekstrakciju aktivnih supstanci iz biljke koristi se voda, najčešće ključala ali ponekad i hladna. Za razliku od čaja koji se svakodnevno priprema npr. u domaćinstvima, infuzija podrazumijeva korištenje veće količine biljnog materijala koji ostaje potopljen u vodi duži vremenski period.

Infuzije se najčešće prave od delikatnijih biljnih dijelova, kao što su listovi, cvjetovi, te neki plodovi i sjeme.

- *Dekokt*: preparat dobijen metodom dekokcije, odnosno kuhanjem biljnih dijelova u vrućoj vodi duži vremenski period. Dekokti se dobijaju najčešće od fibroznih i drvenastih biljnih dijelova kao što su korijen, kora i grančice i iz ove vrste pripravka nešto je teže ekstrahovati aktivne konstituente.
- *Sirup*: biljni dijelovi se dodaju zašećerenoj vodi ili mješavini vode i meda.
- *Prah*: osušeni biljni dijelovi se usitnjavaju do praha, manuelno ili putem specijaliziranih sprava
- *Tinktura*: koncentrirani biljni ekstrakt u kojem se kao otapalo koristi alkohol (u fitoterapiji minimalna koncentracija alkohola, najčešće etanola, u tinkturama iznosi 20%). Tinkture se mogu prirediti i bez korištenja alkohola, najčešće pomoću biljnog glicerina ili octa. Iako one nisu potentne kao tinkture zasnovane na alkoholu, mogu predstavljati alternativu za djecu ili populaciju odraslih koja ne konzumira alkohol.
- *Esencija*: biljni ekstrakt koji posjeduje aktivne principe u koncentriranom obliku.
- Esencijalno ulje predstavlja koncentriranu hidrofobnu tečnost koja posjeduje isparljive hemijske komponente biljke. Poznata su i kao isparljiva ulja ili eterična¹⁶ ulja. Prefiks „esencijalno“ kod ovih pripravaka se koristi u smislu opisivanja esencije biljke koju pripravak sadrži (esencija kao suština aktivnog djelovanja, mirisa i sadržaja biljke). Esencijalna ulja se najčešće dobijaju destilacijom.
- *Mast*: usitnjeni ili aromatični dio biljke se dodaje uljnoj supstanci (maslinovo ulje, petrolejske komponente, pčelinji vosak, mješavine i sl.).
- Ljekovita ulja dobijaju se kombiniranjem ljekovitih biljaka i različitih tipova ulja, pri čemu se za postizanje ljekovitih odlika koristi metoda dvostrukog ključanja ili tzv. solarna metoda.

¹⁶ Eter (grč. *aether*) prema drevnom i srednjevjekovnom učenju označava materiju koja ispunjava Univerzum izvan terestrijalne sfere. Pojam se koristio u objašnjenju prirodnih fenomena, a sinonimi su mu pojmovi „peti element“ ili „kvintesencija“.

Ljekovita ulja mogu poslužiti kao baza za priređivanje melema, u kojima ulje ima ulogu otapala biljnih aktivnih konstituenata.

- *Obloga*: svježa ili sušena biljka se aplicira na kožu uz prisustvo vlažne toplote

Danas, pored velikog broja biljnih pripravaka koji su komercijalno dostupni, važno je informisati se putem deklaracija koje potvrđuju da se radi o „standardiziranom ekstraktu“. Ovo zapravo predstavlja garanciju proizvođača da su ispoštovane mjere kontrole. Standardizacija osigurava pravilnu, konzistentnu i učinkovitu upotrebu. Ovo je osobito važno ukoliko su u pitanju kapsule ili tablete, koje se danas sve češće koriste.

5.5. Sekundarni metaboliti biljaka

Metabolizam se može definirati kao suma svih biohemijskih reakcija u organizmu. Metaboliti predstavljaju intermedijere i produkte metabolizma, i najčešće su u pitanju male molekule. Pojam „sekundarni“ je uveo A. Kossel 1891. godine, s namjernom da ilustruje činjenicu da su primarni metaboliti prisutni u svakoj živoj stanici sposobnoj za diobu, dok su sekundarni metaboliti prisutni samo incidentno i nisu od presudnog značaja za život jednog organizma. Iako sekundarni metaboliti nastaju iz produkata primarnog metabolizma, oni ne čine osnovni molekulski skelet organizma. Njihovo odsustvo ne onemogućava život organizma, ali njihovo prisustvo može itekako da produži trajanje života. Njihovo prisustvo i sinteza su uočeni kod vrsta koje se unutar svojih filogenetskih grupa susreću sa različitim ekološkim izazovima. Osnovne funkcije sekundarnih metabolita su: kompetitivno djelovanje protiv drugih živih sistema, uključujući biljke, životinje i mikroorganizme, transport metala, uspostavljanje simbioze sa drugim organizmima, učešće u reprodukciji i diferencijaciji, te komunikacija između organizama. Ostale funkcije podrazumijevaju interferenciju u formiranju spora i germinaciji. Ipak, predominantno, sekundarni metaboliti se koriste za različite biološke aktivnosti kao antimikrobni i antiparazitski agensi, enzimski inhibitori i antitumorski agensi, imunosupresivi itd.

Biljke su izuzetno bogate različitim vrstama sekundarnih metabolita kao što su: tanini, terpenoidi, alkaloidi i flavonoidi, koji imaju dokazana antimikrobna svojstva. Nadalje, biljke posjeduju gotovo neograničenu mogućnost sinteze aromatičnih supstanci, od kojih su većina fenoli i njihovi oksigen-supstituirajući derivati.

Do sada je prepoznato oko 30.000 terpenoida, kao sekundarnih komponenti deriviranih iz petokarbonskog prekursora izopentil difosfata. Ukupno je identificirano oko 20.000 alkaloida biosintetiziranih od aminokiselina, te preko 8.000 fenolnih komponenti sintetiziranih kroz put šikimske kiseline ili kroz malonat/acetatni put.

Sumarno gledano, moguće je govoriti o preko milion poznatih produkata prirodnog porijekla, od čega je između 600.000-700.000 komponenata biljnog porijekla. Bioaktivnost je dokazana za oko 150.000-200.000 biljnih supstanci, od čega je približno 25.000 antibiotske prirode. Produkcija sekundarnih metabolita iz biljaka ostvaruje se na različite načine. Konvencionalni metod zapravo počiva na ekstrakciji metabolita iz biljnog tkiva putem različitih fitohemijskih procedura. Novine u biotehnološkim metodama, kao što su kultura tkiva, enzimске i fermentacijske tehnologije i sl. su olakšale *in vitro* sintezu i produkciju sekundarnih metabolita.

Istraživači profilirani u smjeru bioaktivnog djelovanja supstanci prirodnog porijekla često ističu zanimljivu tvrdnju da je priroda zapravo najbolji hemičar. Ovakva razmišljanja su potpuno opravdana ako se, makar i površno, razmotri diverzitet primarnih i sekundarnih metabolita sintetiziranih tokom evolucije živog svijeta. Primarni metaboliti, uključujući proteine, masti, nukleinske kiseline i ugljikohidrate, predstavljaju biohemijske supstance esencijalne za rast, razvoj i reprodukciju organizama.

Kao što je i ranije bilo riječi, sekundarni metaboliti se sintetiziraju kao rezultat adaptacije organizama na okoliš i/ili u svrhu uključenja u odbrambene mehanizme datog organizma. Sekundarni metaboliti posjeduju brojne biološke funkcije i aktivnosti, pa i prirodni produkti koji su na njima zasnovani imaju široki spektar biološke aktivnosti. Na primjer, alkaloidi mogu blokirati jonske kanale, inhibirati enzime, blokirati neurotransmitere i uzrokovati halucinacije, pa čak i smrt. Terpenoidi, fenoli i glukozinolati su odgovorni za okus, aromu i boju, ali i interferiraju sa digestijom, blokiraju diobu stanica, ponekad daju organizmima neprijatan miris i okus ili utiču na rast i starenje konzumenata.

I tradicionalna i moderna medicina koriste prirodne produkte. U tradicionalnoj medicini (TM), prirodni produkti se koriste kao tinkture, čajevi, herbalna suplementacija ili formulacijski produkti.

Kao rezultat kompleksnih mješavina hemijskih supstanci prisutnih u sirovim ekstraktima korištenim u TM, održavanje standardne učinkovitosti, kvaliteta i sigurnosti, kao i rasvjetljavanje mehanizama djelovanja često ostaju opskurni ili teški za razumjeti. Ovo itekako ometa proces izolacije pojedinačnih komponenti iz prirodnih produkata. Generalno, izolacija čistih komponenti i identifikacija droge izvedene iz prirodnog produkta je prvi i kritični stadij procesa razvoja novog lijeka, a uspješan razvoj novoidentificiranog lijeka/ili kandidata, ovisi o svakom pojedinom koraku i tehnici tokom istraživačkog i razvojnog procesa. Trenutno je u bazu podataka *Dictionary of Natural Products* uvršteno oko 270.000 izoliranih čistih komponenti. Velika prednost prirodnih komponenata i produkata jeste hemijski i strukturni diverzitet, odabran upravo od strane prirode za specifične i značajne biološke interakcije tokom evolutivnog procesa. Preko 350.000 biljnih imena, iz 642 porodice i 17.020 rodova je pohranjeno u bazu pod imenom *The Plant List*. Od toga je 10-15% kopnenih biljaka izučeno u smislu fitohemijskih osobina i biološke aktivnosti, a kao glavne kategorije biljnih droga prepoznati su terpeni (34%), glikozidi (32%), alkaloidi (16%) i ostali (18%).

5.5.1. Sinteza sekundarnih metabolita u biljkama

Kao što je navedeno, sekundarni metaboliti biljaka predstavljaju multifunkcionalne metabolite tipično involvirane u biljnu odbranu i okolišnu komunikaciju. Nadalje, oni biljkama daju boju, okus i miris. Ipak, najvažnija stavka u funkcionalnom smislu je involviranost sekundarnih metabolita u biljni odgovor na stres. Kao primjer se može navesti uspješnost terminacije infekcije usljed djelovanja sekundarnih metabolita, bez obzira na etiologiju i način posredovanja infektivnog procesa. Skupa sa njihovom važnosti u toleranciji biotičkog stresa, biljni sekundarni metaboliti su uključeni i u mitigaciju abiotičkog stresa kao što su: ekstremne temperature, suša, visoki salinitet i stres povezan sa UV svjetlom.

Biljke su sesilni organizmi i kao takve su tokom evolutivnog procesa stekle različite odbrambene mehanizme koji se „pokreću“ kada je biljka suočena sa određenim biotičkim ili abiotičkim stresom. U morfo-anatomskom smislu, biljke mogu reducirati određene odlike kao što su: broj listova ili grana, površina lista, visina biljke i volumen korijena, razvoj dodatnih prevlaka i kutikule na epidermisu, promjene u izgledu stomatalnog aparata itd.

Fiziološke i reproduktivne prilagodbe na stres također su veoma raznolike, a upravo efikasnost ovih procesa i u nekim slučajevima potpuna izmjena reprodukcijских i evolutivnih strategija, vidljiva je kako na citogenetičkom, tako i na molekularnom nivou. Kada su u pitanju sekundarni metaboliti, tokom stresa biljke mogu pojačati akumulaciju sekundarnih metabolita. Egzogeni signali bivaju prepoznati od strane biljnih receptora i senzora, što omogućava odbrambeni odgovor u cilju zaštite biljke od stresa. Upravo je akumulacija sekundarnih metabolita jedan od ključnih odgovora. Transkripcijski faktori igraju važnu ulogu u kontroli biljne odbrane putem detekcije signala stresa i usmjeravanja odbrambene ekspresije odgovarajućih gena. Slično tome, preživljavanje biljke, otpornost i produktivnost ovise od pojačane sinteze sekundarnih metabolita, što je proces označen kao elicitacija.

Biljke produciraju sekundarne metabolite kroz različite metaboličke puteve koji učinkovito odgovaraju na uslove stresa. Ovi putevi su inicirani kroz puteve primarnih metabolita, koji produkuju prekursore sekundarnih metabolita. Šikimski put je inicijalni put za biosintezu aromatičnih aminokiselina, a aktivira se u stresnim uslovima s ciljem produkcije triptofana, tirozina i fenilalanina, koji dalje omogućavaju biosintezu sekundarnih metabolita. Različiti sekundarni metaboliti akumuliraju se u različitim biljnim organima u odnosu na uslove stresa. Na primjer, fitoaleksini posjeduju antimikrobnu aktivnost protiv fitopatogena i akumuliraju se u visokoj koncentraciji u listovima. U skladu sa njihovim antimikrobnim svojstvima, neki sekundarni metaboliti učestvuju i u konstrukciji polimernih barijera za penetraciju patogena. U tom smislu, biljke posjeduju vrlo sofisticirane signalne sisteme koji omogućavaju rapidno prepoznavanje napada patogena i mogu inicirati dinamičan odbrambeni odgovor. Akumulacija sekundarnih metabolita kao odgovor na stresne uslove je regulirana na molekularnom nivou, različitim genima i transkripcijskim faktorima, uključujući one povezane sa putevima fitohormona. Od svih transkripcijskih faktora, svega nekoliko modulira stresni odgovor posredovanjem akumulacije sekundarnih metabolita.

5.5.2. Biosintetski put sekundarnih metabolita

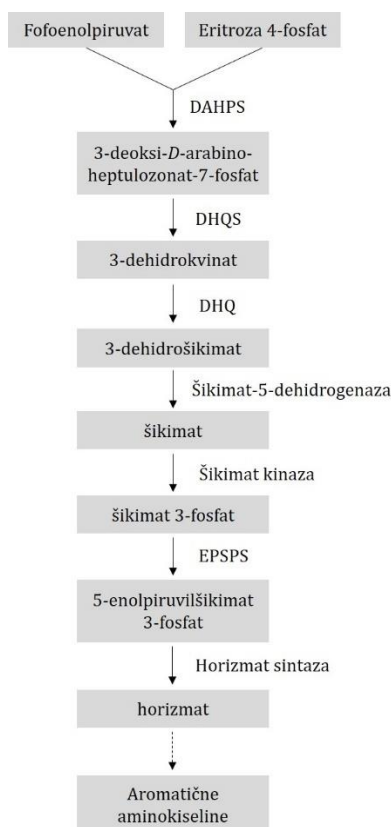
Prekursori metabolita su esencijalno producirani u Krebsovom ciklusu i šikimskom putu. Primarni metaboliti su kritični prekursori sekundarnih metabolita.

Oni se mogu razlikovati na osnovu hemijske strukture, funkcije i distribucije u biljci. Fundamentalni biosintetski putevi metabolita su konzervirani kod većine biljaka, sa većinom primarnih metabolita detektovanih u svim tipovima tkiva. Održavanje ove metaboličke osnove dovelo je do postojanja ograničenog broja fundamentalnih metaboličkih okvira. Česte glikozilacije, metilacije, hidroksilacije, aciklacije, oksidacije, fosforilacije i prenilacije, kao i nekoliko hemijskih alteracija enzima, doveli su širokog ranga modifikacija osnovnih struktura. Na osnovu biosintetskog puta, sekundarni metaboliti mogu biti podijeljeni u tri glavne skupine: fenolne komponente sintetizirane u šikimskom putu, terpeni sintetizirani u mevalonskom putu i nitrogenske komponente sintetizirane u putu trikarboksilne kiseline. Biosinteza sekundarnih metabolita ostvarena je kroz nekoliko osnovnih metaboličkih puteva: put šikimske kiseline, put malonske kiseline (malonat/acetat), put mevalonske kiseline i tzv. MEP (metileritrol-fosfat) put. Ovi biosintetski putevi koriste glukozu koja nastaje u procesu fotosinteze i ona predstavlja glavnu molekulu u metabolizmu sekundarnih metabolita, koja se dalje prevodi u aromatične aminokiseline, tanine, flavonoide, lignine, fenole, alkaloida i terpene kroz četiri glavna biosintetska puta u stanici.

5.5.2.1. Biosintetski put šikimske kiseline (Šikimski put)

Ovo je osnovni proces za biosintezu fenolnih komponenti. Odvija se u hloroplastima i izvodi se iz fenilpropanoidnih prekursora. Ovaj biosintetski put se još naziva i horizmatni put. Šikimski put (ili put šikimske kiseline) sastoji se od sedam koraka koji u konačnici dovode do nastanka krajnjeg produkta, a to je horizmat (Slika 5.8.). U prvom koraku, fesfoenolpiruvat (PEP) iz glikolitičkog puta i eritroza-4-fosfat iz ciklusa pentozofosfata se kondenziraju do 3-deoksi-*D*-arabino-heptulozonat 7-fosfata (DAHP), koji se može smatrati derivatom 2-deoksi-*D*-glukoza-6-fosfata. U drugom koraku, DAHP se modifikuje djelovanjem 3-dehidrokinat sintazom, u cilju formiranja visoko supstituiranih cikloheksan derivata 3-dehidrokinata. Preostali koraci u šikimskom putu služe za dodavanje bočnih lanaca i dvije od tri dvostruke veze kako bi se ovaj cikloheksan konvertovao u benzenov prsten (ključni dio aromatičnih supstanci). Treća i četvrta reakcija ovog puta uključuje dehidraciju dehidrokinata u 3-dehidrošikimate, što katalizira enzim 3-dehidrokinat dehidrataza (DHD), te slijedi reverzibilna redukcija 3-dehidrošikimata u šikimat koristeći NADPH, što je katalizirano šikimat dehidrogenazom (SDH). Peti korak šikimskog puta je formiranje šikimat 3-fosfata.

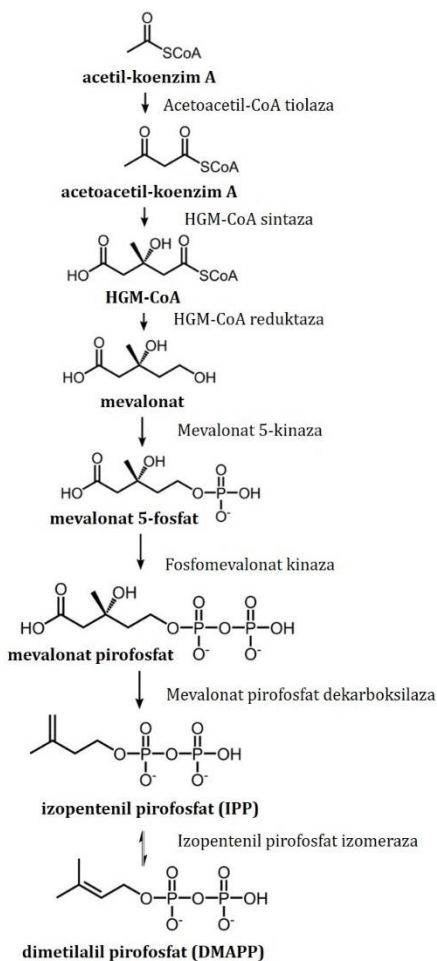
U ovom koraku, šikimat kinaza katalizira fosforilaciju šikimata na C3 hidroksilnoj grupi koristeći ATP kao supstrat. Šesti i sedmi korak su katalizirani 5-enolpiruvilšikimat 3-fosfatsintazom (EPSP) i horizmat sintazom. EPSP regulira naredni, pa do zadnjeg koraka šikimskog puta, transferiranjem enolpiruvatnog ostataka fenolpiruvata u šikimat 3-fosfat. Horizmat sintaza je finalni enzim koji sudjeluje u šikimskom putu, a katalizira konverziju ESPS u horizmat, koji je prekursor sekundarnih metabolita. U ovom finalnom koraku, 1,4-anti eliminacija 3-fosfata i C6-pro-R hidrogena iz ESPS dodaje drugu dvostruku vezu u prsten i nastaje horizmat. Kod viših biljaka, horizmat je prekursor triptofana, tirozina, fenilalanina, salicilata, filohinona i folata. Regulacija je ostvarena enzimima kao što su horizmat mutaza, izo-horizmat sintaza, antranilat sintaza i aminodeoksihorizmat sintaza.



Slika 5.8. Shematski prikaz osnovnih koraka šikimskog puta (DAHPS, 3-deoksi-D-arabino-heptulozonat 7-fosfat sintaza; DHQS, 3-dehidrokvinat sintaza; DHQ, 3-dehidrokvinat dehidrataza, EPSPS, 5-enolpiruvilšikimat 3-fosfatsintaza)

5.5.2.2. Biosintetski put mevalonske kiseline (Mevalonski put)

Ovaj biosintetski put zove se još i izoprenoidni put, a producira dva petokarbonska gradivna bloka: izopentenil pirofosfat (IPP) i dimetilalil pirofosfat (DMAPP) od kojih nastaju izoprenoidi. Mevalonski put počinje sa acetil koenzimom A. U prvom koraku dolazi do kondenziranja takve dvije molekule i nastaje acetoacetyl koenzim A, za čim slijedi druga kondenzacija i nastanak 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzim A (HGM-CoA). Redukcija te komponente stvara (R)-mevalonat. Ova prva tri enzimska koraka se zovu gornji mevalonski put. U donjem mevalonskom putu dolazi do konverzije (R)-mevalonata u IPP i DMAPP (Slika 5.9.).



Slika 5.9. Dijagram mevalonskog puta od acetil-CoA do prekursora izoprenoida

U biosintetičkom putu malonske kiseline (malonat/acetat), glavni produkt su masne kiseline, ali je ovaj put veoma važan i u metabolizmu alifatskih i aromatskih komponenti koji su sintetizirani kroz formiranje poliketida. Prekursor acetat/malonat puta je acetil koenzim A. MEP biosintetički put se još označava ne-mevalonski put i predstavlja alternativni metabolički put za biosintezu izoprenoidnih prekursora IPP i DMAPP. Izoprenoidi su izuzetno velika klasa koja obuhvata preko 30.000 biomolekula.

POGLAVLJE 6

HEMOKLASIFIKACIJA BILJNIH KONSTITUENATA

Muamer Dizdar



Biljke su hemičari, neumorno sastavljaju molekule svijeta.

Gary Snyder

Za razliku od primarnog metabolizma, sekundarni metabolizam se odnosi na metaboličke puteve i male molekule (prirodne produkte), koji nisu esencijalni za rast i reprodukciju organizma. Prirodni produkti sadrže veliku grupu strukturno različitih spojeva nastalih ili iz primarnih metabolita ili intermedijera u biosintetskim putevima ovih primarnih metabolita. Prema njihovim biosintetskim putevima, generalno se klasifikuju u nekoliko velikih molekularnih porodica: fenolskih spojevi, alkaloidi i terpeni.

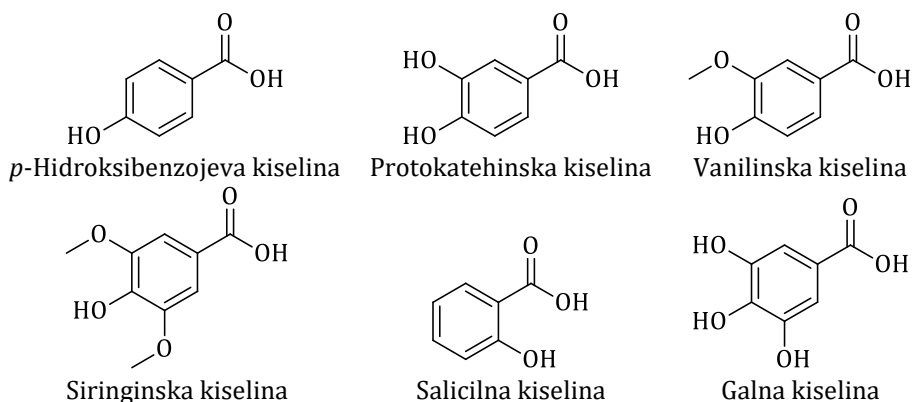
6.1. Fenolski spojevi

Gotovo sve biljke sadrže prirodne produkte koji uključuju karbociklični ili heterociklični aromatični prsten koji općenito sadrži jedan ili više hidroksilnih supstituenata. Žive boje biljaka oko nas uglavnom su posljedica tri izvora: tetrapirola, uglavnom hlorofila; karoteni na bazi terpena; i aromatičnih spojeva. Poznato je nekoliko hiljada aromatičnih spojeva, a nove strukture se neprestano otkrivaju. U nekim slučajevima njihove funkcije su dobro poznate. Na primjer, polifenolski lignini služe kao strukturne komponente staničnog zida. U drugim slučajevima, uključujući flavonoide, pretpostavljene su različite funkcije, ovisno o određenom spoju koji se istražuje. Aromatični spojevi nastaju kroz nekoliko puteva biosinteze, uključujući puteve poliketida i šikimata, kao i od terpenoidnog puta. Zbog kiselosti fenolske funkcionalnosti (pK_a od 8 do 11 u zavisnosti od supstituenata), fenolski spojevi imaju umjerenu rastvorljivost u vodi i često formiraju eterske veze sa ostacima šećera.

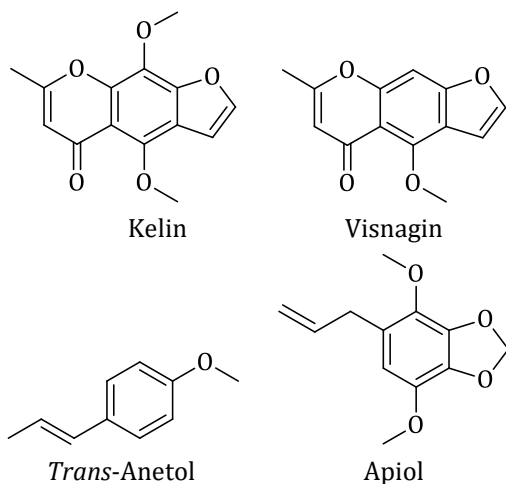
Postoji nekoliko pojedinačnih grupa fenolskih spojeva, od kojih će posebno biti razmatrane najznačajnije, a posebno se izdvajaju flavonoidi kao najviše ispitivani.

6.1.1. Jednostavni fenoli

Većina jednostavnih fenola su monomerne komponente polifenola i kiselina koje čine neka biljna tkiva, uključujući lignin i melanin. Te fenolne komponente se dobijaju kiselom hidrolizom biljnih tkiva. To uključuje *p*-hidroksibenzojevu, protokatehinsku, vanilinsku, siringinsku, salicilnu i galnu kiselinu koje su prikazane ispod.

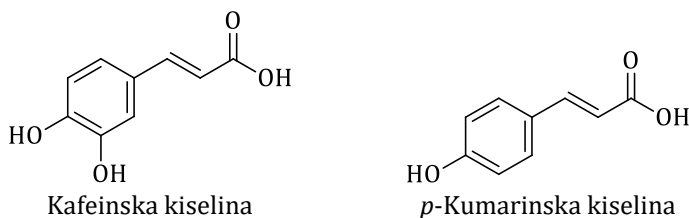


Slobodni fenolski spojevi, koji ne zahtijevaju degradaciju polimera stanične stijenke, relativno su rijetki u biljkama. Hidrohinon, katehol, orcinol i drugi jednostavni fenoli nalaze se u relativno niskim koncentracijama. Mnogi od jednostavnih fenolskih spojeva postoje i kao njihovi metil eteri. Kelin i visnagin su aktivni derivati kumarina ploda *Ammi visnaga* L. *Trans*-Anetol je uglavnom odgovoran za ukus i miris sjemenki anisa (*Pimpinella anisum* L.). Apiol je glavni sastojak eteričnog ulja sjemenja peršuna (*Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss) i snažan je diuretik. Strukture prethodnih metil etera su prikazane ispod.

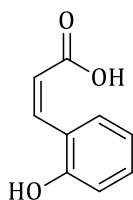


6.1.2. Fenilpropanoidi

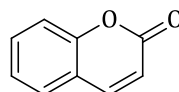
Kao što naziv implicira, fenilpropanoidi sadrže bočni lanac od tri ugljika vezan za fenol. Uobičajeni primjeri uključuju hidroksikumarine, fenilpropene i lignane. Uobičajene su i različite vrste hidroksicimetnih kiselina, uključujući kafeinsku i kumarinsku kiselinu. Fenilpropeni su važne komponente mnogih eteričnih ulja i uključuju eugenol, glavni sastojak ulja karanfilića (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). Kafeinska i *p*-kumarinska kiselina su hidroksicimetne kiseline prisutne u zelenim i prženim zrnima kafe, a strukture su prikazane ispod.



Kumarini, klasa prirodnih proizvoda karakterističnog ugodnog mirisa, zajednički su brojnim biljkama. Kumarin je lakton koji se dobija iz *cis-o*-hidroksicimetne kiseline, poznat kao benzo- α -piron ili benzo-1,2-piron, a struktura glavnog predstavnika je prikazana u nastavku.

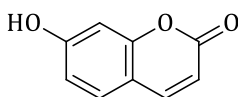


cis-o-Hidroksicimetna kiselina

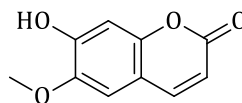


Kumarin

Prirodni kumarini mogu postojati kao aglikoni ili kao glikozidi i široko su rasprostranjeni u više od 30 porodica, uključujući oko 150 vrsta biljaka. Ima ih u izobilju u porodicama Umbelliferae, Rutaceae i Moraceae, a postoje i kod porodica: Leguminosae, Oleaceae, Solanaceae, Compositae, Orchidaceae i drugim. Većini prirodnih kumarina dodijeljena su trivijalna imena koja su izvedena iz imena roda ili vrste, ili kombinacije oba, biljke u kojoj su pronađeni. Umbeliferon i skopoletin, čije su strukture prikazane ispod, su fenilpropanoidi klase kumarina koji su poznati od 1884. godine i izolovani su iz korijena *Scopolia japonica* Maxim.



Umbeliferon

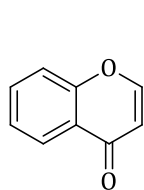


Skopoletin

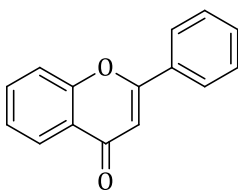
Prirodni kumarini se odlikuju velikom količinom i različitim strukturnim tipovima. Od 1920. do danas u literaturi je prijavljeno oko 2000 različitih kumarina. Zaista, u oblasti prirodnih proizvoda, kumarini pokazuju najbolji primjer klase spojeva s najvećim brojem biogenetskih modifikacija jednostavne strukture.

6.1.3. Flavonoidi

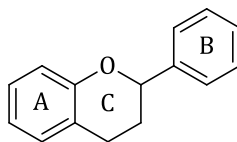
Flavonoidi su najznačajnija grupa fenolskih prirodnih produkata koji su široko prisutni u biljkama. Većina flavonoida je prisutna u obliku *O*- ili *C*-glikozida, a mali dio je u obliku aglikona. Flavonoidi postoje u gotovo svim proučavanim vrstama u biljnom carstvu i igraju važnu ulogu u rastu biljaka, cvjetanju, plodonošenju, odbrani od bolesti i bakterija itd. Ranije su flavonoidi definirani kao spojevi koji su sadržavali osnovnu strukturu 2-fenilhromen-4-ona, a općenito se odnosi na niz spojeva koji sadrže dva benzenska prstena (A i B) povezana preko tri centralna atoma ugljika.



Hromen-4-on

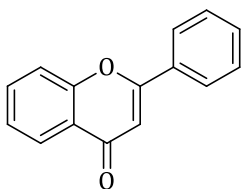


2-Fenilhromen-4-on

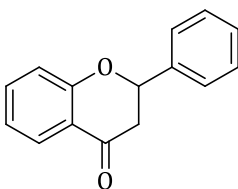


C₆-C₃-C₆ skelet

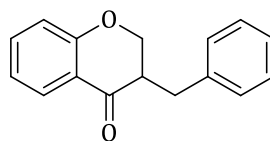
Prema stepen oksidacije, ciklizacije ili ne, i načinu supstitucije (3- ili 2-položaj), flavonoidi se mogu klasificirati kako je prikazano ispod.



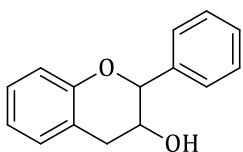
Flavoni



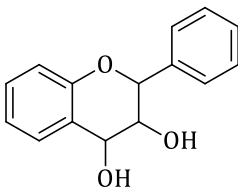
Flavanoni



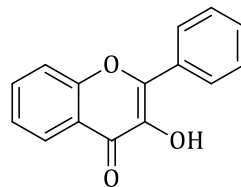
Homoizoflavanoni



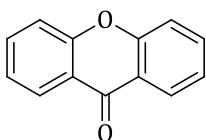
Flavan-3-oli



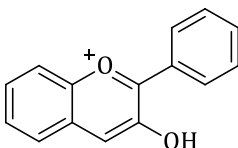
Flavan-3,4-dioli



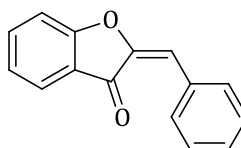
Flavonoli



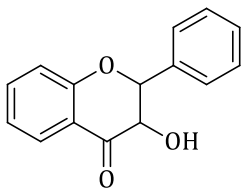
Ksantoni



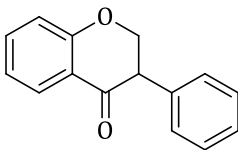
Antocijanidini



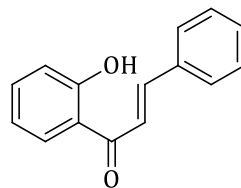
Auroni



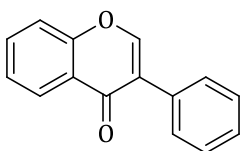
Flavanoli



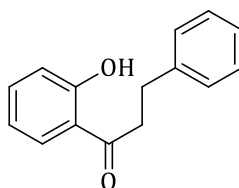
Izoflavanoni



Kalkoni



Izoflavoni



Dihidrochalkoni

Većina prirodnih flavonoida su derivati ovih osnovnih struktura, sa zajedničkim supstituentskim grupama kao što su $-OH$, $-OCH_3$, $-OCH_2O-$, izopentenil i kafeoil, itd. Flavonoidni glikozidi su uglavnom *O*-glikozidi i *C*-glikozidi. Osim ovih, postoje i drugi tipovi strukture, kao što su biflavonoidi, triflavonoidi i homoflavonoidi itd., koje formiraju flavonoidni dimeri ili trimeri.

6.1.3.1. Fizičke i hemijske osobine flavonoida

Općenito, flavonoidi su kristalne čvrste tvari, a samo nekoliko njih su amorfni prahovi. Flavoni, flavonoli i njihovi glikozidi su uglavnom sivkasto žuti do žuti. Kalkoni su žuto do narandžasto žuti, flavanoni i flavanonoli nemaju sistem unakrsne konjugacije i stoga su generalno bezbojni. Međutim, karakteristična boja i fluorescencija mogu se vidjeti pod ultraljubičastim svjetlom. Izoflavoni imaju samo nekoliko konjugacija, pa su blijedo žuti. Boja antocijanidina zavisi od pH vrijednosti, uglavnom crvena ($pH < 7$), ljubičasta ($pH = 8.5$) i plava ($pH > 8.5$) itd.

Flavonoidni aglikoni koji sadrže asimetrični ugljik, kao što su flavanon, flavanonol, izoflavanon i njihovi derivati, imaju optičku aktivnost. Drugi aglikoni nemaju optičku aktivnost, ali svi flavonoidni glikozidi imaju optičku aktivnost i općenito su levorotatorni, jer su monosaharidi ili oligosaharidi povezani u njihovoj strukturi. Flavonoidni aglikoni su slabo rastvorljivi ili nerastvorljivi u vodi, dobro rastvorljivi u organskim rastvaračima kao što su metanol, hloroform, itd. Međutim, flavonoidni glikozidi su rastvorljivi u polarnim rastvaračima kao što su voda, metanol itd. i slabo rastvorljivi ili nerastvorljivi u organskim rastvaračima kao što su benzen, hloroform itd. Budući da većina flavonoida sadrži fenolsku hidroksilnu grupu i na taj način pokazuju kiselost, mogu se rastvoriti u baznim rastvorima (Na_2CO_3 , itd.) i baznim organskim rastvaračima (piridin, formilamin i DMF).

Zbog dva slobodna elektrona na 1-kisiku pironskog prstena, flavonoidi pokazuju slabu bazičnost i mogu formirati soli sa jakim kiselinama, kao što su HCl i H_2SO_4 . Međutim, dobivena sol je izuzetno nestabilna i odmah će se hidrolizirati dodatkom vode. Flavonoidi mogu pokazati karakterističnu boju kada reaguju sa Mg (ili Zn)/ HCl , $NaBH_4$, $AlCl_3$, $NaOH$ i drugim reagensima koji se mogu koristiti za njihovu identifikaciju.

6.1.3.2. Rasprostranjenost flavonoida u biljnom carstvu

Flavonoidi u biljkama potiču iz kalkona, koji se sintetiziraju iz hidroksil cimetne i trioctene kiseline, odnosno nastaju iz glukoze šikimskim putem i HAc-malonske kiseline. Kalkon i flavanon mogu se međusobno transformisati, a oba mogu dalje formirati flavanonole, izoflavone, aurone i dihidrohalne konuse. Flavanonoli mogu dalje formirati flavonole, antocijanidine, katehine i epikatehine. Izoflavoni mogu dalje formirati pterokarpine i rotenone. Neki flavonoidi su koncentrisani u određenim porodicama biljaka.

Flavoni su široko prisutni među angiospermima, posebno u porodicama Rutaceae, Compositae, Scrophulariaceae, Lamiaceae, Umbelliferae, Acanthaceae, Gesneriaceae i Leguminosae. 6-Hidroksiflavoni uglavnom postoje u zeljastim biljkama. 8-Hidroksiflavoni su generalno prisutni u drvenastim biljkama. Flavanoni su vrlo zastupljeni, posebno u angiospermima, kao što su Rosaceae, Rutaceae, Compositae, Zingiberaceae, Ericaceae i Leguminosae. Flavonoli su široko prisutni u dikotiledonima, posebno u cvjetovima i listovima nekih drvenastih vrsta. Kamferol i kvercetin su najčešći flavonoli. Flavanonoli su prisutni u golosjemenjačama, nekoliko vrsta monokotiledona iz porodice Zingiberaceae i kod dikotiledona Leguminosae i Rosaceae. Kalkoni postoje u porodicama Compositae, Leguminosae i Gesneriaceae. Takođe se nalaze u porodicama Scrophulariaceae i Valerianaceae. Dihidroalkalkoni se rijetko nalaze u biljnom carstvu. Izoflavoni su uglavnom prisutni, u skrivenosjemenjačama. Na primjer, kod Leguminosae (oko 70%), a ostalo su u porodicama Iridaceae i Moraceae. Aktivnost glikozida je snažnija od aktivnosti aglikona. Antocijanidini čine da cvijet, plodovi, listovi i stabljike budu obojeni različitim bojama, kao što su plava, ljubičasta i crvena, itd. Široko su prisutni u skrivenosjemenjačama, a najčešći antocijanidini su cijanidin, delfinidin, pelargonidin i malvidin.

Derivati flavan-3-ola, poznati kao katehini, široko su prisutni u biljnom carstvu, uglavnom u drvenastim vrstama, koje sadrže tanine. Derivati flavan-3,4-diola, poznati kao leukoantocijanidini, kao što su leukocijanidin, leukodelfinidin i leukoplargonidin, itd., takođe su široko prisutni u povrću, posebno u drvenastim vrstama i papratima koje sadrže tanin. Ova jedinjenja mogu biti polimerizovana i imaju slična svojstva kao i tanini.

6.1.3.3. Ekstrakcija i izolacija flavonoida

Proces dobijanja flavonoida može se podijeliti u dvije faze. Faza I je ekstrakcija, a glavno pitanje u ovoj fazi je kako odabrati rastvarač za ekstrakciju, što zavisi od toga da li su ciljna jedinjenja glikozidi ili aglikoni, kao i koji dio biljke će se koristiti. Faza II je izolacija, a cilj ove faze je odvajanje flavonoida od ostalih koegzistirajućih spojeva. Kada je potrebno, izvršiće se dalje odvajanje i prečišćavanje kako bi se dobile različite komponente flavonoida. Kako su ove dvije faze međusobno povezane, vrlo ih je teško jasno definirati tokom stvarnih operacija.

Kako rastvorljivost flavonoida uveliko varira, nije pronađen niti jedan rastvarač za ekstrakciju koji bi odgovaralo svim flavonoidima. Izbor rastvarača za ekstrakciju zavisi od svojstava ciljnih jedinjenja i nečistoća. Ekstrakcija toplom vodom je najčešća metoda koja se koristi za flavonoidne glikozide. Kada se koristi ova metoda, sirovine se stavljaju u kipuću vodu kako bi se inaktivirali enzimi. Ova metoda se također može koristiti za ekstrakciju relativno visoko polarnih flavonoidnih aglikona, kao što su flavanol, flavandiol i proantocijanidin. Tokom ekstrakcije, potrebno je uzeti u obzir i količinu dodane vode, vrijeme potapanja, vrijeme ekstrakcije i druge faktore. Metanol i etanol su najčešći rastvarači za ekstrakciju flavonoida. Za ekstrakciju aglikona pogodan je visokokonzentrovani alkohol (90 do 95%), a za ekstrakciju glikozida alkohol sa oko 60% koncentracije.

Proces ekstrakcije često traje dvije do četiri sekvence. Perkolacija, refluks i maceracija se također mogu koristiti za ekstrakciju. Kod sukcesivne ekstrakcije koriste se različiti rastvarači (od niskog do visokog polariteta). Na primjer, prvo se koristi heksan za odmašćivanje. Zatim slijedi benzen za ekstrakciju polimetoksi flavonoida ili izopentenil i metilflavonoida. Nakon toga, eter, hloroform i etil acetat bi se koristili za ekstrakciju većine aglikona. Zatim se aceton, etanol, metanol i metanol-voda (1:1) koriste za ekstrakciju polihidroksi flavonoida, biflavonoida, kalkona itd.. Konačno, razblaženi alkohol i voda se koriste za ekstrakciju glikozida, a 1% HCl se koristi za ekstrakciju antocijanidina. Bazni rastvori (kao što su vodeni rastvori Na_2CO_3 , NaOH i $\text{Ca}(\text{OH})_2$) ili bazni rastvori alkohola mogu se koristiti za ekstrakciju, jer većina flavonoida sadrži slobodnu fenolsku grupu. Zakiseljavanjem ekstrakta dolazi do taloženja flavonoida. Ali, ova metoda nije zadovoljavajuća jer mnoge nečistoće koegzistiraju.

Nadalje, moraju se izbjeći visoke koncentracije alkalija koje mogu narušiti samu strukturu ciljanih komponenti.

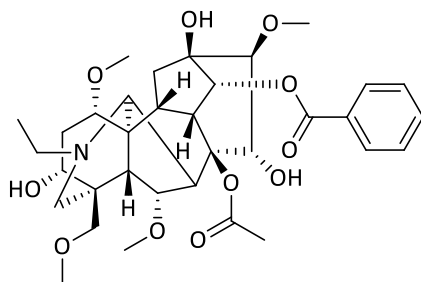
Izolacija flavonoida uključuje dva koraka: prvi je izolacija flavonoida iz drugih koegzistirajućih spojeva, a drugi je daljnja izolacija kako bi se dobila različita jedinjenja flavonoida. Uobičajene metode izolacije koje se koriste su ekstrakcija rastvaračem, alkalna ekstrakcija i taloženje kiselinom, tankoslojna hromatografija, poliamidna kolonska hromatografija, hromatografija na koloni silika gela, taloženje soli olova, hromatografija na gel koloni itd.

6.2. Alkaloidi

Alkaloidi se općenito definiraju kao grupa organskih jedinjenja biljnog porijekla koja sadrže nitrogen (osim proteina, peptida, aminokiselina i vitamina B). Međutim, mnogi spojevi koji sadrže nitrogen ne samo oni koji su otkriveni iz biljaka već i iz morskih proizvoda, mikroorganizama, gljiva i insekata, smatraju se alkaloidima. Stoga, općenito govoreći, sva organska jedinjenja koja sadrže nitrogen iz prirodnih izvora mogu se smatrati alkaloidima.

Alkaloidi su bili prva klasa bioaktivnih prirodnih produkata koju su proučavali naučnici. U Kini, Zhao Xuemin je u svojoj knjizi *Bencao Gangmu Shiyi* zabilježio da Baiyuan Jin, knjiga napisana u 17. stoljeću, vodi evidenciju o kristalnom toksinu ekstrahovanom iz *Aconitum carmichaeli*. Moderna analiza je utvrdila da je ovaj toksin akonitin, čija je struktura prikazana ispod.

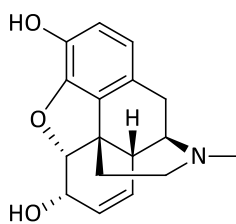
U Evropi je morfin prvobitno izolovao njemački farmaceut Friedrich Wilhelm iz vrste *Papaver somniferum* L. 1804. godine. Nazvan je "biljna alkalija" zbog svog baznog karaktera. Godine 1819. farmaceut W. Meissner je koristio riječ „sličan alkalijama“ ili „alkaloid“ koji se odnosi na bilo koje osnovno nitrogenovo jedinjenje biljnog porijekla. Od tada se koristi termin alkaloid.



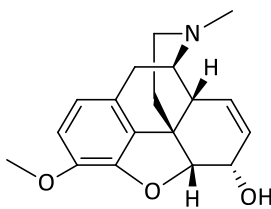
Akonitin

Većina alkaloida ima biološku aktivnost i često su aktivni sastojci raznih ljekovitih biljaka uključujući mnoge tradicionalne kineske lijekove. Primjeri uključuju analgetik morfin i antitusik kodein iz *Papaver somniferum* L., sredstvo protiv astme efedrin iz *Ephedra sinica* Stapf, sredstvo protiv spazma atropin iz *Atropa belladonna* L., sredstvo protiv raka vinkristin iz *Catharanthus roseus* (L.) G.Don, i antiinflamatorno sredstvo berberin iz *Coptis chinensis* Franch; sa odgovarajućim strukturama koje su prikazane ispod.

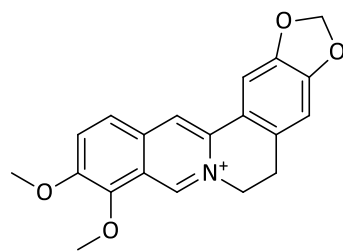
Kada se tretiraju kiselinama, alkaloidi se mogu pretvoriti u soli rastvorljive u vodi, koje se mogu lako apsorbirati *in vivo*. Štaviše, većina alkaloida sadrži složene hemijske strukture. Zbog ovih karakteristika, alkaloidi su oduvijek bili zanimljiva istraživačka tema koja privlači mnoge organske hemičare. Do sada je identificirano više od 12.000 alkaloida, a broj se i dalje povećava svake godine.



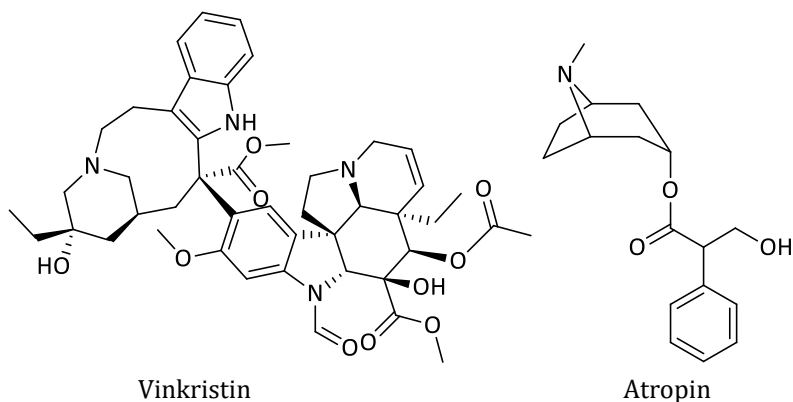
Morfin



Kodein

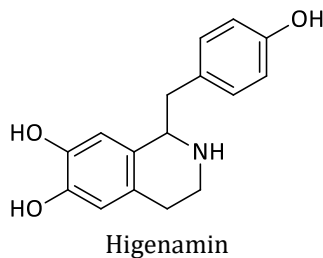


Berberin



Količine alkaloida u tragovima, kao što je agens protiv raka majtanzin, mogu se dobiti iz biljaka. Ovo makrociklično jedinjenje koje sadrži nitrogen ima složenu molekularnu strukturu i objavljena je njegova totalna sinteza. Izolacija, razjašnjavanje strukture i totalna sinteza alkaloida i dalje su važna područja istraživanja za hemičare prirodnih produkata.

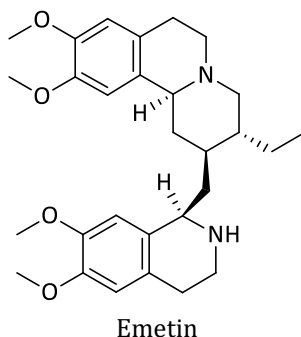
Većina alkaloida posjeduje biološku aktivnost i aktivne su komponente mnogih ljekovitih biljaka. Međutim, postoji nekoliko izuzetaka. Na primjer, akonitin je glavni sastojak *Aconitum carmichaeli* Debeaux. Kardiotonični i analgetički sastojak nije akonitin, već sporedna komponenta higenamin:



Vinkristin (iz *C. roseus*) i majtanzin (iz *Maytenus hookeri* Hook.f. Loes.) su sastojci u tragovima. Alkaloidi se nalaze u mnogim biljkama i obično se nalaze u porodicama Leguminosae, Solanaceae, Manispermaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae i Berberidaceae. Alkaloidi se nakupljaju u kori korijena, korijenu i stabljici nekih biljaka, ali se nalaze i u sjemenkama i plodovima. Sadržaj alkaloida uveliko varira u različitim biljnim vrstama. Na primjer, ukupan sadržaj alkaloida u kori drveta cinchona je više od 3%, dok je sadržaj vinkristina u *C. roseus* samo 0.0001%.

Mnogo manje se nalazi u sadržaju majtanzina iz *M. hookeri*, samo 0.00002%. Općenito, sadržaj alkaloida se smatra visokim ako je veći od 0.1%.

Alkaloidi u jednoj biljci obično su izvedeni iz istog prekursora i često pokazuju slične strukture. U mnogim slučajevima, alkaloidi iz istog roda i iste porodice imaju slične strukturne skelete. Dakle, identifikacija imena biljke, njene vrste i razumijevanje poznatih sastojaka iz iste vrste i roda, kao i njihovog biogenetskog odnosa, prije početka studije je od pomoći za proučavanje alkaloida. U suprotnom, istraživanje može krenuti u pogrešnom smjeru. Važnije je proučavanje kineskih biljnih vrsta, jer mnoge kineske biljke imaju više različitih narodnih naziva, a ponekad se jedno narodno ime udvostručuje s drugim. Međutim, prisustvo alkaloida ne može se predvidjeti samo prema porodici ili rodu biljaka. To je zato što se taksonomija uglavnom zasniva na morfologiji biljaka i ne postoji definitivna veza između taksonomije biljaka i hemijskih sastojaka. Na primjer, *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) Tussac sadrži oko 2% emetina, koji je prikazan ispod, dok *Gardenia jasminoides* J. Ellis i *Rubia cordifolia* L. iz iste porodice ne sadrže alkaloeide.



Alkaloidi čine najveću porodicu prirodnih organskih produkata. Njihove strukture variraju na mnogo načina i uključuju različite podtipove. Dok određuju strukture, naučnici uvijek proučavaju odnose strukture i aktivnosti i modificiraju molekule radi povećanja efikasnosti i masovne proizvodnje. Na primjer, proučavanje morfina rezultiralo je razvojem izohinolinskih alkaloida i otkrićem analgetika dolantina. Proučavanje kokaina rezultiralo je razvojem hiosciaminskih alkaloida i otkrićem lokalnog anestetika prokaina. Alkaloidi se obično prepoznaju kao sekundarni biljni metaboliti, koji igraju zaštitnu ili pozitivnu ulogu u rastu i metabolizmu biljaka.

Međutim, njihov stvarni značaj je kontroverzan, jer biljke koje ne sadrže alkaloida ili ih sadrže u tragovima i dalje rastu i dobro se razvijaju. Stoga, stvarnu funkciju biljnih alkaloida treba dalje istražiti, ali se smatra da je zaštita osnovna uloga.

Klasifikacija alkaloida se uglavnom zasniva na njihovoj hemijskoj strukturi ili njihovim uobičajenim prekursorima molekularnog biosintetskog puta. Međutim, tradicionalna metodologija klasifikacije često je bila izazvana novootkrivenim spojevima s novim strukturnim skeletima. Klasifikacija alkaloida postajala je sve konkretnija. Na primjer, izohinolinski alkaloidi čine veliku grupu spojeva, koji se dalje mogu podijeliti na morfine, benzilizohinoline, aporfine, protopine, dimerne aporfine i *bis*-benzilizohinoline, itd. Cilj narednog tabelarnog prikaza (Tabela 6.1.) je predstavljanje hemijske raznolikosti alkaloida, ali ne i potpuna klasifikacija, koja je jako otežana i literaturno neujednačena.

Tabela 6.1. Prikaz hemijske raznolikosti alkaloida

Klasa	Predstavnik	
Izohinolinski alkaloidi	Jednostavni izohinolini	Salsolin
	Benzilizohinolini	Papaverin
	Bisbenzilizohinolini	Linsinin
	Aporfin alkaloidi	Magnoflorin
	Protoberberini	Berberin
	Protopini	Kriptopin
	Emetini	Emetin
	α -Naftafenantridini	Keleritrin
	Morfin alkaloidi	Morfin
	Furan hinini	Skimianin
	Cinhona alkaloidi	Cinhonidin
Pirolidinski alkaloidi	Jednostavni pirolidini	Higrin
	Pirolizidini	Monokrotalin
	Indolizidini	Ipalbidin
	Tropan alkaloidi	Atropin
	Stemona alkaloidi	Tuberostemonin
Indolski alkaloidi	Vinblastin	

6.2.1. Karakterizacija, identifikacija i izolacija alkaloida

Alkaloidi su bezbojni kristali (neki su tečni) sa specifičnim tačkama topljenja i optičkom rotacijom. Mnogi od njih imaju gorak okus i njihovi slobodni oblici se lako rastvaraju u organskim rastvaračima, ali ne i u vodi. Većina alkaloida je bazna, sa nekim izuzecima, kao što su amidni alkaloidi. Općenito, alkaloidi formiraju soli s organskim ili neorganskim kiselinama prema njihovim različitim baznim svojstvima. Alkaloidne soli se rastvaraju u vodi osim soli koje potiču od nekih posebnih anorganskih kiselina (kao što su silikovolframatna i fosfovolframatna kiselina) ili organskih kiselina (kao što je pikrinska kiselina). Ova karakteristika se može koristiti za identifikaciju i izolaciju alkaloida. Fenolski alkaloidi su amfiprotiska jedinjenja, koja se mogu rastvoriti u baznim rastvaračima. Na primjer, morfin može stvarati soli ne samo s kiselinom, već i sa kaustičnim bazama. Alkaloidi kvaternarnih amonijum soli su obično rastvorljivi u vodi i zahtjevaju posebnu pažnju u postupcima ekstrakcije i izolacije. Alkaloidi pokazuju različite boje kada se tretiraju nekim reagensima, a ovaj kvalitet se može koristiti za identifikaciju specifičnih alkaloida. *Dragendorff*-ov reagens, rastvor kalij bizmut jodida, koristi se za određivanje prisustva alkaloida. Kada se tretira ovim reagensom, rastvor ili mrlja na ploči tankoslojne hromatografije, koja sadrži alkaloidne, postaje smeđe-žuta.

Na osnovu svojih hemijskih svojstava, alkaloidi se mogu ekstrahovati iz biljaka različitim metodama. Alkaloidi obično postoje u biljkama u obliku soli organskih kiselina poput kafeinske, limunske, oksalne ili papaverinske kiseline. Za ekstrakciju alkaloida iz biljaka koristi se etanol, smjesa etanol-voda (60 do 80%), voda ili vodeni rastvori kiselina (0.5 do 1% sulfatne ili acetatne kiseline). Nakon uklanjanja vode ili etanola, koncentrat se tretira sa 2% rastvorom kiseline kako bi se dobio sirovi alkaloidni ekstrakt. Ako se materijal ekstrahuje etanolom, gusti rastvor se zakiseli, a zatim ispere eterom ili hloroformom kako bi se uklonile masti i ulja. Nakon filtracije, kiseli vodeni rastvor se tretira amonijakom ili natrijum karbonatom da bi se alkaloidi pretvorili u slobodne bazne oblike iz njihovih soli. Bazni vodeni rastvor se zatim ekstrahuje etrom ili hloroformom da bi se dobili sirovi alkaloidi. Alkaloidi rastvorljivi u vodi, ako su prisutni, nalaze se u sloju vode. Iako sirovi alkaloidi dobijeni gornjom metodom mogu sadržavati puno nečistoća, metoda je relativno ekonomična i sigurna za upotrebu za industrijsku proizvodnju.

Etanolni ekstrakt se može podvrgnuti hromatografiji na koloni preko makroporozne smole eluirane vodom i kiselinom. Sirovi alkaloidi se dobijaju iz frakcija kiselina. Ako se kolona eluira sa alkoholom u različitim koncentracijama i svaka frakcija se sakupi respektivno, može obezbijediti preliminarnu izolaciju sirovih alkaloida. Hloroform, dihlorometan, benzen ili drugi rastvarači koji se ne miješaju s vodom također se mogu koristiti za ekstrakciju sirovih alkaloida.

Slabo bazni alkaloidi obično postoje u slobodnim baznim stanjima u biljkama i mogu se direktno ekstrahovati organskim rastvaračima kao što su benzen, hloroform, itd. Jako bazni alkaloidi mogu biti prisutni u biljkama u obliku soli. Kako bi se povećala efikasnost ekstrakcije, prah sirovine se macerira vodom da nabubre stanice tkiva ili se macerira razblaženom organskom kiselinom, kao što je limunska kiselina, tako da neki umjereni bazni alkaloidi mogu ostati u biljkama u obliku soli. Zatim se ekstrahuju organskim rastvaračem kako bi se dobili sirovi slabo bazni alkaloidi. Ako se materijal ekstrahira direktno vodom ili razblaženim alkoholom, kondenzirana vodena otopina uvijek pokazuje slaba kisela svojstva zbog prisustva nekih organskih kiselina. U tom slučaju, slobodni slabo bazni alkaloidi mogu se ekstrahovati iz vodenog rastvora hloroformom ili drugim organskim rastvaračima. Na primjer, pH kondenzovanog perkolata iz *Camptotheca acuminata* Decne. je 5.4; kamptotecin se zatim može ekstrahovati direktno hloroformom.

Alkaloidi rastvorljivi u vodi i alkaloidi kvaternarnih amonijum soli ne mogu se ekstrahovati iz vodenih rastvora uobičajenim organskim rastvaračima. Da bi se dobile ove vrste alkaloida, vodeni rastvor treba prvo zakiseliti, a zatim podvrgnuti kolonskoj hromatografiji sa smolom za izmjenu katjona, ili vodeni rastvor direktno ekstrahovati butanolom ili pentanolom. Na primjer, leonurin A rastvorljiv u vodi ekstrahovan je direktno pentanolom iz *Leonuri artemisia* (Lour.)S.Y.Hu.

Isparljivi alkaloidi kao što je efedrin mogu se lako izolovati destilacijom vodenom parom. Sublimirani alkaloidi se mogu direktno dobiti iz praha osušenog biljnog materijala sublimacijom. Na primjer, kada se listovi čaja zagriju, kofein će sublimirati i sakupljati se nakon kondenzacije. Danas se koristi ekstrakcija superkritičnim fluidima (npr. ugljen dioksid) zbog svoje velike brzine i efikasnosti.

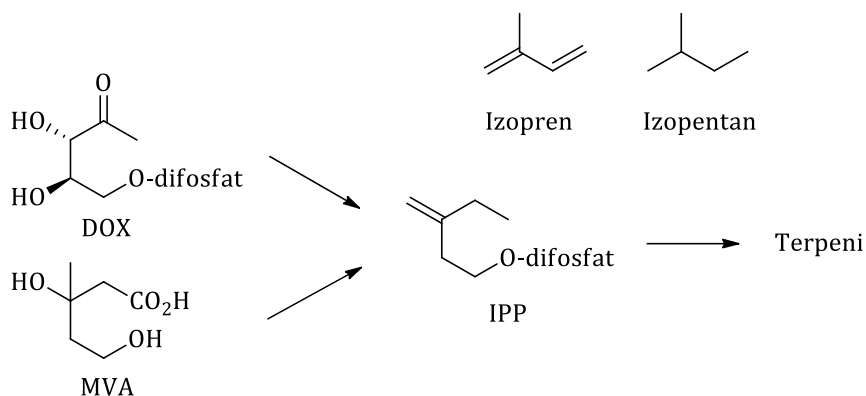
Na primjer, izolacija tetrahidropalmatina iz *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang i skopolamina iz *Datura metel* L. može se izvesti ovom metodom. Međutim, ove metode zahtijevaju specifičnu opremu koja može podnijeti visoki pritisak. Sirove alkaloidne ekstrahirane gore navedenim metodama treba provjeriti TLC-om da bi se odredio sadržaj alkaloida u različitim frakcijama.

6.3. Terpeni

Terpeni su cijenjeni zbog eteričnih ulja i njihove upotrebe kao mirisa više od dvije hiljade godina. Arheološko istraživanje u Egiptu 1997. godine otkrilo je bosvelinsku kiselinu u smoli tamjana (*Boswellia* sp.) koje datiraju od 400. do 700. godine nove ere. Sačuvani su zapisi iz srednjeg vijeka o eteričnim uljima na bazi terpena, a hemijska analiza ulja počela je početkom devetnaestog vijeka. Trgovina eteričnim uljima i aromaterapijom nastavlja se i danas. Na primjer, miris ruže (*Rosa* sp.) je očarao mnoge. Ulju bugarske ruže potrebno je preko 4000 kg latica za proizvodnju 1 kg parno destiliranog ulja. Identificirano je preko 260 sastojaka, od kojih su mnogi relevantni za miris.

Trebalo bi biti jasno da čak i jednostavni terpeni koji se nalaze u mirisima imaju značajnu količinu strukturne raznolikosti. Na sreću, uprkos njihovoj raznolikosti, terpeni imaju jednostavnu ujedinjujuću osobinu po kojoj su definisani i po kojoj se mogu lako klasifikovati. Ovu općenitost, nazvanu pravilom izoprena, postulirao je Otto Wallach 1887. Ovo pravilo opisuje sve terpene da imaju fundamentalne ponavljajuće jedinice izoprena od pet ugljika. Prema tome, terpeni su definirani kao jedinstvena grupa prirodnih proizvoda na bazi ugljovodika koji posjeduju strukturu koja može biti hipotetički izvedena iz izoprena, što dovodi do struktura koje se mogu podijeliti na izopentan (2-metilbutan) jedinice.

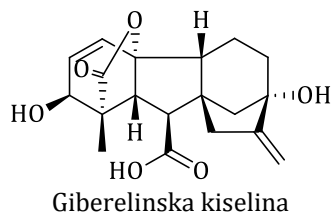
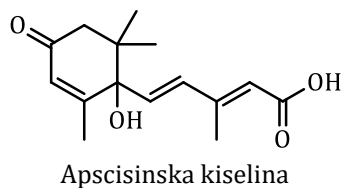
Pravi biosintetski put do terpena nije baš tako jednostavan. Dva različita puta biosinteze proizvode glavni građevinski blok terpena, izopentenil difosfat (IPP). Prvi se naziva ili MEP (metileritritolfosfat) ili DOX (1-deoksi-D-ksiluloza) put. Ovdje se IPP formira u hloroplastu, uglavnom za isparljivije mono i diterpene. Drugi put biosinteze poznat je kao put MVA (mevalonske kiseline). To se dešava u citosolu, proizvodeći seskviterpene. Pojednostavljeni pregled prikazan je ispod.



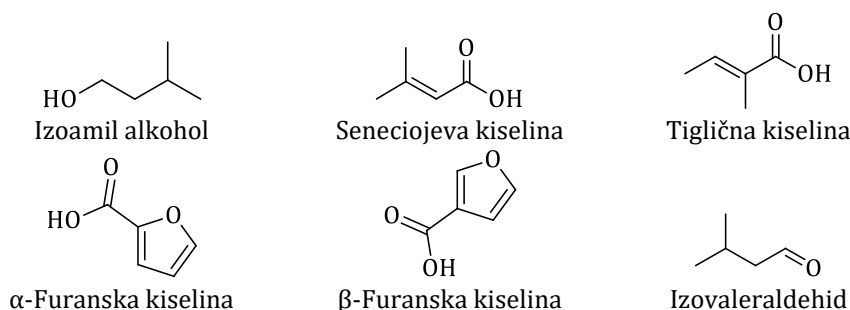
Terpeni se stoga klasificiraju prema broju petougličnih jedinica koje sadrže:

1. Hemiterpeni: C_5
2. Monoterpeni: C_{10}
3. Seskviterpeni: C_{15}
4. Diterpeni: C_{20}
5. Triterpeni: C_{30}
6. Tetraterpeni: C_{40}

Kao i svi prirodni produkti, unutar ove jednostavne klasifikacije leži ogromna količina strukturne raznolikosti koja dovodi do širokog spektra jedinjenja sličnih terpenima (ili terpenoidima). Do sada je identifikovano preko 30.000 terpena. Najjednostavniji primjeri terpena tehnički su ugljikovodici. Funkcija terpena u biljkama općenito se smatra i ekološkom, i fiziološkom. Mnogi od njih inhibiraju rast konkurentskih biljaka (alelopatija). Za neke je poznato da su insekticidni; za druge je utvrđeno da privlače insekte oprašivače. Biljni hormon, apscisinska kiselina, je jedan od seskviterpena. Diterpenska giberelinska kiselina je također jedan od glavnih biljnih hormona, a predstavnici su prikazani ispod. Identificirano je više od 130 giberelina, a nove strukture terpena se i dalje prijavljuju svake godine.

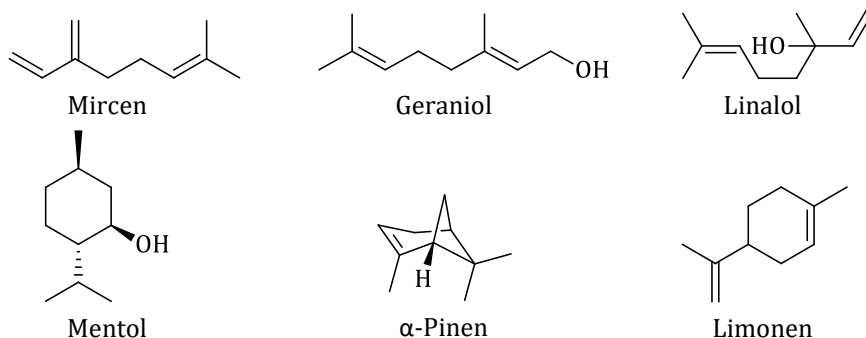


Hemiterpeni su napravljeni od jedne petouglične jedinice i najjednostavniji su od svih terpena. Izopren se emituje iz lišća mnogih biljaka i doprinosi prirodnoj izmaglici (fitohemijski smog) u nekim regionima, kao što su *Smoky Mountains*. Poznata su brojna jedinjenja sa pet ugljenika koja sadrže izopentanski skelet, uključujući izoamil alkohol, seneciojevu kiselinu, tigličnu kiselinu, α - i β -furansku kiselinu i izovaleraldehid (strukture ispod). Postoje dokazi da ova jedinjenja mogu pomoći u odbrani biljaka odbijanjem biljojeda ili privlačenjem predatora i parazita biljojeda.

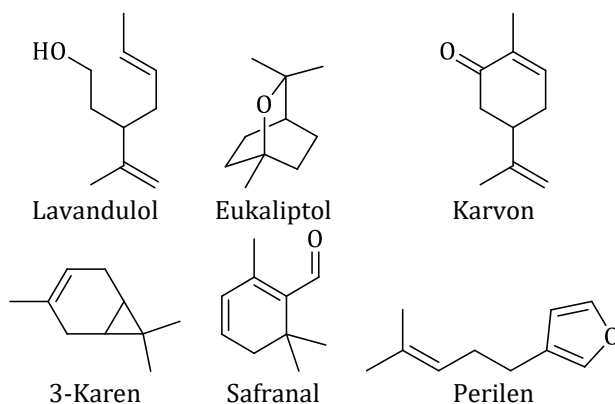


U prirodi postoji zbunjujući asortiman dekanskih aranžmana na bazi izoprena. Ovo daje izrazu "terpenoid" posebno elastično značenje i podsjeća na neke od trenutnih kombinatornih napora koji se koriste u farmaceutskoj industriji.

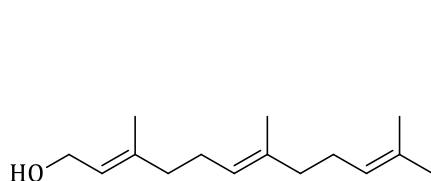
Monoterpeni su glavna komponenta mnogih eteričnih ulja i kao takvi imaju ekonomski značaj kao arome i parfemi. Uobičajeni aciklični primjeri uključuju mircen, geraniol i linalol. Ciklične strukture uključuju mnoge dobro poznate spojeve, uključujući mentol, pinen i limonen:



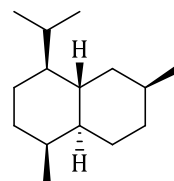
Većina ilustrovanih monoterpena dolazi iz uobičajenih izvora sa kojima je većina nas poznata. Tujonski diastereomeri su konvulzanti koji se brzo metaboliziraju. Oni djeluju kao nekompetitivni blokatori γ -aminobutanske kiseline (GABA) hloridnog kanala. Mircen se nalazi u eteričnom ulju lovorovog lista (*Laurus nobilis* L.) kao i hmelja (*Humulus lupulus* L.). Koristi se kao intermedijer u proizvodnji parfema. Geraniol, koji je izomerni sa linalolom, čini najveći dio ulja geranijuma (*Pelargonium graveolens* L'Hér.), a nalazi se i u eteričnim uljima citronele (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle), limunske trave (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf ili *C. flexuosus* (Nees. ex Steud.) W. Watson) i drugi. Lavandulol je jedan od glavnih sastojaka ulja lavande (*Lavandula angustifolia* Mill.), koji se obično koristi u muškim parfemima. Perilen se može naći u perili (*Perilla frutescens* (L.) Britton), porijeklom iz južne i istočne Azije. Mentol je dobro poznati monoterpen koji se nalazi u eteričnom ulju paprene metvice (*Mentha × piperita*) i drugih članova porodice Lamiaceae. Karvon je uobičajeni monoterpen. Jedna je od glavnih mirisnih komponenti sjemena kima (*Carum carvi* L.) i pokazuje antifungalno djelovanje. 3-Karen je ciklopropan koji sadrži monoterpen, čiji su derivati pokazali anestetičku aktivnost. α -Pinen, glavni sastojak terpentina, može igrati značajnu ulogu u aktivnosti bakterija koje razgrađuju ugljovodonike u prirodi. Linalol je jedan od osnovnih sastojaka korijandera (*Coriandrum sativum* L.), uobičajenog začina. To je također jedno od najčešćih cvjetnih mirisnih jedinjenja koje se nalaze u biljkama cvjetnicama, a uobičajeno je jedinjenje okusa u raznim čajevima. Safranal je uglavnom odgovoran za karakterističan miris šafrana (*Crocus sativus* L.). Eukaliptol (1,8-cineol) je glavna komponenta eteričnog ulja lista eukaliptusa (*Eucalyptus globulus* Labill.). Eukaliptol, zajedno s kamforom, čine glavne sastojke ruzmarinovog ulja:



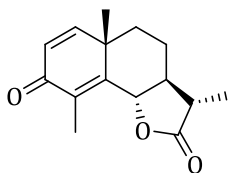
Izvedeni od tri jedinice izoprena, C₁₅ **seskviterpeni** postoje u alifatskom, bicikličkom i tricikličkom okviru. Kao i monoterpeni, većina seskviterpena su komponente esencijalnog ulja biljke iz koje se dobijaju. Važan član ove serije je farnezol, sa pirofosfatom koji služi kao ključni intermedijer u biosintezi terpenoida. Neki uobičajeni seskviterpeni prikazani su ispod.



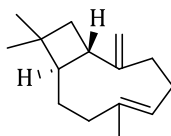
Farnezol



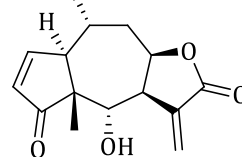
Kadinen



Santonin



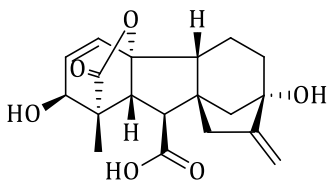
Kariofilen



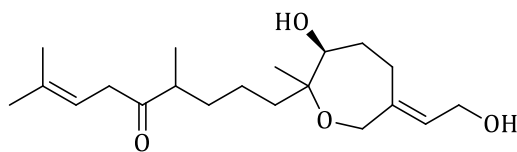
Helenalin

Kadinen se javlja kod eteričnih ulja koja se dobijaju iz stabala kleke i cedra. Santonin je antihelmintik koji se izoluje iz *Artemisia maritima* L. Kariofilen, prvo sintetiziran 1963., jedan je od glavnih sastojaka ulja karanfilića (*E. caryophyllata*). Helenalin je jedan od brojnih pseudogvajanolidnih seskviterpenskikh laktona izolovanih iz ulja arnike (*Arnica montana* L.). Tetrahidroidentin B je jedan od gorkih eudesmolida jedinstvenih za obični maslačak (*Taraxacum officinale* (L.) Weber ex F.H.Wigg.).

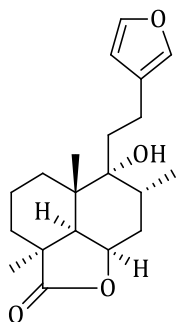
Diterpeni su široko raznolika grupa jedinjenja zasnovana na četiri grupe izoprena. Zbog viših tačaka ključanja, ne smatraju se eteričnim uljima. Umjesto toga, klasično se smatraju smolama, materijalom koji ostaje nakon parne destilacije biljnog ekstrakta. Nekoliko diterpena je prikazano ispod.



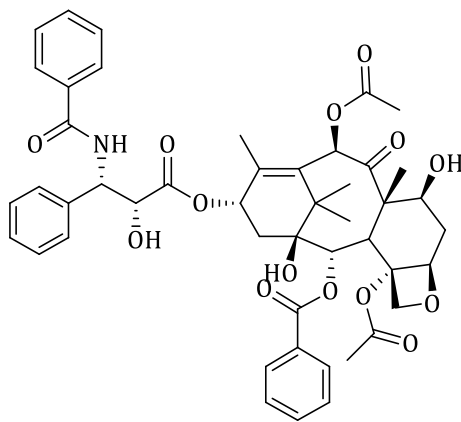
Giberelinska kiselina



Zoapatanol



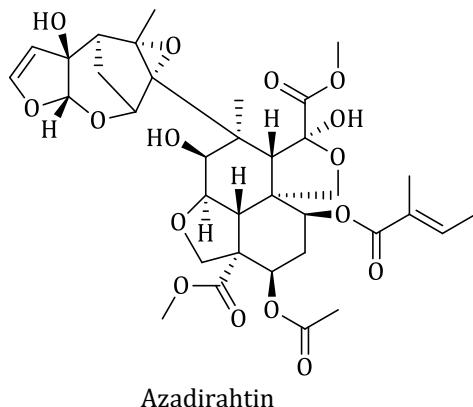
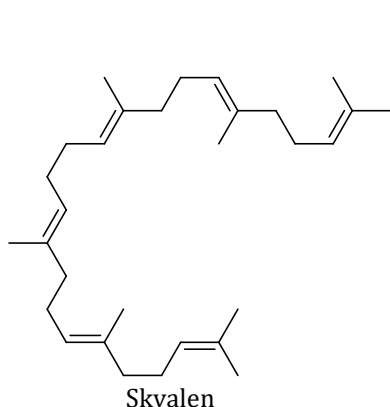
Marubin



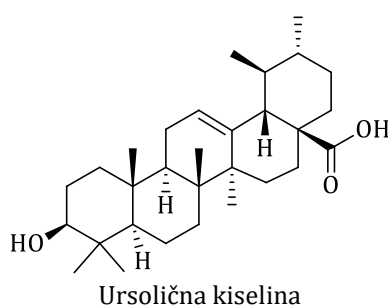
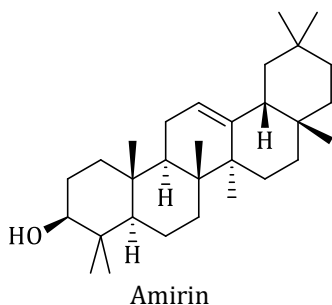
Taxol®

Ovdje se može navesti mnogo zanimljivih primjera. Ciklični eter zoapatanol se dobija iz meksičke biljke *Montanoa tomentosa* Cerv. Korišten je kao abortiv. Određeni broj klerodana je izolovan iz vrsta rodova *Ajuga*, *Salvia* i *Teucrium*. Različiti citotoksični laktoni izolovani su iz vrsta roda *Podocarpus*. Ovi podolaktoni i nigilaktoni imaju antileukemijsko djelovanje. Giberelini čine važnu grupu široko rasprostranjenih biljnih hormona. One spadaju u dvije serije, uključujući porodicu C₂₀ koju predstavlja giberelin i seriju C₁₉ za koju je tipična giberelinska kiselina. Marubin je diterpenski lakton iz marulje (*Marrubium vulgare* L.). Korišten je kao vazorelaksans. Taxol® ili paklitaksol (dobijen od iglica i kore *Taxus* sp., tise) je potpuno jedinstven antimitotički agens koji se koristi za liječenje raka dojke. Hemijski se sastoji od diterpenoidnog jezgra sa alkaloidnom bočnom grupom. Paklitaksol se ne vezuje za mikrotubule, ali ih stabilizuje, za razliku od svih drugih antimitotika tipa tubulina koji se vezuju, kao što su vinkristin, podofilotoksini i kolhicin.

Triterpeni su bazirani na šest jedinica izoprena i biosintetski su dobijeni iz skvalena. Često su bezbojne čvrste tvari visoke tačke topljenja i široko su rasprostranjene među biljnim smolama, plutom i kutinom. Postoji nekoliko važnih grupa triterpena, uključujući uobičajene triterpene, steroide, saponine, steroline i srčane glikozide. Među njima je azadirachtin, moćno sredstvo protiv insekata koji se dobija iz sjemena stabla nim (*Azadirachta indica* A.Juss.):



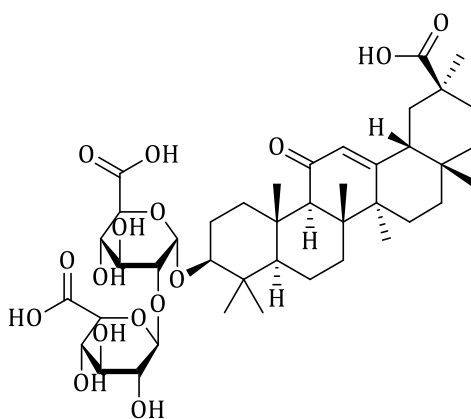
Samo nekoliko uobičajenih triterpena je široko rasprostranjeno među biljkama. To uključuje amirine, i ursoličnu i oleansku kiselinu, koji su uobičajeni na voštanim prevlakama na listovima i kao zaštitni premaz na nekim plodovima, a prikazani su ispod. Ostali triterpeni uključuju limonine i kukurbitacine, za koje je utvrđeno da su moćni antagonisti steroidnih hormona insekata. Praktično svi biljni steroidi su hidroksilirani na C-3 i zapravo su steroli. U životinjskom carstvu, steroidi imaju veliku važnost kao hormoni, koenzimi i provitamini. Međutim, uloga fitosterola je manje shvaćena. Postoje dokazi da su neki od fitosterola efikasni protiv kardiovaskularnih bolesti.



Saponini su triterpenski glikozidi visoke molekularne težine, koji sadrže grupu šećera vezanu za sterol ili drugi triterpen. Široko su rasprostranjeni u biljnom carstvu. Saponini se sastoje od dva dijela: šećera i aglikona ili genina (triterpena). Obično imaju svojstva deterdženta, lako stvaraju pjenu u vodi, imaju gorak okus i toksični su za ribe. Mnoge biljke koje sadrže saponine su se kroz istoriju koristile kao sapuni.

To uključuje *Chlorogalum pomeridianum* (DC.) Kunth, *Quillaja saponaria* Molina, *Sapindus saponaria* L. i *S. mukorossi* Gaertn. Aglikoni mogu biti iz klase triterpena, steroida ili steroidnih alkaloida. Saponini mogu biti mono- ili polidezmodični, ovisno o broju vezanih dijelova šećera.

Biosintetski, saponini se sastoje od šest jedinica izoprena i također su izvedeni iz skvalena. Komercijalno važni preparati na bazi saponina uključuju korijen *Sarsaparilla* sp., sladić (*Glycyrrhiza* sp.), lišće bršljana (*Hedera* sp.), korijen jaglaca (*Primula* sp.), kao i ginseng (*Panax* sp.). Amonijum i kalcijumove soli glicirizinske kiseline nazivaju se glicirizini:



Glicirizin

Oni su 50 do 100 puta slađi od saharoze. Ovi aktivni sastojci u korijenu sladića (*Glycyrrhiza glabra* L.), posjeduju bakteriostatsko i antivirusno djelovanje. Prekomjerna upotreba može dovesti do prekomjernog lučenja natrijuma. Ginsenozidi su jedan od mnogih triterpenskih saponina iz ginsenga (*Panax ginseng* C.A.Mey.) za koje se vjeruje da su odgovorni za njegovo imunostimulativno i analgetsko djelovanje.

Najčešći tetraterpenoidi su karotenoidi, široko rasprostranjena grupa jedinjenja C_{40} . Dok strukture di- i triterpena mogu imati širok izbor fascinantnih struktura, karotenoidi su generalno izvedeni iz likopena. Ciklizacija na jednom kraju daje γ -karoten, a na oba kraja daje β -karoten (prikazano ispod). Ovaj pigment je prvi put izolovan 1831. Praktično je univerzalan u listovima viših biljaka.



104

POGLAVLJE 7

EKSTRAKCIJA I IDENTIFIKACIJA ANTIMIKROBNIH SPOJEVA IZ BILJAKA

Mirsada Salihović

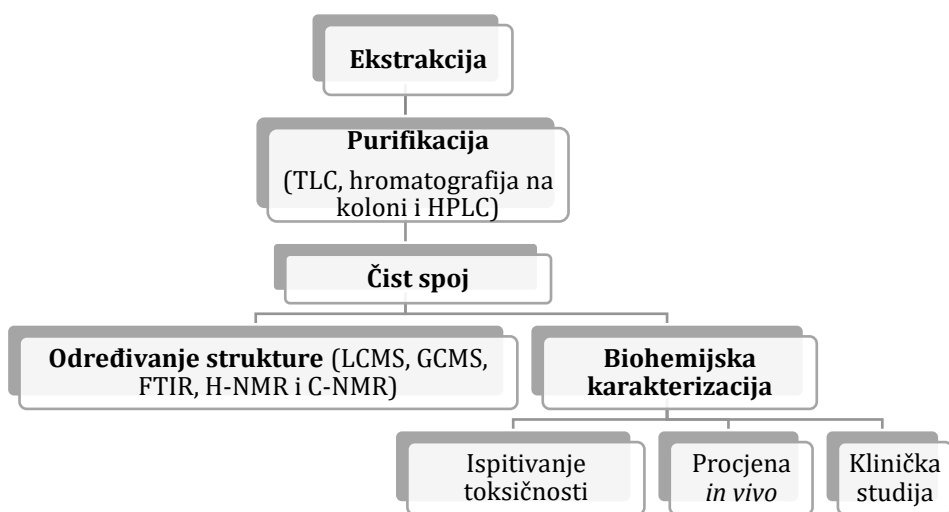


*Kada pokušamo izabrati nešto pojedinačno, shvatimo da je
povezano sa svim drugim u Univerzumu.*

John Muir

Prirodni proizvodi, kao što je biljni ekstrakt, bilo kao čisti spojevi ili kao standardizirani ekstrakti, pružaju neograničene mogućnosti za nova otkrića lijekova zbog neusporedive dostupnosti hemijske raznolikosti. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, više od 80% svjetske populacije, za svoje primarne zdravstvene potrebe, oslanja se na tradicionalnu medicinu. Biljke koje se koriste u tradicionalnoj medicini sadrže širok raspon supstanci koje se mogu koristiti za liječenje hroničnih, ali i zaraznih bolesti. Zbog razvoja štetnih efekata i otpornosti mikroba na hemijski sintetizirane lijekove, mnogi su se okrenuli etnofarmakologiji. Utvrđeno je da su veliki broj fitohemikalija iz biljaka sigurne i generalno efikasne alternative sa manje štetnih efekata. Zabilježeno je mnogo korisnih bioloških aktivnosti kao što su antikancerogena, antimikrobna, antioksidativna, antidijareična, analgetska i aktivnost zacjeljivanja rana.

Glavni koraci za korištenje biološki aktivnih spojeva iz biljnih resursa su ekstrakcija, farmakološki pregled, izolacija i karakterizacija bioaktivnog spoja, toksikološka i klinička procjena. Kratki sažetak općih pristupa u ekstrakciji, izolaciji i karakterizaciji bioaktivnih spojeva iz biljnih ekstrakata prikazan je na Slici 7.1.



Slika 7.1. Kratki sažetak općih pristupa u ekstrakciji, izolaciji i karakterizaciji bioaktivnih spojeva iz biljnih ekstrakata

Često rješenje biološkog problema u regulaciji rasta biljaka, u biohemiji međudjelovanja biljaka i životinja ili u razumijevanju porijekla fosilnih biljaka ovisi o identifikaciji niza složenih hemijskih struktura koje mogu biti dostupne za proučavanje samo u mikrogramskim količinama.

Svrha ovog poglavlja je dati prikaz dostupnih metoda za analizu biljnih supstanci. Za navedene metode ne tvrdi se ništa novo. Zaista, svrha je prikazati metode koje se najčešće koriste kako bi student ili istraživač mogao najbrže razviti vlastite tehnike za rješavanje vlastitih problema.

7.1. Metode ekstrakcije i izolacije

7.1.1. Biljni materijal

Biljke se mogu sušiti prije ekstrakcije. Kod sušenja je jako važno da se ta operacija provodi u kontroliranim uslovima kako bi se izbjeglo previše hemijskih promjena. Sušiti ga treba što je brže moguće, bez korištenja visokih temperatura, po mogućnosti na dobrom propuhu. Nakon što se temeljito osuše, biljke se mogu čuvati prije analize na duže vrijeme. Analize na flavonoide, alkaloidne, hinone i terpenoide uspješno su provedene na herbariziranom biljnom tkivu koji datira mnogo godina unazad.

S vremenom se mogu javiti kvantitativne promjene u sadržaju eteričnog ulja i u tkivu lista i ploda i tu mogućnost treba uzeti u obzir. Na primjer, dokazano je da se sadržaj miristicina u plodovima muškarnog oraščića, *Myristica fragrans* Houtt. sporo povećavao skladištenjem, dok se sadržaj hlapljivijeg β -pinena s vremenom smanjivao. S druge strane, flavonoidi i alkaloidi u herbarijskim uzorcima izvanredno su stabilni s vremenom. Primjer je uzorak lista *Strychnos nux-vomica* L. izvorno sakupljen 1675. godine, a 1982. godine sadržavao je 1-2% masenog alkaloida.

Oslobađanje biljnog tkiva od kontaminacije je jako važno u ovoj fazi. Neophodno je, također, koristiti biljke koje nisu oboljele, odnosno koje nisu zahvaćene virusnom, bakterijskom ili gljivičnom infekcijom. Ne samo da se u takvim biljkama mogu otkriti proizvodi mikrobne sinteze, već i infekcija može ozbiljno da promjeni metabolizam biljke i mogu se formirati neočekivani proizvodi. Dešava se da mješavine biljaka budu ponekad sakupljene greškom. Dvije slične vrste biljaka koje rastu jedna pored druge u prirodi mogu se pogrešno pretpostaviti kao iste, ili se biljka može sakupiti bez spoznaje da ima parazita (kao što je vilina kosa, *Cuscuta epithymum* L.) isprepletenog sa njim.

U fitohemijskoj analizi, botanički identitet proučavanih biljaka mora biti potvrđen od strane priznatih autoriteta. U prošlosti se dogodilo toliko pogrešaka u vezi s identitetom biljaka da je neophodno provjeriti autentičnost materijala svaki put kada se dokazuju nove supstance iz biljaka ili čak poznate supstance iz novih biljnih izvora. Identitet materijala trebao bi biti neupitan (npr. obična vrsta koju je u očekivanom staništu sakupio terenski botaničar) ili bi trebalo biti moguće da identitet utvrdi taksonomski stručnjak. Zbog ovih razloga, sada je uobičajena praksa u fitohemijskim istraživanjima pohranjivanje uzorka vaučera ispitivane biljke u priznati herbarij, tako da se u budućnosti može upućivati na proučavanu biljku ako to bude potrebno.

Aktivne supstance biljaka dijele se na:

a) *Primarne supstance*

Ovoj grupi biljnih sastojaka pripadaju supstance koje su biljci neophodne za rast i reprodukciju. Uglavnom su to šećeri i proteini. Šećeri nastaju procesima fotosinteze ili sudjeluju u izgradnji tkiva biljke. Na osnovu molekulske težine dijele se na monosaharide, oligosaharide i polisaharide.

Najznačajniji jednostavni šećeri su glukoza, fruktoza, manitol i sorbitol (šećerni alkoholi), ksilitol, inozitol, oligosaharidni šećeri u malim količinama (laktoza, saharoza i maltoza) te polisaharidi kao što su škrob, celuloza, pektini, biljne gume i sluzi.

b) Sekundarne supstance

To su supstance koje ne sudjeluju izravno u razvoju biljke, iako neki smatraju da su podjednako važne kao primarne supstance. Obično se nazivaju biološki aktivnim supstancama. U ovu grupu spojeva ubrajaju se lipidi (masti i ulja uključujući i eterična ulja), lipoidi (voskovi, fosfolipidi, steroidi, masni alkoholi, karotenoidi i vitamini topivi u mastima), glikozidi (saponini, kumarini, antrahinoni, hidrohinoni), gorke supstance (amara), ljute supstance (acria), trijesovine, alkaloidi, vitamini, itd.

7.1.2. Ekstrakti i njihova podjela

Ekstrakt se definira kao ekstrakt koji se dobiva postupkom ekstrakcije biljne ili životinjske droge. Ekstrakti se dijele u više grupa ovisno o zajedničkom selektivnom svojstvu.

I. Podjela ekstrakata prema konzistenciji

Prema konzistenciji ekstrakti se dijele u tri glavne grupe:

- a) tečni ekstrakti i tinkture,
- b) polučvrsti ekstrakti - meki ekstrakti i
- c) čvrsti ekstrakti- suhi ekstrakti.

Tečni ekstrakti su pri sobnoj temperaturi tečnosti i kod njih jedan dio mase ekstrakta odgovara jednom dijelu mase suhe biljne droge upotrijebljene za ekstrakciju. Tinkture su također tečni preparati koji se dobivaju ekstrakcijom osušenih biljnih droga pri čemu se kao ekstrakcijsko otapalo koristi alkohol. Meki ekstrakti su preparati koji imaju polučvrstu konzistenciju, a dobivaju se djelomičnim ili potpunim uparavanjem otapala koje se koristi pri ekstrakciji. Suhi ekstrakti su čvrsti preparati koji se dobivaju potpunim uparavanjem otapala.

II. Podjela ekstrakata prema tipu korištenog otapala

Prema tipu korištenog otapala ekstrakti se najčešće dijele na vodene ekstrakte, alkoholne ekstrakte kod kojih su kao ekstrakciona otapala

najčešće korišteni etanol i metanol te uljane ekstrakte kod kojih se kao otapalo najčešće koristi biljno ulje.

III. Podjela ekstrakata prema primjeni

Postoji podjela ekstrakata i prema primjeni. Ekstrakti koji se mogu koristiti odmah nakon pripreme su uglavnom razni infuzati, tinkture, glicerolni ekstrakti i uljni macerati koji predstavljaju konačni ljekoviti oblik (frakciju, izolat) biljke. Obzirom da ove pripreme u svom sastavu sadrže i otapalo, ono ne smije biti toksično pa se obično pripremaju korištenjem vode, etanola, glicerola te biljne i životinjske masnoće (lipida). Iz ekstrakata koji se smatraju međuproizvodom se daljnjom obradom dobivaju drugi tipovi ekstrakata, a najčešće suhi ekstrakti. Izbor otapala kod ovih ekstrakata nije ograničen jer se oni podvrgavaju daljnjoj obradi pa se mogu koristiti i toksičnija otapala koja su u malim količinama neškodljiva za ljude, a omogućuju bolji učinak ekstrakcije aktivnih supstanci.

Postoje i ekstrakti koji su pogodni za uzimanje odmah nakon pripreme i oni se uglavnom odmah oblikuju u određeni ljekoviti proizvod poput tablete i kapsule. Kod ovakvog tipa ekstrakata najzastupljeniji su suhi preparati, ali njihov prekomjerni unos u organizam može imati nepoželjan efekat na zdravlje ljudi pa se stoga obično odmah formuliraju u proizvode tačno određene i poznate mase.

7.1.3. Ekstrakcija

Ekstrakcija se definiše kao proces izdvajanja neke supstance iz čvrste ili tekuće faze korištenjem prikladnog otapala u kojem je ta supstanca topiva ili ima bolju topljivost od ostalih sastojaka smjese.

Prema agregatnom stanju faza razlikuju se dva tipa ekstrakcija: ekstrakcija čvrsto-tečna i ekstrakcija tečno-tečna.

Ekstrakcija čvrsto-tečna je difuzijski proces tokom kojeg jedna ili više komponenti, na osnovu razlike u topivosti, iz čvrstog materijala prelazi u otapalo. Proces se općenito sastoji od tri faze. U prvoj fazi dolazi do kontakta čvrstog materijala i otapala pri čemu otapalo prodire kroz pore čvrstog materijala. Zatim se u drugoj fazi topiva supstanca „lijepi“ na površinu čestica otapala (početak difundacije), dok u trećoj fazi topiva supstanca u potpunosti difundira u otapalo.

Kod tečno-tečne ekstrakcije postoje dvije tečne faze: otopina koja sadrži supstancu koja se želi izolirati i otapalo koje je također u tečnom stanju.

Kako bi došlo do ekstrakcije željene komponente jedna faza se mora raspršiti u drugoj pa se ovaj tip ekstrakcija najčešće primjenjuje kad je nemoguće koristiti postupak destilacije, npr. za azeotropne smjese ili kod termolabilnih sastojaka. Tačan način ekstrakcije, prirodno, ovisi o teksturi i sadržaju vode biljnog materijala koji se ekstrahira te o vrsti supstance koja se izolira. Općenito, poželjno je "ubiti" biljno tkivo, odnosno spriječiti enzimsku oksidaciju ili hidrolizu. To se može postići uranjanjem svježeg tkiva listova ili cvjetova, prikladno izrezanog, u vreli etanol. Alkohol, u svakom slučaju je dobro višenamjensko otapalo za preliminarnu ekstrakciju. Nakon toga, materijal se može macerirati u blenderu i filtrirati, ali je to zaista neophodno samo ako se pokušava iscrpna ekstrakcija.

Dakle ekstrakcija je ključni prvi korak u analizi ljekovitih biljaka jer je iz biljnog materijala potrebno izdvojiti željene hemijske komponente za daljnje odvajanje i karakterizaciju. Osnovna operacija uključuje korake, kao što su pretpranje, sušenje biljnog materijala ili sušenje smrzavanjem, mljevenje kako bi se dobio homogeni uzorak. Kako bi se osiguralo da se ne gube potencijalni aktivni sastojci, pri pripremi ekstrakta iz biljnih uzoraka, moraju se poduzeti odgovarajuće radnje. Tako npr. ako je biljka odabrana na osnovu tradicionalnih upotreba potrebno je pripremiti ekstrakt tačno onako kako je opisano od strane tradicionalnog iscjelitelja kako bi se što više oponašalo tradicionalni "biljni" lijek. Odabir sistema otapala uveliko ovisi o specifičnoj prirodi bioaktivnog spoja koji se ciljano želi izolirati. Dostupni su različiti sistemi otapala za ekstrakciju bioaktivnog spoja iz prirodnih proizvoda. Otapala koja se obično koriste za ekstrakciju hemijskih sastojaka biljaka su: petrolej eter < ugljik tetrahlorid < benzen < dihlormetan < hloroform < eter < etil acetat < *n*-butanol < aceton < etanol < metanol < voda (navedena od slabog do jakog polariteta).

Ekstrakcija hidrofilnih spojeva koristi polarna otapala kao što su metanol, etanol ili etil-acetat.

Za ekstrakciju više lipofilnih spojeva koristi se dihlormetan ili smjesa dihlormetana/metanola u omjeru 1:1. U nekim se slučajevima ekstrakcija s heksanom koristi za uklanjanje hlorofila.

Kod ekstrakcije otapalom najvažnije je odabrati prikladno otapalo za učinkovito ekstrahiranje ciljnih biljnih materijala. Tokom ekstrakcije otapalo prvo mora difundirati u staničnu membranu, u sljedećem koraku mora otopiti topive supstance.

Kao posljedica toga, nastaje razlika intracelularne i ekstracelularne koncentracije željene supstance, te difunduje u ekstracelularni prostor zajedno sa otapalom. Kako ciljani spojevi mogu biti nepolarni do polarni i termički labilni, potrebno je razmotriti prikladnost metoda ekstrakcije. Različite metode, kao što su ultrazvučna ekstrakcija, zagrijavanje pod refluksom, ekstrakcija *Soxhlet*-om i druge, obično se koriste za ekstrakciju biljnih uzoraka. Osim toga, biljni ekstrakti se također pripremaju maceracijom ili perkolacijom svježih zelenih dijelova biljaka ili sušenog biljnog materijala u prahu u vodi i/ili sistemima organskih otapala. Metode ekstrakcije otapalom mogu se klasificirati kao hladna ekstrakcija i vruća ekstrakcija. Kratak pregled eksperimentalnih uslova za različite metode ekstrakcije prikazan je u Tabeli 7.1.

Tabela 7.1 Kratak pregled eksperimentalnih uslova za različite metode ekstrakcije biljnog materijala

	<i>Soxhlet</i> ekstrakcija	Ultrazvučna ekstrakcija	Maceracija
Uobičajena otapala koja se koriste	Metanol, etanol, ili mješavina alkohol i voda	Metanol, etanol, ili mješavina alkohol i voda	Metanol, etanol, ili mješavina alkohol i voda
Temperatura (°C)	Ovisno o korištenom otapalu	Može se zagrijavati	Sobna temperatura
Potrebno vrijeme	3-18h	30 min-1h	3-4 dana
Volumen otapala (ml)	150-200	50-100	Ovisno o veličini uzorka

Ostale moderne tehnike ekstrakcije su mikro-ekstrakcija u čvrstoj fazi, ekstrakcija superkritičnim fluidom, tečna ekstrakcija pod pritiskom, ekstrakcija uz pomoć mikrovalne pećnice, ekstrakcija u čvrstoj fazi i tehnike posredovane surfaktantima, koje poseduju određene prednosti.

To su smanjenje potrošnje organskih otapala i degradacije uzorka, eliminacija dodatnih koraka čišćenja uzorka i koncentracije prije hromatografske analize, poboljšanje efikasnosti ekstrakcije, selektivnosti i kinetike ekstrakcije. Lakoća automatizacije ovih tehnika također pogoduje njihovoj upotrebi za ekstrakciju biljnih materijala. Dobiveni ekstrakti se bistro filtriranjem kroz filter papir na vodenoj pumpi i zatim se koncentriraju u vakuumu. To se sada obično provodi u rotacijskom isparivaču, koji će koncentrirati otopine do malih volumena. Treba naglasiti da kod izolacije komponenti topljivih u vodi iz biljnog tkiva, lipide treba ukloniti u ranoj fazi, prije koncentriranja, ponovnim pranjem ekstrakta petrolejem. Koncentrirane ekstrakte treba čuvati u frižideru i dodati malo toluena kako bi se spriječio razvoj gljivica

7.1.3.1. Soxhlet metoda

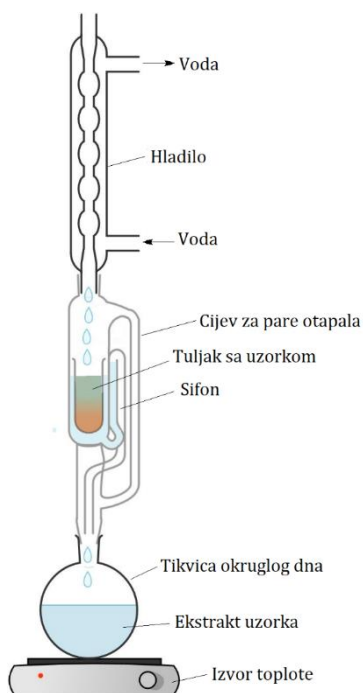
Metoda je dobila ime po Franzu von Soxhletu, njemačkom hemičaru koji ju je opisao 1879. godine. Više od jednog vijeka ova metoda je bila standardna metoda za ekstrakciju masti iz različitih uzoraka. Osim prednosti kao što su jednostavnost metode i jednostavnost aparature te mogućnost korištenja male količine uzorka, metoda ima i brojne nedostatke. Najvažniji nedostaci su: dugo vrijeme ekstrakcije, velike količine otapala, temperatura ključanja otapala može uticati na analit. Međutim ova tehnika ekstrakcije zahtijeva manju količinu otapala u odnosu na maceraciju, ali koristi otapala visoke čistoće što povećava troškove procesa. Ograničenje tehnike leži u samoj prirodi uzorka koji bi u idealnom slučaju trebao biti suh i fino usitnjen. Ekološka neprihvatljivost procesa se očituje u izloženosti opasnim i zapaljivim organskim otapalima koji mogu ispariti u okolinu tokom ekstrakcije, što nije slučaj kod naprednih tehnika poput ekstrakcije superkritičnim fluidima.

- *Postupak konvencionalne Soxhlet ekstrakcije*

Uzorak se pripremi tako što se prethodno usitnjena droga stavi u tuljak (porozni umetak). Soxhlet aparat (Slika 7.2) se sastoji od tikvice okruglog dna u kojoj je smješteno otapalo, a princip ekstrakcije se temelji na tome da zagrijavanjem otapala nastaju njegove pare, koje dalje prolaze kroz bočne cijevi na aparatu, te u kontaktu sa hladilom kondenziraju. Na taj način se formiraju kapljice otapala koje počinju padati na tuljak napunjen biljnim materijalom pri čemu se vrši ekstrakcija.

Kako ekstrakcija napreduje aparat se puni ekstraktom do trenutka kad se dostigne najviša tačka i tada ekstrakt prelije vrh bočne cjevčice tzv. sifona i vraća se u tikvicu okruglog dna. Ova operacija se ponavlja sve dok se ekstrakcija ne završi. Tako da se pri ponavljanju otapalo, ponovo zbog zagrijavanja prelazi u paru, kondenzira na dijelu sa hladilom i pada na biljni materijal pri čemu se provodi kontinuirana ekstrakcija.

Konvencionalna *Soxhlet* ekstrakcija ima neke određene prednosti. Na primjer, uzorak se više puta dovodi u kontakt sa svježim otapalom, što olakšava pomicanje ravnoteže prijenosa. Zatim, sistem ostaje na relativno visokoj temperaturi usljed uticaja toplote primjenjene na destilacioni balon koji u izvjesnoj mjeri dopriveda do šupljine za ekstrakciju. Pored toga, nakon ispiranja nije potrebna filtracija, a prinos ekstrakta se može povećati izvođenjem ponovljenih ekstrakcija. Soxhlet ekstrakcija je vrlo jednostavna metoda koja zahtjeva malo obuke, može izvući više mase uzorka od većine najnovijih metoda (ekstrakcija uz pomoć mikrovalne pećnice, ekstrakcija superkritičnim fluidom, itd.).



Slika 7.2. Konvencionalna *Soxhlet* ekstrakcija

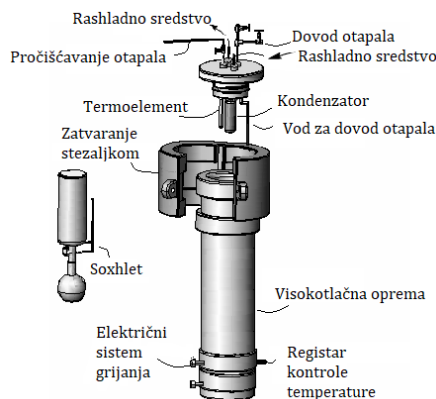
Najozbiljniji nedostaci *Soxhlet* ekstrakcije u usporedbi s drugim tehnikama za dobijanje ekstrakta iz čvrstih uzoraka su: dugo vrijeme koje je potrebno za ekstrakciju i velika količina otpadnog ekstrakta. Taj otpadni ekstrakt je skup za zbrinjavanje, a pri tom i izvor dodatnih ekoloških problema. Uzorci se obično ekstrahiraju na tački ključanja otapala tokom dužeg vremena, što može rezultirati toplinskom razgradnjom termolabilnih ciljanih vrsta. Također, konvencionalni *Soxhlet* uređaj ne osigurava miješanje, što bi pomoglo da se proces ubrza. Osim toga, velike količine otapala koje se koriste moraju se koncentrirati nakon ekstrakcije.

Konvencionalna *Soxhlet* ekstrakcija, sa svojim prednostima i nedostacima, korištena je kao polazna tačka za razvoj niza modificiranih metoda. Većina modifikacija urađenih u poslednjih nekoliko decenija imala je cilj da se Soxhlet približi novijim tehnikama za pripremu ekstrakta iz čvrstih uzoraka. Na primjer skraćivanjem vremena ispiranja uz upotrebu pomoćnih oblika energije i automatizacijom sklopa za ekstrakciju.

Danas su poznate *Soxhlet* ekstrakcija pri povišenom pritisku, automatizirana *Soxhlet* ekstrakcija, *Soxhlet* ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, *Soxhlet* ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima.

- *Soxhlet* ekstrakcija pod visokim pritiskom

Soxhlet ekstrakcija pod visokim pritiskom se postiže postavljanjem ekstraktora u cilindrični autoklav od nehrđajućeg čelika ili upotrebom komercijalnih ili laboratorijski proizvedenih superkritičnih fluid-*Soxhlet* ekstraktora (Slika 7.3).



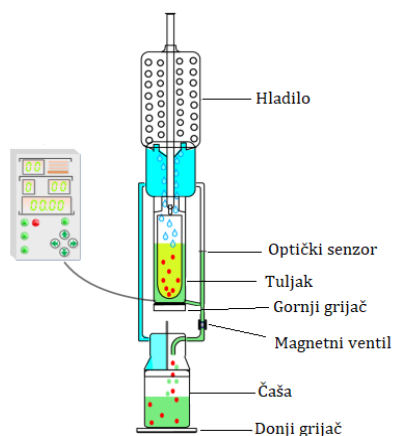
Slika 7.3 *Soxhlet* ekstraktor pod visokim pritiskom

Specifičnost *Soxhlet* ekstrakcije pod visokim pritiskom je u tome što ekstrakti ne prelaze natkritične uslove. Na primjer otapala sa niskim tačkama ključanja ili plinovi pod normalnim pritiskom i temperaturom, ali u tečnom stanju pod visokim pritiskom. Razvoj *Soxhlet* ekstrakcije pod visokim pritiskom trebao bi skratiti potrebno vrijeme i smanjiti potrošnju otapala.

Soxhlet ekstrakcija pod visokim pritiskom korištena je za izolaciju organohlorinih pesticida i polihloriranih bifenila prije određivanja u certificiranim uzorcima krumpira, mrkve, maslinovog ulja i liofiliziranog ribljeg tkiva. U ovoj primjeni, CO₂ je korišten kao medij za ekstrakciju. Postavka za ekstrakciju uronjena je u termostatisiranu kupelj sa sistemom za pumpanje vode za hlađenje (0 °C) kako bi se ekstrakt kondenzirao. Ustanovljeno je da je tečni CO₂ pogodno otapalo za ugljikovodike najniže molekularne mase. Međutim, CO₂ kao otapalo ne otapa ugljikovodike s molekularnom masom većom C-40–C-50. Taj problem je riješen upotrebom tečnog pentana kao pogodnog otapala, jer on otapa ugljikovodike netopive u tečnom CO₂. Glavni nedostatak koji prati ove sisteme ekstrakcije povezan je sa njihovim principima rada. Na *Soxhlet* princip ne bi trebalo da utiču njegove performanse pod visokim pritiskom, što dodaje dodatni nivo složenosti i smanjuje robusnost ekstraktora.

- *Automatizirana Soxhlet ekstrakcija*

Na Slici 7.4 prikazana je shema automatizirane *Soxhlet* ekstrakcije.



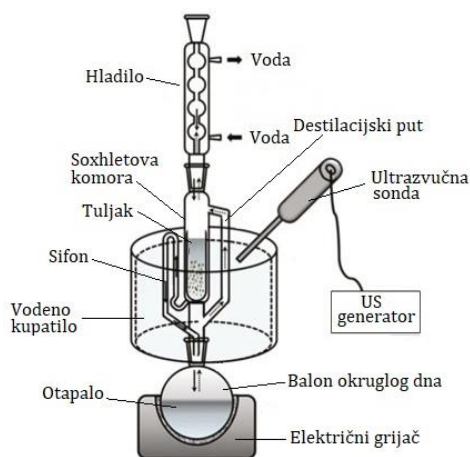
Slika 7.4. Automatizirana *Soxhlet* ekstrakcija

Moderni *Soxhlet* ekstraktori su ubrzali proces ekstrakcije i smanjili količinu potrebnog otapala, ali su zadržali princip *Soxhlet* ekstrakcije. Kod ovih ekstraktora uzorak se uranja u vrelo otapalo, a nakon toga se uzorak vadi iz otapala i smješta iznad otapala. Zatim se skuplja destilat koji sadrži ekstrahirani materijal. Kod ove ekstrakcije može se istovremeno pripremiti četiri do šest uzoraka. Zbog boljeg kontakta između otapala i uzorka, ekstrakcija automatiziranim *Soxhlet*-om puno je brža jer je i prenos mase mnogo bolji. Automatizirana *Soxhlet* ekstrakcija troši manje otapala, ali je taj volumen i dalje velik (50–100 ml), a trajanje ekstrakcije dugo (2-3h).

Automatizirana *Soxhlet* ekstrakcija se koristi za ekstrakciju ukupnih masti u mesu, pesticida, polihloriranih bifenila i policikličkih aromatskih ugljikovodika u zemljištu i biljkama, ulja i masnoća u zemljištu, mulju i vodi, aditiva u plastici i gumi, pesticida u zobenoj kaši i masti u čipsu.

- *Ultrazvučna Soxhlet ekstrakcija*

Mnogo je pažnje posvećeno primjeni ultrazvuka u ekstrakciji prirodnih supstanci za koju su uobičajeno konvencionalnim metodama potrebni sati ili dani. Dizajniran je ekstraktor koji se temelji na fizičko-hemijskim principima *Soxhlet*-a korištenjem prednosti ultrazvučnih efekata (Slika 7.5).



Slika 7.5. *Soxhlet* ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka

Pri radu se koristi konvencionalno stakleno posuđe *Soxhlet*-a, ali je *Soxhlet*-ov ekstraktor smješten u termostatskoj kupelji kroz koju se ultrazvuk primjenjuje pomoću ultrazvučne sonde.

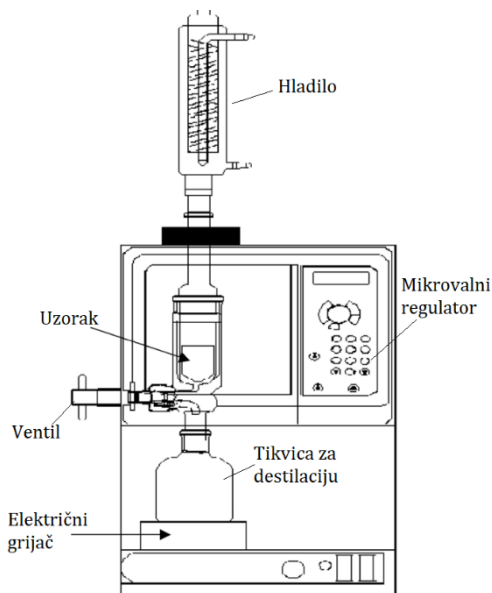
Primjena ultrazvuka na tuljak za uzorke daje rezultate slične, ili čak bolje od onih dobivenih konvencionalnom *Soxhlet* ekstrakcijom. Međutim, to enormno smanjuje broj *Soxhlet*-ovih ciklusa potrebnih u konvencionalnim postupcima. Iako je dokazan oksidativni efekt ultrazvuka u drastičnim uslovima, blagi uslovi korišteni u ovom ekstraktoru ne razgrađuju ekstrahirano ulje.

- *Soxhlet ekstrakcija uz pomoć mikrovalne pećnice*

Najuspješnije poboljšanje performansi *Soxhlet* ekstrakcije je upotreba mikrovalnih pećnica, koje omogućavaju širi raspon pristupa. Zapravo, *Soxhlet* ekstrakcija uz pomoć mikrovalne pećnice (Slika 7.6) ostaje najzanimljivije poboljšanje konvencionalne *Soxhlet* ekstrakcije.

Soxhlet-ova ekstrakcija uz pomoć mikrovalne pećnice razlikuje se od ostalih tehnika ekstrakcije uz pomoć mikrovalne pećnice u sljedećem:

- posuda za ekstrakciju je otvorena, tako da uvijek radi pod normalnim pritiskom,
- mikrovalno zračenje je usmjereno na odjeljak za uzorke,
- koraci ekstrakcije se u potpunosti ili djelomično izvode kao u konvencionalnoj *Soxhlet* tehnici,
- nije potrebna naknadna filtracija.



Slika 7.6. *Soxhlet* ekstrakcija uz pomoć mikrovalne pećnice

7.1.3.2. Ultrazvučna ekstrakcija

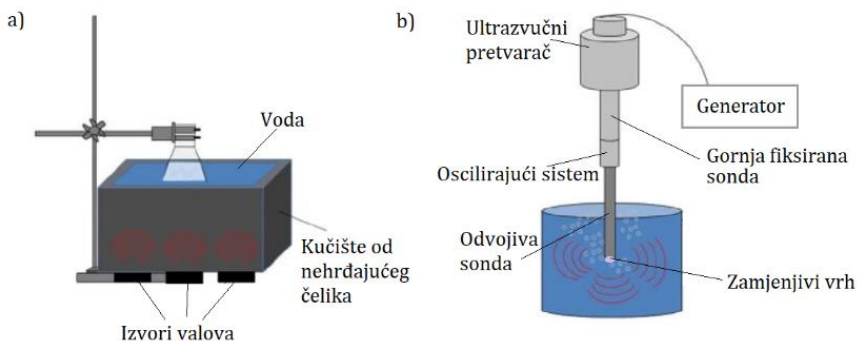
Ultrazvučna ekstrakcija koristi ultrazvuk s frekvencijama u rasponu od 20 do 2000 kHz. Riječ je o jednoj od novijih tehnika koja omogućuje visoku ponovljivost u kraćem vremenu, lakše rukovanje, niže temperature i korištenje manjih količina otapala. Kada se tretira ultrazvukom, kavitacija uzrokuje bubrenje stanica i prodiranje otapala kroz stanične zidove, što omogućuje visoke stope difuzije kroz stanični zid, a time i lakše ispiranje sastojaka. Osim otapala, temperature i pritiska, radi optimizacije procesa potrebno je prilagoditi faktore ultrazvučnog tretmana kao što su frekvencija, vrijeme tretmana, ultrazvučna snaga, a time i raspodjela ultrazvučnih valova. Za postizanje maksimalnog prinosa potrebni su optimalni temperaturni uslovi, ultrazvučna snaga i odabir otapala.

Klasične tehnike za ekstrakciju otapalom bioaktivnih spojeva zasnivaju se na pravilnom odabiru otapala u kombinaciji s korištenjem topline i/ili miješanja. Ekstrakcija otapalom organskih spojeva iz biljaka i sjemenki znatno je poboljšana primjenom snage ultrazvuka.

Tehnologijom ultrazvučne ekstrakcije može se potencijalno povećati ekstrakcija određenih komponenti, kao što su polifenoli, antocijani, aromatske supstance, polisaharidi, ulja i funkcionalni spojevi kada se ultrazvuk koristi kao predtretman obrade biljnog materijala. Sa industrijskog gledišta, glavni interes jeste što veći prinos takvih komponenti. Tehnologija ultrazvučne ekstrakcije može se jednostavno povezati sa postojećim procesima minimalnog procesiranja ekstrakcije u vodenoj sredini gdje se organska otapala mogu zamijeniti sa otapalima koja su generalno priznata kao sigurna, sa smanjenjem količine otapala i skraćanjem ekstrakcijskog vremena. Upotreba ultrazvuka u svrhu ekstrakcije kod sirovina visoke cijene jest ekonomična alternativa za tradicionalne procese ekstrakcije što je zahtjev industrije za njen održivi razvoj. Novi postupci ultrazvučne ekstrakcije nude potencijal za modifikaciju biljnog materijala čime se omogućava poboljšana bioraspoloživost mikronutrijenata zadržavajući njihovu prirodnu kvalitetu, istovremena ekstrakcija i enkapsulacija mikronutrijenata te izbjegavanje nastajanja hidroksilnih i vodikovih radikala.

- *Komercijalni uređaji ultrazvuka*

U hemiji ultrazvuk se može primjeniti na dva načina: izravno na uzorku ili neizravno preko zida posude uzorka pomoću vodene kupelji, što je najviše dostupan i najjeftiniji izvor ultrazvučnog zračenja. Međutim, postoje i mnoga druga učinkovita rješenja, na primjer ultrazvučne sonde (izravno na uzorku) koje omogućuju oslobađanje veće snage ultrazvuka. Ultrazvučna kupelj (Slika 7.7a) koja se obično nalazi u hemijskim laboratorijima, a koja emitira zvučne valove visoke energije i frekvencije u posudi ispunjenoj fluidom (najčešće vodom), nije moćan alat. Snaga zračenja je $1-5 \text{ W/cm}^2$. Klasična kupelj radi sa samo jednom frekvencijom, uglavnom 40 kHz i može imati temperaturni regulator. Postoje i kupelji opremljene s jedinicama različitih frekvencija koje rade istovremeno. Ultrazvučna sonda (Slika 7.7.b) je uronjena izravno u otopinu i daje snagu ultrazvuka barem do 100 puta veću od one koju bi dobili u kupelji pri trajanju od 5 minuta ili manje.



Slika 7.7. Shematski prikaz uređaja za ultrazvučnu ekstrakciju.

a) Ultrazvučna kupelj; b) Ultrazvučna sonda

Sonda je moćan alat za ekstrakciju analita iz čvrstih uzoraka otapalom, ali može pokazati i suprotno svojstvo. Treba naglasiti da kontrola amplitude zračenja sonde omogućuje ultrazvučne vibracije na vrhu sonde i može se postaviti na bilo koji željeni nivo. Izbor pristupa ovisi o zahtjevima pojedine analize. Ako je cilj ukupna ekstrakcija čvrsto-tečna, bolji izbor je primjena snažne sonde jer zahtijeva manje vremena za ekstrakciju. Međutim, kada se treba analizirati velik broj uzoraka, ultrazvučna kupelj je bolji izbor jer omogućuje istovremenu ekstrakciju niza uzoraka, dok drugi uređaji u isto vrijeme mogu obraditi samo jedan uzorak.

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom smatra se dobrim izborom za ekstrakciju organskih spojeva iz različitih matica jer pruža efikasniji kontakt između čvrstog uzorka i otapala zbog povećanog pritiska i temperature. Povećanjem pritiska potiče penetraciju otapala i transport, a temperatura poboljšava topivost i difuziju. Nekoliko se ekstrakcija može izvoditi istovremeno i nije potrebna specijalizirana laboratorijska oprema, a tehnika je relativno jeftina u odnosu na većinu modernih metoda ekstrakcije. Ultrazvučna ekstrakcija je još uvijek dugotrajna i potrebna je velika količina organskog otapala. Zbog toga je ona dobra za predobradu uzoraka za mnogo sofisticiranije ekstrakcijske metode.

7.1.3.3. Maceracija

Maceracija je postupak namakanja biljnog materijala (usitnjenog ili samljevenog) u zatvorenoj posudi s otapalom, pri sobnoj temperaturi uz miješanje. Nakon izvršene ekstrakcije, smjesa ide na prešanje ili filtraciju kako bi se odvojio ekstrakt od netopivog biljnog materijala. Obzirom na statičnost sistema, izuzevši povremeno miješanje, maceracija se zasniva na principima molekularne difuzije te je stoga spora.

Miješanjem se postiže cirkulacija zasićenog i svježeg otapala koja pogoduje difuziji. Zatvorena posuda sprječava isparavanje otapala tokom procesa i time sprječava varijacije rezultata ponavljanjem postupka. Proces ove ekstrakcije je pod utjecajem različitih faktora, a najbitniji su:

- brzina difuzije otapala kroz stanični zid,
- brzina otapanja topivih spojeva u otapalu i
- brzina difuzije otopine ili ekstrakta na površini staničnog zida.

Ekstrakcija iz čvrstog materijala se najčešće može ubrzati povećanjem dodirne površine materijala i otapala te smanjenjem radijalne udaljenosti između čestica materijala (miješanjem i mljevenjem).

Usitnjavanjem biljnog materijala prije ekstrakcije se povećava dodirna površina, a samim time i učinkovitost ekstrakcije. Kako bi se osigurala bolja kvaliteta ekstrakta, u obzir treba uzeti sljedeće:

- iscrpnija ekstrakcija daje bolji prinos ekstrakta,
- usitnjavanje materijala i miješanje može pogodovati ekstrakciji,
- vrijeme ekstrakcije, temperatura i volumen otapala određuju kvalitetu ekstrakta,

- ekstrakcija nekih ljekovitih biljaka je vrlo spora tako da se iscrpna ekstrakcija može postići samo cijedenjem ili višestepenom ekstrakcijom. U mnogim slučajevima ekstrakciji pogoduje i povišena temperatura uz duže vrijeme ekstrakcije (ukoliko željeni spojevi nisu termolabilni),
- kvaliteta ekstrakta i spektar dobivenih sastojaka također je uvjetovan omjerom biljnog materijala i otapala. Količina ekstrahiranog materijala se proporcionalno povećava sa povećanjem volumena otapala,
- sastav biljnog ekstrakta ovisi o vrsti, koncentraciji i snazi otapanja u pogodnom otapalu. Spektar spojeva u ekstraktu može varirati ovisno o hidrofilnoj ili lipofilnoj prirodi otapala.

Osim opisanog generalnog postupka maceracije, moguće je ponoviti ekstrakciju netopivog biljnog materijala nekoliko puta ukoliko su biološki aktivne supstance izrazito vrijedne ili se netopivi biljni materijal ne može prešati.

Maceracija velikih količina biljnog materijala se, zbog veće efikasnosti, u industriji provodi kontinuiranom cirkulacijom otapala u ekstraktoru uz pomoć pumpe ili višestepenom ekstrakcijom.

Maceracija je najlakša i najjednostavnija tehnika ekstrakcije. Nedostatak metode je u dugom vremenu trajanja procesa i nastanku velike količine organskog otpada kojeg je potrebno adekvatno zbrinuti.

Digestija je oblik maceracije pri kome se koristi toplota tokom ekstrakcije. To je jednokratna ekstrakcija usitnjene droge propisanim otapalom na temperaturi od 50 °C.

7.2. Metode razdvajanja

Odvajanje i pročišćavanje biljnih sastojaka uglavnom se provodi korištenjem jedne ili druge ili kombinacijom, četiri hromatografske tehnike:

- 1) papirna hromatografija (engl. *Paper Chromatography*, PC),
- 2) tankoslojna hromatografija (engl. *Thin layer chromatography*, TLC),
- 3) gasno-tečna hromatografija (engl. *Gas Liquid Chromatography*, GLC) i
- 4) tečna hromatografija pod visokim pritiskom (engl. *High Pressure Liquid Chromatography*, HPLC).

Izbor tehnike ovisi o svojstvima topljivosti i hlapljivosti spojeva koji se odvajaju.

PC je posebno primjenjiva na biljne sastojke topive u vodi, odnosno na ugljikohidrate, aminokiseline, baze nukleinskih kiselina, organske kiseline i fenolne spojeve.

TLC je metoda izbora za odvajanje svih komponenti topivih u lipidima, tj. lipida, steroida, karotenoida, jednostavnih hinona i hlorofila.

GLC tehnika svoju glavnu primjenu nalazi kod hlapljivih spojeva, masnih kiselina, mono- i seskviterpena, ugljikovodika i spojeva sumpora. Međutim, hlapljivost biljnih sastojaka sa većim tačkama ključanja može se poboljšati pretvaranjem u estere i/ili trimetilsilil etere tako da postoji nekoliko klasa koje su potpuno neprikladne za GLC odvajanje.

Alternativno, manje hlapljivi sastojci mogu se odvojiti HPLC, metodom koja kombinira efikasnost kolone sa brzinom analize.

Često se koristi kombinacija tehnika: PC i TLC, TLC i HPLC ili TLC i GLC, a mogu biti najbolji pristup za odvajanje određene klase biljnih spojeva. Sve gore navedene tehnike mogu se koristiti i na mikro i na makro skali.

7.2.1. Papirna hromatografija (PC)

Papirna hromatografija (engl. *Paper Chromatography*, PC) se temelji na činjenici da se otopljene supstance nanese u vrlo malim količinama na filter papir, zatim se razdjeljuju između otapala kojim je impregniran filter papir (stacionarne faze) i otapala koje putuje po papiru (mobilne faze). Stacionarne faze mogu biti vodeni, hidrofilni ili hidrofobni sistemi (hromatografija normalnih ili obrnutih faza). Postoji niz kombinacija otapala koji čine mobilnu fazu. To određuje da li je moguće odjeljivanje hidrofilnih ili hidrofobnih vrsta supstanci.

Stacionarna faza je kod papirne hromatografije konvencionalno voda kojom je impregniran filter papir, a mobilna faza neko organsko otapalo ili smjesa otapala zasićeno s vodom koja se kreće u kapilare filter papira.

Danas je komercijalno dostupan značajan raspon "modificiranih" filter papira za postizanje određenih hromatografskih odvajanja.

Na primjer, polarna svojstva celuloze mogu se smanjiti ugradnjom silicijeve kiseline ili glinice u papire, što ih čini prikladnijima za odvajanje lipida. Papiri se također mogu modificirati u laboratoriju, na primjer, natapanjem u parafin ili silikonsko ulje kako bi se provela hromatografija “*obrnute faze*”, također za lipide. Za odvajanje velikih razmjera, dostupni su debeli listovi hromatografskog filter papira (Whatman 3) koji podnosi nekoliko miligrama materijala po listu.

Na pokretljivost supstanci utiču kvaliteta i poroznost filter papira i sadržaj vode u papiru, te karakteristike supstanci koje se razdjeljuju. Ovi parametri određuju brzinu putovanja otapala i supstanci i veličinu razdjeljenja.

U zatvorenom sistemu brzo se uspostavlja ravnoteža između otapala imobiliziranog na papiru i para otapala mobilne faze pa su vrijednosti zadržavanja vrlo reproducibilne. Zaustavljanje sastojaka uzorka definirano je faktorom zaostajanja tj. retencionim faktorom, R_F .

$$R_F = \frac{1}{\left(\frac{1+K}{\beta}\right)} = \frac{1}{(1+KP)} \quad (7.1)$$

gdje je P poroznost filter papira (omjer volumena stacionarne i mobilne faze, $P = V_S/V_M = 1/\beta$). On je konstantan a ovisan je o svojstvima upotrebljenog filter papira.

Velika prednost primjene PC je jednostavno izvođenje odvajanja na listovima filter papira, koji služe i kao medij za odvajanje.

Još jedna prednost je značajna ponovljivost R_F vrijednosti koje su određene na papiru, tako da su takva mjerenja vrijedni parametri za korištenje u opisivanju novih biljnih spojeva. Doista, za supstance kao što su antocijanini, koje nemaju druga jasno definirana fizička svojstva, R_F je najvažnije sredstvo za opisivanje i razlikovanje različitih pigmenata. R_F je vrijednost koja je karakteristična za neku supstancu ali samo kada se hromatografija izvodi pod istim uslovima (ista mobilna faza iste čistoće, ista vrsta filter papira, ista temperatura i isti smjer hromatografiranja).

PC obično uključuje ili particijsku ili adsorpcijsku hromatografiju. Prilikom raspodjele, spojevi su podijeljeni između alkoholnog otapala koje se uglavnom ne miješa s vodom (npr. *n*-butanol) i vode.

Mobilna faza *n*-butanol-sirćetna kiselina-voda se još uvijek često koristi kao opće otapalo za mnoge klase biljnih sastojaka. Nasuprot tome, adsorpcijske sile su jedna od glavnih karakteristika PC u vodenom otapalu. Čista voda je izuzetno svestrano hromatografsko otapalo i može se koristiti za odvajanje uobičajenih purina i pirimidina, a također je primjenjiva na fenolne spojeve i biljne glikozide općenito.

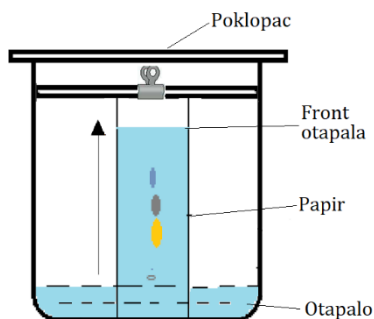
Kod PC, spojevi se obično detektiraju kao obojene ili UV-fluorescentne mrlje, nakon reakcije s hromogenim reagensom, koji se koristi kao sprej. Za velike listove, prskanje je obično lakše, ali sadržaj otapala u spreju treba smanjiti kako bi sušenje bilo brže. Papir se zatim može zagrijati kako bi se razvile boje.

PC se najčešće upotrebljava za odjeljivanje hormona, lipida, šećera, aminokiselina, vitamina i enzima. Glavna ograničenja PC u odnosu na TLC koja se danas preferira su dužina vremena razvijanja, zone koje nisu jasno definirane, skromna ispravnost kvantitativne analize i ponekad teška reprodukcija uslova razvijanja hromatograma.

PC može se klasificirati ovisno o smjeru putovanja mobilne faze na uzlaznu, silaznu i horizontalnu.

- *Uzlazna PC*

Mjesto gdje se nanosi ispitivana supstanca označava se kao start a najdalja tačka do koje je došlo otapalo je front. Kod uzlazne hromatografije se traka filter papira ili veći komad savijen u obliku valjka nakon nanošenja probe na start uroni u sloj otapala u komori za hromatografiranje koja je prethodno zasićena vodenom parom i komora zatvori (Slika 7.8.).

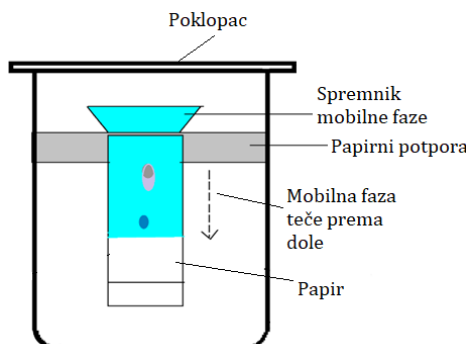


Slika 7.8. Komora za uzlaznu PC

Mobilna faza uslijed kapilariteta ulazi u papir i podigne se do visine fronta tj. do linije nešto ispod ruba filter papira u tom momentu se hromatografiranje prekine. Otopalo za sobom povlači komponente smjese koje se zaustavljaju na različitim ali kod određenih uslova reproducibilnim udaljenostima.

- *Silazna PC*

Kod PC se češće koristi silazna hromatografija, jer zbog djelovanja sile teže otopalo brže putuje prema dole pa ona kraće traje (Slika 7.9.).



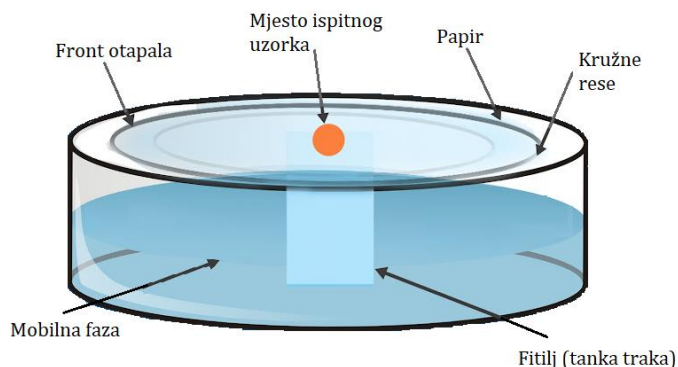
Slika 7.9. Komora za silaznu PC

Kod silazne PC startna linija se nalazi na gornjem dijelu filter papira, koji se gornjim krajem pomoću staklene ploče uroni u posudu s otopalom tj. mobilnom fazom smještenu na gornjem dijelu komore.

Kako mobilna faza putuje prema dole ona povlači za sobom pojedine komponente iz otopine uzorka koje putuju različitim brzinama tj. zaustavljaju se na različitim mjestima i daju mrlje na papiru. U ovoj tehnici, komponente sa nižom R_F -vrijednošću se razdvajaju bolje od uzlazne PC.

- *Horizontalna PC*

Kod horizontalne (radijalne, kružne) PC (Slika 7.10) uzorak se nanosi na sredinu papira i razvija pomoću fitilja tj. tanke trake koja je (pod uglom od 90°) umočena u mobilnu fazu. Mobilna faza se po tankoj traci uspinje na sredinu papira na kojoj se nalazi mrlja uzorka, a zatim se u horizontalnom smjeru radijalno širi. Budući da se elucija odvija radijalno stoga se ova PC naziva i radijalna. Ovo je rijetko korištena PC.



Slika 7.10 Komora za horizontalnu PC

7.2.2. Tankoslojna hromatografija (TLC)

Tankoslojna hromatografija (engl. *Thin Layer Chromatography*, TLC), također poznata kao planarna hromatografija, neprocjenjiva je metoda koja se koristi u hemiji i biohemiji, komplementarna je HPLC-u, a ima vlastitu specifičnost. Iako se ove dvije metode primjenjuju različito, princip razdvajanja i priroda faza ostaju isti. TLC je jeftina i osjetljiva tehnika koja je jednostavna za korištenje, a može se automatizirati. To je postalo bitno jer je moguće paralelno poduzeti nekoliko odvajanja. Razvoj automatskih aplikatora i denzitometara doveo je do nano-TLC-a, također nazvan tankoslojna hromatografija visokih performansi (engl. *High Performance Thin Layer Chromatography*, HPTLC), vrlo osjetljive tehnike koja se može spojiti pomoću masene spektrometrije.

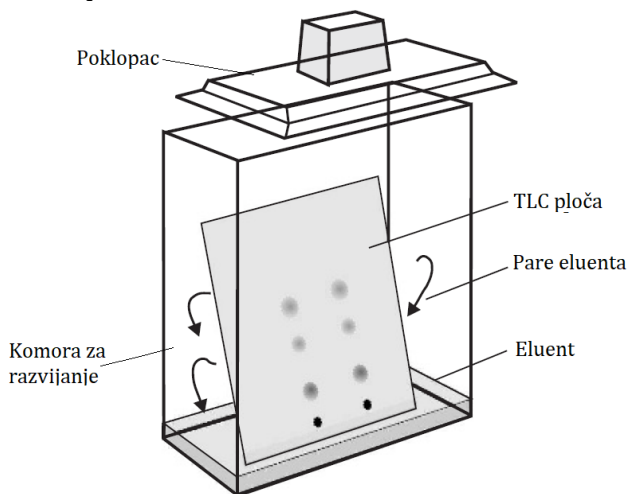
- *Princip TLC*

Princip razdvajanja između faza komponenti uzorka sličan je onom kod HPLC-a, iako je migracija sastojaka kroz stacionarnu fazu drugačija. Odvajanje se provodi na tankom sloju (100-200 μm) stacionarne faze, obično na bazi silika gela nanesenog na pravougaonu ploču od stakla, plastike ili aluminija dimenzija nekoliko centimetara.

Kako bi se održala stacionarna faza na nosaču i osigurala kohezija čestica, inertno vezivo poput gipsa (ili organskog povezičaća) se miješa u stacionarnu fazu tokom proizvodnje ploče. Sastojci se mogu identificirati istovremenom primjenom standarda s nepoznatim. Postoje tri koraka za odvajanje ovom tehnikom:

a) Taloženje uzorka

Mali volumen uzorka (između nekoliko nanolitara do nekoliko mikrolitara), otopljen u hlapljivom otapalu, nanosi se blizu dna ploče kao mala mrlja promjera oko 1-2 mm. To se vrši ručno ili automatski, s kapilarom s ravnim krajem. Tačka može imati i oblik horizontalne trake od nekoliko milimetara koja se dobiva automatskim prskanjem uzorka. Ova posljednja metoda ima prednost jer ima visoku ponovljivost, što je naravno neophodno za kvantitativnu analizu. Pripremljena ploča se zatim stavlja u staklenu komoru za razvijanje koja sadrži malu količinu odgovarajuće mobilne faze (Slika 7.11.). Zatim se komora prekriva. Položaj na kojem je uzorak odložen mora biti iznad nivoa otapala.



Slika 7.11. Komora za razvijanje sa TLC pločom

Komore su dostupne u različitim dimenzijama prema veličini ploča (od 5×5 do 20×20 cm), izrađene od stakla sa poklopcem koji dobro prijanja.

b) Razvijanje ploče

Mobilna faza kapilarno se diže u stacionarnu fazu, pomičući komponente uzorka različitim brzinama zbog njihovog različitog stepena interakcije s matriksom i topivosti u otapalu. Njihovo razdvajanje može biti završeno za nekoliko minuta. Kada front otapala pređe dovoljnu udaljenost (nekoliko centimetara), ploča se izvlači iz komore, odmah se bilježi položaj koji je dostigla mobilna faza, a zatim se suši.

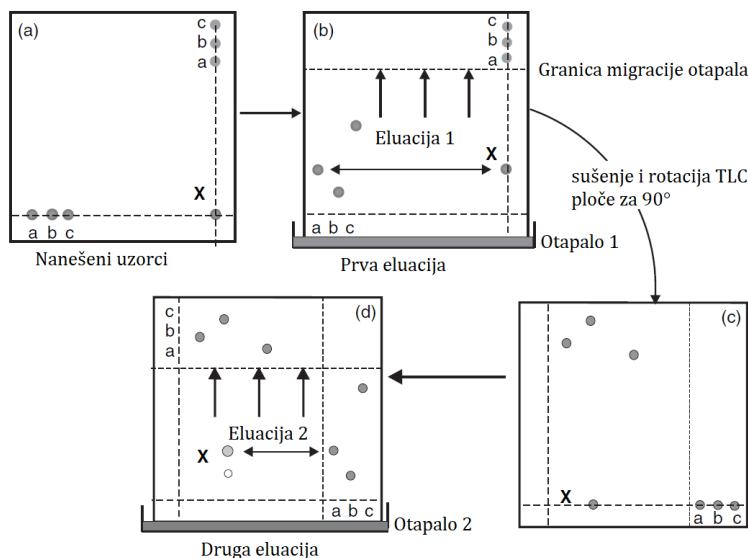
Kada se koristi ploča obrnutog polariteta (engl. *Reversed Phase-Thin-Layer Chromatography*, RP-TLC), mobilna faza će općenito sadržavati vodu. U tom slučaju može biti korisno dodati sol kao što je litijev hlorid (LiCl) koji ograničava pojave difuzije i time povećava rezoluciju.

c) Vizualizacija - Određivanje položaja mrlja na ploči

Za lociranje bezbojnih spojeva potrebno je razviti TLC ploču, kako bi se olakšala vizualizacija mrlja. Proizvođači prodaju ploče koje sadrže fluorescentnu sol cinka koja emitira svijetlo zelenu fluorescenciju kada se ploča ozrači UV lampom ($\lambda = 254 \text{ nm}$) i posmatra u kabinetu za gledanje.

Svi spojevi koji apsorbiraju na ovoj valnoj dužini pojavljuju se kao tamna mrlja (ili ponekad obojena) na svijetloj zeleno-plavoj pozadini. Druga metoda da spojevi budu vidljivi, gotovo univerzalno korištena, sastoji se od zagrijavanja ploče nakon prskanja sumpornom kiselinom (H_2SO_4) koja za sobom ostavlja ugljenisane mrlje. Koncentrovana H_2SO_4 je koristan reagens za detekciju steroida i lipida. Ovaj pristup, međutim, nije prilagođen kvantitativnoj TLC metodi. U ovom slučaju, razvoj se vrši uranjanjem ploče, korištenjem općeg (fosfomolibdinska kiselina, vanilin) ili specifičnog (npr. ninhidrin u alkoholnoj otopini za aminokiseline) reagensa.

Opisano je na stotine reagenasa koji služe za uvođenje hromofora ili fluoroformnih grupa u molekule analita nakon odvajanja. Visok stepen razdvajanja može se postići upotrebom četvrtastih TLC ploča koje omogućuju provođenje dvodimenzionalne hromatografije pomoću dva uzastopna eluiranja s dvije različite mobilne faze. Na Slici 7.12 prikazan je primjer procesa razdvajanja pomoću dva različita otapala u dva okomita smjera. Na slici 7.12a prikazan je nanešeni nepoznati uzorak (x) i tri standarda. Slika 7.12b predstavlja migraciju u prvom smjeru sa prvim otapalom. Na slici 7.12c prikazana je ploča nakon sušenja i rotacije. Slika 7.12d predstavlja migraciju u drugom smjeru s drugim otapalom. Dakle, na osnovu navedenog može se zaključiti da je nepoznati uzorak (x) smjesa od najmanje dva spoja među kojima je referentni spoj **a** (isti R_F u dva otapala) i jedan drugi spoj koji nije **b**. Tipična primjena ovog pristupa je odvajanje aminokiselina.



Slika 7.12. Dvodimenzionalna TLC

- *Stacionarna faza*

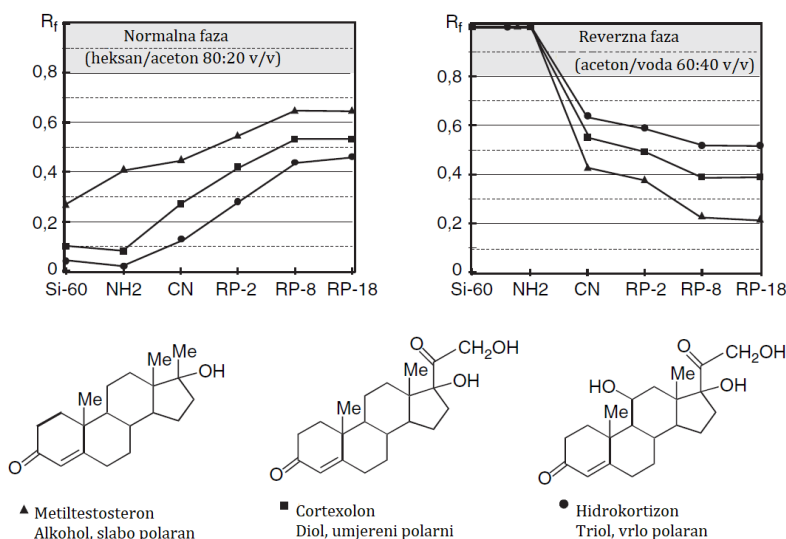
Mnogi fizičko-hemijski parametri i nekoliko faktora moraju se uzeti u obzir pri izboru dobre stacionarne faze. Veličina čestica, njihova specifična površina, volumen pora i raspodjela promjera čestica su faktori koji određuju svojstva stacionarne faze. Za nano-TLC, veličina čestica je reda veličine 4 μm , a pore su 6 nm. Omjer silanola i siloksanskih grupa određuje više ili manje izražen hidrofilni karakter faze. Kao i kod HPLC-a, moguće je koristiti vezani silicij u kojem su različiti lanci vezani kovalentnim vezama za silanolne grupe na površini. Neke faze uključuju alkilne lance (RP-2, RP-8, RP-18), dok druge sadrže organske funkcionalne grupe npr. nitril, amin ili alkohol. U Tabeli 7.2. prezentirani su adsorbensi koji se najčešće koriste kod TLC-a kao i njihova primjena.

Navedene faze mogu se koristiti sa brojnim mobilnim fazama koje imaju odgovarajući pH i odgovarajuću koncentraciju soli (Slika 7.13.). TLC ploče se također mogu pripremiti da sadrže hemijske grupe sa neto pozitivnim ili negativnim naelektrisanjem na površini. Ova vrsta ploča se koristi za TLC sa jonskom izmjenom. Modificirani celulozni nosači također se koriste u TLC-u, bilo kao vlakna ili hemijski modificirani mikrokristalni prah.

Najpoznatija je DEAE-celuloza, faza prilično bazična koja sadrži dietilaminoetilne grupe. Druge polarne faze, sa svojstvima jonske izmjene, mogu se koristiti za odvajanje amfolita.

Tabela 7.2. Adsorbensi i njihova primjena kod TLC

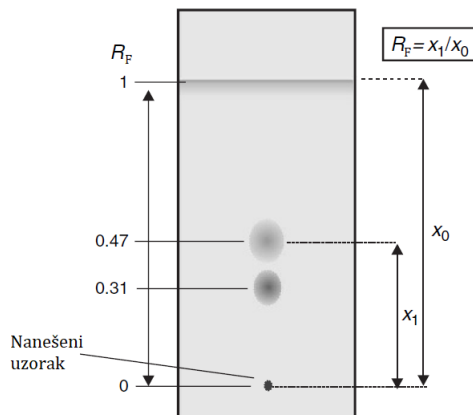
Adsorbens	Supstance koje se razdvajaju
Silika-gel	Aminokiseline, alkaloidi, šećeri, masne kiseline, lipidi, neorganski kationi i anioni
Aluminijum-oksidi	Alkaloidi, fenoli, steroidi, vitamini karoteni, aminokiseline, bojene materije u hrani
Celit	Steroidi, neorganski kationi
Celulozni prah	Aminokiseline, alkaloidi, nukleotidi, bojene materije u hrani
Poliamid prah	Antioksidanti, proteini
Sephadex	Aminokiseline proteini
Jonoizmjjenjivači	Nukleotidi
Mg-oksidi i Mg-hidroksidi	Ugljikovodici



Slika 7.13. Razdvajanje tri steroida različitog polariteta na šest stacionarnih faza sa dva binarna sistema otapala. Evolucija R_F vrijednosti i inverzna migracija uzrokovana promjenom eluirajuće mobilne faze, jedne polarne i druge nepolarne

- *Parametri razdvajanja i zadržavanja*

Tipičan izgled TLC ploče koji je djelomično suh, predstavljen je na Slici 7.14. Na mjestu gornje granice od otapala može se uočiti slaba crta. Ova linija se naziva frontom otapala. Supstanca koja ne migrira iz izvora uzorka ima $R_F=0$.



Slika 7.14. TLC ploča dostupna u različitim dimenzijama (od 5×5 do 20×20cm)

Svaki spoj je definiran svojim faktorom zadržavanja R_F (bez jedinice) koji odgovara njegovoj relativnoj migraciji u poređenju sa otapalom. Vrijednosti R_F nalaze se između 0 i 1.

$$R_F = \frac{\text{Pređeni put otopljene tvari}}{\text{Pređeni put fronta otapala}} = \frac{X_1}{X_0} \quad (7.2)$$

R_F (*retention factor*) - faktor zadržavanja zavisi od: otapala, temperature, veličine posude za razvijanje hromatograma, hromatografske ploče odnosno adsorbensa (veličina zrna, zapremina vode) i prirode smješe supstanci. Identifikacija supstanci upoređivanjem eksperimentalnih s objavljenim R_F vrijednostima nije uvijek sasvim sigurna. Zbog toga je bolje koristiti relativne R_F vrijednosti koje se određuju u odnosu na referentnu supstancu. Identifikacija nepoznate supstance se može izvršiti ako se ponovi razdvajanje. Zatim se sloj adsorbensa na kome se nalazi zona supstance skida sa nekom pogodnom tehnikom sa ploče. Supstanca se sa skinutog adsorbensa ekstrahuje i određuje nekom odgovarajućom fizičko-hemijskom metodom.

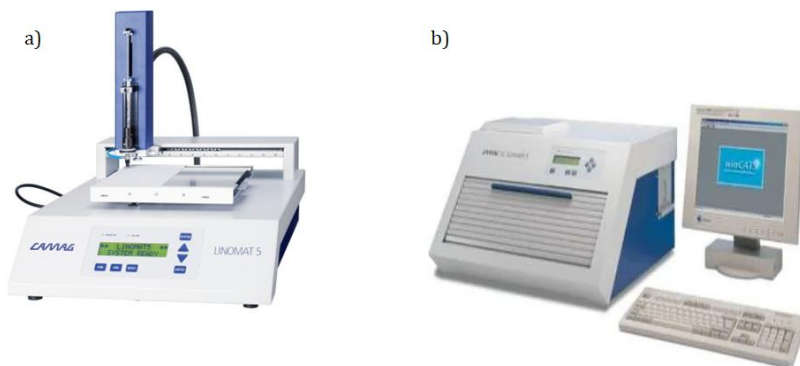
- *Kvantitativna analiza*

Postoje dvije osnovne tehnike koje se mogu koristiti za kvantitativno određivanje supstanci razdvojenih na hromatografskim pločama:

- a) određivanje supstanci direktno na ploči ili
- b) određivanje nakon predhodne ekstrakcije razdvojenih supstanci sa ploče.

Ako su supstance obojene, fluoresciraju ili sa nekim reagensom kvantitativno reaguju dajući obojeni spoj, mogu se tada odrediti spektrofotometrijskim metodama, uglavnom na osnovu reflektovane svjetlosti. Kvantitativno određivanje supstanci, poslije skidanja sloja adsorbensa sa zonom ("mrljom") supstance i njene ekstrakcije iz adsorbensa, vrši se nekom konvencionalnom kvantitativnom metodom.

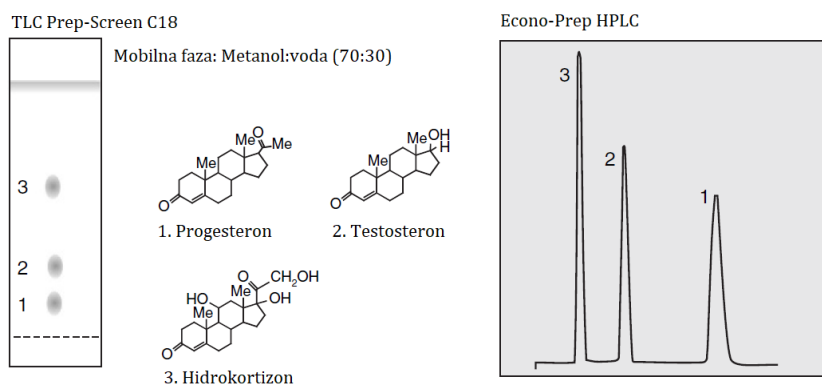
Dakle, da bi se TLC koristio kao kvantitativna metoda analize, važno je kvantificirati mrlje, zajedno sa definicijama za sve uobičajene parametre (specifičnost, opseg domena linearnosti, preciznost, itd.). To se postiže postavljanjem ploče ispod leće denzitometra (ili skenera) koji može mjeriti ili apsorpciju ili fluorescenciju na jednoj ili nekoliko valnih dužina. Ovaj instrument proizvodi pseudohromatogram koji sadrži pikove čije se površine mogu mjeriti (Slika 7.15.). Kod TLC, mrlja se obično može detektovati ako odgovara barem nekoliko nanograma spoja UV apsorbenta.



Slika 7.15. Uređaj za automatsko nanošenje uzoraka za TLC i sistem za „čitanje“ ploče. a) Programabilni aplikator Linomat IV; b) Denzitometar - mjeri svjetlost koju reflektira ili propušta ploča. Optička postavka je slična onoj kod UV/vidljivog spektrometra (model Scanner 3)

Za mnoge primjene, TLC može zamijeniti HPLC. Poređenjem TLC i HPLC moguće je brzo usavršiti razdvajanje pomoću HPLC-a, koristeći u početku TLC, sa istom stacionarnom fazom i istom mobilnom fazom za razvoj ili eluiranje (Slika 7.16.). Iako TLC tehnika zahtijeva više ručnih manipulacija nego HPLC, novi poboljšani alati za uočavanje, migraciju, eluiranje gradijenta, razvoj i snimanje daju potrebnu reproduktivnost. U usporedbi s HPLC-om, TLC može obraditi više uzoraka u istom vremenskom razdoblju postavljanjem analiza paralelno na istoj ploči. Ploča, korištena za jednokratnu upotrebu, omogućuje brzu pripremu uzorka uz manji rizik od gubitka ili kontaminacije, što je korisno u slučaju analize bioloških uzoraka.

TLC ploča na kojoj su razdvojeni analiti je sredstvo za očuvanje veoma malih uzoraka nakon ekstrakcije, koji mogu poslužiti za druge analize (npr. masena spektrometrija). Tehnološkim napredkom omogućeno je sa eluent migrira konstantnom brzinom primjenom pozitivnog pritiska gasa u migracionoj komori, što je posebno razvijen efekat koji dobija na vremenu i kvalitetu odvajanja.



Slika 7.16. Odvajanje smjese tri steroida na TLC ploči i na HPLC koloni

Tankoslojna hromatografija visokih performansi, HPTLC je poboljšanje tehnike u kojoj sorbentni materijal (npr. silikagel 60) ima manju veličinu čestica i užu raspodjelu veličine čestica od konvencionalne TLC. HPTLC ploče imaju poboljšanu homogenost površine i tanje su. Rezolucija je poboljšana, vrijeme analize je kraće i dovoljno je primijeniti nanolitre ili nanograme uzorka.

7.2.3. Gasna hromatografija

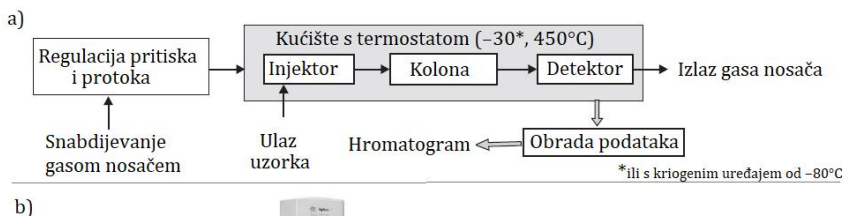
Gasna hromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) je široko rasprostranjena tehnika čije prve primjene datiraju više od 60 godina. Od tada, ova tehnika se nastavlja razvijati na najbolji način koristeći izuzetnu osjetljivost, svestranost, mogućnosti automatizacije i lakoću s kojom se mogu razviti nove analize. Budući da se odvajanje smjese spojeva na koloni događa dok su u gasovitom stanju, čvrsti i tečni uzorci moraju se prvo prevesti u gasovito stanje.

Ovo predstavlja, najveće ograničenje hromatografije u gasnoj fazi pošto je njena upotreba ograničena na proučavanje termostabilnih i dovoljno isparljivih spojeva. Međutim, primjene su brojne u svim domenima, a razvoj brze ili višedimenzionalne gasne hromatografije čini ovu tehniku još atraktivnijom. Njegova veoma velika osjetljivost omogućava detekciju količina reda pikograma za određene spojeve.

7.2.3.1. Osnovne komponente GC

Aparat potreban za GC je sofisticiran i skup, u odnosu na onaj koji je potreban za PC ili TLC. Međutim, GC nije ništa komplikovanija od drugih hromatografskih procedura. Gasni hromatograf se sastoji od nekoliko komponenti unutar posebnog okvira. Ove komponente uključuju injektor, kolonu i detektor, povezane sa termostatski kontrolisanom pećnicom koja omogućava koloni da postigne visoke temperature (Slika 7.17.).

Mobilna faza koja transportuje analite kroz kolonu je gas koji se naziva gas nosač. Protok nosećeg gasa, koji je precizno kontrolisan, omogućava ponovljivost vremena zadržavanja. Analiza počinje kada se mala količina uzorka unese kao tečnost ili gas u injektor, koji ima dvostruku funkciju isparavanja uzorka i miješanja s protokom gasa na vrhu kolone. Kolona je obično cijev, uskog otvora, koja se mota oko sebe s dužinom koja može varirati od 1 do preko 100 m, ovisno o vrsti i sadržaju stacionarne faze. Kolona, koja može da posluži za hiljade uzastopnih injekcija, smeštena je u termostatski kontrolisanoj peći. Na kraju kolone, mobilna faza (gas-nosač), prolazi kroz detektor prije nego što izađe u atmosferu.



Slika 7.17. a) Shema gasnog hromatografa; b) Komercijalni gasni hromatograf sa sistemom masene spektrometrije za detekciju, model GCMS 5973, Agilent Technologies

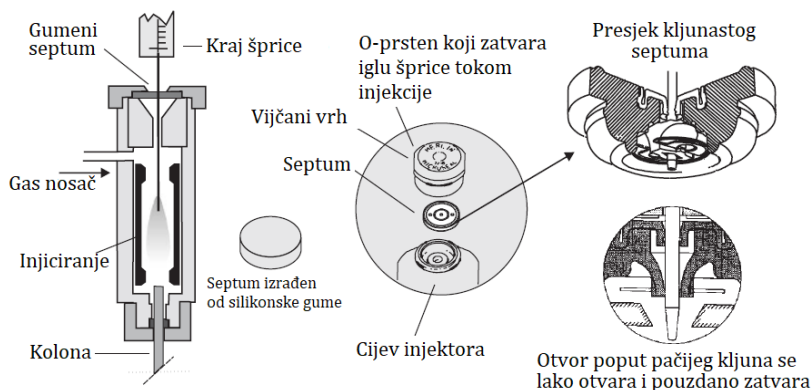
- *Injektori*

Injektor, je ulaz uzorka u hromatograf, i on ima različite funkcije. Osim što ima ulogu ulaza za uzorak, on mora da ispari, pomješa se sa gasom-nosačem i donese uzorak na čelo kolone.

Karakteristike injektora, kao i načini ubrizgavanja, razlikuju se u zavisnosti od tipa kolone. Upotreba automatskog sistema za ubrizgavanje može značajno poboljšati preciznost mjerenja.

a) Injektor za direktnu vaporizaciju

Za uvođenje uzorka u naelektrisane kolone, koje obično koriste brzinu protoka od oko 10 ml/min obično se upotrebljava injektor za direktnu vaporizaciju tj. isparavanje (Slika 7.18.). Ovi injektori sastoje se od metalne cijevi sa staklenim omotačem (umetak). U zavisnosti od zahtjevane funkcije postoji širok spektar umetaka. Na Slici 7.18. predstavljena je tipična shema modela koji koristi septum i to samozaptivni septum („Microseal“ Merlin), koji se može koristiti hiljade puta.



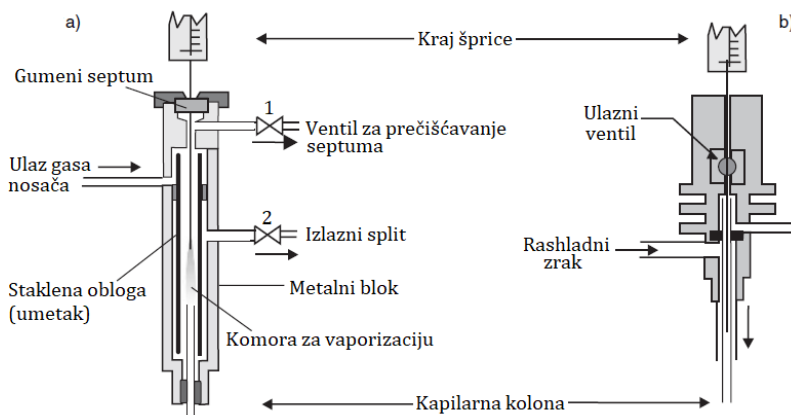
Slika 7.18. Injektor za direktnu vaporizaciju koji se koristi za naelektrisane kolone

Zagrijavaju se do prosječne temperature ključanja spojeva koji se razdvajaju. Igla mikro-šprice koja sadrži uzorak probija septum, izrađen od silikonske gume, koja zatvara kraj injektora. Drugi kraj, također zagrijan, spojen je izravno na kolonu. Kada se sav uzorak unese špricom, on odmah ispari i u potpunosti uđe u kolonu u roku od nekoliko sekundi, ponesen gasom-nosačem.

b) Split/splitless injektor

Za kapilarne kolone koje mogu podnijeti samo mali kapacitet uzorka, čak i najmanji volumen koji je moguće ubrizgati mikrošpricom (0.1 μ l) može zasititi kolonu. Za takve kolone koriste se posebni injektori koji mogu raditi na dva načina rada, sa ili bez dijeljenja protoka tj. *split* ili *splitless*.

U split načinu rada velika brzina protoka gasa nosača dolazi u komoru za isparavanje gdje se miješa s parama ubrizganog uzorka (Slika 7.19.). Ventil za odzračivanje, reguliran je na između 50-100 ml/min, odvaja ovaj protok na dvije frakcije, od kojih se najveći dio ispušta iz injektora, uzimajući sa sobom većinu unesenog uzorka. Omjer podjele obično varira između 1 : 20 i 1 : 500. Samo najmanja frakcija, koja sadrži količinu uzorka jednaku omjeru podjele, će prodrijeti u kolonu. Kada se radi sa kapilarnim kolonama, ovaj tip injektora se takođe koristi za veoma razblažene uzorke u načinu rada *splitless*.



Slika 7.19. Injektori. a): Komora za ubrizgavanje; b): Hladno ubrizgavanje u kolonu

Na Slici 7.19. predstavljena je komora za ubrizgavanje gdje gas nosač može da ulazi i izlazi u komoru na tri puta (kada je injektor u split modu). Dio gasa nosača teče prema gore i pročišćava septum (1), drugi izlazi kroz podijeljeni izlaz (igličasti ventil regulira cijepanje, 2) i treći dio prelazi na kolonu.

Hladno ubrizgavanje u kolonu nije tehnika isparavanja. Uzorak se deponuje direktno u kapilarnu kolonu. Posebana mikrošprica, čija je igla (čelična ili silicijum dioksid) prečnika 0,15 mm, neophodna je za prodiranje u kolonu koja se ohladi na 40 °C prije nego što se vrati na normalnu radnu temperaturu. Ovaj postupak, koristan za termički labilne spojeve ili spojeve sa visokim temperaturom ključanja.

- *Automatski uzorkivač*

Automatski uzorkivači (engl. *autosampler*) omogućavaju injektiranje određenog volumena uzorka pri zadanoj brzini injektiranja čime se postiže brže i preciznije injektiranje u odnosu na ručno te time i veća reproducibilnost mjerenja (Slika 7.20.).

S obzirom na mogućnost programiranja, na ovaj način se pojednostavljuje postupak, jer nema obaveze ručnog injektiranja u određeno vrijeme.



Slika 7.20. Automatski uzorkivač (Shimadzu AOC-20i)

- *Termostatski kontrolirana pećnica*

Gasni hromatograf se sastoji od peći sa dovoljnom volumenom da lako drži jednu ili dvije kolone i koja može da se zagrije na više od 400 °C. Slaba toplotna inercija dozvoljava brz, ali kontrolisan porast temperature (gradijent koji može da dostigne 100 °C/min). Temperatura se mora kontrolisati u granicama od 0.1 °C da bi se dobila ponovljiva razdvajanja u izotermnim ili temperaturno programiranim načinima rada. Ugradnjom kriogenog ventila koji se napaja s N₂ ili CO₂ u tečnom stanju, pećnica se može regulirati na niskoj temperaturi.

- *Kolone*

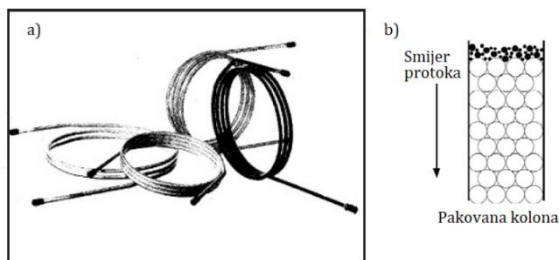
Postoje dvije vrste kolona koje se razlikuju po performansama: pakovane (zbijene) i kapilarne kolone. Za pakovane kolone stacionarna faza se deponuje ili vezuje hemijskom reakcijom na porozni nosač. Za kapilarne kolone tanak sloj stacionarne faze se nanosi na, ili vezuje za unutrašnju površinu kolone.

a) Pakovane kolone

Pakovane kolone (Slika 7.21.), se danas rjeđe koriste, imaju promjer od 1/8 ili 1/4 inča (3.18 i 6.35 mm) i dužinu između 1-3 m. Izrađene su od čelika ili stakla, a unutarašnji zid cijevi je obrađen kako bi se izbjeglo katalitičko djelovanje s uzorkom.

Ove kolone mogu izdržati brzinu protoka gasa nosača u omjeru od 10-40 ml/min. Sadrže inertan i stabilan porozni nosač na koji se može impregnirati ili vezati stacionarna faza.

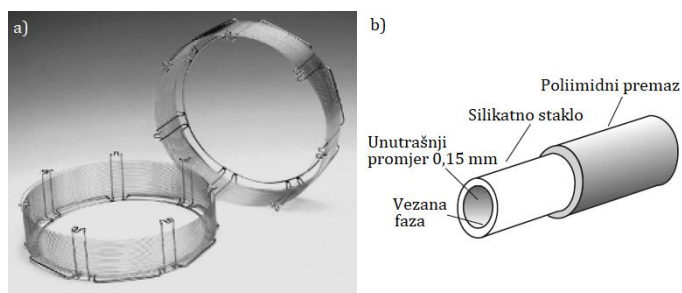
Svi nosači imaju hemijsku reaktivnost uporedivu sa silika gelom zbog prisutnosti silanolnih grupa. Iako su performanse pakovanih kolona skromnije od kapilarnih, one se i dalje obično koriste za mnoge rutinske analize. Jednostavne su za proizvodnju i sa velikim izborom dostupnih stacionarnih faza.



Slika 7.21. a) Pakovane kolone; b) Shematski prikaz pakovane kolone

b) Kapilarne kolone

Kapilarne kolone se obično izrađuju od topljenog silicijum dioksida najviše čistoće koji se dobija sagorijevanjem tetrahlorosilana (SiCl_4) u atmosferi bogatoj kisikom (Slika 7.22.). Danas su dostupne kolone izrađene od metalne kapilare (Al, Ni ili Fe) koje podnose visoke radne temperature od $450\text{ }^\circ\text{C}$, pod uslovom da je stacionarna faza dovoljno stabilna. Unutrašnja površina kolone obično se obrađuje kako bi se pogodovalo pravilno vezivanje za stacionarnu fazu. To može biti hemijski tretirano HCl na $350\text{ }^\circ\text{C}$ ili nanošenjem tankog sloja aluminijuma ili silika-gela u zavisnosti od tehnike koja se koristi za vezivanje stacionarne faze. Kovalentno vezanje putem Si-O-Si-C omogućuje vezivanje organskih spojeva na površinu silicija. Kolone su posebno stabilne i mogu se povremeno ispirati otapalima što im omogućuje da povrate svoj početni kvalitet performansi.



Slika 7.22. a) Kapilarne kolone; b) Shematski prikaz kapilarne kolone od topljenog silicijum dioksida

- *Stacionarne faze*

Za pakovane kolone, za koje su tehnike impregnacije vrlo jednostavne, poznato je preko 100 stacionarnih faza različitih tipova. S druge strane, za kapilarne kolone izbor stacionarne faze je ograničen, jer stvaranje filma na površini kolone zahtijeva drugačiji princip od impregnacije. Danas se koriste dva tipa faza: polisiloksani i polietilen glikoli. Budući da svaka faza ima minimalnu i maksimalnu preporučenu radnu temperaturu, ove faze se koriste između minimalne temperature ispod koje su ravnoteže koncentracije prespore da bi se ostvarile i maksimalne temperature iznad koje dolazi do razgradnje polimera. Ova visoka granica ovisi o debljini filma i prirodi polimera.

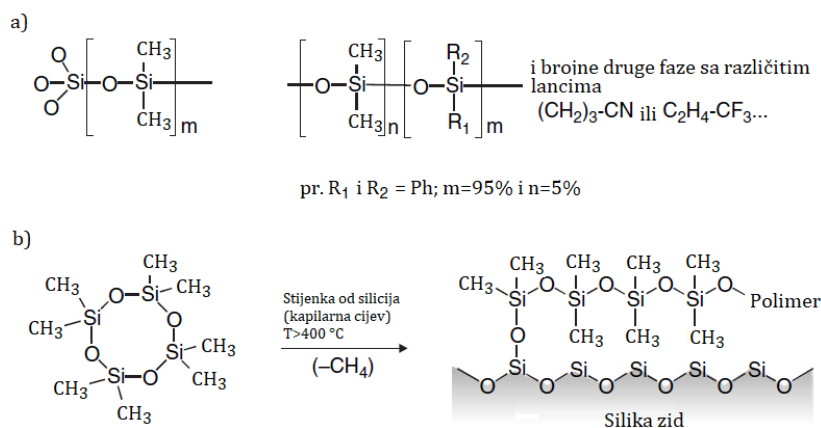
Postoje faze specijalno dizajnirane za pojedine klase spojeva. Tako na primjer, za proučavanje optički aktivnih spojeva (enantiomerne separacije) koriste se pojedine faze koje sadrže ciklodekstrine.

a) Faze tipa polisiloksana

Ove faze se još nazivaju silikonska ulja ili silikonske gume. Sastoje se od dva ugljikovodikova lanca vezana za jedan silicij (Slika 7.23.). Danas postoji oko 20 različitih sastava alkilnih ili arilnih lanaca (metil ili fenil) u koje se mogu ugraditi daljnje funkcionalne grupe (npr. cijanopropil, trifluoropropil). Zbog svog vrlo širokog temperaturnog raspona ove faze su najčešće korištene. Dobro poznata faza koja se koristi kao referentna faza je skvalan, Ovaj zasićeni ugljikovodik $C_{30}H_{62}$ dobiva se iz skvalena, terpenoidnog prirodnog ekstrakta iz jetre morskog psa (također prisutan u sebumu kože). Na ovoj stacionarnoj fazi, koja se može koristiti između 20 i 120 °C (nakon taloženja ili impregnacije), spojevi se eluiraju u rastućem redoslijedu njihovih temperatura ključanja, a vrijeme zadržavanja je obrnuto proporcionalno pritisku pare analita. Različite vezane faze na bazi polialkilsiloksana, gotovo apolarne, mogu se koristiti kao zamjena za skvalan.

b) Polietilen glikoli

Polietilen glikoli ($[-O-CH_2-CH_2-O-]_n-$) su polarni polimeri poznati pod nazivom "Carbowax", molekulske mase od 1500 do 20000 (*Carbowax* 20M). Mogu se koristiti za taloženje, impregnaciju ili kao vezne faze.

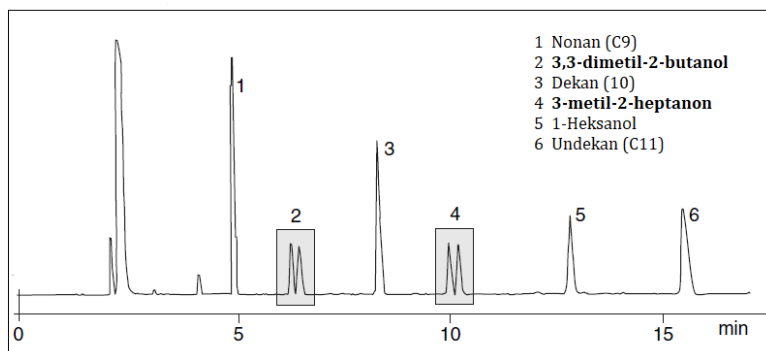


Slika 7.23. a) Struktura polisiloksana (silikona) i vezani polisiloksani; b) Stvaranje vezane faze tretiranjem unutrašnjeg zida kolone silicijevog dioksida sa tetradimetilsiloksanom dobiva se stacionarna faza koja je polimerizirana i mrežasta

c) Hiralne stacionarne faze

Hiralne stacionarne faze su općenito polisiloksanske bazične faze pomiješane s 10 do 20 težinskih procenata ciklodekstrina (polisaharida). Ova vrsta kolone prikladna je za prečišćavanje racemičnih smjesa. Na slici 7.24 predstavljen je hromatogram dobiven pri sljedećim uslovima: Kolona β -DEX, unutrašnji prečnik 120, 30 m \times 0,25 mm; Tem.= 80 $^{\circ}\text{C}$; Detektor FID; Inj. 1 μl ; omjer podjele 100:1. Ako organski spoj sadrži asimetrični ugljik, *R* i *S* enantiomeri neće imati isti afinitet za naelektrisanu stacionarnu fazu u ciklodekstrinu, što se izražava kao dva karakteristična pika. Tako na primjer korištenjem hiralne kolone za odvajanje racemične smjese spojeva dovodi do cijepanja signala što se može jasno vidjeti za spojeve 2 i 4 (Slika 7.24.).

Stoga će hemijski spoj kao čisti racemat dati dva pika jednake veličine, od kojih svaki odgovara enantiomeru. Neke kolone podnose visoke temperature do 450 $^{\circ}\text{C}$ (npr. "DEXSIL 400" ili "PETROCOL").



Slika 7.24. Primjer razdvajanja sa hiralnom fazom koja sadrži ciklodekstrine

d) Čvrste stacionarne faze

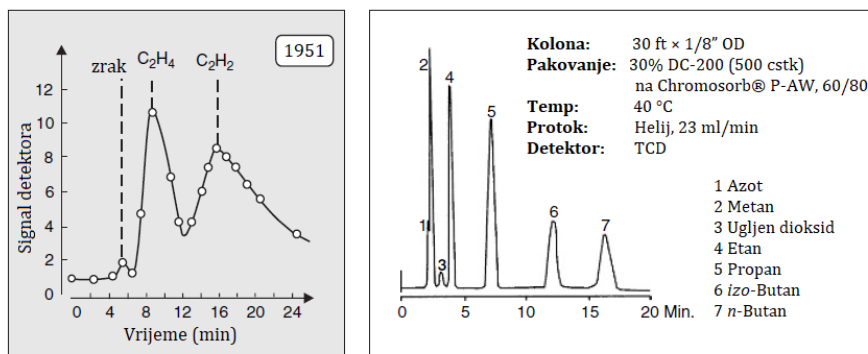
Ove faze se sastoje od raznih adsorbirajućih materijala: silicij ili aluminij deaktiviran mineralnim solima, molekularna sita, porozno staklo, grafit (npr. *Chromosorb® 100*, *Porapak®*). Kapilarne kolone izrađene taloženjem ovih materijala u obliku finog poroznog sloja nazivaju se PLOT. Koriste se za odvajanje gasovitih ili vrlo isparljivih uzoraka. Kolone koje sadrže grafitni crni ugljik razvijene su za odvajanje N_2 , CO, CO_2 i vrlo lakih ugljikovodika. Efikasnost ovih kolona je vrlo visoka. Na Slici 7.25.a predstavljen je jedan od najranijih hromatograma.

Ovaj hromatogram je dobiven tačku po tačku i predstavlja mješavinu zraka, etilena i acetilena razdvojenih na silika gelu, a na slici 7.25b predstavljen je hromatogram nakon GC analize na modernoj naelektrisanjoj koloni.

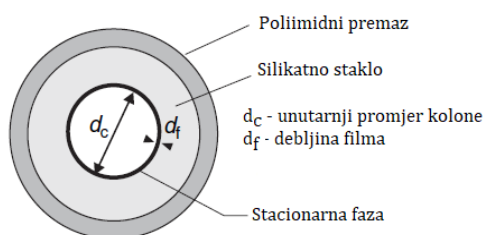
Danas su čvrste faze postale mnogo sofisticiranije. Za usporedbu ili predviđanje ponašanja kapilarnih kolona korisno je izračunati omjer faza $\beta = V_M/V_S$ (Slika 7.26.). Ako je d_c -unutarnji promjer kolone i d_f debljina filma nanesenog na njenu unutrašnju površinu, izračun dovodi do jednačine:

$$\beta = \frac{V_M}{V_S} = \frac{d_c}{d_f} \quad (7.3)$$

Ako su komponente uzorka volatilne, treba birati kolone sa malim odnosom faza i obrnuto.



Slika 7.25. a) Hromatogram, jedan od najranijih; b) Hromatogram nakon GC analize na modernoj naelektrisanoj koloni



Slika 7.26. Presjek kapilarne kolone

- **Detektori**

Izlaz kolone je direktno povezan sa detektorom u gasnom hromatografu. Postoji veliki izbor GC detektora, kako selektivnih tako i univerzalnih. Detektori se mogu klasifikovati kao detektori osjetljivi na masu ili koncentraciju mogu davati samo informaciju o vremenu zadržavanja i površini ispod signala, ili mogu davati strukturne informacije o molekuli.

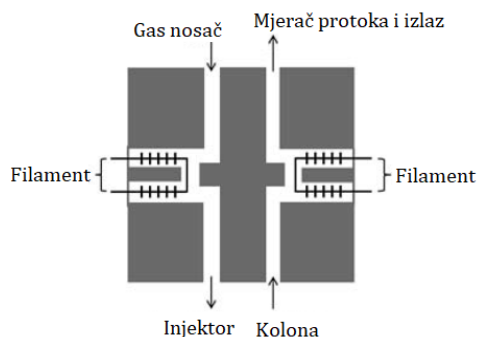
a) **Detektor toplotne vodljivosti (TCD)**

Detektor toplinske vodljivosti (engl. *Thermal conductivity detector*, TCD) sastoji se od zagrijanog metalnog bloka sa dva kanala. Svaki kanal je opremljen filamentom tj. metalnom žicom (Slika 7.27.), a filamentu su spojeni sa Vitstonovim mostom. Gas nosač koji ide u injektor/kolona vodi se kroz jedan od kanala, dok se gas nosač iz kolone vodi kroz drugi kanal. Temperatura filamenta ovisi od toplotne provodljivosti gasa koji prolazi.

I He i H_2 imaju prilično veliku vodljivost, dok N_2 ima manju. Kada spoj eluiran iz kolone prođe kroz filament, vodljivost gasa se smanjuje i temperatura filameta raste. Ovo povećanje temperature rezultira promjenom električnog otpora filameta. Ovu promjenu registruje sistem Vitstonova mosta pri čemu se uočava promjerna signala detektora.

Dakle, svi spojevi koji imaju provodljivost manju od gasa nosača bit će otkriveni pomoću TCD, a to je univerzalni detektor koji je osjetljiv na koncentraciju. TCD je nedestruktivan i može se koristiti za preparativno odvajanje.

Međutim, detektor ima nisku osjetljivost, a minimalna masa koja se može detektovati je oko 10 ng čak i ako se koristi He ili H_2 kao gas nosač. TCD se obično koristi za određivanje lakih i trajnih gasova u nabijenim ili PLOT kolonama. TCD je veoma pogodan za prenosne gasne hromatografe jer se lako minijaturizira i ne zahtjeva dodatne gasove.

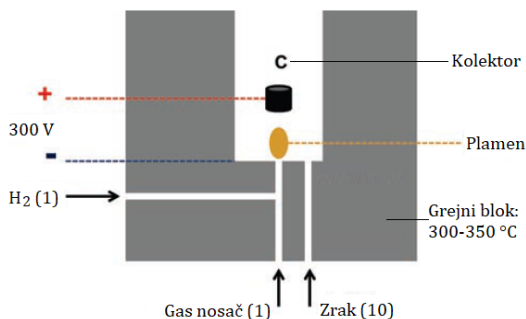


Slika 7.27. Shema detektora toplotne vodljivosti

b) Plamenojonizacijski detektor (FID)

Plamenojonizacijski detektor (engl. *Flame Ionization Detector*, FID) je jedan od najčešće korišćenih detektora u GC. Detektor se sastoji od zagrijane (300–350 °C) zone, gdje se gas nosač u koloni miješa sa H_2 prije ulaska u odeljak za detekciju kroz vrh mlaza (Slika 7.28.). Zrak ulazi u odeljak za detekciju kroz poseban kanal, a odnos protoka gasa nosača, H_2 , i zraka se održava na oko 1 : 1 : 10.

Plamen se pokreće električnim pražnjenjem i održava se u višku zraka. Međutim, zbog činjenice da se zrak dovodi iz posebnog kanala, u unutrašnjem djelu plamena je prisutna redukciona zona.



Slika 7.28. Shema plamenojonizacijskog detektora

Kada ugljovodonični spoj iz kolone uđe u plamen, u redukcionoj zoni se dešava sljedeće:

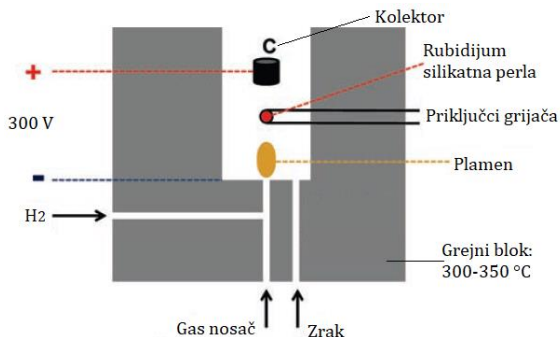
CH radikali nastaju iz ugljikovodika: $(CH) \rightarrow CH^{\bullet} + O^{\bullet}$

Formil katjoni nastaju iz CH radikala: $CH^{\bullet} \rightarrow CHO^{+} + e^{-}$

Između vrha mlaza (plamena) i kolektora primenjuje se potencijal (300 V). Nastali joni u plamenu proizvode malu struju (10^{-12} A), koja je proporcionalna količini sagorjelog spoja. Struja (signal) se pojačava u elektrometru. FID može otkriti sve organske spojeve koji sadrže C i H, sa izuzetkom mravlje kiseline i metana. Ovaj detektor je osjetljiv na masu. Minimalna masa koja se može detektovati je oko 0,01–0,1 ng i FID ima veliki dinamički opseg od 10^7 .

c) Nitrogen-fosfor detektor (NPD)

Nitrogen-fosfor detektor (engl. *Nitrogen-Phosphorus Detector*, NPD) reaguje na spojeve nitrogena i fosfora. Struktura detektora je vrlo slična FID-u, samo se dodaje zrnca rubidijeve soli, zagrijane do usijanja (Slika 7.29.).

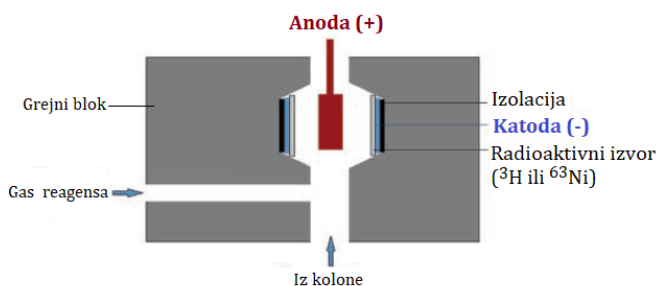


Slika 7.29. Shema nitrogen-fosfor detektora

Zrno se postavlja na izlaz iz kolone. Rubidijeva perlica jonizira spojeve koji sadrže N i P, što dovodi do promjene napona koji se može registrovati. Za pravilan rad detektora potrebna je mješavina H_2 i zraka, čiji je omjer ključan. Da bi se spriječila jonizacija ugljikovodika, koristi se deset puta manji protok H_2 nego kod FID-a. NPD je jedan od najosjetljivijih selektivnih detektora. Njegova osjetljivost je 0.1-0.4 pg/s, a linearnost 5 redova veličine.

d) Elektron apsorbirajući detektor (ECD)

Elektron apsorbirajući detektor (engl. *Electron Capture Detector*, ECD) je osjetljiv na organohalogene spojeve, ima visoku osjetljivost, ali ograničenu linearnost odgovora. ECD se sastoji od zagrijanog metalnog bloka s kanalom za detekciju (Slika 7.30.). Pretinac za detekciju sadrži anodu, katodu i izvor β -zračenja. Izvor β -zračenja može biti 3H (0.018 MeV) ili ^{63}Ni (0.067 MeV). Izvor ^{63}Ni ima praktične prednosti i može se koristiti na višim temperaturama. Princip detekcije temelji se na ćeliji koja sadrži određenu količinu elektrona koje emitira radioaktivni izotop nikal (^{63}Ni). Elektroni u ćeliji stvaraju određenu konstantnu struju. Kada spoj koji ima afinitet prema elektronima prođe kroz ćeliju, on privlači elektrone i tako mijenja struju koja se bilježi kao vrh. Ovaj detektor je neosjetljiv na alkohole, ugljikovodike i amine.



Slika 7.30. Shema elektron apsorbirajućeg detektora

e) Maseno-spektrometrijski detektor (MSD)

Maseno-spektrometrijski detektor ili maseni detektor (engl. *Mass Spectrometry Detector* ili *Mass Detector*, MSD) je jedan od univerzalnih detektora koji potvrđuju identitet spoja na temelju usporedbe masenog spektra spoja s masenim spektrom iz biblioteke.

Ovaj detektor svaki spoji, koji eluira iz hromatografske kolone, podvrgava jonizaciji u snopu elektrona određene energije.

Najčešće je to energija od 70 eV. Jonizacija se može izvesti hemijski, gdje se spojevi sudaraju s joniziranim gasom reagensa (npr. amonijakom ili metanom). Tokom procesa jonizacije dolazi do fragmentacije spoja u jonskom izvoru detektora mase. Fragmenti mogu biti neutralni dijelovi molekula, a poželjno je da budu jonizirani (naelektrisani). Rezultirajući fragmenti, koji imaju naboj, odvoje se u analizator mase. Analizator mase može biti kvadropolis, magnet ili elektromagnet. Bit rada analizatora mase je odvajanje fragmenata na temelju omjera mase i naboja (m/z) u električnom, magnetnom ili elektromagnetnom polju. Podešavanjem napona na krajevima kvadropolisa odabiru se joni koji imaju odgovarajući m/z omjer i dovoljnu kinetičku energiju da prođu kroz elektromagnetno polje do fotoćelije koja registruje jone i umnožava signal tako da se može mjeriti. Fragmenti mase formirani u jonskom izvoru predstavljaju maseni spektar ("*otisak prsta*") organskog spoja. Jonizacija u snopu elektrona daje bogatiji maseni spektar, za razliku od hemijske jonizacije, koja se također naziva "*soft*" jonizacija.

Postoje i druge vrste masenih detektora kao što su "*Ion trap*" (IT) i "*Time of fly*" (TOF) koji imaju svoje specifične prednosti i nedostatke.

7.2.4. Tečna hromatografija

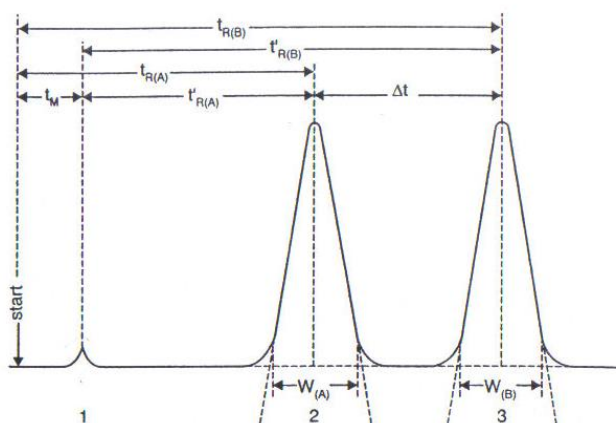
Tečna hromatografija ili tečna hromatografija pod visokim pritiskom (engl. *High Preassure Liquid Chromatography*, HPLC) ima sve veću primjenu u hemijskoj industriji, za kvalitativno i kvantitativno određivanje organskih spojeva u biljnim uzorcima, u kontroli farmaceutskih proizvoda, ispitivanju životne sredine i u drugim oblastima analitike. U poređenju sa klasičnom hromatografijom na koloni, gdje se mobilna faza kreće zahvaljujući gravitaciji, i razdvajanje može trajati satima, HPLC analiza traje 5-30 minuta. Priprema uzorka kod ove hromatografije obično je jednostavnije nego kod gasne hromatografije. Biološke tečnosti likvor, serum i urin često se mogu injicirati direktno u kolonu bez predhodnog postupka ekstrakcije. Mogu da se analiziraju termolabilni spojevi, amino kiseline, proteini, nukleinske kiseline, ugljovodici, antibiotici, pesticidi, lijekovi, terpenoidi, steroidi, organometalni spojevi, kao i mnogi neorganski spojevi.

Glavni cilj tečne hromatografije jeste da se dobije zadovoljavajuće razdvajanje komponenti analizirane smješe u što kraćem vremenu.

Retenciono vrijeme t_R je vremenski period od momenta injiciranja uzorka do momenta kada je signal ispitivane komponente uzorka dostiglo maksimum (Slika 7.31.). Tokom prolaska kroz kolonu, molekule supstance jedan dio vremena provedu u mobilnoj fazi i kreću se brzinom kojom protiče i mobilna faza. Drugi dio vremena molekule supstance provedu u stacionarnoj fazi i tada se ne pomjeraju. Prvi signal koji se javlja nakon injiciranja predstavlja otapalo (*front*), a njegovo retenciono vrijeme t_M odgovara vremenu koje supstance uzorka provedu u mobilnoj fazi. Razlika retencionog vremena zadržane komponente i nezadržanog otapala predstavlja vrijeme koje molekule supstance provedu u stacionarnoj fazi:

$$t'_R = t_R - t_M \quad (7.4)$$

Veličina t'_R naziva se reducirano retenciono vrijeme.



Slika 7.31. Tipični hromatogram u tečnoj hromatografiji: 1-signal ne zadržane komponente, 2- i 3- signali zadržanih komponenti

t_M = retenciono vrijeme otapala

$t_{R(A)}$ i $t_{R(B)}$ = retenciono vrijeme komponente A i komponente B

$t'_{R(A)}$ i $t'_{R(B)}$ = reducirano retenciono vrijeme komponente A i komponente B

$W_{(A)}$ i $W_{(B)}$ = širina signala komponente A i komponente B na baznoj liniji

Kada se analizira uzorak sa više komponenti, svaka komponenta će provesti isto vrijeme u mobilnoj fazi, ali će, pod uslovom da se razdvajaju, svaka komponenta provesti različito vrijeme u stacionarnoj fazi. To je razlog njihovog razdvajanja.

Vrlo je važno znati koliko će vremena proesti molekule supstance u stacionarnoj fazi u odnosu na vrijeme provedeno u mobilnoj fazi. Ovaj odnos ukazuje na to koliko će svaka komponenta biti zadržana na koloni i naziva se *faktor kapaciteta*:

$$K = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (7.5)$$

Poznavanje faktora kapaciteta (K) omogućuje izračunavanje retencionog vremena supstance:

$$t_R = t_M(1 + k) \quad (7.6)$$

Ako faktor kapaciteta supstance sa najkraćim retencionim vremenom iznosi najmanje 1, tada je signal te supstance dobro razdvojen od signala otapala. Faktor kapaciteta supstance sa najdužim retencionim vremenom ne bi trebao da prelazi vrijednost 10, jer je to znak da analiza traje predugo.

Osobina mobilne i stacionarne faze da razdvoje dvije komponente sa bliskim retencionim vremenom karakteriše se *faktorom razdvajanja* ili *relativnom retencijom* α :

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A} = \frac{t'_{R(B)}}{t'_{R(A)}} \quad (7.7)$$

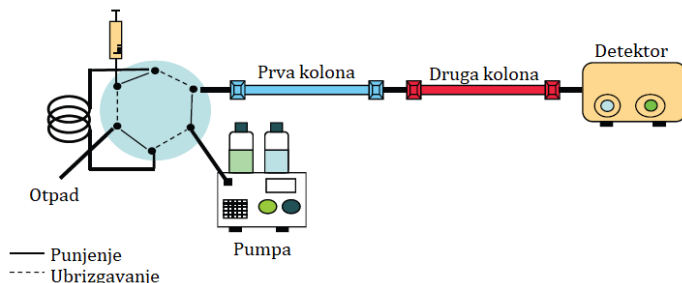
Ova vrijednost označava relativan odnos dva susjedna signala i jednaka je odnosu faktora kapaciteta za te signale. Faktor razdvajanja ne daje podatke o stvarnom razdvajanju dva signala, jer ono zavisi od oštine signala, odnosno, od efikasnosti kolone. Zato je uvedena vrijednost R_s , razdvajanje signala, koja predstavlja odnos razmaka između maksimuma dva signala i prosječne širine signala na baznoj liniji:

$$R_s = \frac{t}{\frac{W_{(A)} + W_{(B)}}{2}} = \frac{2t}{W_{(A)} + W_{(B)}} \quad (7.8)$$

Ako je vrijednost R_s manja od 1, nije moguće provesti tačnu kvantitativnu analizu.

7.2.4.1. Osnovne komponente HPLC sistema

Osnovne komponente HPLC sistema su: pumpa, injektor (ručno ili automatsko ubrizgavanje), kolone(a), detektor i uređaja za rukovanje podacima (Slika 7.32.).



Slika 7.32. Shema HPLC sistema (sa dvije spojene kolone)

Pumpa isporučuje otapalo (mobilnu fazu) unutar datog omjera protoka, koji se odnosi na veličinu kolone i izbor detektora. Uzorak se uvodi na ulaz kolone i to najčešće autoinjektorom. Zatim se komponente odvajaju u koloni i eluiraju pomoću spojne cijevi u detektor, a signali se prenose sa detektora na pisač (računar) gdje se odvija rukovanje podacima. Uz odgovarajući softver moguće je u svim koracima u potpunosti kontrolirati HPLC. Ako jedna kolona nije dovoljna, može se dodati još jedna. Prva kolona također može biti kratka zaštitna kolona koja štiti analitičku kolonu.

a) Sistem za napajanje mobilnom fazom

Ovaj sistem se sastoji od rezervoara mobilne faze, degasera, pumpe visokog pritiska i mješača otapala. Rezervoari za mobilnu fazu su svijetle ili zatamnjene staklene boce. Mobilna faza se sastoji od jednog ili više otapala filtriranih kroz $0.45\ \mu\text{m}$ i prečišćenih („UV Cut off“) tako da nemaju apsorpciju u UV području elektromagnetnog spektra. Otapala se mogu miješati u različitim omjerima i tako sipati u rezervoare mobilne faze. Također je moguće miješati otapala tokom hromatografskog odvajanja. Omjer otapala u mobilnoj fazi može biti promjenjiv u vremenu (hromatografski gradijent).

HPLC pumpe su pumpe koje postižu visoke pritiske do 1 200 bara, zahvaljujući safirnom klipom malog prečnika. Pumpe mogu biti binarne ili kvaternarne.

Binarne pumpe miješaju dva otapala, a kvaternarne pumpe mogu miješati četiri otapala. Prije pumpe i poslije rezervoara nalazi se sistem za degaziranje mobilne faze, koji koristi polupropusnu cijev pod vakuumom za ekstrakciju gasova otopljenih u mobilnoj fazi. Ako mobilna faza nije degazirana, u hromatografskom sistemu se oslobađa vazduh, što dovodi do varijacija u pritisku i protoku.

b) Injektor

Uzorak u tečnom stanju se injektira u injekcioni blok HPLC-a pomoću manualnog injektora (Slika 7.33.), sa mikrošpricom ili automatski.



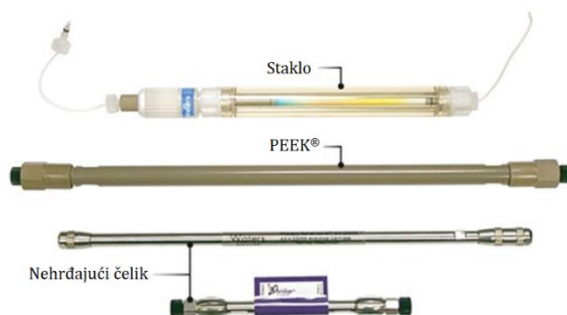
Slika 7.33. Manualni HPLC injektori sa eksternom petljom

Zapremine koje se injektiraju su od 1 do 50 μl , a zavise od dimenzija kolone. Uzorke je potrebno prije injektiranja profiltrirati ili centrifugirati, kako bi se uklonile suspendovane čestice koje mogu da dovedu do porasta pritiska u sistemu i začepljenja.

Injektor mora obezbijediti aplikaciju uzorka bez osjetnog snižavanja radnog pritiska. Kod manualnog injektora najjednostavniji način injektiranja uzorka je mikrošpricom kroz elastičnu membranu, pri čemu problem predstavlja visok unutrašnji pritisak. Kod savremenih HPLC sistema koriste se injektori tipa ventila različite konstrukcije koji nemaju membrane, a omogućavaju injektiranje uzorka bez uticaja na pritisak i protok mobilne faze. Često se koriste aparati čiji je rad potpuno automatizovan (autosampleri) koji sami injiciraju zadati volumen uzorka u hromatografsku kolonu (vidi Sliku 7.20.).

c) Kolona

Kolone za tečnu hromatografiju su metalne, staklene ili plastične cijevi različitog prečnika i dužine (Slika 7.34.).



Slika 7.34. Kolone za tečnu hromatografiju

Na početku razvoja HPLC tehnike prečnik kolona je bio 1-5 cm, a dužina 50-500 cm. Kolone su bile punjene česticama većih dimenzija, prečnika 150-200 μm . Prvi uređaji radili su pod atmosferskim pritiskom, što je rezultiralo malim protokom, a razdvajanje je trajalo više sati. Danas su kolone manjeg prečnika, 0.21-0.5 cm i manje, dužine 5-25 cm, dok je prečnik čestica pakovanja drastično smanjen na 3-10 μm . Čestice stacionarene faze takvih dimenzija stvaraju veliki otpor proticanju mobilne faze. Zbog toga se protok 1-5 ml/min može ostvariti samo primjenom pumpi visokog pritiska. U koloni se komponente na osnovu njihove interakcije sa mobilnom fazom i interakcije sa stacionarnom fazom razdvajaju, pri čemu one sukcesivnom brzinom izlaze iz kolone. Najnoviji uređaji hromatografsko razdvajanje završavaju za samo nekoliko minuta.

d) Detektor

Detektori koji se koriste u tečnoj hromatografiji su posebne konstrukcije, tj. imaju protočnu ćeliju kroz koju prolazi kontinuirana struja mobilne faze sa razdvojenim supstancama iz uzorka. Oni mogu biti univerzalni i selektivni. Detektor koji mjeri indeks refrakcije u eluentu je selektivni detektor i može da mjeri samo spojeve koji zakreću ravan polarizacije svjetla, kao što su šećeri.

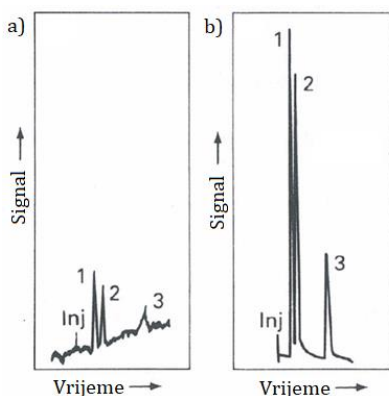
Neki detektori mogu da daju informaciju o identitetu spoja. Najčešće korišteni detektori su univerzalni detektor je UV-VIS i elektrohemijski detektor (Slika 7.35.).

- *Univerzalni UV-VIS detektor*

Ovaj detektor koristi provođenje monohromatske svjetlosti, određene talasne dužine, kroz ćeliju povezanu sa HPLC sistemom i mjerenje apsorbance u funkciji vremena. Komponente koje apsorbiraju svjetlost (hromofori) povećavati će mjerenu apsorbanciju, što će se manifestovati pojavom pikova, čija je površina direktno proporcionalna koncentraciji hromofora. Količina apsorbirane svjetlosti također zavisi od korištene talasne dužine, pri čemu svakoj komponenti odgovara specifična talasna dužina na kojoj data komponenta pokazuje maksimum apsorpcije. UV detektor je popularan zato što je jednostavan za korištenje i činjenica je da mnoge komponente apsorbiraju svjetlost različitih talasnih dužina.

- *Elektrohemijski detektor (ECD)*

Kod elektrohemijskih detektora (engl. *Electrochemical Detection*, ECD), umjesto propuštanja svjetlosti kroz ćeliju, primjenjuje se napon na elektrodi koja se dovodi u kontakt sa eluatom iz kolone. Elektroaktivne komponente eluirane kroz kolonu, bilo da imaju sposobnost ka otpuštanju elektrona (oksidaciji) ili prihvatanju elektrona (redukciji) daju pik struje u funkciji vremena. Količina nastale struje proporcionalna je koncentraciji analita i zavisi od primjenjenog napona, koji bi trebao da odgovara naponu oksidacije. ECD su jako osjetljivi i to im daje prednost pri određivanju nekih komponenti kod HPLC sistema.



Slika 7.35. a) UV-Vis hromatogram; b) ECD hromatogram

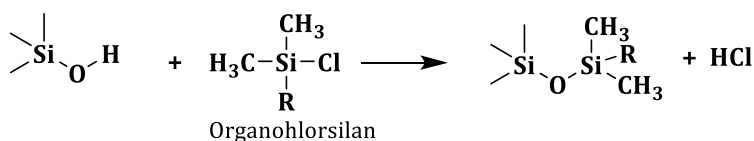
7.2.4.2. Podjela hromatografije

Prema prirodi stacionarne faze i prirodi razdvajanja tečnu hromatografiju možemo podijeliti na: podionu, adsorpcionu, jonoizmjenjivačku i ekskluzionu.

- *Podiona (tečno-tečna) hromatografija*

U ovoj vrsti hromatografije supstance se razdvajaju preraspodjelom između dvije tečnosti, odnosno, razdvajanje se temelji na različitom koeficijentu preraspodjele. Dvije tečnosti, koje se koriste kao mobilna i stacionarna faza, ne smiju se međusobno miješati. U klasičnoj tečnoj podionoj hromatografiji stacionarna tečna faza samo je fizički navučena preko čestica čvrstog nosača (punila). U ovom slučaju, mobilna i stacionarna faza moraju biti zasićene jedna drugom da ne bi došlo do spiranja stacionarne faze sa punila.

U modernoj hromatografiji daleko se više upotrebljavaju vezne faze, kod kojih je stacionarna tečna faza hemijskim putem vezana na punilo. Ova hromatografija se često naziva *vezno-faznom tečnom hromatografijom*. Punila s hemijski veznom fazom obično se pripremaju reakcijom organohlorsilana sa hidroksilnim grupama na površini silikagela:



Ova punila su mnogo stabilnija od punila na kojima je stacionarna faza vezana fizikalnim silama. Na osnovu polariteta stacionarne i mobilne faze *podionu (tečno-tečnu) hromatografiju* možemo podijeliti na: *normalno-faznu tečnu i reverzno-faznu tečnu*.

a) *Normalno-fazna tečna hromatografija*

Kod normalno-fazne tečne hromatografije stacionarna faza je polarna, a mobilna faza relativno nepolarna. Najčešće korištena stacionarna faza je alkilamin vezan za silikagel (Tabela 7.3.). Mobilna faza je najčešće organsko otapalo kao heksan, heptan, dihlormetan i etilacetat. Mehanizam separacije normalno-fazne tečne hromatografije predstavljen je sposobnošću analita da potiskuje molekule mobilne faze adsorbovane kao monosloj na površini stacionarne faze.

Ova hromatografija se koristi kada je analit polaran. Polaran analit se adsorbira i zadržava na česticama stacionarne faze. Redoslijed eluiranja analita je sljedeći: najmanje polarni analit će eluirati prvi, a analit najvećeg polariteta eluirat će zadnji. Jačina adsorpcije je veća što je veća polarnost analita, a samim time veće je i retenciono vrijeme. Korištenjem polarnijih otapala u mobilnoj fazi smanjuje se retenciono vrijeme. Normalno-fazna tečna hromatografija je pogodna za ispitivanje sintetskih polimera, alkohola, alkaloida, aromatskih spojeva i drugih. Međutim, ova vrsta hromatografije se sve manje upotrebljava zbog slabe reproducibilnosti i zbog promjena na česticama stacionarne faze pod uticajem otapala, kao i sa razvojem reverzno-fazne tečne hromatografije.

Tabela 7.3. Stacionarne faze koje se najčešće koriste u HPLC

Hromatografija	Priroda stacionarne faze	Tip površine
Adsorpciona	Oktilsilan	Porozna
	Silicij-dioksid	Opnasta
	Aluminij-trioksid	Opnasta
	Silicij-dioksid	Mikroporozna
	Aluminij-trioksid	Mikroporozna
	Oktadecilsilan (ODS)	Opnasta
	Oktadecilsilan (ODS)	Porozna
Tečno-tečna (podiona)	Oktadecilsilan (ODS)	Porozna
	Alkilamin	Porozna
	Jaka baza	Porozna
	Slaba baza	Porozna
Jonoizmjenjivačka	Jaka kiselina	Porozna
	Jaka baza	Opnasta
	Slaba baza	Opnasta
	Jaka kiselina	Opnasta
	Staklo	Čvrsta
Ekskluzivna (gel-permeaciona)	Polistiren-divinilbenzen	Polukruti gel
	Agaroza	Mekan gel
	Polivinilklorid	Polukruti gel

b) Reverzno-fazna tečna hromatografija

Razdvajanje kod reverzno-fazne tečne hromatografije se ne zasniva samo na preraspodjeli između dvije tečne faze, nego na razdvajanje istovremeno utiče preraspodjela, adsorpcija i površinska napetost između dvije faze koje

se međusobno ne mješaju. Kod reverzno-fazne tečne hromatografije stacionarna faza je nepolarna, a mobilna faza relativno polarna.

Najčešća korištena stacionarna faza je silikatna, tretirana sa RMeSiCl , gdje je R alkilna grupa ravnog lanca kao oktadecil- ($\text{C}_{18}\text{H}_{37}$) ili oktil- (C_8H_{17}) (Tabela 7.3.). Mobilna faza je najčešće voda ili puferi, metanol, acetnitril ili tetrahidrofuran ili njihova smješa. Vrijeme retencije je duže za manje polarne analite. Vrijeme retencije se povećava dodatkom polarnog otapala mobilnoj fazi, a smanjuje dodatkom nepolarnog (hidrofobnog) otapala. Kod reverzno-fazne tečne hromatografije najpolarniji analit se eluira prvi. Na brzinu eluiranja utiče pH, zbog mogućnosti promjene polarosti analita. Zbog toga se često u mobilnu fazu dodaju puferi. Reverzno-fazna tečna hromatografija je najčešće korištena hromatografija za analitičku separaciju složenih spojeva u hemiji, biologiji, farmaceutskoj i biohemijskoj nauci.

- *Adsorpciona (tečno-čvrsta) hromatografija*

Kod tečno-čvrste adsorpcione hromatografije razdvajanje se temelji na međusobnoj interakciji polarnih funkcionalnih grupa stacionarne faze i molekula otopljene supstance u uzorku. U adsorpcionoj hromatografiji kao stacionarna faza najčešće se koristi silikagel. Površina silikagela je pokrivena polarnim grupama, koje ulazi u interakciju sa molekulama uzorka. Otapala koja se koriste kao mobilna faza u adsorpcionoj hromatografiji su heksan, izo-oktan, hloroform, acetonitril, metanol i voda. Mobilna faza je relativno nepolarna i to je obično smješa nekog nepolarnog otapala uz prisustvo polarnog otapala, koji je modifikator polarosti. Kao modifikatori polarosti koriste se voda, alkoholi i hlorirani ugljikovodici. Adsorpciona hromatografija je pogodna za razdvajanje supstanci umjerene polarosti. Supstance koje su izrazito nepolarne ne zadržavaju se na površini adsorbensa, a jako polarne supstance se čvrsto vežu i teško eluiraju sa stacionarne faze. Adsorpciona hromatografija se najčešće koristi u analitici steroida, vitamina, amina, barbiturata, antioksidanasa, pesticida i drugih supstanci.

- *Jonoizmjenjivačka hromatografija*

Joni i jonizovane molekule dobro se razdvajaju i analiziraju na jonoizmjenjivaču kao stacionarnoj fazi. Stacionarna faza je kationski ili anionski jonoizmjenjivač, izrađen od visokomolekularnih polimera ili silikagela za koje su hemijskim putem vezane jonske grupe.

Kationski jonoizmjenjivač ima vezane ostatke sulfonskih ili karbonskih kiselina, a anionski kvarternerne amonijum grupe. Mobilna faza je vodena otopina kiselina, baza ili soli. Na hromatografsko razdvajanje utiču tri osobine mobilne faze, i to: jonska jačina, pH vrijednost i organski modifikatori. Najveći uticaj ima jonska jačina, koja zavisi od koncentracije i naelektrisanja jona u mobilnoj fazi. Izbor organskog modifikatora je bitan kod razdvajanja organskih spojeva koji su netopivi u vodi, a mogu se jonizirati. Step en jonizacije slabih baza i slabih kiselina mjenja se sa koncentracijom hidrogen jona i na taj način pH vrijednost mobilne faze utiče na razdvajanje, odnosno na izmjenu jona. Ova vrsta hromatografije se koristi u analitici elektrolita i jonizovanih uzoraka kao što su organske kiseline i slične supstance

- *Ekskluziona (gel-permeaciona) hromatografija*

Ekskluzivna hromatografija se bazira na fenomenu gel filtracije. U gel filtraciji supstance se razdvajaju prvenstveno prema veličini molekula, ali na razdvajanje utiče i priroda molekula. Molekule uzorka manjih dimenzija ulaze u punila kolone, veće molekule prolaze mimo punila kolone otopljene u mobilnoj fazi. Tehnika je pogodna za razdvajanje biološkog materijala u vodenoj otopini. Stacionarne faze su čvrsti organski gelovi sa kontrolisanom veličinom pora. Kao mobilna faza najčešće se koristi voda, metilenhlorid, tetrahidrofuran, hloroform, toluen i alkoholi. Ova vrsta hromatografije koristi se u analitici enzima, proteina, nukleinskih kiselina, polisaharida i drugih spojeva velike molekulske mase.

7.3. Metode identifikacije

U identifikaciji biljnog sastojka, nakon što je izoliran i prečišćen, potrebno je prvo odrediti klasu spoja, a zatim saznati koja je supstanca u toj klasi. Klasa spoja obično se određuje pomoću testova boje, njegove topljivosti i R_F svojstava te njegovih UV spektralnih karakteristika.

Potpuna identifikacija unutar klase zavisi od mjerenja drugih svojstava, a zatim upoređivanja tih podataka sa onima u literaturi. Ova svojstva uključuju tačku topljenja (za čvrste materije), tačku ključanja (za tečnosti), optičku rotaciju (za optički aktivne spojeve) i R_F ili RR_t (pod standardnim uslovima).

Međutim, podjednako informativni podaci o biljnoj supstanci su njene spektralne karakteristike: ultraljubičasta (UV), infracrvena (IR), nuklearna magnetna rezonancijska (NMR) i masena spektralna (MS) mjerenja. Poznata biljna supstanca se obično može identifikovati na osnovu gore navedenog.

Direktno poređenje sa autentičnim materijalom (ako postoji), treba izvršiti kao konačnu potvrdu. Ako autentični materijal nije dostupan, pažljivo poređenje sa literaturnim podacima može biti dovoljno za njegovu identifikaciju. Ako je prisutan novi spoj, svi gore navedeni podaci bi trebalo da budu dovoljni da ga karakteriziraju. Kod novih spojeva, međutim, poželjno je potvrditi identifikaciju putem hemijske degradacije ili pripremom spoja laboratorijskom sintezom.

7.3.1. UV-Vis spektroskopija

Spektrofotometrija u vidljivom i ultraljubičastom dijelu spektra (UV-Vis) koristi se za identifikaciju, ispitivanje čistoće i određivanje sadržaja aktivnih i pomoćnih ljekovitih supstanci. Princip UV-Vis metode je molekularna apsorpciona spektrofotometrija. Apsorpcija svjetla u ultraljubičastom (180-350 nm) i vidljivom (350-800 nm) području uzrokuje pobuđivanje elektrona u π i σ vezama, kao i tzv. n elektrona koji nisu direktno uključeni u obrazovanje veze već su locirani u orbitalama kisika, nitroгена i sumpora.

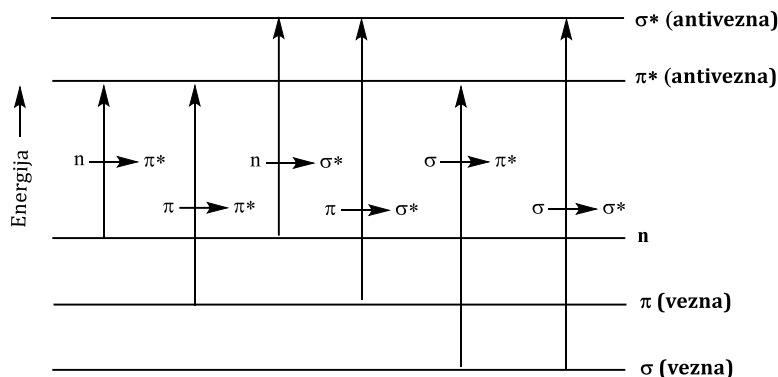
7.3.1.1. Elektronski prelazi

Apsorpcija svjetla izaziva prelaz elektrona sa vezujuće orbitale na antivezujuću. Tri su vrste elektronskih prelaza (Slika 7.36.): prelazi koji uključuju p , s i n elektrone, prelazi koji uključuju elektronski prijenos naelektrisanja, prelazi koji uključuju d i f elektrone.

Apsorpcija je u organskim molekulama ograničena određenim funkcionalnim grupama (hromoforima) koje sadrže valentne elektrone niske energije pobuđivanja.

Prelazi $\sigma \rightarrow \sigma^*$

Elektron u veznoj s orbitali pobuđen je u odgovarajuću antiveznu orbitalu, a potrebna energija je velika. Na primjer metan (koji ima samo C-H veze, može imati samo $\sigma \rightarrow \sigma^*$ prelaze) pokazuje apsorpcijski maksimum kod 125 nm, pa se ne vidi u UV-Vis spektru (200-700 nm).



Slika 7.36. Mogući elektronski prelazi p , s i n elektrona

Prelazi $n \rightarrow \sigma$

Zasićeni spojevi koji sadrže atome sa slobodnim elektronskim parovima (nevezni elektroni) sposobni su za $n \rightarrow \sigma$ prelaze, međutim takvih organskih spojeva je malo. Za ovakve prelaze obično je potrebno manje energije nego za $\sigma \rightarrow \sigma^*$ prelaze. Oni mogu biti inicirani svjetlom čije su valne dužine u području 150 - 250 nm.

Prelazi $n \rightarrow \pi$ i $\pi \rightarrow \pi^*$

Organski spojevi s najviše prelaza n ili π elektrona u pobuđeno stanje. Za takve prelaze potrebna je nezasićena grupa u molekuli s π elektronima. Molarna ekstinkcija za n prelaze je relativno niska 10 - 100 ($\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$), dok prelazi $\pi \rightarrow \pi^*$ imaju molarnu ekstinkciju između 1000 i $10\,000$ ($\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Apsorpcija svjetla u ultraljubičastom i vidljivom području koriste se za kvantitativnu i kvalitativnu analizu organskih i neorganskih supstanci. Valna dužina na kojoj dolazi do maksimuma apsorpcije λ (max) ovisna je o strukturi molekula i koristi se za identifikaciju organskog spoja. U ultraljubičastom i vidljivom području kao jedinica za valnu dužinu upotrebljava se nanometar (nm).

Osnova na kojoj se temelji primjena spektroskopije u kvantitativnoj analizi je Lamber-Berrov zakon, koji kaže da je količina apsorbirane svjetlosti direktno proporcionalna sa koncentracijom molekula koje apsorbiraju. Izraz $\log I_0/I$ naziva se apsorbancija (A), ekstinkcija (E) ili optička gustoća (D) definisan je kao logaritam odnosa intenziteta ulaznog i propuštenog svjetla, a može se predstaviti jednačinom:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = Kcl \quad (7.9)$$

A-apsorbancija; **I**₀-intenzitet upadnog svjetla; **I**-intenzitet izlaznog svjetla; **c**-koncentracija supstance; **l**-debljina sloja; **K**-konstanta

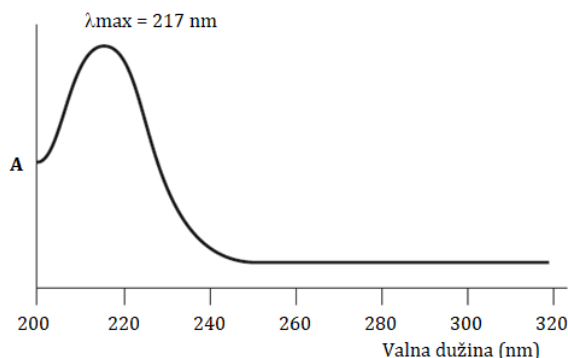
Konstanta **K** naziva se apsorpcioni, odnosno ekstinkcioni koeficijent i mjera je intenziteta apsorpcije na određenoj talasnoj dužini. Molarni apsorpcioni koeficijent, odnosno molarni ekstinkcioni koeficijent (ϵ) predstavlja apsorpciju uzorka debljine 1 cm u koncentraciji mol/l.

$$\epsilon = \frac{A}{cl} \quad (7.10)$$

ϵ -molarni apsorpcioni koeficijent; **A**-apsorbancija; **l**-debljina sloja;
c-molarna koncentracija

UV-Vis apsorpcijski spektar, kojeg karakteriziraju dva parametra: valna dužina (λ_{\max}) na kojoj je intezitet apsorpcije najveći i vrijednost ϵ na toj valnoj dužini, izraz je koji se koristi za opisivanje dobivenog dijagrama. Kao primjer prikazan je apsorpcijski spektar butadiena na Slici 7.37.

Standardni UV-Vis spektrofotometar ozračuje uzorak valnim džinama svjetlosti u rasponu od 200 do 800 nm. Svjetlost se prvo dijeli na dva snopa. Jedna zraka prolazi kroz kivetu (mali stakleni spremnik) koja sadrži organski spoj otopljen u nekom otapalu, dok druga zraka (referentna zraka) prolazi kroz kivetu koja sadrži samo otapalo. Spektrofotometar zatim uspoređuje intenzitete zraka na svakoj pojedinoj valnoj dužini, a rezultati se ucrtavaju na dijagram koji prikazuje apsorbanciju kao funkciju valne dužine.



Slika 7.37. Spektar apsorpcije butadiena

Instrumenti koji se upotrebljavaju za mjerenje intenziteta apsorpcije u ovoj oblasti su kolorimetri i spektrofotometri (Slika 7.38.b). Najvažniji dijelovi ovih instrumenata su: izvor zračenja, monohromatori i optički sistemi, detektorski sistemi i registratori (Slika 7.38.a).



Slika 7.38. a) Osnovni dijelovi kolorimetra i spektrofotometra; b) Komercijalni kolorimetar, model LICO 690, Hach i UV-VIS spektrofotometra model UV-1280, Shimadzu. Registracija signala i intenziteta apsorpcije svjetlosti se vrši praćenjem vrijednosti za ekstinkciju priključenjem aparata za pisač, integrator ili vezivanje na računske sisteme.

Uzorak za mjerenje se priprema otapanjem u odgovarajućem otapalu, koje mora biti transparentan za područje u kojem se vrši mjerenje.

Izbor otapala u vidljivoj i ultraljubičastoj spektroskopiji je mnogo širi nego u infracrvenoj spektroskopiji. Položaj apsorpcionom maksimuma može biti pomjeren usljed uticaja otapala.

Za mjerenje u vidljivom području upotrebljavaju se staklene kivete, a za mjerenje u ultraljubičastom području upotrebljavaju se kvarcne kivete, jer staklo apsorbira u ultraljubičastom području.

7.3.1.2. Utjecaj otapala na UV-Vis spektar

Izabrano otapalo ne bi smjelo apsorbirati UV u istom području kao i uzorak. Najčešće upotrebljavana otapala za područja oblasti valnih dužina u kojima se mogu upotrebljavati navedeni su u Tabeli 7.4.

Tabela 7.4. Otapala koja se najčešće koriste kod UV-Vis

Otapalo	Upotrebljivo iznad (nm)
Voda (H ₂ O)	205
Metanol (CH ₃ OH)	210
Etanol (CH ₃ CH ₂ OH)	210
Dietileter [(CH ₃ CH ₂) ₂ O]	210
Tetrahidrofuran	220
Acetonitril (CH ₃ C≡N)	210
Cikloheksan	210
Metilcikloheksan	210
Dihlormetan (CH ₂ Cl ₂)	235
Hloroform (CHCl ₃)	245
Ugljiktetrahlorid (CCl ₄)	265
N,N-dimetilformamid	270
Benzen	280
Aceton	330

Otapalo koje se najčešće koristi za UV spektroskopiju je 95% etanol jer većina klasa spojeva pokazuje neku topivost u njemu. Komercijalni apsolutni alkohol treba izbjegavati jer sadrži rezidualni benzen koji se upija u kratkom UV zraku. Ostala otapala koja se često koriste su voda, metanol, heksan, petrolej i etar. Otapala kao što su hloroform i piridin općenito treba izbjegavati jer oni snažno apsorbiraju u području od 200-260 nm. Međutim, oni su prilično pogodni za mjerenje u vidljivom području spektra s biljnim pigmentima kao što su karotenoidi.

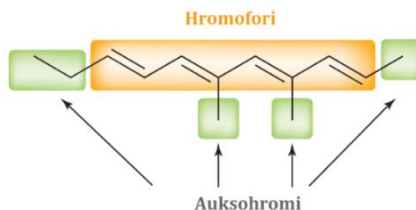
Uvijek se uz UV spektar mora navesti i otapalo. Utjecaji konjugacije i/ili otapala izazivaju promjene u apsorpcijskim maksimumima, koje se definiraju na sljedeći način:

- Batohromni pomak je pojava da uslijed supstitucije ili zbog otapala dolazi do većih apsorpcijskih maksimuma, pa se takav pomak naziva i crvenim pomakom (*red shift*).
- Hipsokromni pomak je pomak ka manjim valnim dužinama ili plavi pomak (*blue shift*).

Ukoliko nekom promjenom uslova dolazi do povećanje intenziteta apsorpcije, govorimo o hiperhromnom efektu, dok je suprotni efekt hipohromni.

7.3.1.3. Hromofori

Područje molekule odgovorno za apsorpciju svjetla (konjugirani π sistem) naziva se hromofor, dok se grupe vezane na hromofor nazivaju auksohromi, na primjer:



Auksohromi su grupe s neveznim elektronima koje vezane za hromofor mijenjaju valnu dužinu i intenzitet apsorpcije. Auksohromi ne moraju apsorbirati u području 200-800 nm, ali utiču na spektar hromofora za koji su vezani. Najvažnije auksohromne grupe su OH, NH₂, Cl, CH₃ i NO₂. Boja molekula može biti pojačana auksohromima. U Tabeli 7.5. prikazane su apsorpcije jednostavnih nekonjugiranih hromofora. Karakteristične hromoforne grupe su:

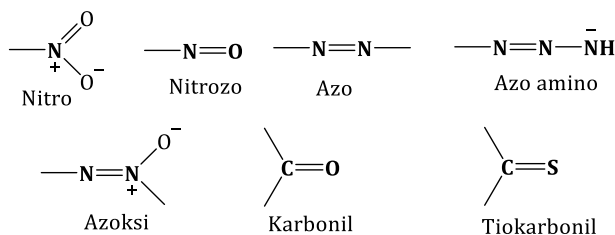






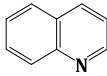
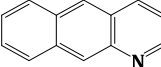
Tabela 7.5. Apsorpcije jednostavnih nekonjugiranih hromofora

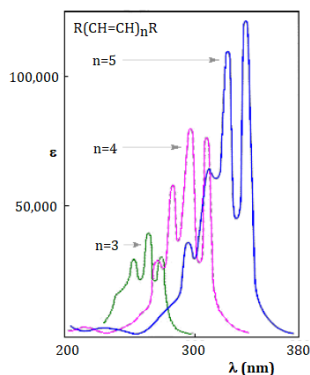
Hromofor	σ -vezni elektroni	slobodni elektronski parovi			π -vezni elektroni		
	$\begin{array}{c} \diagup \text{C} \text{---} \text{C} \diagdown \\ \diagdown \text{C} \text{---} \text{C} \diagup \\ \\ \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \diagup \text{C} \diagdown \\ \\ \text{C} \end{array}$	$\begin{array}{c} \diagup \text{N} \diagdown \\ \\ \text{N} \end{array}$	$\begin{array}{c} \diagup \text{S} \diagdown \\ \\ \text{S} \end{array}$	$\begin{array}{c} \diagup \text{C}=\text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{C}=\text{O} \diagup \end{array}$	$\begin{array}{c} \diagup \text{C}=\text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{C}=\text{O} \diagup \end{array}$	$\begin{array}{c} \diagup \text{C}=\text{C} \diagdown \\ \diagdown \text{C}=\text{C} \diagup \end{array}$
Oznaka prelaza	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	$n \rightarrow \sigma^*$	$n \rightarrow \sigma^*$	$n \rightarrow \sigma^*$	$n \rightarrow \sigma^*$	$n \rightarrow \pi^*$	$\pi \rightarrow \pi^*$
λ_{max} (nm)	~150	~185	~195	~195	~190	~300	~190

7.3.1.4. Uticaj povećanja konjugacije na apsorpcijski spektar

Povećanje konjugacije uzrokuje batohromni pomak, odnosno pomicanje maksimuma apsorpcije prema većim valnim dužinama i povećanje maksimuma apsorpcije, tj. hiperhromni pomak. U Tabeli 7.6. su prikazane valne dužine maksimalne apsorpcije za jednostavan dien, trien, tetraen, piridin, hinolin i benzo[g]hinolin. Vidimo da spojevi s većim stepenom konjugacije imaju duži λ_{\max} . Stoga, može se reći da λ_{\max} nekog spoja pokazuje stepen konjugacije prisutne u spoju. Svaka dodatna konjugirana dvostruka veza dodaje između 30 i 40 nm (Slika 7.39.).

Tabela 7.6. Valne dužine maksimalne apsorpcije za spojeve koji sadrže dvostruke veze

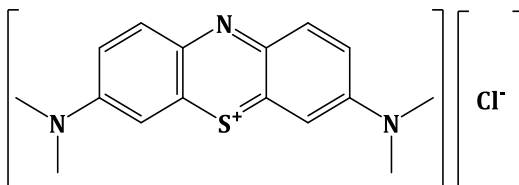
Spojevi sa = vezama	λ_{\max} (nm)
	217
	258
	290
	250
	290
	300



Slika 7.39. Uticaj povećanja konjugacije na apsorpcijski spektar lančanih poliena

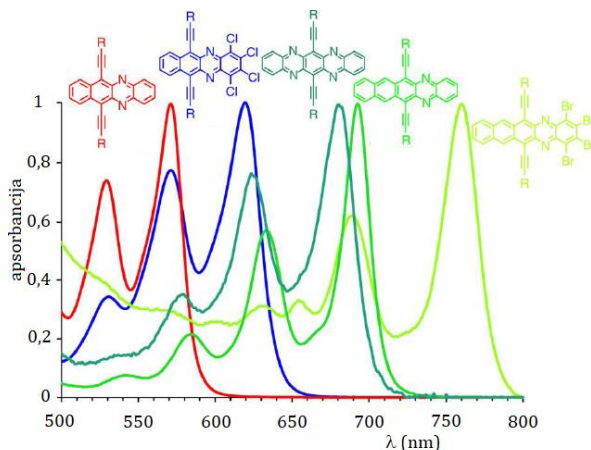
7.3.1.5. Vis spektroskopija

Spoj će apsorbovati u vidljivom području ako ima najmanje pet konjugiranih hromofornih i auksohromnih grupa, kao na primjer metilensko modrilo (Slika 7.40.) koje apsorbira pri 660 nm ili derivati fenazina (Slika 7.41.).



Slika 7.40. Struktura metilenskog modrila (metiltioninijum hlorid)

Kod Vis spektra derivata fenazina jasno se vidi uticaj supstituenata i povećanja konjugacije na Vis spektre.



Slika 7.41. Vis spektri derivata fenazina

7.3.1.6. Apsorpcijski spektri biljnih sastojaka

Spektri apsorpcije biljnih sastojaka mogu se izmjeriti u vrlo razrijeđenoj otopini u odnosu na slijepu probu (otapalo) pomoću spektrofotometra. Za bezbojne spojeve, mjerenja se vrše u rasponu od 200 do 400 nm, za obojene spojeve, opseg je od 200 do 700 nm. Kada se supstance izoluju kao kristalni spojevi i njihove molekulske težine su poznate ili se mogu odrediti, tada se intenziteti maksimuma valne dužine normalno bilježe u terminima $\log \epsilon$. Kod spojeva kod kojih nisu poznate ni koncentracija ni molekularna težina, moraju se koristiti vrijednosti apsorpcije.

U tim slučajevima, visine različitih maksimuma mogu se usporediti uzimajući u obzir apsorbancije kao postotak one na najintenzivnijem vrhu.

Pročišćavanje je bitno kod spektralne studije za biljne sastojke koji pokazuju karakteristična svojstva apsorpcije. Takve uzorke treba više puta pročišćavati dok ta svojstva ne postanu konstantna.

Korisnost spektralnih mjerenja u svrhu identifikacije može se poboljšati ponavljanjem mjerenja u neutralnoj otopini, bilo u rasponu različitih pH vrijednosti ili u prisutnosti određenih anorganskih soli. Na primjer, kada se baze dodaju alkoholnim otopinama fenolnih spojeva, spektri su karakteristično pomaknuti prema dužim valnim dužinama (podvrgnuti su batohromskim pomacima) s povećanjem apsorbancije. Nasuprot tome, kada se baza doda neutralnim otopinama aromatskih karboksilnih kiselina, pomak je u suprotnom smjeru prema kraćim valnim dužinama (hipsohromni pomaci). Reakcije kao što su hemijska redukcija (s natrijevim borohidridom) ili enzimska hidroliza mogu se jednako dobro pratiti u ćelijskoj kiveti spektrofotometra za snimanje, a mjerenja apsorpcije u redovnim vremenskim intervalima pokazat će je li došlo do redukcije ili hidrolize.

Vrijednost UV vidljivog spektra u identifikaciji nepoznatih sastojaka očito je povezana s relativnom složenošću spektra i općim položajem maksimuma valne dužine. Ako supstanca pokazuje jednu apsorpcionu traku između 250 i 260 nm, to može biti bilo koji od velikog broja spojeva (npr. jednostavan fenol, purin ili pirimidin, aromatična aminokiselina itd.). Ako, međutim, pokazuje tri različita vrha u području od 400-500 nm, sa malom apsorpcijom na drugim mjestima, gotovo je sigurno karotenoid. Nadalje, spektralna mjerenja u dva ili tri druga otapala i poređenje sa literaturnim podacima mogu čak ukazati o kojem se konkretnom karotenoidu radi.

Navedene tvrdnje upućuju na to da su apsorpcijski spektri od posebne vrijednosti u proučavanju biljnih pigmenta, a to svakako vrijedi i za biljne boje topive u vodi i u lipidima (Tabela 7.7.).

Druge klase koje pokazuju karakteristična svojstva apsorpcije uključuju nezasićene spojeve (posebno poliacetilene), aromatične spojeve općenito (npr. hidroksicimetne kiseline) i ketone. Potpuno odsustvo UV apsorpcije također pruža neke korisne strukturne informacije.

Ukazuje na prisustvo zasićenih lipida ili alkana u lipidnim frakcijama biljnih ekstrakata, ili organskih kiselina, alifatskih aminokiselina ili šećera u frakcijama topivim u vodi.

Tabela 7.7. Spektralna svojstva različitih klasa biljnog pigmenta

Klasa pigmenta	Vidljivi spektralni raspon (nm)*	Ultraljubičasti raspon (nm)
Hlorofili (zeleni)	640-660 i 430-470	intenzivna kratka UV apsorpcija zbog vezivanja proteina
Fikobilini (crveni i plavi)	615-650 ili 540-570	-II-
Citohromi (žuti)	545-605 (mala grupa ponekad na 415-440)	-II-
Antocijani (ljubičasti ili crveni)	475-550	Ca.275
Betacijanini (ljubičasti)	530-554	250-270
Karotenoidi (žuti do narandžasti)	400-500 (glavni vrh s dva manja vrha ili pregiba)	-
Antrahinoni (žuti)	420-460	3-4 intenzivna vrha između 220 i 290
Halkoni i auronni (žuti)	365-430	240-260
Žuti flavonoli (žuti)	365-390	250-270

* Sve vrijednosti su približne; stvarne vrijednosti variraju ovisno o korištenom otapalu, pH i fizičkom stanju pigmenta.

7.3.2. Infracrvena (IR) spektroskopija

Infracrvena spektroskopija (engl. *Infrared spectroscopy*, IR) također je važna metoda u prikupljanju informacija o strukturi i prepoznavanju hemijskih spojeva, ali služi i kao analitičko sredstvo za određivanje čistoće/kvantifikacije spojeva. IR koristi infracrveni dio elektromagnetskog spektra. To su elektromagnetni valovi većih valnih dužina i nižih frekvencija od vidljivog dijela spektra. Infracrveni dio elektromagnetnog spektra podijeljen je u tri područja:

- blisko infracrveno područje 0,8-2,5 μm (12000-4000 cm^{-1}),
- srednje infracrveno područje 2,5-15 μm (4000-667 cm^{-1}),
- daleko infracrveno područje 15-200 μm (667-50 cm^{-1}).

Većina organskih molekula sa karakterističnim funkcionalnim grupama apsorbira u području od 2,5 do 15 μm (4000-667 cm^{-1}).

Pozicija apsorpcije se izražava u jedinicama za valnu dužinu (μm) ili u vrijednostima za valni broj u (cm^{-1}), a jedni u druge se prevode:

$$\mu\text{m} = \frac{10^4}{\text{valni broj}}; \text{valni broj} = \frac{10^4}{\mu\text{m}} \quad (7.11)$$

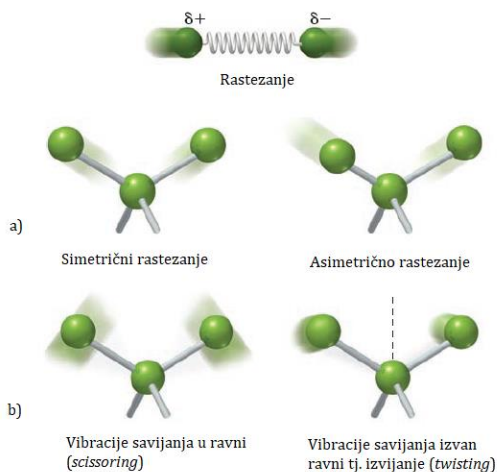
IR spektroskopija koristi činjenicu da molekuli apsorbuju određene frekvencije, što je karakteristika njihove strukture. Molekula apsorbira one frekvencije (to su rezonantne frekvencije) koje odgovaraju vibracijskim frekvencijama veza i funkcionalnih grupa u molekuli. Atomi u molekuli vibriraju neprekidno, izazivajući promjenu dužine veze i orijentaciju atoma u odnosu na osu veze.

Vibracije u molekuli zavise od mase atoma, prostornog rasporeda i jačine veze. Po ovim osobinama razlikujemo jednu molekularnu vrstu od druge, iz čega slijedi da je infracrveni spektrogram jedinstvena karakteristika za određenu molekularnu vrstu.

Kod apsorpcije elektromagnetnog zračenja u infracrvenom području razlikujemo dva tipa vibracija:

- rastezanje (*stretching*), kojima odgovaraju veće vrijednosti valnog broja (Slika 7.42.a) i
- savijanje (*bending* ili deformacijske vibracije), kojima odgovaraju niži valni brojevi, a koje mogu biti simetrične i asimetrične (Slika 7.42.b).

Dakle, postoje različite vrste vibracija rastezanja i savijanja uzrokovanih apsorpcijom energije infracrvenog spektra. Stvarne relativne frekvencije vibracija mogu se predvidjeti. Veze s "lakšim" atomima vibriraju uvijek brže od onih s "težim" atomima. Trostruke veze (koje su jače) vibriraju pri višim frekvencijama od dvostrukih veza, dok dvostruke veze vibriraju pri višim frekvencijama od jednostrukih veza. IR spektri se dobijaju stavljanjem uzorka u jednozračni ili dvozračni infracrveni spektrofotometar, uz registraciju apsorbiranog zračenja.

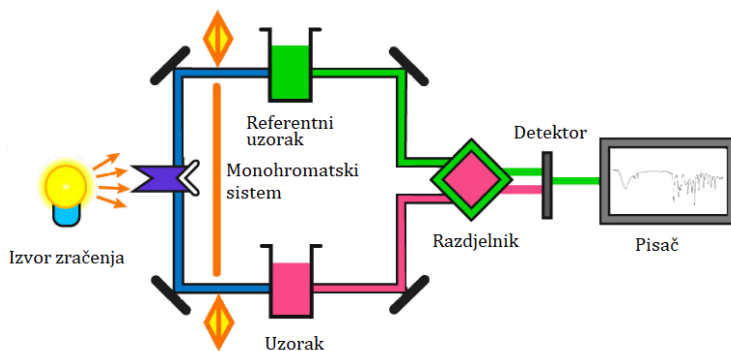


Slika 7.42. Vrste vibracija. (a) rastezne vibracije i (b) vibracije savijanja

Osnovni dijelovi iz kojih je izrađen infracrveni spektrofotometar su: izvor zračenja, monohromator i optički sistem, detektor i sistem za registraciju signala (Slika 7.43.).

Kao izvor zračenja najčešće se upotrebljava Nernstov štapić, koji je izrađen od cirkoniju, torijum ili litijum-oksida, koji se zagrijava na 1500-200 °C. Nernstov štapić je dobar izvor IR zračenja i gotovo se u potpunosti podudara sa kontinuiranim zračenjem crnog tijela. Globarov štapić je napravljen od silicijum-karbida i može se zagrijati na 1200-1700 °C.

Za dobijanje monohromatskog svjetla u IR spektroskopiji upotrebljavaju se prizme ili difrakcione rešetke. Prizme su napravljene od monokristala NaCl ili KBr jer je taj materijal transparentan za područje 0.2-15 μm.



Slika 7.43. Shema infracrvenog spektrofotometra

Za detekciju apsorbovanog zračenja služi nekoliko vrsta detektora: termopar, bolometri i pneumatski detektori.

- termopar ima široku primjenu i sastoji se od zacrnjene zlatne folije i dva semikonduktora,
- bolometri služe za detekciju IR zračenja, kod kojih se detekcija zasniva na mjerenju električnog otpora sa promjenom temperature,
- pneumatski detektori predstavljaju metalni cilindar napunjen ksenonom, koji na jednom kraju ima metalnu dijafragmu, a na drugom tamnu metalnu pločicu.

Kada zračenje padne na metalnu pločicu, dolazi do povećanja ekspanzije ksenona, koji utiče na deformaciju dijafragme.

Gibanje dijafragme prati se refleksijom svjetlosti. Registrovane promjene u detektoru prenose se preko pojačivača na uređaj za registraciju. Tehnika pripreme uzorka za snimanje zavisi od agregatnog stanja uzorka. Za snimanje gasova koriste se gasne ćelije.

U standardnim gasnim ćelijama debljina sloja je obično 10 cm, a upotrebljavaju se i veće ćelije. Veća debljina sloja postiže se upotrebom specijalnih ćelija reflektiranjem zraka svjetlosti pomoću sistema ogledala, koji su ugrađeni u gasnu ćeliju. Čvrsti uzorak može se snimiti tehnikom KBr pastile, nujlon tehnikom ili u otopini.

- *Tehnika KBr pastile:* Za pripremu KBr pastile uzima se 3-5 mg supstance, a zatim se usitni i homogenizira sa oko 100 mg čistog i osušenog KBr. Ovako dobijena smjesa se pomoću prese presuje u pločicu određenih dimenzija.
- *Tehnika nujlon:* Čvrsti uzorak se može pripremiti za snimanje tako da se nekoliko mg uzorka pomiješa sa parafinskim uljem (nujol), heksahlorbutadienom ili perfluor-kerozinom. Pripremljena suspenzija nanese se između dvije pločice od KBr. Na ovaj način stavljanjem uzorka između pločica KBr mogu se snimiti i viskozne tečnosti.
- *Tehnika u otopini:* Snimanje tečnih uzoraka izvodi se u ćelijama različite debljine, čiji su zidovi od KBr ili NaCl. Ova činjenica ograničava upotrebu većeg broja otapala u IR spektroskopiji.

- Najčešće se upotrebljavaju ugljik disulfid (CS_2), ugljiktetrahlorid (CCl_4) ili hloroform (CHCl_3), apsolutni etanol i druga otapala koja ne sadrže vodu. Za mjerenje vodenih otopina služe kivete čiji su zidovi napravljeni od AgCl.

Ukoliko se ne mogu snimiti IR spektri supstance navedenim tehnikama onda se koriste specijalne tehnike i dodaci kao što je uređaj za refleksiju ATR (engl. *Attenuated total reflectance*) ili FMIR (engl. *Frustrated multiple internal reflectance*).

7.3.2.1. Fourierova transformacija (FT) u IR spektroskopiji

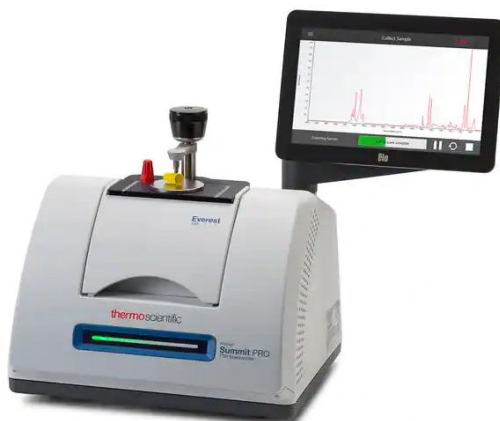
Fourierova transformacija (engl. *Fourier Transform*, FT) ima primjenu kod IR spektroskopije zahvaljujući primjeni elektronskih računara sjedinjeni Michelov interferometar sa matematičkom operacijom koju je uveo Fouruier.

Instrumenti koji su konstruisani na ovom principu imaju ugrađen Michelov interferometar, koji registruje promjene intenziteta monohromatskog interferiranog zračenja i promjene razlike u dužini putanjeinterferirane i reflektovane svjetlosti, što se registruje u formi interferograma.

Fourierova transformacija interferograma, upotrebom elektronskog računara, direktno daje intenzitet zračenja koje prolazi kroz uzorak u zavisnosti od frekvencije, što odgovara IR spektrogramu dobijenom na jednozračnom instrumentu.

Upotrebom FT tehnike ubrzano je snimanje spektra tako da je svedeno na dio sekunde u odnosu na klasične instrumente kod kojih je minimum potrebnog vremena 6 minuta da se dobije spektrogram. Ovim načinom mjerenja dobija se veća osjetljivost, smanjuje se količina uzorka potrebnog za analizu. Moguće je ponavljanje spektra, poređenje snimljenih spektara sa podacima iz biblioteke, kao i druge radnje koje omogućuje računar.

FT IR spektrometar (Slika 7.44.), povezan sa gasnim hromatografom je mnogo doprinio bržoj identifikaciji supstanci podvrgnutih hromatografskom razdvajanju i predstavlja specifičan detektor u gasnoj hromatografiji koji služi za identifikaciju funkcionalnih grupa, identifikaciju uz pomoć pretraživanja biblioteke računara i kvantitativnu analizu.



Slika 7.44. FT IR spektrometar Nicolet™ Summit ,Thermo Scientific

7.3.2.2. Interpretacija infracrvenih spektrograma

Kada govorimo o interpretaciji IR spektra, treba naglasiti da se u IR spektrima generalno interpretiraju samo određeni signali, a da se sve vrpce nikada ne pripisuju nekoj funkcionalnoj grupi. U stvari, tip molekule, vrsta veze koja postoji u posmatranoj molekuli, definiše se iz podataka o valnom broju na kome se pojavljuju određene vrpce u definisanim područjima IR spektra. Na ovaj način se nepoznata molekula može klasifikovati u određenu grupu molekula prema posjedovanju karakterističnih veza/grupa, ali se kroz interpretaciju IR spektra ne može izvesti zaključak o kompletnoj strukturi ispitivane molekule.

Za tako nešto potrebno je kombinovati informacije prikupljene analizom rezultata drugih spektroskopskih odnosno spektrometrijskih tehnika.

IR spektar najčešće se dobiva mjerenjem apsorpcije IR zračenja, premda se koriste i IR emisija i refleksija. IR spektar nekog spoja daje važne informacije o njegovog hemijskoj prirodi i molekulskoj strukturi.

Apsorpcijske vrpce koje odgovaraju vibracijama određenih funkcionalnih grupa su lokalizovani na istim pozicijama u spektru nezavisno od ostatka molekule, što čini IR spektroskopiju korisnom za određivanje prisustva određenih funkcionalnih grupa.

Kada govorimo o ugljikovodicima, treba napomenuti da su karakteristične C-H vibracije rastezanja uvijek u području od 2800-3300 cm^{-1} .

C-H veze u kojima je veći udio s karaktera veze su kraće, jače i pokazuju vibracije pri višim frekvencijama, pa se tako C-H veze na sp centrima javljaju kod 3000-3100 cm^{-1} , C-H veze na sp^2 centrima javljaju se kod 3080 cm^{-1} , dok se C-H veze na sp^3 centrima nalaze kod $\sim 2800\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$. Kada se govori o višestrukim vezama, frekvencije vibracija rastezanja C-C veze su jedine koje su korisne. Tako C-C dvostruke veze pokazuju signale pri 1620-1680 cm^{-1} , dok C-C trostruke veze pokazuju signale pri 2100-2260 cm^{-1} . Svi ovi signali odsutni su u simetričnim dvostrukim i trostrukim vezama.

U Tabeli 7.8. dat je pregled svih karakterističnih područja vrpce za određene tipove veza, pojedine funkcionalne grupe molekula.

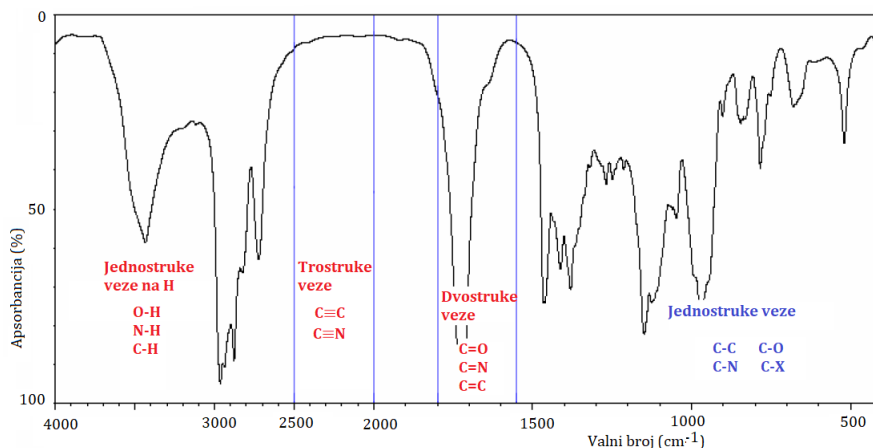
Prema karakterističnim područjima vrpce za određene tipove veza u pojedinim funkcionalnim grupama molekula može se dobiti uvid u to kojoj grupi spojeva pripada određena/ispitivana molekula. Oni su naglašeni uz frekvencije i intenziteti vrpce, koji su u pojedinim slučajevima veoma karakteristični za određenu funkcionalnu grupu. Pri pregledu podataka, posebnu pažnju treba obratiti na podatke koji se odnose na alkeni i arome, gdje se tip supstitucije na dvostrukoj vezi ili na aromatičnom prstenu može definisati na osnovu karakterističnih vrpce u području „otiska prsta“.

Područje od 500-1500 cm^{-1} , naziva se područje „otiska prsta“ (*fingerprint region*), prema kojem se može sa potpunom sigurnošću može utvrditi da li je identična molekula ili ne upoređivanjem dva infracrvena spektra. IR spektar molekule obično sadrži veliki broj pikova. Dodatni pikovi rezultat su preklopljenih (overtone, harmonic) pikova koji su slabiji i niže frekvencije. Međutim jedan infracrveni spektar je zapravo otisak prsta cijele molekule, jer je jedinstven za pojedinu molekulu.

Tabela 7.8. Područja valnih brojeva vibracijskih vrpca i pripadajući intenziteti za grupe organskih molekula

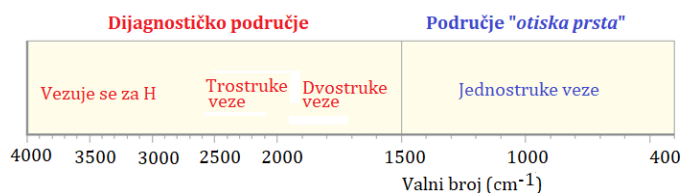
Grupa	Frekvencija (cm ⁻¹)	Intenzitet
A. Alkil		
C-H (istezanja)	2853-2962	srednje jak
izopropil, -CH(CH ₃) ₂	1380-1385 i 1365-1370	jak
tert-butil, -C(CH ₃) ₃	1385-1395 i ~1365	srednje jak
B. Alkenil		
C-H (istezanja)	3010-3095	srednji
C=C (istezanja)	1620-1680	promjenjiv
R-CH=CH ₂	985-1000	jak
R ₂ C=CH ₂	905-920 i 880-900	jak
cis-RCH=CHR	675-730	jak
trans-RCH=CHR	960-975	jak
C. Alkinil		
≡C-H (istezanja)	~3300	jak
C≡C (istezanja)	2100-2260	promjenjiv
D. Aromatičan		
Ar-H (istezanja)	~3030	promjenjiv
Tip aromatske supstitucije: (C-H izvan ravni savijanja)		
Monosupstitucija	690-710 i 730-770	veoma jak
o-Disupstitucija	735-770	jak
m-Disupstitucija	680-725 i 750-810	jak
p-Disupstitucija	800-860	veoma jak
E. Alkonoli, Fenoli i Karboksilne kiseline		
O-H (istezanja)		
Alkoholi, fenoli (razrijeđene otopine)	3590-3650	oštar, promjenjiv
Alkoholi, fenoli (vodikove veze)	3200-3550	širok, jak
Karboksilne kiseline (vodikove veze)	2500-3000	širok, promjenjiv
F. Aldehidi, Ketoni, Estri i Karboksilne kiseline		
C=O (istezanje)	1630-1780	jak
Aldehidi	1690-1740	jak
Ketoni	1680-1750	jak
Estri	1735-1750	jak
Karboksilne kiseline	1710-1780	jak
Amidi	1630-1690	jak
G. Amini: N-H	3300-3500	srednji
H. Nitrili: C≡N	2220-2260	srednji

Tipičan IR spektar je prikazan na Slici 7.45. gdje su predstavljene karakteristične vrpce funkcionalnih grupa u tačno unaprijed definiranim područjima valnih brojeva. Na apscisi je uvijek valni broj (cm^{-1}), a na ordinati apsorbancija (%).



Slika 7.45. Infracrveni (IR)spektar

IR spektri se mogu podijeliti u dva glavna područja: dijagnostičko i područje „otiska prsta“ (Slika 7.46.). Dijagnostičko područje općenito ima manje vrhova i pruža najjasnije informacije. Ovo područje sadrži sve signale koji proizlaze iz dvostrukih veza, trostrukih veza i X-H veza. Područje „otiska prsta“ sadrži signale koji proizlaze iz vibracijskog pobuđivanja većine jednostrukih veza (istezanje i savijanje).

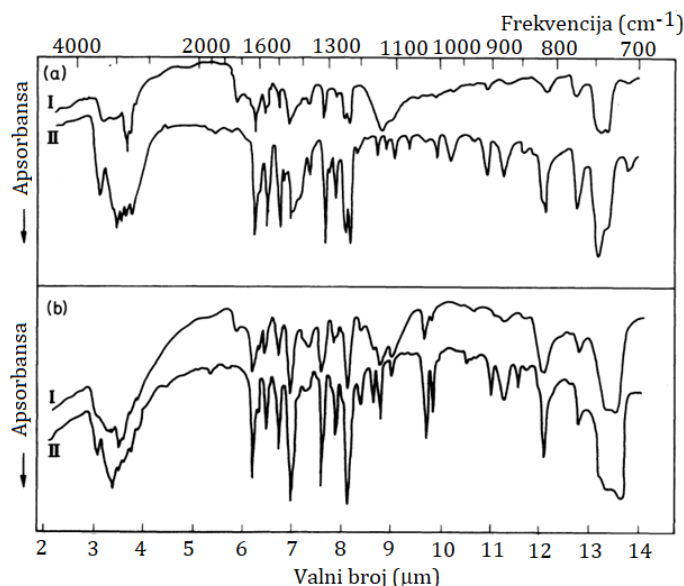


Slika 7.46. Dijagnostička područja i područja otiska prsta IR spektra

Činjenica da se mnoge funkcionalne grupe mogu identificirati prema njihovim karakterističnim frekvencijama vibracija (tabela 7.8) čini IR spektar najjednostavnijom i često najpouzdanijom metodom svrstavanja spoja u njegovu klasu. Unatoč tome, IR spektroskopija se najčešće koristi u fitohemijskim istraživanjima kao alat za „uzimanje otisaka prstiju“, koji omogućuje usporedbu prirodnog sa sintetskim uzorkom (Slika 7.47.).

Složenost IR spektra posebno je pogodna za ovu svrhu i takve su usporedbe vrlo važne u potpunoj identifikaciji mnogih vrsta biljnih sastojaka. Na primjer, IR spektri su se intenzivno koristili za identifikaciju poznatih komponenti eteričnih ulja.

Na Slici 7.47. se jasno vide dvije komponente duhanskog dima u tragovima koje su identifikovane kao baze harman i norharman, koristeći KBr pastila postupak. Može se primijetiti da su neki detalji u području „otisku prsta“ oba alkaloida odsutna u prirodnim uzorcima, vjerojatno zbog prisutnosti tragova nečistoća. Također se može primijetiti da iako su alkaloidi vrlo slični u strukturi (razlikuju se samo po tome što je harman C-metil derivat norharmana) mogu se lako razlikovati po njihovim IR spektrima.



Slika 7.47. Infracrveni spektri dvaju alkaloida iz duhanskog dima. (a) harmane prirodni (I) i sintetski (II); (b) norharmane prirodni (I) i sintetski (II).

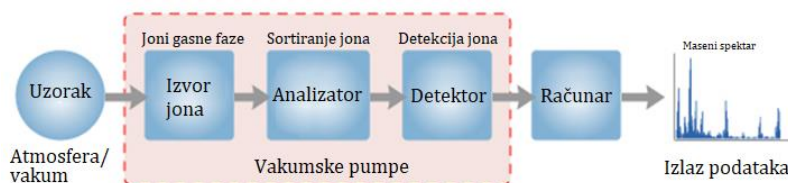
7.3.3. Masena spektrometrija (MS)

Masena spektrometrija (engl. *Mass Spectrometry*, MS) je revolucionirala biohemijska istraživanja prirodnih proizvoda i na mnogo načina je olakšala zadatak fitohemičara. Vrijednost tehnike je u tome što zahtijeva samo mikrogramske količine uzorka, što može dati tačnu molekularnu masu i da može dati složen obrazac fragmentacije koji je često karakterističan za (i može identifikovati) taj određeni spoj.

MS je tehnika kojom se analiziraju molekule na osnovu omjera njihove mase i njihovog naelektrisanja. Primjena masene spektrometrije je neophodna pri ispitivanju strukture supstanci dobijenih sintezom ili izolacijom iz biološkog materijala, praćenju metabolizma, određivanju strukture metabolizma, određivanju raspadnih produkata pri razgradnji lijekova i drugim biomedicinskim istraživanjima.

Dakle MS se koristi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzoraka, određivanje strukture molekula posmatranjem fragmentacije molekula, određivanje molarne mase molekula, određivanje fizičkih i hemijskih svojstava supstanci itd.

U svom najjednostavnijem obliku, maseni spektrometar ima pet komponenti (Slika 7.48.).



Slika 7.48. Shematski prikaz spektrometra masa

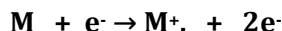
Prva komponenta MS je ulaz za uzorak, koji dovodi uzorak iz laboratorijskog okruženja tj. pritiska od 1 atm do nižeg pritiska masenog spektrometra. Pritisci unutar masenog spektrometra kreću se od nekoliko milimetara žive u izvoru hemijske jonizacije do nekoliko mikrometara žive u oblastima analizatora mase i detektora instrumenta. Ulaz uzorka vodi do izvora jona, gdje se molekule uzorka pretvaraju u jone gasne faze. Nedavno su razvijeni neki instrumenti koji kombiniraju ulaz uzorka i izvor jona u uslovima okoline, čime se uveliko pojednostavljuje priprema uzorka. Joni se zatim ubrzavaju elektromagnetnim poljem. Zatim, analizator mase odvaja uzorke jona na osnovu njihovog omjera mase i naelektrisanja (m/z). Jone broji detektor, a signal se snima i obrađuje u sistemu podataka, obično personalnom računaru. Izlaz iz sistema podataka je maseni spektar tj. grafikon broja detektovanih jona kao funkcije njihovog m/z omjera.

7.3.3.1. Tehnike jonizacije

Jonizacija molekula ili atoma može se provesti na više od dvadeset načina. Najčešće vrste jonizacije su jonizacija sudarom sa brzim elektronima, hemijska jonizacija, jonizacija u električnom polju sa desorpcijom, jonizacija sa atomima argona, ksenona i drugim, jonizacija sa varnicom, jonizacija sa laserskim zrakama.

- *Jonizacija sa elektronima (EI)*

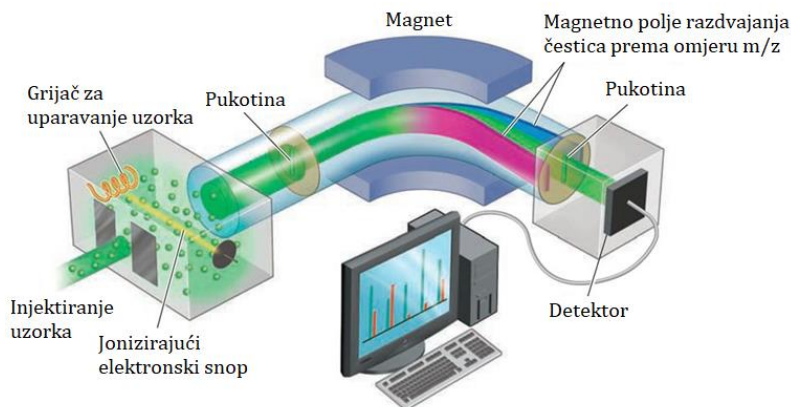
Jonizacija sa elektronima (engl. *Electron Ionization*, EI) (Slika 7.49.) se provodi tako da usijana katoda od volframovog vlakna emituje brze elektrone koje privlači anoda i koji se na svom putu sudaraju sa molekulama uzorka, pri čemu dolazi do izbijanja jednog ili više elektrona iz molekule uzorka i obrazovanja naelektrisanih jona. Razlika u potencijalima između katode i anode predstavlja energiju jonizacije eV. Da bi se eliminisao jedan elektron, potrebno je oko 12 eV, a snimanje se obično provodi na 70 eV, što rezultira velikim viškom energije u molekuli. Izbijanjem jednog elektrona iz molekule obrazuje se jon koji ima istu masu kao i ispitivana supstanca i to je tzv. „molekulski jon“:



Molekulski jon primi više energije nego što je potrebno za izbijanje jednog elektrona, i tako dolazi do pobuđenog stanja, usljed čega dolazi do daljeg cijepanja molekulskog jona i kidanja određenih hemijskih veza, odnosno do fragmentacije molekulskog jona i stvaranja fragmentnih jona.

Za MS i njenu primjenu važno je da se ovo cijepanje za datu molekulu uvijek obavlja na isti način. Proces jonizacije i fragmentacije odvijaju se u jonskom izvoru vrlo brzo u vremenskom periodu od 10^{-7} sekundi.

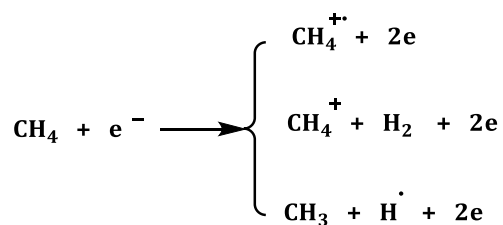
Nedostatak ove tehnike jonizacije je što često zbog potpunog cijepanja u spektru masa izostaje molekulski jon. To se može izbjeći korištenjem blažih jonizacijskih tehnika poput hemijske jonizacije i jonizacije brzim atomima.



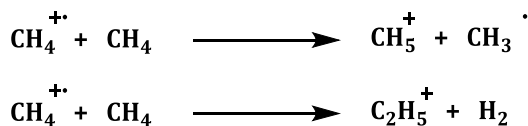
Slika 7.49. Maseni spektrometar sa jonizacijom elektronima i magnetnim analizatorom

- *Hemijska jonizacija (CI)*

Hemijska jonizacija (engl. *Chemical Ionization*, CI) se provodi sa jonima reagujućeg gasa. Kao reagentni gasovi koriste se metan, amonijak, izobutan, voda i neki inertni gasovi. Uzorak i reagentni gas se simultano uvode u komoru gdje su izloženi bombardovanju sa elektronima pri čemu se jonizuju samo molekule gasa:



Ovako nastali primarni joni reaguju kroz jonsko molekulske sudare sa reagentnim gasom CH_4 dajući sljedeće produkte:



Joni CH_5^+ i C_2H_5^+ reaguju sa molekulama uzorka i daju jone tipa $(\text{M} + \text{C}_2\text{H}_5)^+$. Stvaraju se molekulski joni sa malim viškom energije i samim tim velike stabilnosti.

Od jonizacionih tehnika najefikasnija za fragmentaciju makromolekula je bombardovanje sa brzim atomima npr. argona (FAB-*Fast Atom Bombardment*).

- Jonizacija u električnom polju (FI) i jonizacija u električnom polju sa desorpcijom (FD)

Kod jonizacije u električnom polju i u električnom polju sa desorpcijom (engl. *Field Ionization*, FI i *Field Desorption*, FD) uzorak se nalazi u tečnom, odnosno čvrstom agregatnom stanju u blizini elektrode ili u čvrstom obliku na elektrodi i desorbuje se kao jon iz površine elektrode. Ovako se mogu jonizovati teško isparljivi spojevi, soli, kiseline i polarni spojevi, a jonizacija sa desorpcijom služi za analizu polarnih i termički nestabilnih spojeva, kao glikozida, šećera i alkohola.

Jonizacija sa laserskim zrakama ostvarzuje se sa neutralnim molekulama ksenona, radona ili sa jonima cezijuma. Jonizacija sa varnicom služi u analitici tragova neorganskih spojeva.

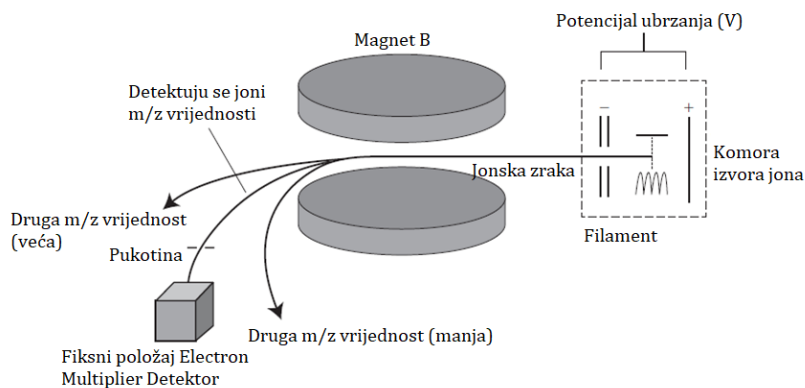
Za analizu nestabilnih spojeva i spojeva velike molekulske mase koji se lako fragmentiraju koriste se blage tehnike jonizacije poput jonizacije elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionisation*, ESI), termoraspršenjem (engl. *Thermo-Spray*, TS), jonskim raspršenjem (engl. *Ion Spray*, IS) i matricom potpomognuta jonizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*, MALDI).

Stvoreni joni u komori bivaju potisnuti iz jonskog izvora u sistem za razdvajanje i detekciju jona. Razdvajanje jona provodi se u analizatoru mase gdje se razdvajaju na osnovu njihove mase i omjera m/z . Najčešće korišteni analizatori masa su analizator mase sa magnetskim sektorom, kvadrupolni analizator mase, jonska zamka i analizator mase vremena leta.

7.4.3.2. Analizatori mase

Magnetni analizator (engl. *Magnetic Sector Mass Analyzer*, B,) sastoji se od magneta, između čijih polova prolaze joni nastali u jonskom izvoru (Slika 7.50.). Na ulazu i izlazu iz magnetnog sektora nalaze se dva prereza koja ograničavaju snop jona koji ulaze, odnosno izlaze iz sektora. U magnetnom polju dolazi do različitog skretanja jona u zavisnosti od njihove vrste.

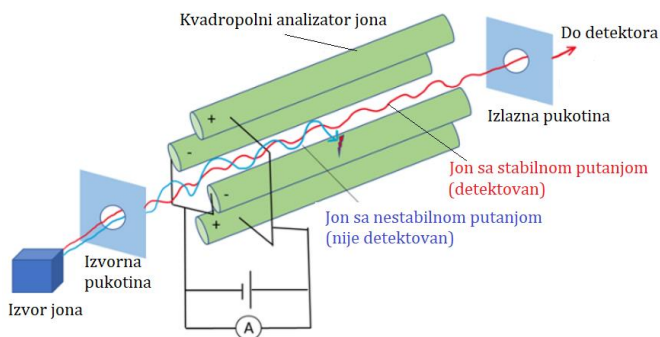
Pri ulasku u analizator svi joni imaju istu brzinu tako da se razdvajanje u magnetnom polju izvodi na osnovu vrijednosti odnosa m/z jona tj. joni različitog m/z putuju različitim radijusima zakrivljenosti. Jačina magnetnog polja određuje jon koji će biti detektovan. Ovaj analizator je spor, ali odlikuje ga visoka rezolucija, osjetljivost i širok opseg masa.



Slika 7.50. Shema analizatora mase sa magnetskim sektorom

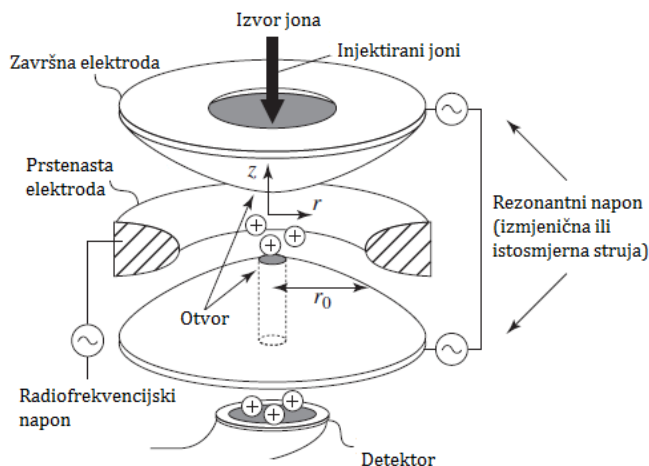
Kvadrupolni maseni analizator (engl. *Quadrupole Mass Analyzer, Q*.) sastoji se od četiri okrugle paralelne elektrode, suprotno električki povezane (Slika 7.51.). Joni koji se kreću između elektroda bivaju privučeni suprotno naelektrisanim elektrodama i kreću se ka njima.

Prije nego što udare u njih mijenja se polaritet elektrode. Kroz analizator prolaze samo određeni joni, dok ostali udaraju u elektrode i razelektrišu se.



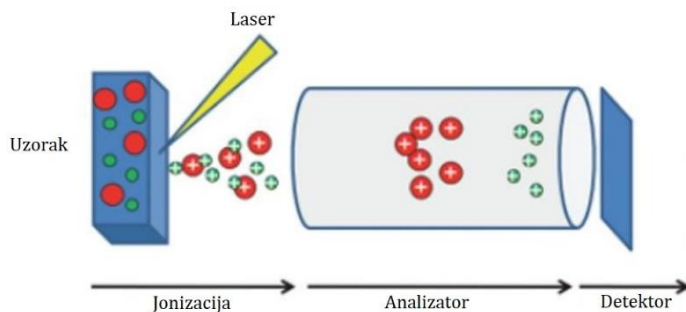
Slika 7.51. Shema kvadrupolnog analizatora mase

Analizator mase sa jonskom zamkom (engl. *Ion Trap*, IT) je uređaj koji se ponaša kao trodimenzionalni kvadrupol, a sastoji se od tri elektrode (Slika 7.52.). Jedna prstenasta i dvije tanjiraste koje zatvaraju prsten sa donje i gornje strane, stvarajući tako komoru u kojoj su „zarobljeni“ joni različitih masa.



Slika 7.52. Shema analizatora mase sa jonskom zamkom

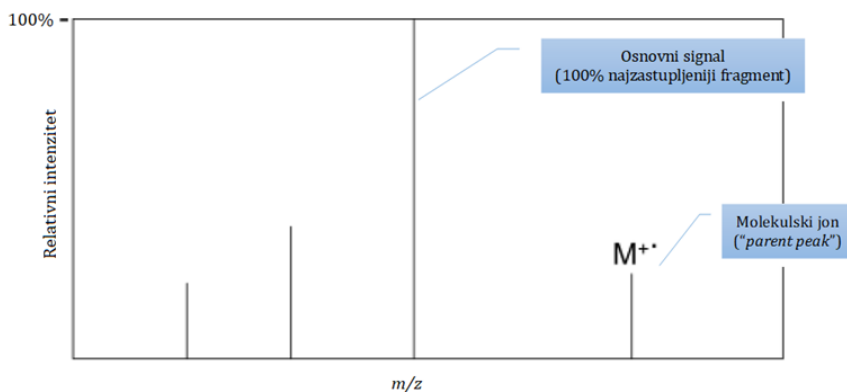
Analizator mase vremena leta (engl. *Time Of Flight Mass Analyzer*, TOF) je metoda masene spektrometrije u kojoj se omjer m/z jona određuje vremenom mjerenja leta (Slika 7.53.). Jone ubrzava električno polje poznate jakosti. Rezultat ovog ubrzanja je jon koji ima istu kinetičku energiju kao bilo koji drugi jon koji ima isto naelektrisanje.



Slika 7.53. Shema analizatora mase vremena leta

7.4.3.3. Interpretacija masenog spektrograma

Spektar masa predstavlja grafički prikaz omjera m/z nanesenih na apcisu prema relativnom prinosu ili intenzitetu pojedinih jona nanesenih na ordinatu. Signal sa najvećim intenzitetom uzima se za signal čiji je intenzitet 100%, a intenzitet ostalih signala se prikazuju u odnosu na taj signal (Slika 7.54.). Dakle, u spektru masa signal s najvećim brojem m/z zove se signal molekulskog jona i obično odgovara molekulskoj masi analizirane molekule, dok signal najvećeg intenziteta odgovara najstabilnijem jonu i zove se osnovni signal, a intenziteti ostalih signala izraženi su kao postotak osnovnog signala.

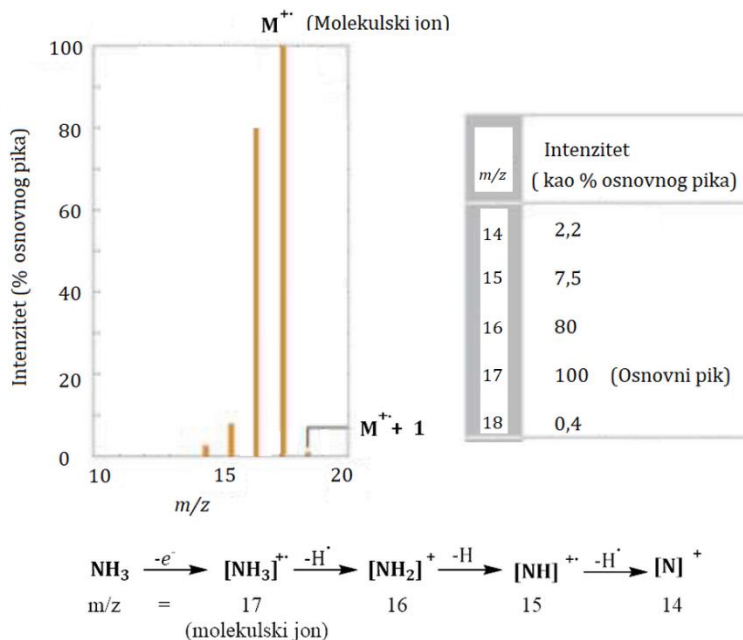


Slika 7.54. Prikaz spektra masa

Primjer spektra masa za molekulu amonijaka data je na slici 7.55. Glavni pik je molekulski jon, što obično nije slučaj, te dolazi do daljnje fragmentacije. Slab signal na m/z 18 potiče od male količine spoja $^{15}\text{N}^1\text{H}_3$ zbog niske zastupljenosti izotopa ^{15}N u usporedbi sa ^{14}N . Ovaj signal se naziva M+1 pik.

Višak vibracione energije koju prima molekulski jon izaziva fragmentaciju, što je upravo karakteristično za strukturu analizirane molekule.

Fragmenti se uvek raspoređuju prema odnosu mase i naelektrisanja, m/z , pri čemu većina detektovanih fragmenata ima naelektrisanje od +1. Važno je pomenuti i tzv. „Pravilo azota“, prema kome spojevi sa neparnim brojem N atoma u molekuli moraju imati neparnu molekulsku masu, a sa parnim brojem N atoma parnu molekulsku masu ili spoj nema N atom. Ovo pravilo može biti izuzetno korisno kada se interpretira maseni spektar nepoznate molekule.



Slika 7.55. Maseni spektar amonijaka

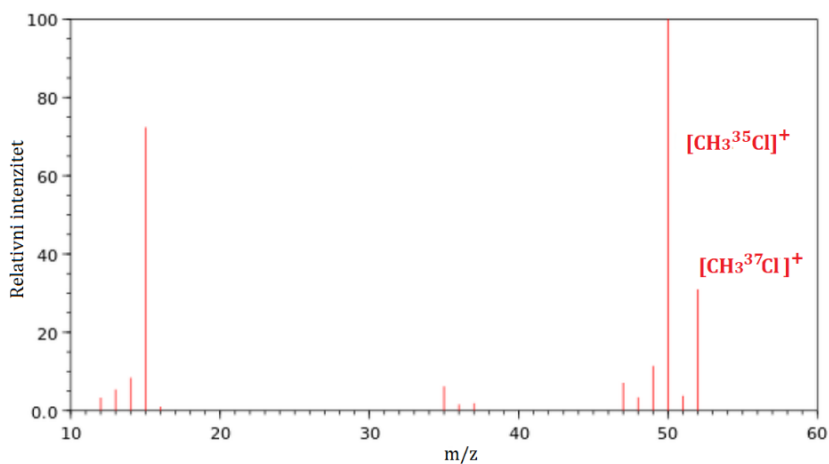
Prilikom određivanja molekulske formule i molekulske mase analizirane molekule treba obratiti pažnju na prisustvo težih izotopa, koji također daju pikove u masenom spektru. Prisustvo težih izotopa za jednu ili dvije masene jedinice iznad najčešćeg izotopa dovodi do formiranja malih pikova na $M^+ + 1$ (C, H, N) i $M^+ + 2$ (O, S, Br, Cl). Intenzitet $M^+ + 1$ i $M^+ + 2$ pikova u odnosu na M pik može se koristiti za potvrdu molekularne formule (Tabela 7.9.).

Na primjer ako je u molekuli prisutan višeizotopni element, intenzitet signala za jone će odgovarati njegovoj izotopnoj raspodjeli. Tako molekula koja u svojoj strukturi sadrži hlor koji ima izotope ^{35}Cl i ^{37}Cl tada će u spektru masa biti prisutna dva signala za molekulski jon u omjeru 3:1 jer je izotop ^{35}Cl tri puta više zastupljeniji od ^{37}Cl , udaljeni za dvije jedinice m/z (Slika 7.56.).

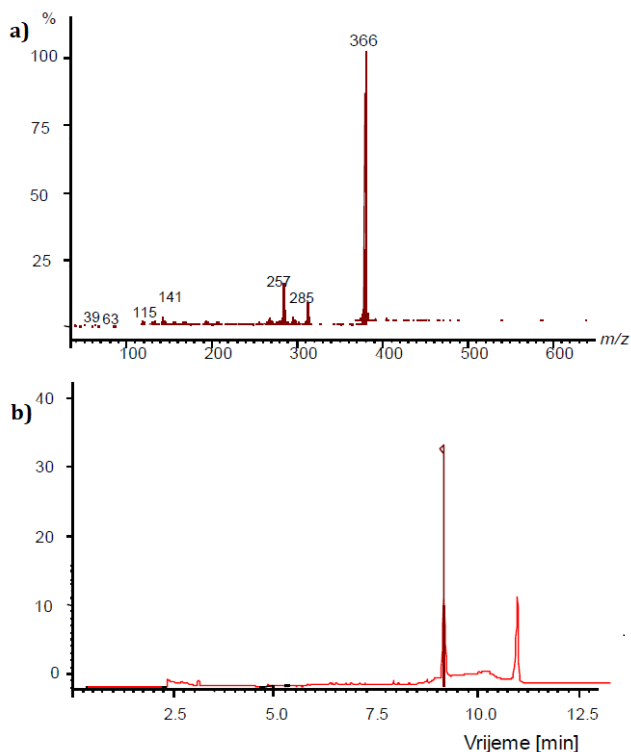
MS se često koristi u kombinaciji sa GC, a kombinirana operacija u jednom potezu omogućuje kvalitativnu i kvantitativnu identifikaciju mnogih strukturno složenih komponenti koje mogu biti zajedno prisutne u određenom biljnom ekstraktu (Slika 7.57.).

Tabela 7.9. Prirodni niz uobičajenih elemenata i njihovi izotopi

Element	Najzastupljeniji izotop	Drugi izotop	Zastupljenost
Vodik	^1H	^2H	0.016
Ugljik	^{12}C	^{13}C	1.08
Nitrogen	^{14}N	^{15}N	0.38
Kisik	^{16}O	^{17}O	0.04
		^{18}O	0.20
Sumpor	^{32}S	^{33}S	0.78
		^{34}S	4.40
Hlor	^{35}Cl	^{37}Cl	32.5
Brom	^{79}Br	^{81}Br	98.0
Silicij	^{28}Si	^{29}Si	5.10
		^{30}Si	3.35



Slika 7.56. Spektar masa hlormetana



Slika 7.57. Spektar masa. a) Hromatogram uzorka; b) Hromatogram nepoznate komponente u uzorku

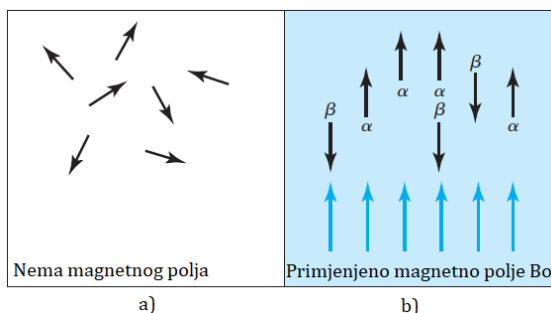
7.3.4. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR)

Nuklearna magnetna rezonanca (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) je najmoćnija metoda za određivanje strukture organskih spojeva. Naziv nuklearna magnetna rezonanca potiče od činjenice da je ovaj fenomen povezan sa svojstvima jezgre i javlja se samo kada se jezgro stavi u magnetno polje određene jačine, pri čemu je količina apsorbirane energije identična kvantumu emitovane energije. Tipovi jezgare koji se najčešće istražuju u NMR-u jesu vodik (^1H) i manje zastupljeni izotop ugljika (^{13}C).

Pozitivno naelektrisano jezgro vodika, proton, ponaša se kao rezultat rotacije oko svoje ose, kao mali magnet sa magnetnim momentom.

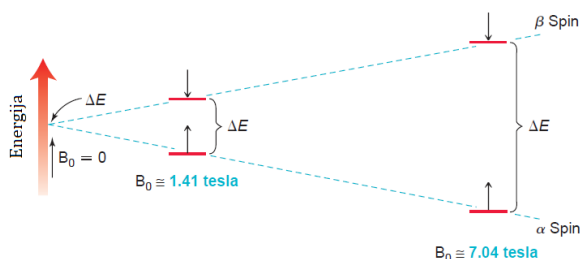
Ako je proton smješten u vanjsko magnetno polje, on je orijentisan na jedan od dva moguća načina u paralelnom (α) i antiparalelnom (β) pravcu sa vanjskim magnetnim poljem (Slika 7.58.). Paralelan smjer s vanjskim magnetnim poljem je energetski niži i stabilniji.

Da bi proton zauzeo antiparalelnu orijentaciju u odnosu na vanjsko magnetno polje, nužno je da apsorbira energiju. To se postiže ako se proton podvrgne elektromagnetnom zračenju određene frekvencije.



Slika 7.58. Orijentacija magnetskih momenata protona u a) odsutnosti vanjskog magnetnog polja ili b) prisutnosti vanjskog magnetnog polja

U trenutku kada se energija zračenja izjednači s energijom nužnom za promjenu orijentacije, dolazi do apsorpcije i prelaska protona iz stanja E_1 u E_2 (Slika 7.59.). Vraćanjem u orijentaciju paralelnu sa vanjskim magnetnim poljem otpušta se energija $h\nu$ emitovanjem radiofrekventnog signala koji se hvata.



Slika 7.59. Odnos između jačine magnetnog polja i energetske jaza između α i β spin stanja

Količina energije potrebna za promjenu orijentacije data je jednačinama:

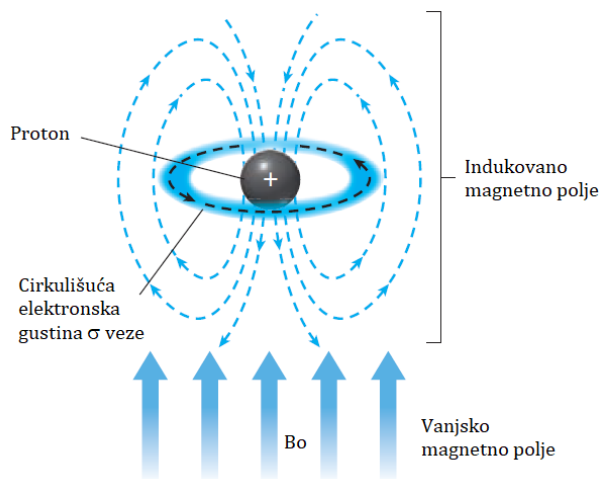
$$E = h\nu \quad (7.12)$$

$$E = \frac{h\gamma B_0}{2\pi} \quad (7.13)$$

$$\nu = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (7.14)$$

h = Planckova konstanta; ν = frekvencija radiovalnog zračenja; B_0 = jačina vanjskog magnetnog polja; γ = žiromagnetni odnos, nuklearna konstanta za proton

NMR spektroskopija ima praktičnu vrijednost samo ako dva različita jezgra (^1H ili ^{13}C) u molekuli apsorbiraju energiju pod različitim uslovima i na taj način se mogu razlikovati jedno od drugog. Kada bi izvor magnetnog polja bio samo spektrometar, onda bi sve jezgre u uzorku osjećale isto magnetno polje u svakom trenutku. U tom bi slučaju sve jezgre izotopa, npr. vodika (^1H) apsorbirale u isto vrijeme. Međutim, elektroni u molekuli su naelektrisane čestice u kretanju koje također stvaraju magnetno polje, koje je suprotno magnetnom polju spektrometra (Slika 7.60.). Stoga, proton u molekuli osjeća slabije magnetsko polje nego što bi "goli" proton osjećao pod istim uslovima tj. elektroni zasjenjuju (engl. *shield*) proton od primijenjenog magnetnog polja. Različiti protoni u molekuli su različito zasjenjeni, jer je njihovo elektronsko okruženje različito. Da bi došlo do apsorpcije energije svi protoni moraju osjetiti isto magnetno polje. Ako je proton zasjenjen, tada primijenjeno magnetno polje mora biti jače od magnetno polja jezgre da bi se prevladalo zasjenjenje.



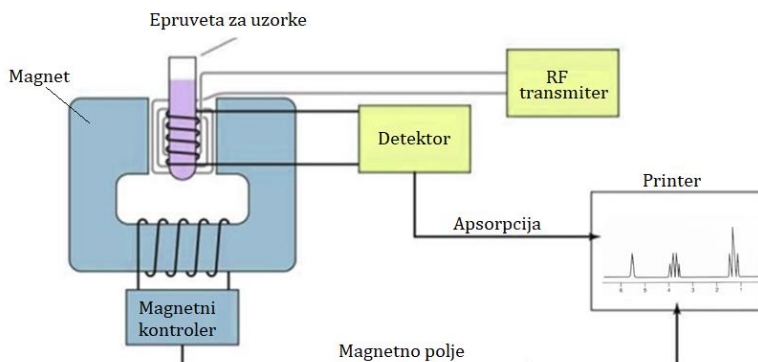
Slika 7.60. Indukovano magnetno polje koje nastaje kao rezultat kretanja elektrona koji okružuju proton

Dakle, različiti hemijski pomaci posljedica su različitog zasjenjenja različitih protona. Promjene u distribuciji elektrona oko jezgre utiču na lokalno magnetno polje koje osjeća jezgro, frekvenciju na kojoj jezgro dolazi u rezonanciju i hemijsko okruženje atoma u molekuli.

7.3.4.1. Snimanje NMR spektra

Snimanje NMR spektra provodi se u NMR spektrometrima. NMR spektrometar (Slika 7.61.) sastoji se iz četiri glavna dijela:

- magnet koji stvara magnetno polje,
- odašiljač elektromagnetnog zračenja (*RF transmitter*) koji emitira zračenje određene frekvencije,
- detektor, apsorpciju i emisiju energije bilježi detektor,
- pisarč (*recorder*) koji iscrtava spektar.



Slika 7.61. Shematski prikaz NMR spektrometra

U principu, spektri protona se dobijaju stavljanjem uzorka u magnetno polje čija se jačina mijenja, uz održavanje konstantne frekvencije. Kada dođe do apsorpcije energije, neophodne za promjenu orijentacije, elektronski uređaj (rekorder) snima signal. Intenzitet apsorpcije se automatski prikazuje na grafikonu kao funkcija povećanja jačine magnetnog polja. S obzirom da su atomi vodika u organskoj molekuli identični, isti element, bilo bi normalno očekivati da svi protoni apsorbiraju pri određenoj, ali istoj jačini polja. Kao rezultat, dobio bi se jedan signal koji ne bi bio od velike koristi. Činjenica da se to ne dešava čini protonske spektre neobično korisnim u strukturnoj analizi. Jačina polja pri kojoj dolazi do promjene orijentacije nije ista za sve protone u organskoj molekuli.

Da bi se objasnilo zašto različite vrste protona apsorbiraju na različitim jačinama polja, neophodno je razlikovati efektivnu jačinu magnetnog polja od primjenjene jačine vanjskog magnetnog polja. Različite vrste protona različito osjećaju primjenjeno magnetno polje.

Ta efektivna jačina magnetnog polja za svaki proton zavisi ne samo od jačine primjenjenog polja već i od elektronske gustoće na protonu, koja zavisi od susjednih protona. Neke vrste protona zahtijevaju različitu primjenjenu jačinu magnetnog polja da bi se javila ista efektivna jačina na kojoj dolazi do apsorpcije. Svi protoni, bez obzira na vrstu, apsorbiraju na istoj efektivnoj jačini polja, ali na različitim vrijednostima primjenjenog polja u zavisnosti od sredine. Kao posljedicu toga dobivamo spektar sa više signala, čiji relativni položaj govori o okruženju različitih protona. Jezgra C, O, nisu magnetna, jer bi u suprotnom spektri protona postali veoma komplikovani. Spektralni parametri NMR-a su hemijski pomak (δ), konstanta sprege spin-spin (J) i zasjenjenje.

7.3.4.2. Hemijski pomak i zasjenjenje

Hemijski pomak jezgre odražava njenu elektronsku okolinu i funkcija je elektronske gustoće oko jezgre. Ovisi o konstanti zasjenjenja koja je karakteristična za hemijsku okolinu svake jezgre.

Položaj signala na spektru mjeri se u odnosu na signal referentne supstance. Kao referentna supstanca najčešće se koristi tetrametilsilan $[(CH_3)_4Si]$ (engl. *Tetramethylsilane*, TMS) koji daje osamljeni i oštar signal (singlet) i u 1H i ^{13}C spektrima NMR nižim poljima od većine poznatih molekula. Desno od TMS kojem se pripisuje 0 ppm su negativne (-), a lijevo pozitivne (+) vrijednosti hemijskih pomaka. Dakle, hemijski pomak je udaljenost signala od referentnog signala TMS:

$$\delta = \frac{\text{frekv. uzorka [Hz]} - \text{frekv. TMS [Hz]}}{\text{radna frekv. magneta za rezonanciju [MHz]}} \quad (7.15)$$

Da bismo mogli koristiti iste omjere za instrumente različite jačine magnetnog polja, hemijski pomak se izražava u jedinicama ppm (to je broj nezavisan o polju). Na taj način će hemijski pomak koji mjeri poziciju signala biti isti bez obzira na instrument, što je onda olakšavajuća okolnost pri upoređivanju spektra. Izračunato, u omjeru 0-10 ppm registrujemo sve vodike, a u intervalu 0-200 ppm sve ugljike (za iste molekule udaljenosti su mnogo veće za ^{13}C nego za jezgro 1H). U stvari, hemijski pomak jezgre odražava njeno elektronsko okruženje, on je, dakle funkcija elektronske gustine oko jezgre. Drugim riječima, hemijski pomak je posljedica činjenice da na jezgre ne djeluje samo magnetsko polje B_0 , koje se primjenjuje u eksperimentu, već i individualno magnetsko polje, koje je posljedica

superpozicije polja B_0 i lokalnog magnetskog polja, induciranog kretanjem elektrona oko jezgra u suprotnom smjeru od B_0 . Iz tog razloga, hemijski pomak je osjetljiv na konfiguracijske i konformacijske karakteristike molekule.

Ako imamo malu gustoću elektrona kojima je jezgro izloženo, govorimo o *nezasjenjenom području* NMR spektra ili području niskog magnetnog polja, odnosno visoke frekvencije.

U *zasjenjenom području* NMR spektra bit će jezgre koje su izložene visokoj gustini elektrona kao rezultat hemijskog okruženja, pa takođe kažemo da su signali za takve jezgre u visokom magnetnom polju, odnosno u polju niskih frekvencija.

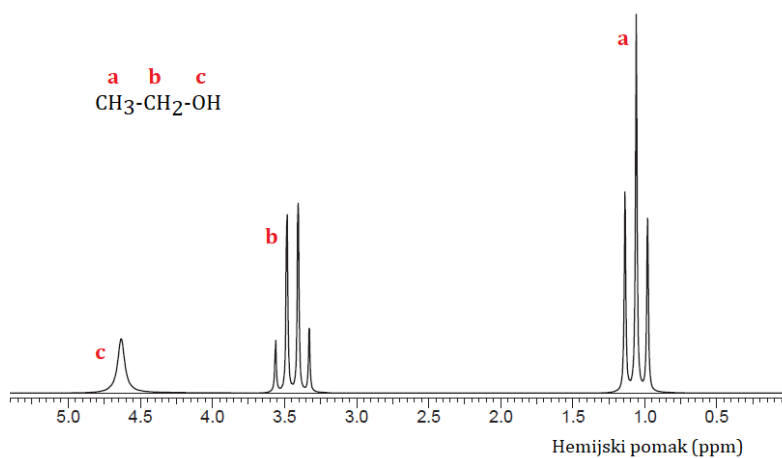
7.3.4.3. Spin-spin sprega

Spin-spin sprega između identičnih jezgara (npr. ^1H - ^1H) je homonuklearna sprega, dok se sprega između različitih jezgara (npr. ^1H - ^{13}C) naziva heteronuklearna sprega. Na primjeru spektra etanola (Slika 7.62.) jasno se vidi da se neki signali pojavljuju kao više linija, a ne kao pojedinačne. Signal koji odgovara metil-protonima pocjepan je u tri simetrične linije različitog intenziteta, a signal koji odgovara metilenskim protonima u četiri linije. Kako će izgledati multipliciranje, zavisi od broja protona koji su vezani na susjedni C atom.

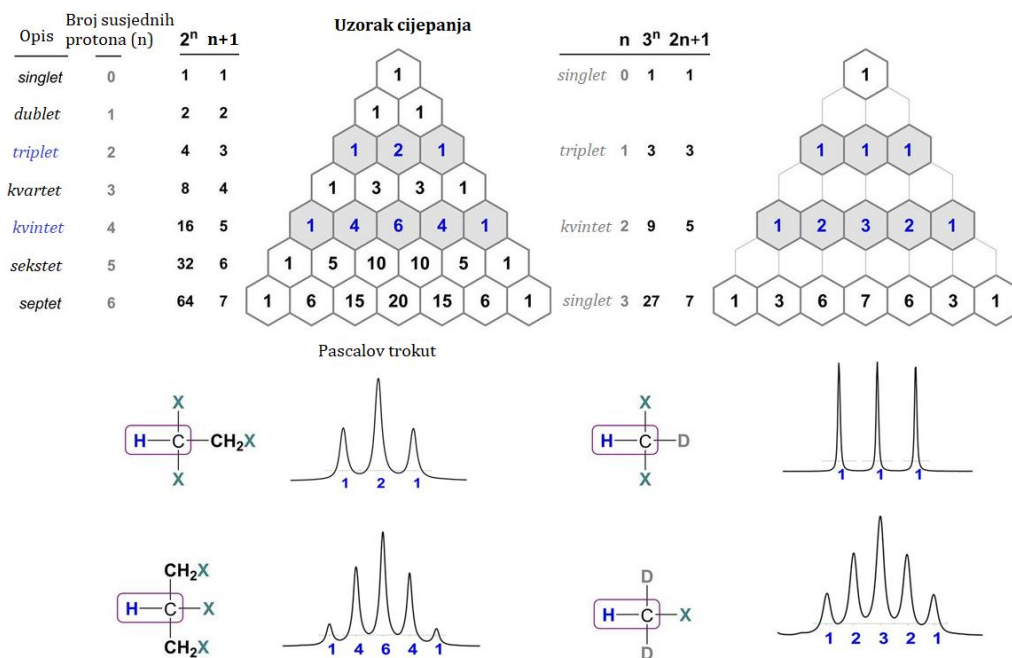
Ova pojava poznata je pod nazivom „*cijepanje signala*“, a uzrokovana je spin-spin spregom. Do cijepanja dolazi usljed promjene magnetnog polja datog protona pod uticajem magnetnog momenta susjednih protona.

Dakle, NMR signal posmatranog jezgra se zbog sprežavanja sa susjednom jezgrom cijepa u multiplet prema pravilu $2nI+1$, pri čemu je n broj susjednih jezgara, a I spinski kvantni broj jezgre. Prema multipletnosti signali mogu biti singlet (s), dublet (d), triplet (t), kvartet (q), kvintet itd.

Signali u ^1H -NMR spektru cijepaju se prema pravilu $2nI+1$ u $n+1$ pikova, gdje je n broj ekvivalentnih protona vezanih za susjedni ugljik, a $I=1/2$. Broj pikova u signalu zove se multiplet signala. Relativni intenzitet signala (linija) u jednom multipletu najbolje se može uočiti uzimajući Pascalov trougao (Slika 7.63.).



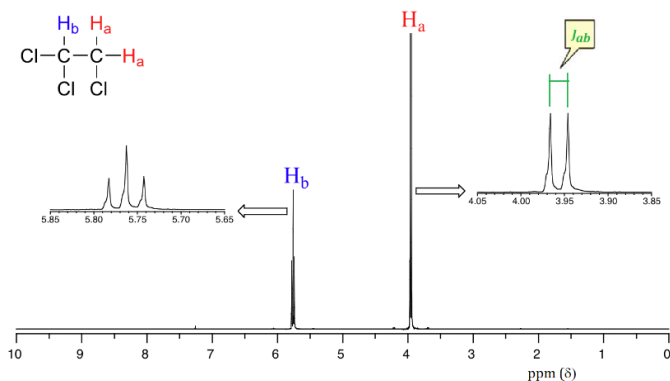
Slika 7.62. ^1H -NMR spektar etanola



Slika 7.63. Upotreba Pascalovog trokuta za izračunavanje relativnih veličina pikova

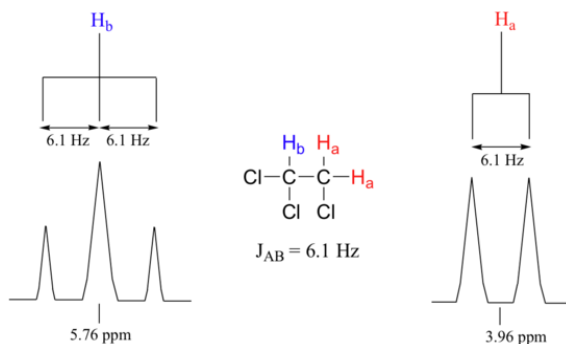
7.3.4.4. Konstanta sprege

Pod konstantom sprege (J) se podrazumjeva razmak između linija u multipletu. Dakle, konstanta sprege (Slika 7.64.) je jednostavno razlika, izražena u Hz, između dva susjedna podpika u podijeljenom signalu.



Slika 7.64. Konstanta sprege

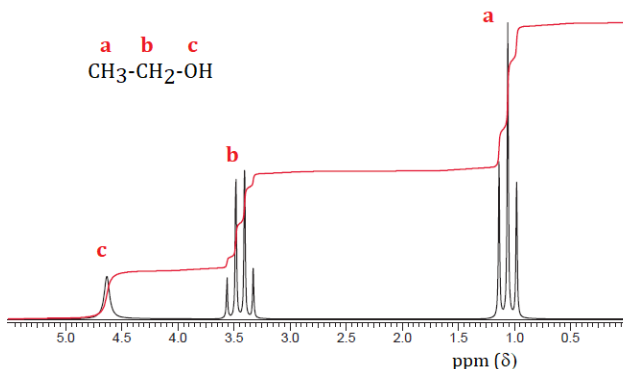
Za razliku od hemijskog pomaka vrijednost J se ne mijenja sa promjenom osnovne frekvencije, odnosno jačine polja. Zbog toga, ako se snime NMR spektri nekog organskog spoja pri raznim frekvencijama, razmak između multipleta ostaje konstantan, dok se veličina hemijskog pomaka mijenja. Veličina za konstantu sprege kreće se 0-20 Hz izavisno od međusobnog odnosa strukture spregnutih protona (što je vrijednost J veća bolja je sprege). Za dublet u spektru 1,1,2-trihloretna (Slika 7.65.), na primer, dva podpika su razdvojena za 6.1 Hz, i tako se piše $^3J_{a-b} = 6.1$ Hz. Superskript 3 znači da je ovo interakcija spajanja sa tri veze, a indeks a-b znači da se radi o sprezi između H_a i H_b .



Slika 7.65. Proračun konstanta sprege za 1,1,2-trihloretna

7.3.4.5. Integracija

Poslije snimanja spektra površina ispod signala se automatski integrira. Površina svakog signala je proporcionalna broju jezgara u tom hemijskom pomaku. Ako pogledamo primjer spektra etanola (Slika 7.66.), signal za metilnu grupu u etanolu treba da ima površinu u odnosu 3 : 2 u poređenju sa metilenskim signalom.



Slika 7.66. ^1H -NMR spektar etanola sa integralima

Kada se crtaju protonski NMR podaci, obično se crta i integral. Ovo će pokazati relativne površine ispod krivih. Na Slici 7.66 prikazan je spektar etanola sa integralima.

7.3.4.6. Priprema uzorka

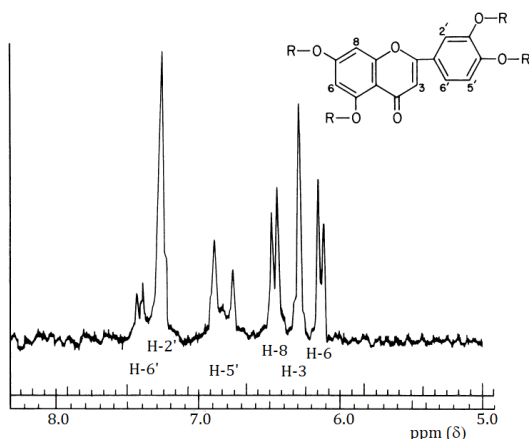
Uzorak za ispitivanje NMR spektroskopijom može biti u sva tri agregatna stanja. Tečnosti obično daju dobre spektre dok su signali kod gasovitih supstanci slabog intenziteta pa se uzorak obično priprema pod pritiskom. Čvrste supstance (30-40 mg) se otapaju u odgovarajućem otapala (0.4-0.5 ml) i kao takve su spremne za snimanje u normalnoj cjevčici (15 cm x 4 mm). Za snimanje manjih količina uzorka 1-3 mg u volumenu od oko 0.025 ml upotrebljavaju se mikrocjevčice raznih oblika. Otapala koja se upotrebljavaju su ugljik tetrahlorid (CCl_4), ugljik disulfid (CS_2), deuterio metanol (CD_3OD), deuterio hloroform (CDCl_3), deuterio dimetil sulfoksid ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (DMSO- d_6), deuterio voda (D_2O), deuterio benzen (C_6D_6), trifluorsirćetna kiselina (CF_3COOH) i drugi. Uslovi koje treba da zadovolji otapalo za upotrebu u NMR su: da ne sadrže atome H, da su hemijski inertni i dovoljno isparljivi kako bi se poslije mjerenja mogla regenerirati supstanca. Uzorak se otopi u pogodnom otapalu, uklone paramagnetične nečistoće, prenese u mjernu cjevčicu i doda malo tetrametilsilana (TMS).

Kisik otopljen u pripremljenom uzorku može da ometa dobijanje dobrog spektra, pa se iz uzorka uklanja dodavanjem natrijum-ditionata ili uvođenjem nitrogena ili argona.

7.3.4.7. Interpretacija ^1H -NMR spektra

Prilikom interpretacije ^1H -NMR spektra poznate ili nepoznate molekule, potrebno je odrediti broj signala, veličinu hemijskih pomaka i multipletnost, pogledati okolinu pikova i odrediti spin-spin sprege. Kada se analizira ^1H -NMR spektar nepoznate molekule, ako je poznata molekulska formula, izračuna se stepen nezasićenosti (prsten, dvostruka veza, trostruka veza) [$n = \frac{1}{2} (2C + 2 - H)$]. Svaki prošireni signal (široki signal) u spektru je proton – OH ili –NH, ako je široki signal iza 10 ppm, najverovatnije je to proton OH kiseline. Ako postoji signal na oko 3-4 ppm, to je proton na ugljiku za koji je vezan elektronegativni element (kisik ili halogen). Ako su signali prisutni na oko 7-8 ppm, radi se o aromatičnim protonima. Signali na oko 5-6 ppm upućuju na vinil protone, a iz konstante sprege potrebno je izračunati da li je u pitanju *cis* ili *trans* stereoizomer. Ako je signal (singlet) prisutan u spektru na oko 2.1-2.5 ppm, to su vjerovatno protoni uz karbonil grupe ($\text{CH}_3\text{-CO}$) ili uz aromatični prsten (Ph-CH_3). Signal na oko 9-10 ppm ukazuje na aldehid (CO-H), dok slab singlet oko 2.5 ppm ukazuje na terminalni alkin (CCH).

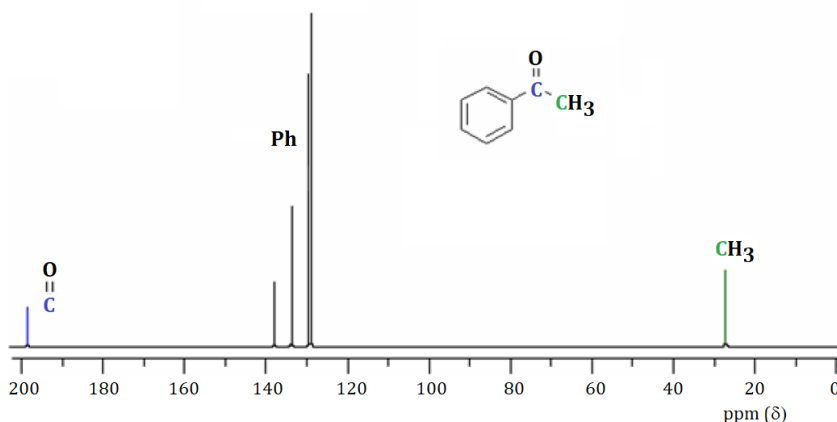
Primjer ^1H -NMR spektar flavona luteolina predstavljen je na Slici 7.67. gdje su hemijski pomaci relativni u odnosu na TMS. Šest protona u luteolinu daje dobro razdvojene pomake. Ako se luteolin dalje supstituira, položaj supstitucije je jasan iz nestanka jednog ili drugog od šest signala.



Slika 7.67. ^1H -NMR spektar luteolina

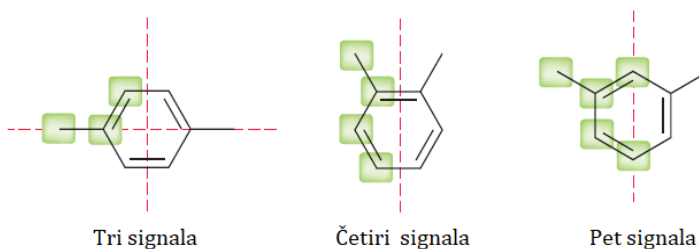
7.3.4.8. ^{13}C -NMR spektroskopija

^{13}C -NMR spektroskopija daje još jednu veliku mogućnost za određivanje strukture i jako je koristana u mnogim slučajevima gdje spojevi sadrže relativno malo protona. U ^{13}C -NMR spektru (Slika 7.68.) broj signala predstavlja broj različitih vrsta ugljikovih atoma u spoju.



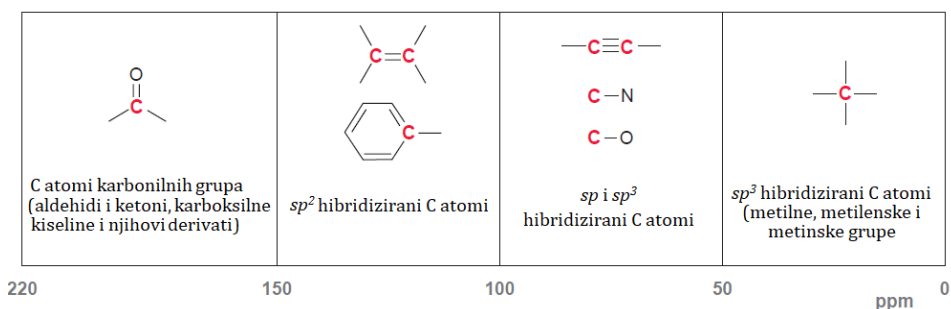
Slika 7.68. ^{13}C -NMR spektar acetofenona

Tako na primjer na Slici 7.69. predstavljen je spoj sa atoma ugljika u različitim elektronskim okruženjima (koji nisu zamjenjivi po simetriji). Atomi ugljika koji su međusobno zamjenjivi operacijom simetrije (bilo rotacijom ili refleksijom) proizvodit će samo jedan signal. Jasno se vidi da svaki spoj ima osam ugljikovih atoma, ali ne proizvodi osam signala. Jedinstveni ugljikovi atomi u svakom spoju su istaknuti. Svaki atom ugljika koji nije označen ekvivalentan je jednom od istaknutih atoma ugljika.



Slika 7.69. Različite vrste C atoma datog spoja koje predstavljaju broj signala u ^{13}C -NMR spektru

Na Slici 7.70. predstavljeni su hemijski pomaci nekoliko važnih vrsta ugljikovih atoma. ^{13}C -NMR spektroskopija omogućava detekciju karbonilnog, alkinskog ili aromatskog ugljikova atoma zahvaljujući njihovim različitim hemijskim pomacima u ^{13}C -NMR spektru. Signali ugljikovih atoma oko 6400 puta su slabij od signala protona.



Slika 7.70. Opšta lokacija signala kojeg daju različite vrste atoma ugljika

Stoga, ^{13}C -NMR spektroskopija zahtjeva duže vrijeme snimanja. ^{13}C -NMR spektroskopija je manje osjetljiva od ^1H -NMR spektroskopije jer je samo 1% ugljikovih atoma u uzorku u stanju ^{13}C izotopa, a žiromagnetni omjer za ^{13}C iznosi tek $\frac{1}{4}$ žiromagnetnog odnosa za proton.

Karakteristični hemijski pomaci u ^{13}C -NMR spektru za ugljike u nekim funkcionalnim grupama prikazani su u Tabeli 7.10.

Tabela 7.10. Karakteristični hemijski pomaci C atoma u ^{13}C -NMR spektru u različitim funkcionalnim grupama

Vrsta C atoma	Hemijski pomak (ppm)	Vrsta C atoma	Hemijski pomak (ppm)
$(\text{CH}_3)_4\text{Si}$	0	C-I	0-40
R-CH_3	8-35	C-Br	25-65
$\text{R-CH}_2\text{-R}$	15-50	C-Cl	35-80
$\text{R}_3\text{-CH}$	20-60		110-175
$\text{R}_4\text{-C}$	30-40		165-175

C-N	40-60	$\begin{array}{c} \text{R} \\ \diagdown \\ \text{C}=\text{O} \\ \diagup \\ \text{RO} \end{array}$	165-175
C-O	50-80	$\begin{array}{c} \text{R} \\ \diagdown \\ \text{C}=\text{O} \\ \diagup \\ \text{HO} \end{array}$	175-185
≡C	65-85	$\begin{array}{c} \text{R} \\ \diagdown \\ \text{C}=\text{O} \\ \diagup \\ \text{H} \end{array}$	190-200
=C	100-150	$\begin{array}{c} \text{R} \\ \diagdown \\ \text{C}=\text{O} \\ \diagup \\ \text{R} \end{array}$	205-220

7.3.5. Kriteriji za fitohemijsku identifikaciju

Kao što je već pomenuto, poznati spoj otkriven u nekom biljnom izvoru može se identifikovati na osnovu hromatografskog i spektralnog poređenja sa autentičnim materijalom (standardom). Autentični materijali (standardi) se mogu dobiti komercijalno od različitih dobavljača, ponovnom izolacijom iz poznatog izvora ili sintezom. Obim poređenja koje treba napraviti varira u zavisnosti od klase spoja koji se proučava, ali kao opšti princip, poželjno je koristiti što više kriterija da bi bili sigurni u ispravnost identifikacije (Tabela 7.11.).

Hromatografsko poređenje treba da se zasniva na kohromatografiji spoja sa standardom, bez razdvajanja, u najmanje četiri sistema. Ako je TLC glavna osnova za poređenje, onda postoje prednosti u korištenju različitih adsorbenata (npr. celuloze i silika gela) kao i različitih otapala na istom adsorbentu (Tabela 7.11.). Kad god je moguće, poželjno je uporediti nepoznato i standardno po tri različita hromatografska kriterijuma, npr. po vremenu zadržavanja pomoću GC i HPLC i R_F na TLC ili pomoću R_F na PC i TLC i relativnoj pokretljivosti na elektroforezi. Međutim, za spektralne usporedbe treba usvojiti dva ili više postupaka gdje god je to moguće. Idealno bi bilo da se UV, IR MS i $^1\text{H-NMR}$ spektri uspoređuju.

Kod novih biljnih supstanci obično je moguće utvrditi strukturu na osnovu spektralnih i hromatografskih mjerenja, posebno u odnosu na ona napravljena na poznatim spojevima iz iste serije. Potvrda strukture može biti moguća hemijskom konverzijom u poznati spoj. Nekada je suštinski korak u strukturnoj identifikaciji bilo određivanje molekulske formule mikroanalizom, sa određivanjem najmanje ugljika i vodika.

Takve mikro analize su i dalje veoma poželjne, ali kada su dostupni samo mikrogrami materijala, moguće je koristiti precizno mjerenje mase na molekularnom jonu, određeno masenom spektrometrijom (vidjeti Odjeljak 7.3.3.3. i Tabelu 7.9.).

Tabela 7.11. Vrsta kriterija potrebnih za identifikaciju poznatih biljnih sastojaka.
Identifikacija 6-hidroksi luteolin 7-metil etera u listu *Crocus minimus*

Kriterij	Zabilježene osobine
1. Fizička svojstva	Žuti prah, t.t. 245-6°C
2. Molekulska formula od MS	Pronađeni molekularni jon 316,0574 $C_{16}H_{12}O_7$ zahtijeva 316,0582
3. MS uzorak fragmentacije	Fragment jona demetilacijom na 301,0344 ($C_{15}H_9O_7$ zahteva 301,0345) itd
4. UV spektralna svojstva (i pomaci s alkalijama, itd.)	Maksima na 254. 273, 346 nm itd.
5. Boja na TLC ploči	Žuto na dnevnom svjetlu Tamno smeđa u UV \pm NH_3
6. TLC na celulozi	R_F 0.73 u n -BuOH-HOAc- H_2O (4:1:5) R_F 0.59 u 50% HOAc R_F 0.67 u $CHCl_3$ -HOAc- H_2O (90:45:6)
7. TLC na poliamidu	R_F 0.36 u C_6H_6 -MeCOEt-MeOH (4:3:3)
8. Hemijska konverzija	Demetilacija piridinijum hloridom u 6-hidroksiluteolin

Derivatizacija je vrijedna i kod novih spojeva, npr. priprema acetata, metil etra itd., jer njihova analiza daje korisnu potvrdu molekularne formule originalne supstance.

POGLAVLJE 8

MEHANIZMI ANTIMIKROBNOG DJELOVANJA BILJNIH SUPSTANCI

Irma Mahmutović-Dizdarević



*Osoba koja uzima lijek mora se oporaviti dva puta.
Jednom od bolesti, a jednom od lijeka.*

William Osler

Ekstenzivna, neprimjerena, neregularna upotreba, kao i zloupotreba antibiotika je rezultirala emergencijom antimikrobne rezistencije, što trenutno dostupne lijekove čini neučinkovitim. Navedeni trend emergencije Svjetska zdravstvena organizacija smatra vjerovatno i najurgentnijim problemom s kojim se suočava savremena medicina. Stoga je nemoguće prenamagati potrebu za pronalaskom novih antimikrobnih supstanci. U tom smislu, ljekovite biljke predstavljaju gotovo nepresušne izvore bioaktivnih supstanci i njihova upotreba kao antimikrobnih agenasa je do sada izučavana i razmatrana na različite načine. Svakako, brojne komponente su još uvijek neistražene, a čak i one koje su u nauci poznate i priznate već neko vrijeme, mogu se izučavati u svjetlu novih spoznaja i perspektiva, što otvara mogućnosti njihove ponovne evaluacije u kontekstu antimikrobnog djelovanja. Prirodni antimikrobni agensi mogu djelovati pojedinačno ili u kombinaciji sa antibioticima kako bi se postigla učinkovitost protiv sve šireg spektra patogenih mikroorganizama. U cilju sticanja sveobuhvatne perspektive potencijalne upotrebe ekstrakata ljekovitih biljaka u borbi protiv rezistencije na antimikrobne lijekove, potrebno je dobro razumjeti načela njihove antimikrobne aktivnosti, u prvom redu mehanizam djelovanja, potom različite mehanizme rezistencije, hemijsku i bioaktivnu prirodu biljnih komponenti itd.

8.1. Antimikrobna aktivnost biljnih ekstrakata

Ekstrakti izolirani iz ljekovitih biljaka ispoljavaju različitu biološku aktivnost kao što je: antimikrobna, antiinflamatorna, antioksidativna itd. Konkretno, antimikrobne komponente ljekovitih biljaka mogu inhibirati rast bakterija, funga, virusa i protozoa putem različitih mehanizama. Ukoliko se ti mehanizmi razlikuju od onih koje koriste dostupni sintetički antimikrobni lijekovi, dati biljni ekstrakt može imati veliki potencijal u kliničkom smislu, osobito u tretmanu rezistentnih i multirezistentnih patogena. Dokazano je da pojedine biljne komponente imaju intrinzičnu antibakterijsku aktivnost, ali i aktivnost modifikacije antibiotske rezistencije. Nadalje, neke od njih nemaju učinkovitost koja bi se mjerila sa učincima sintetičkih antibiotika, ali u kombinaciji sa njima daju dobre rezultate. Veliki terapijski potencijal posjeduju hemijski kompleksne biljne komponente, najprije jer izazivaju manje nuspojava u poređenju sa sintetičkim lijekovima, ali je za njih zabilježena i manja stopa stvaranja rezistencije. Nekada, ukoliko je pripravak ljekovite biljke zasnovan na jednom ciljnom aktivnom sastojku, moguć je brži nastanak rezistencije na takav pripravak. Učinkovitost ekstrakata ljekovitih biljaka najprije je rezultat sinergizma pojedinih aktivnih komponenti koje sadrži. Generalno, danas ne postoji mnogo literaturnih podataka o stvaranju mikrobne rezistencije na biljne lijekove.

Mehanizmi djelovanja sintetičkih antimikrobnih supstanci su već ranije objašnjeni, kao i načini stvaranja rezistencije na antimikrobike. Kada su u pitanju mehanizmi antimikrobne rezistencije na sekundarne metabolite, oni podrazumijevaju: izmjene u djelovanju efluks pumpi, strukturnu modifikaciju porina, enzimsku inaktivaciju, destrukciju antimikrobnog agensa, te alteraciju ciljnih mjesta. Slično kao i kod djelovanja sintetičkih antimikrobnih lijekova, u slučaju sekundarnih metabolita govori se o sljedećim metama i interferiranju sa sljedećim procesima: inhibicija biosinteze proteina, inhibicija sinteze i funkcije DNK, te disrupcija strukture (i poremećaj funkcija) stanične stijenke.

8.2. Mehanizmi antimikrobnog djelovanja supstanci biljnog porijekla

Iako su sintetski antimikrobni agensi u velikom dijelu savremenog svijeta prvi lijek izbora u liječenju infekcija, upotreba ljekovitih supstanci prirodnog porijekla u iste svrhe kontinuirano privlači pažnju istraživača.

Sekundarni metaboliti imaju široku antimikrobnu aktivnost u skladu sa strukturom, brojem i pozicijom supstitucionih grupa, te prisustvom glikozidnih alkilacija OH grupa. Također, antimikrobni potencijal direktno je povezan i sa topografijom staništa i klimatskim prilikama u prirodnim habitatima ljekovitih biljaka. Varijacije u kvantitetu i kvalitetu bioaktivnih sekundarnih metabolita u hemijskom profilu biljke itekako modificiraju njenu antimikrobnu aktivnost protiv različitih mikrobnih sojeva.

U većini slučajeva, biljni bioaktivni ekstrakti posjeduju kompleksne mješavine sastojaka i njihova sinergistička aktivnost može im olakšati djelovanje. Istovremeno, mikroba stanica (ili virusna partikula) može biti izložena učinku ovih supstanci na različite načine. Generalno, bioaktivne supstance primarno djeluju na plazma membranu i utiču na njenu strukturu i integritet, permeabilnost ili funkcionalnost. Rezultati istraživanja sugeriraju da biljni ekstrakti u svom sastavu često posjeduju komponente koje djeluju kao inhibitori efluks pumpi kod mikroorganizama. Nadalje, inhibicija normalne stanične komunikacije (engl. *quorum sensing*, *QS*) je jedan od najvjerovatnijih mehanizama djelovanja bioaktivnih komponenti protiv multirezistentnih patogena. Inhibitori *QS*-a moraju imati sposobnost da smanje ekspresiju *QS*-kontroliranih gena i moraju biti hemijski stabilni kako bi se oduprli metaboličkim procesima organizma domaćina. Određene komponente mogu modificirati ili inhibirati protein-protein interakcije, što ih čini učinkovitim modulatorima imunog odgovora, mitoze i apoptoze. Štaviše, često supstance ovog tipa imaju mogućnost interferencije sa intermedijarnim metabolizmom, pri čemu dolazi do indukcije koagulacije citoplazmatskih konstituenata i posljedično, disrupcije ili inhibicije formiranja biofilma, koji je svojevrsna zaštita patogenima u toku infekcije.

Također, prisustvo brojnih antivirusnih komponenti u ekstraktima ljekovitih biljaka uzrokuje interferenciju sa različitim virusnim proteinima u različitim stadijima virusne replikacije. Diverzitet antimikrobnih komponenti u smislu njihove strukture, hemijske kompozicije, biosintetičkih puteva, solubilnosti i drugih odlika je gotovo nesaglediv, te će biti prezentirani glavni mehanizmi akcije.

8.2.1. Alkaloidi

Brojne studije su do danas potvrdile značajnu ulogu hemijske skupine alkaloida u tretmanu infekcija uzrokovanim mikroorganizmima. Aktivnost alkaloida protiv Gram-negativnih bakterija i gljivica je dokazana na primjeru indohinolinskih alkaloida, dok je npr. hinin vrlo popularan antiparazitik. Veliki broj alkaloida djeluje preko inhibicije efluks pumpi. Nadalje, antimikrobno djelovanje alkaloida utemeljeno je na DNK interkalaciji, interferenciji sa RNK-polimerazom, girazom i topoizomerazom IV, te na inhibiciji stanične diobe djelovanjem na FtsZ¹⁷ protein. Alkaloidi ometaju stanične funkcije putem različitih mehanizama kao što su oštećenje stanične strukture, inhibicija sinteze DNK i proteina, povećanje nastanka rezova u DNK lancu itd. Dobro poznati antimikrobni alkaloid je berberin (Slika 8.1.B). Berberin je izohinolinski alkaloid i često je prisutan u grančicama i kori *Berberis* vrsta (Slika 8.1.A), te je glavni aktivni sastojak pripravaka poznatih pod komercijalnim nazivima *Rhizoma coptidis* (osušeni rizom vrsta roda *Coptis* Salisb., Ranunculaceae) i *Cortex Phellodendri* (osušena kora vrsta roda *Phellodendron* Rupr., Rutaceae), a koji se vrlo često koriste u tradicionalnoj medicini.

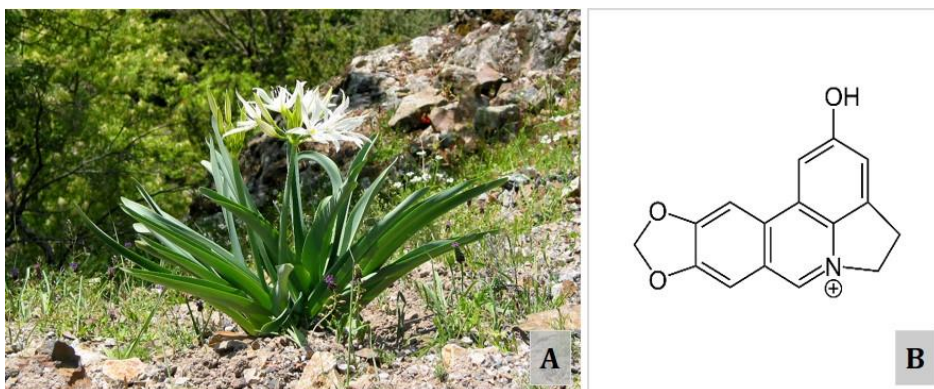


Slika 8.1. A, *Berberis vulgaris*; B, struktura berberina

¹⁷ FtsZ je protein kodiran *ftsZ* genom, a sklapa se u prsten na mjestu buduće diobe bakterijske stanice (tzv. Z prsten). FtsZ je prokariotski homolog eukariotskog proteina tubulina. Naziv je akronim od: *Filamenting temperature-sensitive mutant Z*. Hipoteza je da mutanti stanične diobe kod *E. coli* rastu kao filamenti, jer nemaju mogućnost međusobnog razdvajanja stanica kćeri. FtsZ se nalazi kod gotovo svih bakterija, velikog broja arheja, svih hloroplasta i nekih mitohondrija, gdje je neophodan za diobu stanica.

Berberin pokazuje antimikrobnu aktivnost protiv bakterija, funga, protozoa i virusa. Najvjerovatniji mehanizmi njegovog antimikrobnog djelovanja obuhvataju DNK interkaliranje, ometanje enzima RNK-polimeraze, giraze i topoizomeraze IV, te inhibiciju stanične diobe djelovanjem na FtsZ protein. Berberin uspješno inhibira stanične funkcije bakterija putem različitih mehanizama kao što su oštećenje stanične strukture, disrupcija membrane, povećanje permeabiliteta membrane, inhibicija sinteze proteina i DNK. Sve navedeno može rezultirati smrću stanice. Berberin ima jako antibakterijsko djelovanje i nekada može zamijeniti konvencionalne antibiotike. Generalno, FtsZ inhibitori se mogu smatrati novom klasom antibakterijskih agenasa sa potencijalno širokim spektrom aktivnosti.

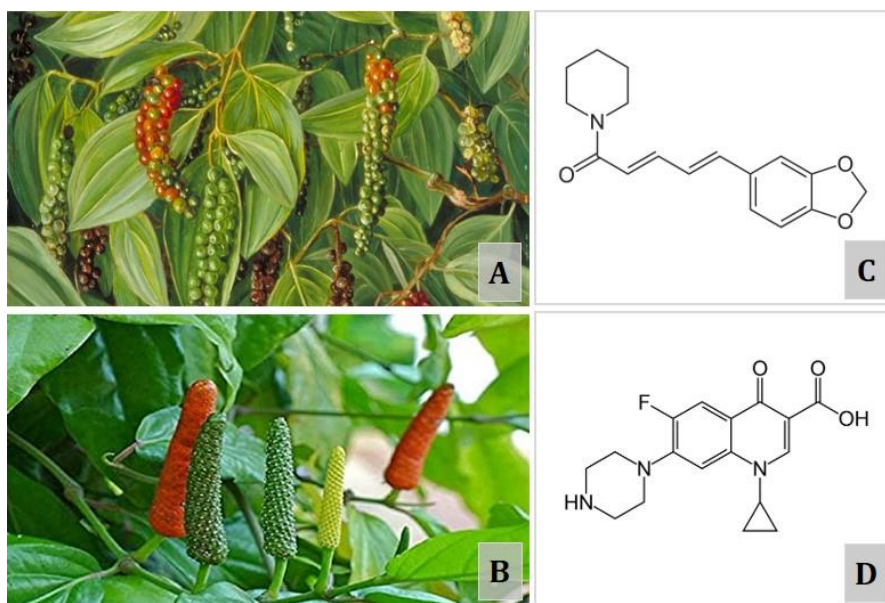
Ungeremin (Slika 8.2.B) je također izohinolinski alkaloid detektovan u metanolnom ekstraktu lukovica *Pancratium illyricum* L. (Slika 8.2.A). Ima naglašeno antibakterijsko djelovanje, a djeluje putem povećanja broja rezova na DNK inhibicijom bakterijske topoizomeraze I.



Slika 8.2. A, *Pancratium illyricum*; B, Struktura ungeremina

Piperin (Slika 8.3.C), piperidinski alkaloid izoliran iz vrsta bibera *Piper nigrum* L. (Slika 8.3.A) i *P. longum* L. (Slika 8.3.B), u kombinaciji sa antibioticima kakav je ciprofloksacin (Slika 8.3.D) inhibira rast bakterija i smanjuje vrijednosti njegove minimalne inhibitorne koncentracije. U kombinaciji sa gentamicinom čak je uspješan u liječenju MRSA infekcija.

Upotreba piperina kao inhibitora efluks pumpi pokazuje da ovo jedinjenje utiče na aktivnost NorA¹⁸ efluks pumpi kod patogenih bakterija.



Slika 8.3. A, *Piper nigrum*; B, *P. longum*; C, piperin; D, ciprofloksacin

Hinolinski alkaloidi kao što su na primjer diktamin, kokusagin i makulin izolirani iz kore biljne vrste *Teclea afzelii* Engl. (Rutaceae) imaju antibakterijsko djelovanje. Prirodni ili sintetički hinolinski alkaloidi inhibiraju enzime kao što je topoizomeraza II i konsekvantno inhibiraju DNK replikaciju. Alkil-metil hinoloni reduciraju konzumaciju kisika kod bakterija i smatraju se inhibitorima disanja. Rezerpin (Slika 8.4.B) je indolni alkaloid pronađen kod vrste *Rauwolfia serpentina* (L.) Beneth. ex Kurz (Apocynaceae) (Slika 8.4.A) i također je prepoznat kao inhibitor efluks pumpi. Brojne vrste bakterija ispoljavaju pojačanu osjetljivost na antibiotike ukoliko se tretiraju lijekovima u kombinaciji sa rezerpinom, što je osobito naglašeno kod MDR sojeva gdje rezerpin pojačava njihovu antibiotsku osjetljivost.

¹⁸ NorA je jedan od najviše istraženih efluks sistema bakterija, a po svojoj strukturi je protein sačinjen od 388 aminokiselina sa 12 transmembranskih segmenata i pripada skupini sekundarnih transportera označenoj kao *Major Facilitator Superfamily* (MFS). Ovaj sistem koristi pokretačku silu protona da iz bakterijske stanice odstrani različite antimikrobne supstance.

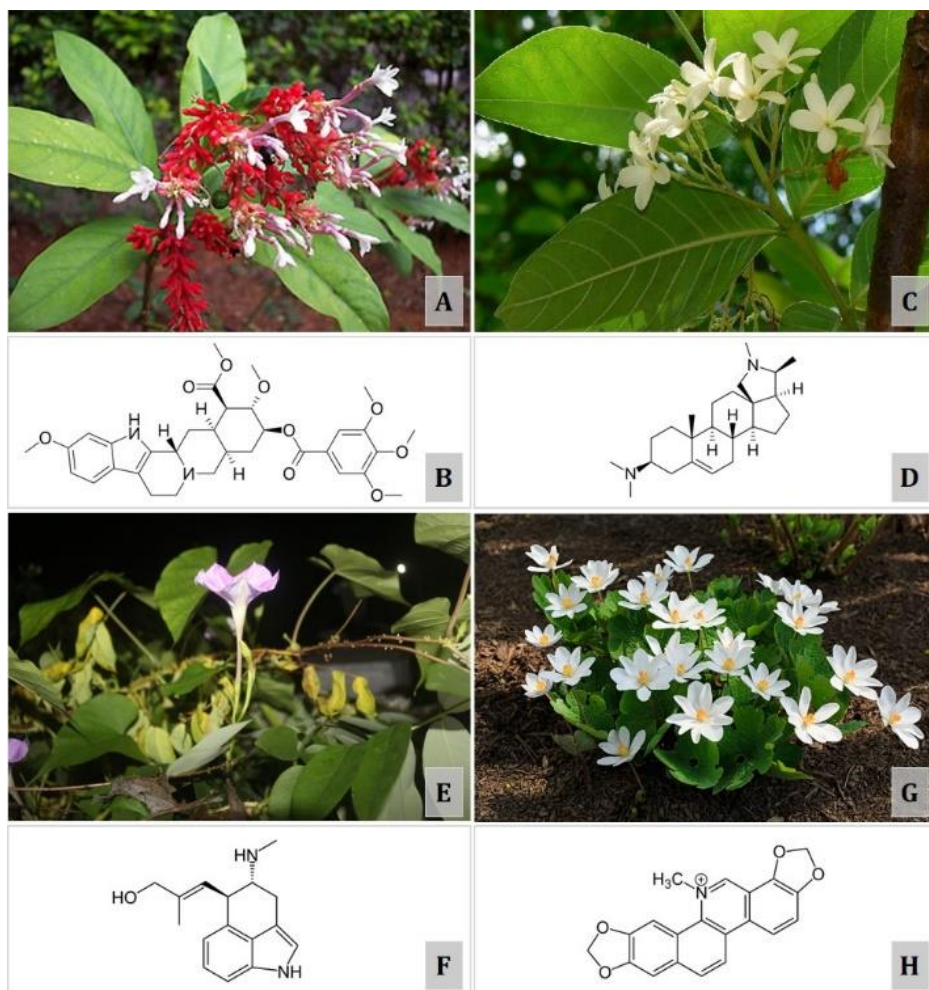
Tomatidin je steroidni alkaloid koji je čest kod biljaka iz porodice pomoćnica kao što su paradajz, krompir i patlidžan, a posjeduje antibakterijsku aktivnost, kako samostalno tako i u kombinaciji sa aminoglikozidima, kada čak može djelovati i sinergistički. Tomatidin dokazano poboljšava djelovanje različitih antibiotika kao što su: gentamicin, cefepim, ciprofloksacin i ampicilin.

Vrsta *Holarrrhena antidysenterica* (L.) Wall. ex A. DC. (Apocynaceae) (Slika 8.4.C) bogata je alkaloidima, osobito steroidnim alkaloidom konezinom (Slika 8.4.D), koji joj daje terapijske odlike. Konezin djeluje poput antibiotika, a u kombinaciji sa antibioticima ispoljava sinergističko djelovanje. Također ima dokazanu aktivnost protiv AdeIJK¹⁹ efluks pumpe koja izbacuje brojne antibiotike iz stanice.

Hanoklavin (Slika 8.4.F) je triciklični ergot-alkaloid izoliran iz vrste *Ipomoea muricata* (L.) Jacq. (Slika 8.4.E), a ispoljava sinergističko djelovanje kada se koristi u kombinaciji sa tetraciklinima. Inhibira efluks pumpe i to one koje su povezane sa ATP-azama.

Sangvinarin (Slika 8.4.H) se može izolirati iz ekstrakata biljaka kao što su *Chelidonium majus* L., *Sanguinaria canadensis* L. (Slika 8.4.G) i *Macleaya cordata* (Willd.) R.Br.

¹⁹ AdeIJK je trokomponentni efluks sistem koji doprinosi rezistenciji na brojne antibiotike uključujući beta-laktame, hloramfenikol, tetracikline, eritromicin, linkozamide, florohinolone itd.



Slika 8.4. A, *Rauwolfia serpentina*; B, Rezerpin; C, *Holarrhena antidysenterica*; D, Konezin; E, *Ipomoea muricata*; F, Hanoklavine; G, *Sanguinaria canadensis*; H, Sangvinarin

8.2.2. Organosumporni spojevi

Postoji veliki broj navoda o antimikrobnom djelovanju biljnih organosumpornih spojeva, koje obuhvata antibakterijske, antifungalne, antivirusne i antiprotozoalne učinke. Neki primjeri su: alicin, ajoen, dialkenil- i dialkilsulfidi, *S*-alilcistein i *S*-alilmerkaptocistein, te izocijanati koji imaju naglašenu aktivnost protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija.

Generalno, antimikrobna aktivnost je zasnovana na inhibiciji sulfhidril-ovisnih enzima i djelimičnoj inhibiciji sinteze DNK i proteina, narušavanju integriteta staničnog zida, smanjenim stopama konzumacije oksigena, intracelularnoj akumulaciji reaktivnih oksigenskih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i depolarizaciji mitohondrijske membrane.

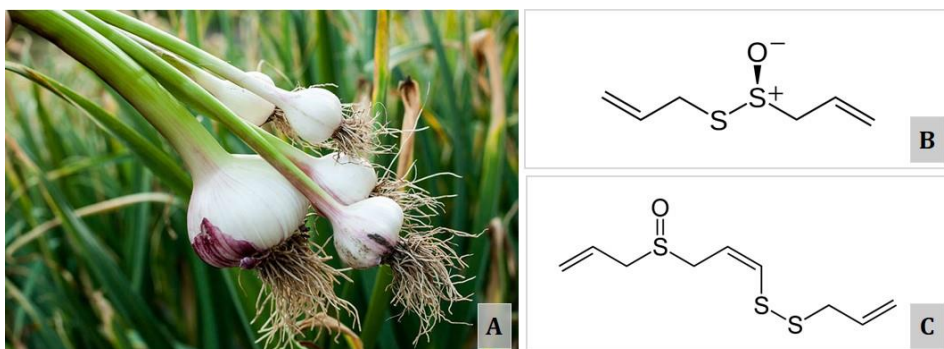
Alicin (dialiltiosulfinat) (Slika 8.5.B) se dobija iz bijelog luka, *Allium sativum* L. (Slika 8.5.A) i aktivan je protiv velikog broja mikroorganizama. Također, alicin pojačava antibakterijsku aktivnost određenih antibiotika kakvi su primjerice cefoperazon, tobramicin i ciprofloksacin. Mehanizam antimikrobnog djelovanja zasnovan je na inhibiciji sulfhidril-ovisnih enzima uključujući alkohol-dehidrogenazu, tioredoksin reduktazu i RNK-polimerazu. Nadalje, alicin parcijalno inhibira sintezu proteina i DNK, te djeluje na RNK, što indicira i tu molekulu nukleinske kiseline kao potencijalnu metu njegovog djelovanja. Ajoen (Slika 8.5.C) je organosumporna komponenta detektovana također u ekstraktu bijelog luka. Sastoji se od mješavine dva glavna steroizomera *E*- i *Z*-ajoen. Posjeduje jako antibakterijsko djelovanje, ali i potentnije antivirusno djelovanje u poređenju sa alicinom. Ajoen, kao i alicin ispoljava slične antibakterijske mehanizme, a funkcioniranje mu je neizostavno povezano sa različitim tiol-ovisnim enzimskim sistemima.

Izotiocijanati predstavljaju isparljive organosumporne komponente dobijene reakcijom između biljnih glukozinolata i enzima mirozinaza. Nakon disrupcije tkiva, enzim hidrolizira u aktivne komponente kao što su nitrili, tiocijanati i izotiocijanati. Ove komponente su zastupljene kod biljaka iz reda Capparales, osobito kod predstavnika porodice Brassicaceae (=Cruciferae, krstašice, kupusnjače). Precizan mehanizam njihovog antimikrobnog djelovanja nije poznat, ali smatra se da je povezan sa reaktivnosti izotiocijanata i proteina, što *in vivo* ometa odvijanje biohemijskih procesa. Ugljik u izotiocijanatnoj grupi je elektrofilan i lako reaguje sa aminima, tiolima i hidroksilima, što posljedično utiče na tiole i amine aminokiselinских rezidua unutar proteina, te na sulfhidrilnu grupu. Cistein ima ključnu ulogu u strukturi proteina, njihovoj regulatornoj funkciji i stabilizaciji putem različitih mehanizama, a izotiocijanati inhibiraju vezna mjesta za ATP na P-ATP-azi bakterija, što se ostvaruje kroz djelovanje na cisteinske rezidue.

Još jedan primjer antimikrobnih organosumpornih spojeva je sulforafan, prisutan kod vrste *Diplotaxis harra* (Forssk.) Boiss (Slika 8.6.B).

Alilizotiocijanati sa snažnim antibakterijskim djelovanjem pronađeni su kod vrsta *Armoracia rusticana* G. Gaertn., B. Mey & Schreb. (Slika 8.6.D) i *Eutrema japonicum* (Miq.) Koidz. Ovi spojevi ispoljavaju bakteriostatsko i baktericidno djelovanje, smanjuju vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije eritromicina i sinergistički djeluju sa streptomycinom. Također, uočeno je da dovode do narušavanja integriteta stanične stijenke zbog čega dolazi do curenja metabolita iz stanice. Dovode i do inaktivacije esencijalnih intracelularnih enzima putem oksidativnog cijepanja disulfidnih veza.

Benzilizotiocijanat izoliran iz vrste *Alliaria petiolata* (M. Bieb.) Cavara & Grande (Slika 8.6.A), djeluje baktericidno i na multirezistentne sojeve mikroorganizama. Potencijalna aktivnost ove komponente ovisi od hemijske strukture, s obzirom da posjeduje lipofilne i elektrofilne odlike te može penetrirati kroz vanjsku membranu bakterija i na taj način dovesti do narušavanja integriteta membrane. Fenilizotiocijanat je detektovan kod vrsta *Brassica campestris* L. (Slika 8.6.C) i *B. rapa* L. Djeluje inhibitorno na mikroorganizme, osobito na Gram-pozitivne bakterije. Istraživanja sugeriraju i antifungalno djelovanje ovog spoja, najvjerovatnije u kombinaciji smanjene stope konzumacije kisika, intracelularne akumulacije reaktivnih oksigenskih vrsta i depolarizaciji membrane mitohondrija. Berteroin prisutan u brokuli, *B. oleracea* L. također posjeduje snažnu baktericidnu aktivnost.



Slika 8.5. A, *Allium sativum*. Strukture bioaktivnih organosumpornih spojeva: B, alicin; C, ajoen



Slika 8.6. Različite vrste iz porodice Brassicaceae, bogate organosumpornim spojevima

A, *Alliaria petiolata*; B, *Diplotaxis harra*; C, *Brassica campestris*; D, *Armoracia rusticana*

8.2.3. Fenolne komponente

Fenoli su najheterogenija skupina bioaktivnih sekundarnih metabolita prisutnih u ljekovitim biljkama i dosta se koriste protiv različitih patogena. Ipak, njihovo antimikrobno djelovanje može biti slabo i često nespecifično. Fenolne komponente kao što su: flavoni, flavanoli, flavonoidi, hinoni i tanini pokazuju različite mehanizme djelovanja protiv različitih mikrobnih sojeva. Glavne strategije podrazumijevaju inhibiciju efluks pumpi, modificiranje permeabiliteta membrane, promjenu određenih intracelularnih funkcija u smislu vezivanja za enzime ili pak, gubitak integriteta stanične stijenke različitim interakcijama sa plazma membranom. Flavoni su učinkoviti antimikrobni agensi u smislu disrupcije ovojnice mikroorganizama. Flavanoli formiraju komplekse sa staničnim zidom i inaktiviraju određene enzime, vjerovatno kroz reakciju sa sulfhidrilnim grupama ili putem nespecifične interakcije sa proteinima.

Flavonoidi su dosta poznati po svom antimikrobnom i antiinflamatornom djelovanju. Njihova aktivnost proizilazi iz mogućnosti da formiraju komplekse sa ekstracelularnim proteinima kao i sa bakterijskom membranom. Stoga često djeluju kroz inhibiciju bakterijskih faktora virulencije kao što su QS signalni receptori i enzimi, kroz destabilizaciju i permeabilizaciju plazma membrane, inhibiciju ekstracelularnih mikrobnih enzima i deprivaciju supstrata neophodnih za mikrobnog rast (npr. željezo i cink). Nadalje, u smislu pružanja stabilnih slobodnih radikala, hinoni kompleksiraju sa nukleofilnim aminokiselinama u mikrobnim proteinima što često vodi ka gubitku njihove funkcije.

Tanini su okarakterisani antibakterijskom aktivnosti protiv Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija, mehanizmima koji uključuju disrupciju staničnog zida i plazma membrane, inhibiciju oksidativne fosforilacije koja utiče na kompletan mikrobni metabolizam, te interkaliranje u DNK i inhibiciju enzima što interferira sa transkripcijom, smanjuje ekspresiju gena i u konačnici uzrokuje staničnu smrt. Primjeri antimikrobnih fenolnih spojeva iz biljaka su navedeni u nastavku.

Resveratrol je prirodna fenolna komponenta koja ispoljava inhibiciju efluks pumpi, što može dovesti do akumulacije štetnih spojeva u stanici. Prvi put je izoliran iz biljke *Veratrum grandiflorum* O.Loos, a naknadno je dokazan i u brojnim drugim biljkama. Baikalein (Slika 8.7.B) je flavon izoliran iz korijena vrsta *Thymus vulgaris* L., *Scutellaria baicalensis* Georgi (Slika 8.7.A) i *S. laterifolia* L. Baikalein poboljšava učinkovitost beta-laktamskih antibiotika, tetraciklina i ciprofloksacina, te ispoljava sinergistički efekat sa tetraciklinom. Inhibitorna aktivnost biohanina A, izoflavonskog spoja, na efluks sistem nekih multirezistentnih sojeva indicira da ova supstanca inhibira efluks pumpe redukcijom ekspresije NorA proteina. Inhibitorski efekat je uočen i za neke intracelularne mikroorganizme, kakvi su *Chlamydia* i *Mycobacterium*.

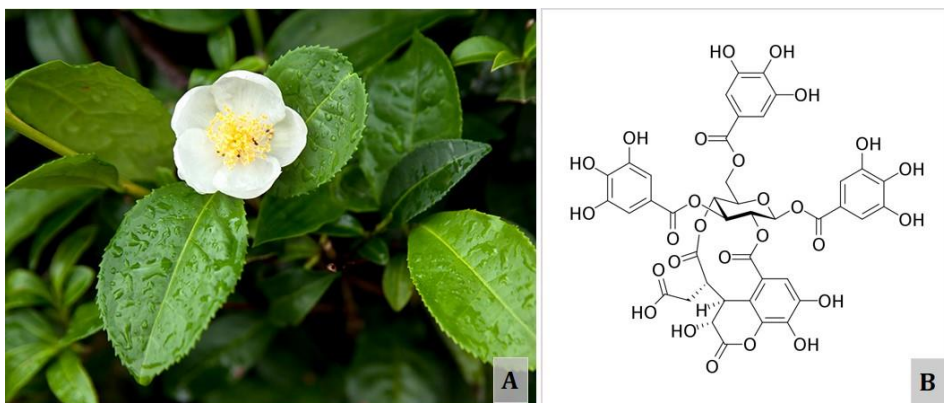


Slika 8.7. A, *Scutellaria baicalensis*; B, struktura baikaleina

Hrizosplenol D i hrizoplenetin koji predstavljaju metoksilizirane flavone izolirane iz slatkog pelina, *Artemisia annua* L. inhibiraju NorA efluks pumpu u prisustvu subinhibitorskih koncentracija berberina kao supstrata za NorA. Izoflavonoidi i flavonolignani inhibiraju NorA i povećavaju potentnost norfloksacina i berberina.

Silibin, flavonolignan iz vrste *Silybum marianum* (L.) Gaertn., te izoflavonoidi biohanin A, genistein i orobol iz vrste *Lupinus argenteus* Pursh također su uključeni u izmjene aktivnosti NorA efluks pumpi. Kaempferol je aktivni flavonoid koji se smatra potencijalnim kandidatom protiv brojnih patogenih mikroba. Inhibira efluks pumpe slično kao verapamil. Kaempferol ramnozid je prirodni glikozidni derivat kaempferola izoliran iz vrste *Persea lingue* (Ruiz & Pav.) Nees ex Kopp. Kvercetin ispoljava umjerenu inhibiciju efluks pumpi. Halkoni inhibiraju aktivnost efluks pumpi i povećavaju djelovanje antibiotika, a primjer biljke koja ih posjeduje je *Dalea versicolor* Zucc. Katehin galati, među kojima je i poznati epigalokatehin galat predstavljaju skupinu fenolnih spojeva koji su se pokazali uspješnim čak i protiv multirezistentnih sojeva mikroorganizama.

Polifenoli iz zelenog čaja (Slika 8.8.A) (tanini), hebulinska kiselina (Slika 8.8.B) i antrahinoni inhibitorno djeluju na aktivnost DNK giraze. Haloemodini su semisintetski prirodni antrahinonski derivati koji snažno inhibiraju DNK girazu kod multirezistentnih sojeva bakterija. Nekoliko halogeniranih analoga prirodnih emodina je sintetizirano i pokazuju snažnu aktivnost protiv bakterijske DNK giraze, ali slabu aktivnost protiv humane topoizomeraze I.



Slika 8.8. A, Zeleni čaj, *Camellia sinensis*; B, Struktura hebulinske kiseline

Nove fenolne komponente iz vrste *Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don ispoljavaju značajnu antibakterijsku aktivnost koja se ogleda u nastanku oštećenja plazma membrane i indukciji curenja intracelularnih konstituenata usljed hiperpolarizacije membrane.

Rezultati studija sugeriraju da hidroksicimetna kiselina i njeni produkti (*p*-kumarinska, kafeinska i ferulinska kiselina) mogu narušiti integritet membrane, a što su lipofilniji, kao recimo *p*-kumarin, time ispoljavaju snažnije djelovanje. Flavonoidi također mogu rigidizirati membranu bakterija, odnosno smanjiti njenu fluidnost. Fenoli interreaguju sa ključnim enzimima odgovornim za produkciju prekursora membrane bakterijske stanice ili enzimima uključenim u biosintezu i elongaciju masnih kiselina. Neki flavanoni kao što su naringenin, eriodiktiol i taksifolin su potentni inhibitori KAS III²⁰ enzima kod nekih bakterija.

Kurkumin je poznata fenolna komponenta čija se baktericidna aktivnost zasniva na oštećenju stanične membrane. Amfipatična i lipofilna hemijska struktura kurkumina omogućava penetraciju u membranski dvosloj i olakšava permeabilnost. *D*-Alanil-*D*-alanin ligaza je ključni enzim u sastavljanju peptidoglikanskih prekursora staničnog zida, a kvercetin i apigenin inhibiraju ovaj enzim kod nekih bakterija. Neki drugi fenoli ulaze u direktnu interakciju sa peptidoglikanima i inhibiraju biosintezu staničnog zida. Takav je recimo soforaflavanon B, prenilni flavonoid. Dakle, inhibicija nekih enzima uključujući dihidrofolat reduktazu, ureazu i sortazu može biti način djelovanja nekih fenolnih spojeva.

Dakle, fenolne komponente ispoljavaju različite mehanizme antimikrobne aktivnosti, od sinergizma putem inhibicije efluks pumpi, preko interakcije sa staničnom membranom i inhibicije biosinteze stanične stijenke, do inhibicije kritičnih enzima kao što su ureaze, sortaze i dihidrofolat reduktaze. Fenoli su dobri kandidati za buduće *in vivo* studije, pa čak i klinička testiranja u smislu antimikrobnih učinaka.

8.2.4. Kumarini

Kumarini pripadaju velikoj grupi spojeva poznatih kao benzopironi, a mnogi predstavnici ove skupine imaju naglašenu antimikrobnu aktivnost.

²⁰ KAS (3-ketoacil-ACP sintaza) III proteini spadaju u najzastupljenije enzime u prirodi, a uključeni su u biosintezu masnih kiselina i prirodnih produkata. KAS III enzimi kataliziraju reakciju nastanka ugljik-ugljik veze koja uključuje α -ugljik tioestera i karbonil ugljik drugog tioestera.

Kumarini mogu supresirati QS kaskadu kod patogenih bakterija čime utiču na sposobnost formiranja i razvoja biofilma, ali i faktora virulencije. Štaviše, kumarini inhibitorno djeluju na efluks pumpe nekih multirezistentnih sojeva i potentni su inhibitori DNK giraze. Posredno su korisni u slučajevima infekcije, s obzirom na činjenicu da stimuliraju makrofage. Za antibakterijski učinak kumarina ključne su lipofilne odlike i planarna struktura. Smatra se da je antimikrobna aktivnost kumarina rezultat pasivne difuzije, što olakšava celularnu penetraciju osobito kod Gram-pozitivnih bakterija. S druge strane, kumarini sa metoksi funkcionalnom grupom na C-7 poziciji imaju širok spektar antibakterijske aktivnosti. Postojanje aromatičnog dimetoksi aranžmana daje kumarinima vrlo prominentne antimikrobne karakteristike. Kumarini mogu supresirati i QS sistem bakterija i ometati nastanak i razvoj biofilмова.

Vrsta *Ferulago campestris* (Besser) Grecscu posjeduje različite kumarine i piranokumarine sa antibakterijskim i antioksidativnim djelovanjem, među kojima se izdvajaju agasilin, grandivitin i egelinol. Također, prenilni kumarini su prisutni u ekstraktu korijena novoopisane vrste štitarica (Apiaceae) *Prangos hulussii* (Senol, Yildirim & Seçmen) i ispoljavaju antimikrobnu aktivnost. Nadalje, asfodelin A izoliran iz *Asphodelus microcarpus* Viv. ima dokazanu antimikrobnu aktivnost.

Bergamotin epoksid (Slika 8.9.B), furanokumarin iz grejpa, *Citrus × paradisi* (Slika 8.9.A) smanjuje vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije norfloksacina putem inhibicije efluks pumpi kod određenih multirezistentnih sojeva. *O*-Geranil kumarin i galbanična kiselina su terpenoidni kumarini koji također inhibiraju efluks pumpe.



Slika 8.9. A, *Citrus × paradisi*, grejp; B, epoksibergamotin

8.2.5. Terpeni i terpenoidi

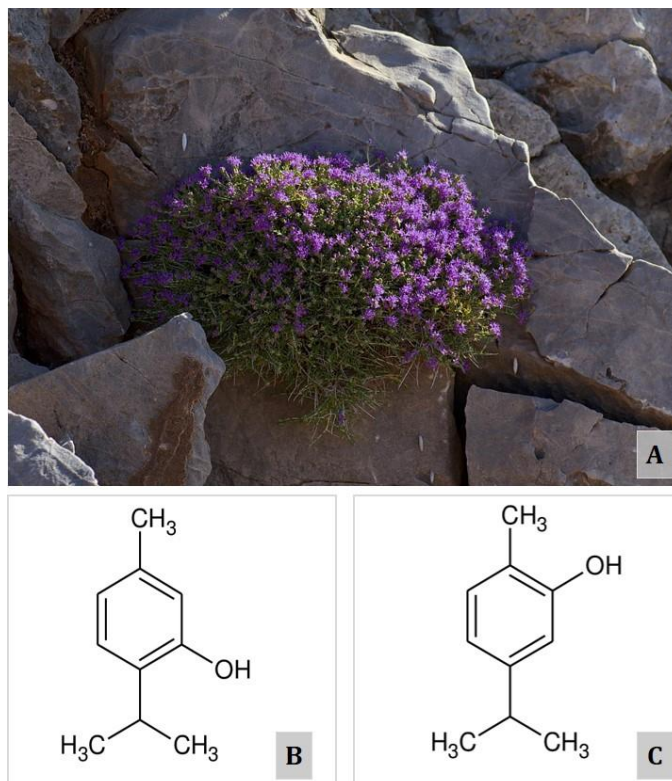
Terpeni ili izoprenoidi, kao i njihovi derivati sa dodatnim elementima (najčešće kisikom), tj. terpenoidi se smatraju najraznovrnijom porodicom prirodnih produkata. Široko su rašireni u prirodi i imaju brojne funkcije, od učešća u izgradnji primarnih struktura stanice do aktivnog sudjelovanja u staničnim funkcijama. Terpeni su također osnovna komponenta frakcije eteričnih ulja, koja ispoljavaju veliki antimikrobni potencijal osobito kroz sinergističko djelovanje sa drugim aktivnim komponentama. Antimikrobna aktivnost terpena predstavlja izazovan istraživački fenomen, najprije zbog njihove slabe topivosti, ali i zbog strukturnih razlika među pojedinim mikrobnim skupinama. Generalno, Gram-pozitivne bakterije su osjetljivije na terpena u odnosu na Gram-negativne bakterije.

Konkretan mehanizam djelovanja terpenoida nije do kraja definiran, ali rezultati studija pokazuju da uključuje disrupciju membrane lipofilnim komponentama, disrupciju pokretačke sile proteina i koagulaciju staničnog sadržaja. Derivati terpenoida kao što su diterpenoidi također ispoljavaju antimikrobnu aktivnost i to protiv bakterija, funga, virusa i protozoa. Antimikrobni mehanizmi terpena su direktno povezani sa njihovim lipofilnim odlikama koje im olakšavaju penetraciju kroz stanični zid mikroorganizama. Monotepreni dominantno utiču na strukture membrane povećanjem njene fluidnosti i permeabiliteta, alteracijom topologije proteina i ometanjem respiratornog lanca.

Interesantno je djelovanje terpenskih alkohola sa različitim alifatskim karbonskim lancima, kao što su linalol (C6), geraniol (C8), nerolidol (C10), plaunotol (C11), farnezol (C12) i geranilgeraniol i fitol (C16).

Ove supstance najvjerojatnije dovode do curenja kalijumovih jona iz stanice. Također, dužina hidrokarbonskog lanca povezanog sa hidroksilnom grupom ima važnu ulogu u antibakterijskoj aktivnosti i disrupciji membrane. Jedan od najpoznatijih terpena koji ima potencijal da se koristi kao antimikrobna terapija je karvon, osobito kada su u pitanju gljivice. Još jedna važna antifungalna komponenta je timol, koji se može primijeniti samostalno ili u kombinaciji sa flukonazolom. Timol, karvakrol, eugenol i mentol se inače smatraju odličnim alternativama sintetičkim fungicidima, osobito u industriji hrane. Timol (Slika 8.10.B), kao i karvakrol (Slika 8.10.C) su glavne komponente pripravaka deriviranih iz vrste *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. & Link. (Slika 8.10.A).

Djeluju kroz narušavanje integriteta membrane, ali i inhibicijom efluks pumpi. Pentaciklični triterpeni sa antimikrobnom aktivnošću su ursolična kiselina i α -amirin.



Slika 8.10. A, *Thymus capitatus*; B, Timol; C, Karvakrol

Drugi poznati terpenoidi prisutni u eteričnim uljima su učinkoviti protiv širokog spektra patogena. Eugenol ima snažnu bioaktivnost jer sprečava formiranje biofilma, ometa intercelularnu komunikaciju, eradicira već uspostavljene biofilmove i uništava bakterije u biofilmu.

Najvjerovatnije se ovo dešava usljed narušavanja integriteta membrane i curenja staničnog sadržaja. Eugenol nadalje reducira ekspresiju gena povezanih sa produkcijom biofilma i enterotoksina, u subinhibitornoj koncentraciji. Nekoliko terpenoidnih derivata pokazuje i antimikobakterijsku aktivnost, a takvi su na primjer: sandaropimarinska kiselina, agelazin F, elizapterozin B, kostunolid, partenolid, rejnozin, alantolakton, elatol itd. Navedeni spojevi djeluju putem svoje lipofilne prirode koja im omogućava prodor kroz mikobakterijski stanični zid.

Zanimljiv fenomen je i interakcija ekstrakata ljekovitih biljaka i konvencionalnih antibiotika. Postoje dokazi za poboljšano djelovanje određenih antibiotika kada se primjenjuju sa ljekovitim biljnim pripravcima, što se temelji na sinergiji aktivnih komponenti. Tako na primjer kombinacija β -laktama sa α -magnostinom izoliranim iz plodova vrste *Garcinia mangostana* L. (Clusiaceae) povećava učinkovitost terapije β -laktamima kod rezistentnih bakterijskih sojeva. Najvjerovatniji scenarij je da biljne bioaktivne komponente u navedenoj kombinaciji inhibiraju bakterijske beta-laktamaze, te na taj način reaktiviraju antibiotik.

In vitro studije interakcije biljnih ekstrakata i antibiotika su zabilježile značajnu redukciju vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika protiv određenih rezistentnih mikrobnih sojeva. Kurativno djelovanje biljnih ekstrakata u ovakvim kombinacijama najčešće se označava kao aktivnost modifikacije rezistencije (engl. RMA, *Resistance Modifying Activity*). Interakcija biljnih ekstrakata i antibiotika ovisi o nekoliko faktora, uključujući farmakokinetiku i farmakodinamiku, jer izvjesna aktivna kombinacija dokazana *in vitro* ne mora imati iste efekte *in vivo*. Farmakokinetičke interakcije su uglavnom u vezi sa povećanjem permeabilnosti antibiotika u staničnu membranu bakterija ili inhibiranjem ili induciranjem enzima i transportera za metaboliziranje antibiotika, što utiče na apsorpciju, distribuciju, metabolizam i ekskreciju konkurentnih antibiotika. Farmakodinamičke interakcije biljnih ekstrakata i antibiotika kao što je sinergizam ili antagonizam također se pojavljuju.

8.3. Bakterijski biofilmovi i antibiofilm aktivnost ljekovitih biljaka

Tokom procesa evolucije organizmi su razvili brojne sofisticirane sisteme i mehanizme korištene u adaptaciji sa faktorima okoliša u kojem žive. To je neminovno podrazumijevalo različite metaboličke i fenotipske promjene u svrhu odgovora na eksterni ili intrinzični stres.

Fenotipske modifikacije uočene kod odvedenijih organizama uključuju postojanje regulatornih mehanizama koji prvenstveno djeluju putem promjene genske ekspresije putem aktiviranja ili inhibiranja transkripcijskih faktora. To se ostvaruje različitim epigenetičkim promjena povezanim sa DNK molekulom i/ili statusom hromatina. Koordinacija interakcija između bakterija i viših organizama odvija se putem intercelularnog sistema zasnovanog na ekspresiji novih gena, poznatim kao *quorum sensing* (QS) sistem.

On se može posmatrati kao sistem stimulusa i odgovora koji je direktno povezan sa gustoćom bakterijskih stanica u populaciji, a koji regulira gensku ekspresiju uključujući i determinante virulencije. Ovaj sistem regulira veliki broj aktivnosti bakterija uključujući patogenost i rezistenciju na antibiotike. Nadalje, *QS* sistem učestvuje u formiranju bakterijskih biofilma koji su sve češće prepoznati kao razlog rezistencije na antibiotike i najvjerojatniji uzrok hroničnih infekcija.

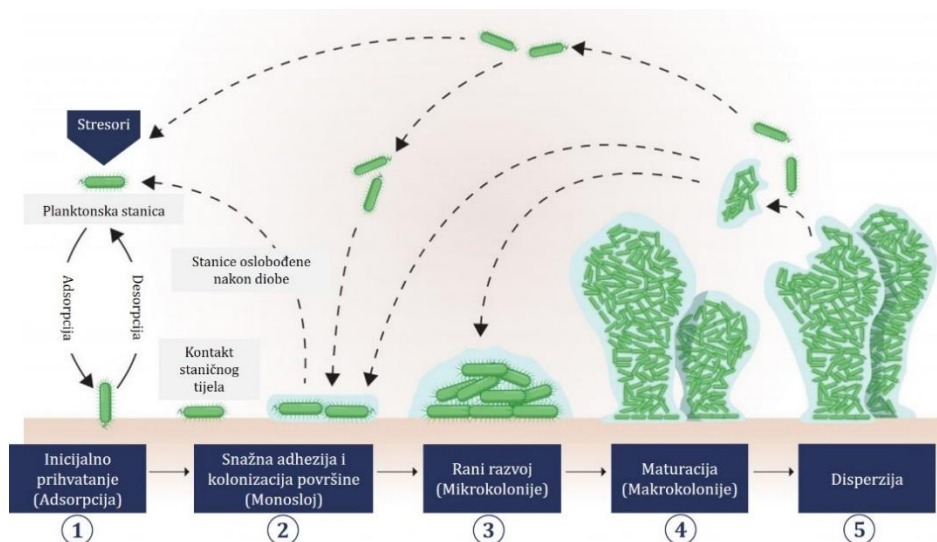
8.3.1. Formiranje biofilma i mikroba patogenost

Biofilm predstavlja zajednicu mikroorganizama pričvršćenu na određenu površinu, a koja se održava sekrecijom adhezivnog i protektivnog matriksa. Biofilm je živa i dinamična struktura koja se konstantno mijenja. Danas su konsekvence postojanja biofilma uglavnom posmatrane kao negativne tj. štetne, osobito u kliničkom i tehnološkom smislu, ali postoje i određeni pozitivni aspekti. Na globalnom nivou, biofilm najvjerojatnije predstavlja dominantan način života bakterija, a struktura i fiziologija biofilma mikroorganizmima koji ga čine daje odlike socijalne organizacije slične onoj koju imaju eukariotske stanice u tkivima. U razumijevanju biofilma potrebno je razlikovati kontekstualni i deskriptivni kriterij. Kontekstualni kriterij odnosi se na mono- ili polimikrobnu zajednicu prisutnu na nivou neke čvrste površine. Vrlo često su takve površine neka strana tijela kao npr. proteze, umjetne valvule, kateteri itd. S druge strane, deskriptivni ili morfološki kriterij je povezan sa formiranjem ekstracelularnog matriksa koji se sastoji od kompleksa polimera i označava se kao ekstracelularna polimerna supstanca (EPS). Molekularni kriterij je najkompleksniji i nije do kraja objašnjen, a odnosi se na specifičnosti transkripcije.

U procesu nastanka biofilma načelno se može razlikovati nekoliko faza, a to su: inicijalno prihvatanje (adhezija ili adsorpcija), ireverzibilna adhezija, formiranje prostorne strukture, maturacija i finalna disperzija (Slika 8.11).

U inicijalnoj fazi formiranja biofilma, planktonske stanice dopijevaju na povoljnu površinu u cilju fiksacije. Bakterijsko prihvatanje za površinu, kao i kohezija (interakcija između stanica) može se ostvariti posredstvom bakterijskih izdanaka kao što su flagele ili pili, ili putem fizičkih faktora kao što su van der Waalsove sile ili elektrostatske interakcije. Kada su bakterije pričvršćene, ulaze u stadij mirovanja, a nakon toga stanice se pomjeraju usljed pozitivne regulacije gena povezanih sa sintezom EPS i alginata (algC).

Kao rezultat ovih procesa nastaje mikrokolonija i u konačnici se formira diferencirani klaster tj. biofilm. Tokom maturacije biofilma bakterije su pričvršćene na površinu i kreiraju protektivni okoliš oko sebe sekrecijom EPS čime se sprečava ulazak antibiotika u biofilm. Također, dolazi do formiranja vodenih kanala unutar biofilma s ciljem razmjene nutrijenata i otpadnih produkata metabolizma. Iako unutar biofilma mogu biti prisutne vrlo niske koncentracije kisika i nutrijenata, bakterije su na to tolerantne, čak dolazi do pojačane ekspresije faktora virulencije. Usljed pojave povoljnijih uslova, stanice se mogu odvojiti od biofilma.



Slika 8.11. Osnovne faze u procesu formiranja bakterijskog biofilma
(1, adsorpcija; 2, adhezija i kolonizacija; 3, rani razvoj; 4, maturacija; 5, disperzija)

Formiranje biofilma je direktno povezano sa rezistencijom. Kada bakterije uđu u stadij rasta biofilma, iz toga proizilaze najprije povećana otpornost na antibiotike, ali i perzistentan imuni odgovor. Neke bakterije biofilma tolerišu 10-1000 puta veće koncentracije antibiotika u odnosu na genetički slične bakterija koje žive kao planktonski oblici. Ova rezistencija je rezultat smanjene dostupnosti antibiotika od strane matriksa biofilma, povećane aktivnosti efluks pumpi, metaboličke heterogenosti, sporog rasta (ili čak dormancije) bakterija u pojedinim dijelovima biofilma, ekspresije gena uključenih u odgovor na stres, te emergencije specifičnih biofilm-fenotipova.

U ovom smislu važnu ulogu igraju i genetičke promjene koje reguliraju prelaz planktonskih u perzistentne bakterije, a na sam proces rezistencije može djelovati i kombinacija svih navedenih faktora.

8.3.2. *Quorum sensing, QS*

Quorum sensing je vid bakterijske signalizacije zasnovan na produkciji malih posredujućih molekula nazvanih auto-induktori, tokom faze bakterijskog rasta. Kada se dostigne određena kritična koncentracija auto-induktora, oni ulaze u interakciju sa regulatorima transkripcije i omogućavaju specifičnu ekspresiju grupe gena. Jedan od najbolje istraženih intraspecijskih auto-induktora je N-acilhomoserin lakton (AHL) kod Gram-negativnih bakterija. Kod ove skupine bakterija, genetičke determinante *quorum sensing*-a su organizirane u kompleksnu regulatornu mrežu uključujući *QS* kaskadu i spektar transkripcijskih i post-transkripcijskih regulatora koji djeluju na sintezu AHL auto-induktora. Gram-pozitivne bakterije koriste signalizaciju zasnovanu na oligopeptidima sa dvokomponentnim senzorom. Pored laktona, Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije mogu koristiti signalnu molekulu poznatu kao auto-induktor-2 (IA-2) i (IA-3), tj. borat furanozil.

- *Quorum sensing zasnovan na AHL molekulama*

Kod Gram-negativnih bakterija, u *quorum sensing* proces su uključeni LasR-I i RHLR-I sistemi. Sinteza AHL molekula je katalizirana posebnim enzimom nazvanim lakton sintaza (*luxI*) koji se luči u ekstracelularni medij. Porastom gustoće stanica (čime se dostiže kvorum), AHL molekule prisutne u mediju dostižu svoju kritičnu koncentraciju, te difunduju u stanice i ulaze u interakciju sa regulatorima transkripcije. Ovi kompleksi mogu dalje aktivirati veliki broj regulatora transkripcije kao što su *lasI*, *lasB* i *toxA*. Aktivacija regulatora genske familije je povezana sa koncentracijom AHL molekula.

- *Quorum sensing zasnovan na lučenju peptida*

Quorum sensing kod Gram-pozitivnih bakterija je zasnovan na formiranju oligopeptida od peptida. Molekule nazvane auto-inducirajući oligopeptidi (engl. *auto-inducing oligopeptide*, AIP) koriste *QS* signalne molekule. Auto-inducirajući oligopeptidi se izlučuju u ekstracelularni prostor i odlikuju se afinitetom za histidin membranskog receptora kinaze.

Ekspresija AIP peptidnih molekula je povezana sa agrD genskom familijom. Jednom ekspresiran, membranski AgrB protein modificira konformaciju dodavanjem tiolaktona, čime se omogućava eksportovanje u ekstracelularni prostor kao oligopeptida.

Kada ekstracelularna koncentracija AIP molekula dostigne kritičnu vrijednost, ove molekule se vežu za AgrC receptor. Transmembranska signalna transdukcija generira autofosforilaciju AgrA, time aktivirajući nekoliko signalnih puteva koji su odgovorni za ekspresiju agrBDCA proteina. Aktivacija ovog sistema ovisi od koncentracije tj. gustoće stanica. Kada gustoća raste, agr sistem može biti aktiviran time mijenjajući fiziološko stanje bakterija.

- *Quorum sensing zasnovan na i AI-2 sistemu*

Ovaj sistem je definiran kod Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija. Zasnovan je na signalnoj molekuli nazvanoj furanozil borat diester (AI-2), koja učestvuje u inter- i intraspecijskom signaliziranju u ovisnosti od praga koncentracije tj. gustoće stanica. Kao i kod drugih auto-induktivnih molekula, AI-2 protein se inkorporira u stanice putem specifičnih transportera. Kada se nalazi unutar stanice, AI-2 podilazi fosforilaciji i generira signalni put koji završava regulacijom luxS-reguliranog operona.

Quorum sensing svakako može biti zasnovan i na drugim sistemima, te je uočena prirodna varijacija QS sistema. Također, neke bakterijske vrste i sojevi ne proizvode auto-induktore, ali mogu odgovarati na signale produkovane auto-induktorima drugih bakterija.

8.3.2.1. *Quorum sensing* u terapijskom smislu

Emergencija antibiotske rezistencije predstavlja veoma ozbiljan problem globalnog zdravlja, koji zahtijeva razvoj novih terapijskih pristupa i strategija. Oko 80% infekcija posljedica su bakterijskih biofilmova, sa naglašenom rezistencijom na sintetičke lijekove. U cilju uništavanja biofilmova primjenjuju se različiti pristupi. Jedna od strategija inhibiranja formiranja biofilma je prevencija bakterijskog prihvaćanja na površinu. To se može postići oblaganjem površina sa antimikrobnim agensima kao što su metalne nanočestice, surfaktanti (kvaterne amonijumove soli) i sl. U potpunosti razvijen, zreli biofilm je veoma teško eradicirati.

Za eradikaciju potpuno razvijenog biofilma potrebno je koristiti komponente koje mogu penetrirati u strukture ili ih uništiti mehanički. Takvi su neki surfaktanti. Nekada oni nemaju dovoljno snage da eradikiraju biofilm u potpunosti, ali mogu uzrokovati smrt stanica.

Kao što je navedeno, formiranje bakterijskog biofilma je pod kontrolom komunikacijskog sistema nazvanog *quorum sensing*. Bakterijski *QS* sistem, kao fenomen zasnovan na produkciji, oslobađanju i detekciji autoinduktora, omogućava mnogim patogenim bakterijama adaptaciju na različite okolišne uslove posredstvom regulacije gena za produkciju biofilma, faktore virulencije, rezistencije na antibiotike ili posredstvom transfera genetičkog materijala u procesima transformacije i konjugacije. U tom smislu, djelovanje na *QS* medijatore, tj. razvoj novih anti-*QS* molekula može se smatrati alternativnim terapijskim pristupom. Strategije koje su zastupljene u prekidanju ili interferenciji sa bakterijskim *QS* sistemima podrazumijevaju inhibiciju generiranja, difuzije i prijema signala.

Pojam *quorum quenching* (*QQ*) označava relativno fenomen inhibiranja produkcije faktora virulencije i prevencije formiranja biofilma putem slabljenja *quorum sensing*-a. Djelovanje na *QS* sistem je definitivno obećavajuća strategija u borbi sa mikroorganizmima. Brojne komponente mogu djelovati na komunikaciju između bakterija, a u zavisnosti od njihove molekulske težine i hemijske kompozicije mogu se podijeliti u dvije osnovne grupe: makromolekularni *QQ* enzimi i mikropartikularni *QS* inhibitori.

Definirano je nekoliko osnovnih mehanizama inhibicije *QS* signalizacije: (1) inhibicija sinteze signalnih molekula, (2) inaktivacija ili enzimska degradacija signalnih molekula, (3) kompeticija sa receptorskim analogima signalnih molekula, te (4) blokiranje kaskada signalne transdukcije.

8.3.2.2. *Quorum sensing* inhibitori ljekovitih biljaka

Studije potvrđuju da veliki broj biljnih supstanci, a najprije sekundarnih metabolita posjeduje anti-*QS* odlike. Takve komponente su: flavonoidi, fenoli, fenolne kiseline, saponini, kumarini, tanini, hinoni, terpenoidi, alkaloidi, poliacetileni itd.

S obzirom na veliki diverzitet i biohemijsku kompleksnost prirodnih produkata, može se govoriti o različitim načinima djelovanja na *QS* medijatore i u konačnici inhibiranje formiranja biofilмова.

Fitohemikalije mogu biti posmatrane kao netoksični *QS* inhibitori uz pomoć kojih se ostvaruje kontrola infekcija bez mogućnosti stvaranja rezistencije. Također, biljne aktivne komponente predstavljaju najbogatiji i najdostupniji rezervoar novih terapijskih produkata.

U Tabeli 8.1. prikazane su određene ljekovite biljke čiji pripravci, tj. njihove aktivne komponente ispoljavaju anti-*QS* djelovanje.

Tabela 8.1. Biljne vrste sa dokazanom anti-*QS* aktivnošću

Biljna vrsta	Pripravak/ Osnovna komponenta	Testirani soj bakterije	Učinak
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Metanolni ekstrakt/ Flavonoidi (likorikon, glicirin, gilzirin)	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Smanjenje formiranja i pokretljivosti biofilma; Redukcija <i>QS</i> molekula koje reguliraju faktore virulencije
<i>Terminalia chebula</i>	Ekstrakt ploda/ Elaginska kiselina (benzojeva kiselina)	<i>Burkholderia cepacia</i>	Redukcija formiranja biofilma
<i>Piper bredemeyeri</i> , <i>P. brachypodon</i> , <i>P. bogotense</i>	Eterično ulje -	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Inhibicija produkcije violaceina
<i>Commiphora leptophloeos</i>	Ekstrakt kore -	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Inhibicija <i>QS</i> faktora koji kontroliraj-u formiranje biofilma
<i>Pityrocarpa moniliformis</i>	Ekstrakt lista -	<i>S. epidermidis</i>	Inhibicija <i>QS</i> faktora koji kontroliraju formiranje biofilma

<i>Bauhinia acuruana</i>	Ekstrakt grančica i ploda -	<i>S. epidermidis</i>	Inhibicija QS faktora koji kontroliraju formiranje biofilma
<i>Cocos nucifera</i>	Ekstrakt vlakana ljuske -	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Alteromonas</i> sp. <i>Galionella</i> sp.	Inhibicija formiranja biofilma i produkcije EPS
<i>Terminalia catappa</i>	Metanolni ekstrakt -	<i>C. violaceum</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Inhibicija QS kontrolirane produkcije violaceina; Inhibicija maturacije biofilma; Redukcija LasA aktivnosti i inhibicija maturacije biofilma
<i>Citrus reticulata</i>	Eterično ulje/ limonen	<i>P. aeruginosa</i>	Inhibicija formiranja biofilma; Inhibicija vijabilnosti stanica biofilma
<i>Eucalyptus radiata</i>, <i>E. globulus</i>	Eterično ulje/ Limonen, α -terpineol, α -terpinil acetat, α - pinen, 1.8-cineol, aromadendren, <i>p</i> -cimen	<i>A. baumannii</i>	Inhibicija QS regulirane produkcije violaceina
<i>Thymus vulgaris</i>	Eterično ulje/ Timol, karvakrol	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Smanjenje AHL produkcije; Supresija pokretljivosti bakterija i redukcija produkcije mRNA flagela gena

<i>Rubus rosifolius</i>	Fenolni ekstrakt -	<i>C. violaceum</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Serratia marcescens</i>	Inihibicija fenotipa reguliranih QS (produkcija violaceina, pokretljivost i formiranje biofilma)
<i>Centella asiatica</i>	Flavonoidna frakcija -	<i>P. aeruginosa</i> <i>C. violaceum</i>	Inihibicija produkcije violaceina; Inihibicija QS reguliranih fenotipa (produkcija piocijanina, elastolične i proteolitičke aktivnosti, pokretljivost); Formiranje biofilma
<i>Areca catechu</i>	Ekstrakt sjemenki -	<i>P. aeruginosa</i> <i>C. violaceum</i>	Interferencija sa produkcijom violaceina i pokretljivosti
<i>Scelrocarya birrea</i>	Metanolni ekstrakt -	<i>P. aeruginosa</i>	Redukcija plivanja, pokretljivosti i produkcije faktora virulencije
<i>Ocimum sanctum</i>, <i>Ananas comosus</i>, <i>Musa × paradisiaca</i>, <i>Monilkara zapota</i>	Vodeni ekstrakt -	<i>P. aeruginosa</i> <i>C. violaceum</i>	Inihibicija AHL posredovane produkcije violaceina; Inihibicija piocijanina, proteaze, produkcije elastaze i formiranja biofilma
<i>Rosa rugosa</i>	Polifenolni ekstrakt/ Epigalaktokatehin galat, epikatehin	<i>C. violaceum</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>	Smanjenje produkcije violaceina; Inihibicija pokretljivosti i formiranja biofilma

<i>Panax notoginseng</i>	Ekstrakt cvijeta i korijena -	<i>C. violaceum</i> <i>P. aeruginosa</i>	Interferencija sa produkcijom violaceina i pokretljivosti, Supresija produkcije LasA i LasB; Uticaj na regulaciju produkcije AHL molekula
<i>Buchanania lanzan</i>	Metanolni ekstrakt -	<i>Escherichia coli</i> <i>P. aeruginosa</i>	Redukcija formiranja biofilma
<i>Syzygium aromaticum</i>	Eterično ulje -	<i>P. aeruginosa</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>	Redukcija faktora virulencije; Uticaj na pokretljivost
<i>Psoralea corylifolia</i>	Sok i ekstrakt -	<i>E. coli</i>	Inhibicija formiranja biofilma
<i>Nymphaea tetragona</i>	Vodeni ekstrakt -	<i>C. violaceum</i> <i>P. aeruginosa</i>	Inhibicija produkcije violaceina; Inhibicija pokretljivosti; Redukcija produkcije piocijanina i Las proteazne aktivnosti
<i>Cecropia pachystachya</i>	Vodeni ekstrakt/ C-glikozil flavonoidi	<i>C. violaceum</i> <i>P. aeruginosa</i>	Inhibicija QS

Pored ovih, poznato je da su i iz drugih biljnih vrsta izolirane i identificirane bioaktivne molekule koje direktno inhibiraju QS sistem. Neke od takvih biljaka i njihovih komponenata su: *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews (vanilin), *Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don (taksifolin), *Eriodictyon californicum* (Hook & Arn.) Torr. (eriodiktol), *Armoracia rusticana* G. Gaertn., B. Mey & Schreb. (iberin), *Brassica oleracea* L. (erucin), *Allium sativum* L. (ajoen), *Citrus × sinensis* (naringin, naringenin, kaempferol, kvercetin, rutin, hesperidin, apigenin, neosferidin, neoeriocitrin), *Acacia karroo* Hayne (epigalaktokatehin, β -sitosterol), *Terminalia chebula* Retz. (elaginska kiselina), *Cinnamomum zeylanicum* J. Presl. (cinamaldehyd).

Nadalje, navode se: *Cuminum cyminum* L. (metil eugenol), *Curcuma longa* L. (kurkumin), *Zingiber officinale* Roscoe (zingeron), *Quercus infectoria* Oliv. (taninska kiselina), *Cecropia pachystachya* Trécul (hlorogenska kiselina, izoorientin, soviteksin, izoviteksin, viteksin).

Anti-QS aktivnost ljekovitih biljaka i njihovih produkata nije do kraja istražen fenomen. Mehanizmi uključeni u ovaj proces mogu biti zasnovani na glavnim hemijskim konstituentima, sinergističkog djelovanja pojedinih hemokomponenti ili mogu uključivati i male molekule koje nekada pojačavaju aktivnost glavnih klasa hemijskih supstanci.

Eterična ulja imaju dokazano snažno antibiofilm dejstvo. Inhibicija bakterijskog QS sistema može se ostvariti putem nekoliko mehanizama: inhibicija sinteze AHL molekula, inhibicija transporta i/ili sekrecije AHL molekula, sekvestracija AHL molekula, djelovanje na antagoniste medijatora ili inhibicija drugih ciljnih mjesta koja se ne nalaze na AHL receptoru. Kada je u pitanju anti-QS djelovanje organskih ekstrakata, uglavnom se ponašaju kao QS inhibitori usljed sličnosti njihovih hemijskih struktura sa strukturama signala *quorum sensing*-a, i/ili njihove mogućnosti da degradiraju signalne receptore (LuxR/LasR). Tako na primjer pirogolol iz *Embllica officinalis* Gaertn. ispoljava antagonističko djelovanje protiv Al-2. Kurkumin izolovan iz *Curcuma longa* L. inhibira ekspresiju gena virulencije, ekstrakti jabuke i srodnih vrsta posjeduju anti-QS aktivnost usljed prisustva polifenola kao što su hidroksicinamična kiselina, rutin i epikatehin. Hidroalkoholni ekstrakti *Berberis aristata* DC. i *Camelia sinensis* (L.) Kuntze ispoljavaju anti-adhezivnu i antibiofilm aktivnost. Etanolni i etil acetatni ekstrakt *Hypericum connatum* Lam. ima zabilježenu direktnu anti-QS aktivnost itd. Specifičnost anti-QS djelovanja supstanci ljekovitih biljaka definitivno ovisi od mnogo faktora kao što suodabrani bakterijski soj ili vrsta, tip ekstrakta, primijenjene eksperimentalne metode itd. Detaljno definiranje anti-QS aktivnosti zahtijeva poznavanje aktivne supstance svakog pripravka, te poznavanje ciljne molekule uključene u istraživani QS sistem.

8.4. Antivirusno djelovanje biljaka

Lijekovi derivirani iz biljaka, popularno zvani i etnomedikamenti, predstavljaju svojevrsan repozitorij u smislu strukturnog diverziteta i bioaktivnosti, te se kao takvi mogu tretirati kao važan izvor potencijalnih antivirusnih lijekova. Savremena nauka je dokazala da veliki broj ljekovitih biljaka zastupljenih još u drevnim praksama Ayurvede i Tradicionalnog kineskog sistema liječenja i danas imaju potencijal da se koriste kao lijekovi u prevenciji i tretmanu virusnih infekcija.

Rana istraživanja specifičnog antivirusnog potencijala biljaka započela su 1950-tih godina prošlog stoljeća i vezana su za virus gripe. Do danas je *in vitro* i *in vivo* definiran antivirusni potencijal brojnih biljnih vrsta. Carstvo biljaka je veoma raznoliko i obuhvata brojne oblike i životne forme, od mikroskopskih oblika do dugoživućih stoljetnih stabala. Istražiti svaku biljku i njene pojedine dijelove u smislu identifikacije antivirusnih komponenti je veoma težak zadatak, stoga možemo reći da do danas ne postoji definitivan spisak biljnih vrsta sa antivirusnim potencijalom. U Tabeli 8.2. predstavljene se biljne vrste čiji sekundarni metaboliti posjeduju antivirusno djelovanje.

Tabela 8.2. Biljne vrste sa dokazanim antivirusnim djelovanjem svojih sekundarnih metabolita

Porodica	Biljna vrsta	Bioaktivni spoj
Equisetaceae	<i>Equisetum giganteum</i> L.	Izoflavonoidi, indoli, fitosteroli, polisaharidi, seskviterpeni, alkaloidi, glukani i tanini
Taxaceae	<i>Torreya nucifera</i> (L.) Siebold & Zucc.	Diterpenoidi i biflavonoidi
Cupressaceae	<i>Taxodium distichum</i> (L.) Rich.	Lignani, diterpeni, flavonoidi, proantocijanidi i steroli
Ephedraceae	<i>Ephedra alata</i> (Stapf) Andr.	Protokatehinska kiselina, kafeinska kiselina, epikatehin, rutin, resveratrol, kvercetin, kaempferol
Schisandraceae	<i>Illicium verum</i> Hook.f.	Organske kiseline, terpenoidi i flavonoidi
Myristicaceae	<i>Myristica fragrans</i> Houtt.	Flavonoidi
Berberidaceae	<i>Epimedium koreanum</i> Nakai	Ikarin i kvercetin

Fagaceae	<i>Quercus persica</i> Jaub. & Spach	Flavanoidi, fenoli i tanini
Moraceae	<i>Artocarpus integrifolia</i> L.f.	Flavonoidi, tanini, terpeni, saponini
	<i>Ficus benjamina</i> L.	Flavonoidi rutin, kaempferol-3- <i>O</i> -rutinozid i kaempferol-3- <i>O</i> - robinobiozid
	<i>F. carica</i> L.	<i>N</i> -Arginin, luteolin, kafeinska kiselina
	<i>F. religiosa</i> L. not Forssk.	Flavonoidi, tanini, saponini, alkaloidi i steroidi/triterpenoidi
	<i>F. sycomorus</i> L.	Tanini, flavonoid, saponin, glikozid
Zygophyllaceae	<i>Balanites aegyptiaca</i> (L.) Delile	Ugljikohidrati, lipidi, proteini, alkaloidi, flavonoidi, saponini i organske kiseline
Menispermaceae	<i>Cissampelos pareira</i> L.	Alkaloidi, flavonoidi, tanini, isparljiva ulja i glikozidi
Rosaceae	<i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb.	Flavonoidi, tanini i triterpenoidi
	<i>Prunus dulcis</i> (Mill.) D.A.Webb.	Hidroksicimetna kiselina, eridiktiol, izorhamnetin, kvercetin, kaempferol, epikatehin, katehin
	<i>Acacia arabica</i> (Lam.) Willd.	Flavonoidi i polofenoli
Fabaceae	<i>Aspalathus linearis</i> (Burm.f.) R. Dahlgren	Luteolin i viteksin
	<i>Vachellia nilotica</i> (L.) P.J.H.Hurter & Mabb	Saponini i flavonoidi
	<i>Acacia catechu</i> (L.f.) Willd.	Katehin, kaempferol, kvercetin, rutin, izorhamnetin, epikatehin, afzelehin, epiafzelehin, meskvitol, opioglonin, aromadendrin i fenol
Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i> L.	Tanini i flavonoidi
	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M.Perry	Seskviterpeni, monoterpeni, ugljikovodici, eugenil acetat i eugenol

Combretaceae	<i>Combretum adenogonium</i> Steud. ex A. Rich	Flavonoidi, terpenoidi, alkaloidi, tanini, glikozidi i saponini
	<i>Terminalia mollis</i> M.A. Lawson	Triterpeni, flavonoidi i elagitanini
Anacardiaceae	<i>Anacardium occidentale</i> L.	Tanini, flavonoidi, terpeni i saponini
	<i>Rhus aromatica</i> L.	Tanini, galna kiselina, flavonoidi kao što su kvercetin i kvercitrin, fenoli, triterpeni
	<i>R. parviflora</i> Roxb.	Galna kiselina, kvercetin, kaempferol, glikozidi
	<i>Spondias lutea</i> L.	Tanini i flavonoidi
Sapindaceae	<i>Dimocarpus longan</i> Lour.	Triterpeni, tanini, flavonoidi i ugljikohidrati
Geraniaceae	<i>Geranium thunbergii</i> Siebold ex Lindl. & Paxt.	Galna kiselina, korilagin, geranin, elaginska kiselina, kaempferitrin, kaempferol, kvercetin
Celastraceae	<i>Cassine xylocarpa</i> Vent.	Prirodni lupanski triterpenoidi
	<i>Maytenus cuzcoina</i> Loes.	Triterpenoidi
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia denticulata</i> Lam.	Triterpeni i steroidi
	<i>E. hirta</i> L.	Tanini i diterpeni
	<i>Jatropha multifida</i> L.	Diterpenoidi, multifidoni, multifidanol i multifidenol
Phyllanthaceae	<i>Phyllanthus acidus</i> (L.) Skeels	Seskviterpenoidi, filantacidoidna kiselina, metil ester
	<i>P. amarus</i> Schumach. & Thonn.	Alkaloidi, flavonoidi, lignani, fenoli i terpeni
	<i>P. niruri</i> L.	Geranin, rutin, galna kiselina, hlorogenska kiselina, korilagen, galoilglukopironozid i kvercetin glukozid
	<i>P. urinaria</i> L.	Trigaloilglukopironozid, kvercetin ramnozik, geranin, rutin, galna kiselina, hlorogenska kiselina, korilagen

	<i>P. watsonii</i> A. Shaw	Kvercetin ramnozid, geranin, rutin, galna kiselina, hlorogenska kiselina, korilagen, galoilglukopironozid, digaloilglukopironozid i kvercetin glukozid
Paeoniaceae	<i>Paeonia delavayi</i> Franch.	Peoniflorin, monoterpen glikozid, albiflorin, benzoilpeoniflorin, galna kiselina, etil galat
Violaceae	<i>Viola diffusa</i> Ging.	Friedelolaktoni, flavonoidi, kumarini, terpenoidi, steroli, polipeptidi
Tamaricaceae	<i>Tamarix nilotica</i> (Ehrenb.) Bunge	Nilocitin, elaginska kiselina, galna kiselina, flavonoidi
Capparaceae	<i>Capparis sinaica</i> Veill.	Flavonoidi (kvercetin, izokvercetin i rutin)
Rubiaceae	<i>Pavetta tomentosa</i> Roxb. ex Sm.	Saponini, flavonoidi i alkaloidi
	<i>Tarenna asiatica</i> (L.) Kuntze ex K.Schum.	Saponini, flavonoidi i alkaloidi
Adoxaceae	<i>Sambucus nigra</i> L.	Alkaloidi, flavonoidi, kumarini
Acanthaceae	<i>Andrographis paniculata</i> (Burm.f.) Nees	Diterpneoid
Lamiaceae	<i>Ocimum sanctum</i> L.	Flavonoidi, terpenoidi i polifenoli
	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	Baikalini i flavonoidi
Paulowniaceae	<i>Paulownia tomentosa</i> (Thunb.) Steud.	Flavonoidi, tomentin A, B, C, D, E
Linderniaceae	<i>Lindernia crustacea</i> (L.) F.Muell.	Opuntin B, triterpen saponin, seroidi i feniletanoidi
Amaranthaceae	<i>Iresine herbstii</i> Hook.	Alkaloidi, antrakvinoni, glikozidi, flavonoidi, saponini, fenoli, terpenoidi, šećeri, proteini i tioli
Moringaceae	<i>Moringa peregrina</i> (Forssk.) Fiori	Alkaloidi, tanini, fenoli i saponini
Loganiaceae	<i>Strychnos pseudoquina</i> St. Hil.	Kvercetin-3-O-metil eter (3MQ) i strinobiflavon (SBF)

Plumbaginaceae	<i>Plumbago indica</i> L.	Plumbagin, alicin, ugljikohidrati, flavonoidi, proteini, saponini, lipidi i ulja, alkaloidi, steroidi, fenoli i tanini
Asteraceae	<i>Achillea fragrantissima</i> (Forssk.) Sch. Bip.	Fenolske kiseline, flavonoidi (apigenin, apigeninglukozid, luteolin, kirsiliol, diosmetin), lignani, terpeniski laktoni i alkamidi
	<i>Baccharis gaudichaudiana</i> DC.	Flavonoidi, diterpenoidi, fenoli, hidroksicimetna kiselina
	<i>B. spicata</i> (Lam.) Baill.	Diterpenoidi
	<i>Bidens subalternans</i> DC.	Triterpenoidi i steroidi
	<i>Eupatorium perfoliatum</i> L.	Flavonoidni glikozidi i hlorogenska kiselina
	<i>Jasonia montana</i> Vahl. (Botsch.)	Flavonoidi i terpeni
	<i>Pluchea sagittalis</i> (Lam.) Cabr.	Fenilpropanoidi, flavonoidi, eterična ulja, polifenoli, tanini, triterpeni
	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	Silimarin, kvercetin i kaempferol
	<i>Tagetes minuta</i> L.	Terpenoidi, flavonoidi i eterična ulja
	<i>Tanacetum parthenium</i> (L.) Sch. Bip.	Fenolske kiseline (hlorogenska kiselina) i seskviterpeniski laktoni (partfenolid)
	<i>Taraxacum officinale</i> (L.) Weber ex F.H.Wigg.	Flavonoidi, D-glukopiranozid, kvercetin, luteolin
	<i>Tridax procumbens</i> L.	Flavonoidi (apigenin, kvercetin, kaempferol, falkarinol, selinen, limonen i zerumbon)
Cyperaceae	<i>Cyperus rotundus</i> L.	Monoterpenoidi, seskviterpenoidi, triterpenoidi, steroidi, alkaloidi, flavonoidi i fenoli
Araceae	<i>Arisaema tortuosum</i> (Wall.) Schott	Apigenin i luteolin

Veliki broj studija iz ovog domena kao kriterij klasifikacije biljaka sa antivirusnim djelovanjem uzima sam virus. U tom smislu, a slijedeći istu logiku koja se prati u kreiranju sintetičkih antivirusnih lijekova, najviše su istraživani oni virusi koji su česti u ljudskoj populaciji i koji mogu izazvati teške infekcije. Također, često se ispituje antivirusno djelovanje biljaka za koje postoje sintetički lijekovi, a za koje je zabilježen problem rezistencije ili je naveden veliki broj nuspojava. U nastavku su prezentirane biljne vrste sa dokazanim djelovanjem na pojedine česte viruse (Tabele 8.3.-8.5.).

Tabela 8.3. Najčešće supstance biljnog porijekla sa antiherpesvirusnim djelovanjem

Biljna vrsta	Aktivna supstanca	Mehanizam djelovanja
<i>Achyrocline flaccida</i> Weinm. DC.	-	Inhibitor virusne replikacije
<i>Allium sativum</i> L.	Ajoen, alicin, alil metiltiosulfinat i metil aliltiosulfinat	Interferencija sa virusnom adsorpcijom i penetracijom
<i>Aloe</i> sp.	Antrahinoni, Aloe emodin	Parcijalna destrukcija virusne ovojnice i njena inaktivacija/Inhibicija pričvršćavanja virusa, ulaska i replikacije
<i>Anagallis arvensis</i> L.	Triterpenski saponin	Inhibicija virusne replikacije
<i>Caesalpinia pulcherrima</i> (L.) Sw.	Derivati kvercetina	Inhibicija replikacije u ranim stadijima
<i>Cassia angustifolia</i> L.	Antrahinoni	Parcijalna destrukcija virusne ovojnice i njena inaktivacija
<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench.	Alkeni i amidi, polisaharidi, cikorinska kiselina	-
<i>Hamamelis virginiana</i> L.	Oligomerni i polimerni proantocijanidini	-
<i>Melia azedarach</i> L.	Meliakarpin	Inhibicija virusne replikacije
<i>Myrica rubra</i> Siebold. & Zucc.	Tanini	Inhibicija pričvršćavanja na stanicu domaćina
<i>Bostrychia montagnei</i> Harvey*	Sulfatni polisaharidi	Inhibicija virusne replikacije
*Crvena alga (Rhodophyta)		

Pored ovih, navedene su brojne biljne vrste čije aktivne supstance također ispoljavaju antiherpesvirusno djelovanje, uglavnom *in vitro*, kao što su: *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees (diterpeni), *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (lektini), *Cedrella tubiflora* Bertoni. (kiseli polisaharidi), *Cicer arietinum* L. (fenolne komponente), *Cocos nucifera* L. (katehin, epikatehin i procijanidini B-tipa), *Glyptopetalum sclerocarpum* M.A. Lawson (seskviterpeni, sklerokarpinska kiselina), *Helichrysum aureonitens* Sch. Bip. (galangin), *Maclura cochinchinensis* (Lour.) Corner (morin), *Pandanus amaryllifolius* Roxb. (lektini), *Punica granatum* L. (tanini), *Rhamnus* sp. (antrahinoni), *Syzigium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry (engeniin), ali i one za koje je zabilježeno djelovanje na herpes viruse, ali tek slijedi definiranje konkretnih antivirusnih supstanci: *Hyssopus officinalis* L., *Ocimum* sp., *Phyllanthus* sp., *Rhus aromatica* L., *Saponaria officinalis* L. itd.

S obzirom na pandemijske razmjere i ozbiljnost virusnog oboljenja humane imunodeficijencije, AIDS, jasno je da odavno postoji interes za alternativnim anti-HIV lijekovima, osobito onim biljnog porijekla, sa što manje kontraefekata. U naučnoj literaturi postoje gotovo nepregledne liste koje navode potencijalne antivirusne supstance biljaka koje su na neki način inhibitorne prema virusu HIV, a u Tabeli 8.4. navedene su samo one koje se najčešće spominju.

Tabela 8.4. Neke od biljnih vrsta sa antivirusnim djelovanjem usmjerenim na HIV

Biljna vrsta	Aktivna supstanca	Mehanizam djelovanja
<i>Agastache rugosa</i> (Fisch. & C.A. Mey.) Kuntze	Ruzmarinska kiselina	Inhibicija enzima integraze
<i>Calophyllum</i> sp.	Apetalinska kiselina, kalanolidi A, B, C, inofilum, kostatolid	Inhibicija reverzne transkriptaze
<i>Corydalis yanhusuo</i> W.T.Wang	Gosipol, alkaloidi	Inhibicija reverzne transkriptaze
<i>Gelonium multiflorum</i> A.Juss.	Protein (GAP31)	Inhibicija integracije virusne DNK u DNK domaćina; inhibicija virusne replikacije
<i>Monotes africanus</i> A.DC.	Flavonoidi	Inhibicija reverzne transkriptaze
<i>Panax ginseng</i> C.A.Mey.	Protein panaksagin	Inhibicija reverzne transkriptaze

<i>Phaseolus lunatus</i> L., <i>P. vulgaris</i> L.	Tripsinski inhibitori, lektin	Inhibicija reverzne transkriptaze
<i>Rhizophora</i> sp.	Polisaharidi lista i kore	Blokiranje vezivanja HIV-1 viriona, inhibicija vezivanja sa stanicom
<i>Rhus succedanea</i> L.	Flavonoidi	Inhibicija reverzne transkriptaze
<i>Ricinus communis</i> L.	Lektini	Inhibicija reverzne transkriptaze i N- glikohidrolaze
<i>Shepherdia argentea</i> (Pursh.) Nutt.	Tanini	Inhibicija reverzne transkriptaze
<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.	Unguilin	Inhibicija reverzne transkriptaze, glikohidrolaza α - i β - glukozidaze

Influenza virus se odlikuje visokom prevalencom u humanoj populaciji, sezonskom dinamikom bolesti i pandemijskim potencijalom. Virus gripe mnogo je istraživao u smislu inhibicije i kreiranja antivirusnih lijekova, kako sintetičkih, tako i alternativnih. U Tabeli 8.5. navedene su samo najčešće biljke sa dokazanim anti-influenza djelovanjem.

Tabela 8.5. Neke biljne vrste sa dokazanim anti-influenza učincima

Biljna vrsta	Aktivna supstanca	Mehanizam djelovanja
<i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb.	-	Inhibicija RNK sinteze i reakcija sa virusnom ovojnicom
<i>Aloe barbadensis</i> Mill.	Antrahinoni: Aloe emodin	Parcijalna destrukcija virusne ovojnice
<i>Aronia melanocarpa</i> (Michx.) Elliott	Antocijanini	-
<i>Camelia sinensis</i> (L.) Kuntze	Derivati katehina	Inhibicija virusne replikacije i hemaglutinacije
<i>Cistus × incanus</i>	Polifenoli	Inhibira ulazak virusa u stanicu modulacijom virusnih površinskih strukture
<i>Clinacanthus communis</i> (Burm.f) Lindau	-	Produkcija antivirusnih antitijela

<i>Commelina communis</i> L.	Alkaloidi	Inhibira rast virusa i reducira virusni titar u plućima
<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench.	-	Zaustavlja ulazak virusa inhibicijom vezujućih receptora i replikacije
<i>Geranium sanguineum</i> L.	Polifenoli	Djeluje na ekspresiju virusnih proteina na površini stanice
<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	Izoskutelarein-8-metil eter	Inhibira virusnu replikaciju

Najveći broj istraživanja antivirusnog djelovanja biljnih spojeva odnosi se na porodice Flaviviridae, Herpesviridae i Picornaviridae. U slučaju DNK virusa, najčešći mehanizam djelovanja je ograničavanje ulaska virusnih partikula u stanicu domaćina ili inhibicija virusne replikacije. Destrukcija virusne ovojnice također spada u jedan od mehanizama djelovanja na DNK viruse. S druge strane, reverzna transkriptaza igra veoma važnu ulogu u replikaciji RNK virusa. S ciljem dizajniranja učinkovitih antivirusnih lijekova najviše pažnje je potrebno usmjeriti upravo na virusne enzime koji su involvirani u ključne metaboličke aktivnosti (integraciju, replikaciju i sl.).

Dakle, molekularni mehanizmi asocirani sa antivirusnim djelovanjem biljnih ekstrakata mogu se razlikovati među različitim virusima. Ipak, veoma je važan potencijal biljnih ekstrakata da pokrenu inherentnu antivirusnu odbranu ljudskog organizma koja uključuje imuni sistem. Brojne studije su dokazale imunostimulativne odlike biljnih ekstrakata, koje se u konačnici reflektiraju u antivirusno djelovanje. Takav primjer je ekstrakt korijena *Heracleum maximum* Bartr. čije se antivirusno djelovanje zasniva na stimulaciji produkcije interleukina (IL-6) u makrofagima. Nadalje, vrste *Plantago major* L. i *P. asiatica* L., koje su česte biljke u tradicionalnoj medicini, induciraju proliferaciju limfocita i sekreciju interferona- γ . Navedeni faktori su poznati indikatori modulacije stanično-posredovanog imunog odgovora. Također, sambukol izoliran iz ploda crne zove, *Sambucus nigra* L. je učinkovit protiv različitih sojeva virusa gripe, te pospješuje imuni odgovor sekrecijom inflamacijskih citokina (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8).

Na listama ljekovitih biljaka sa antivirusnim odlikama moguće je uočiti brojne egzotične vrste. Razlog tome je ekstenzivna primjena ljekovitih biljaka u tretmanu infekcija u određenim geografskim dijelovima svijeta kao što su: Kina, Indija, Japan, Pakistan, Šri Lanka, Tajland i brojne afričke zemlje. Ipak, danas se i zapadni svijet sve više okreće ovim prirodnim izvorima antimikrobnih komponenti.

8.5. Prisustvo antimikrobnih supstanci u biljnom svijetu – filogenetski pristup

Ljekovite biljke obiluju najrazličitijim hemijskim komponentama, za koje je *in vitro* dokazana antimikrobna aktivnost. Samim tim, gotovo je nemoguće ponuditi jedan konačni popis svih ljekovitih biljaka, njihovih aktivnih konstituenta i raspona antimikrobnog djelovanja. S obzirom na specifičnost bakterijskih infekcija, njihovu učestalost i općenito biološku prirodu bakterijskih patogena, veliki broj studija antimikrobnog potencijala biljaka je usmjeren na bakterije. Recentna istraživanja navode da je globalno istraženo blizu 1000 biljnih vrsta u kontekstu antibakterijske aktivnosti, što predstavlja oko 0.3% od ukupnog broja opisanih vrsta vaskularnih biljaka. Najveći broj navedenih studija uključivao je predstavnike porodica Lamiaceae, Fabaceae, Asteraceae, Myrtaceae i Anacardiaceae, a sve navedene, osim Anacardiaceae, spadaju u deset najvećih botaničkih porodica koje obuhvataju između 5.900 i 25.040 vrsta rasprostranjenih širom svijeta. Neki od najčešće istraživanih rodova su *Acacia* Mill., *Cinnamomum* Schaeff., *Salvia* L., *Teucrium* L. i *Thymus* L., a među najčešće ispitivane vrste spadaju: *Cinnamomum verum* J. Presl. (Lauraceae), *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae), *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae), *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) i *Mentha × piperita* L. (Lamiaceae). Sve navedene vrste se često koriste kao jestive i začinske biljke, što može indicirati da se u tradicionalnoj medicini preklapaju načela upotrebe hrane i lijekova. Drugi razlog potencijalne popularnosti u istraživanju antimikrobnih odlika navedenih vrsta može biti njihova relativna dostupnost.

Ljekovite biljke i njihova antimikrobna svojstva istražuju se širom svijeta, ali statistički gledano, na globalnom nivou, vodeće zemlje u ovoj vrsti studija su Južna Afrika, Kamerun, Brazil, Indija i Iran. U ovim regijama svijeta zabilježen je visok stepen biodiverziteta, ali pored toga, lokalno staništvo se dosta oslanja na etnobotaničku praksu i sisteme tradicionalnog liječenja.

Naravno, da bi bilo koji lijek biljnog porijekla mogao biti razmatran u kliničkom smislu, potrebno je provesti odgovarajuća klinička testiranja, a i u tom domenu bilježi se pozitivan trend.

Poznato je da su biljke tokom procesa evolucije koevoluirale sa drugim organizmima zadovoljavajući na taj način određene potrebe, te na kraju održavajući integritet vrste. Koevolucija se može razmatrati na nivou disperzije sjemena (razmnožavanja), odbrane od herbivora, od patogenih mikroorganizama itd. Hemijska diverzifikacija sekundarnih metabolita u različitim evolutivnim linijama biljaka nije nasumična, već precizno korelirana sa opisanom adaptivnom radijacijom. Praćenje korelacije između filogenije biljnih vrsta i njihovog hemijskog profila potencijalno može ponuditi svojevrstan prediktivni pristup otkriću lijekova, što omogućava efikasniji odabir biljaka i smisleniju potragu za ciljnim hemijskim konstituentima.

Papratnjače i golosjemenjače su generalno u ovom smislu slabo istražene. Čak i kada je u pitanju antibakterijska aktivnost koja se dosta češće ispituje u odnosu na druge aspekte antimikrobnog djelovanja, do danas nije dostupan veliki broj navoda o antibakterijskom djelovanju biljaka iz navedenih skupina. Od 37 porodica papratnjača, predstavnici svega četiri porodice imaju navedenu antibakterijsku aktivnost: Polypodiaceae, Pteridaceae, Salviniaceae i Lygodiaceae. Također, zabilježen je trend prema kojem je u svakoj opisanoj porodici istraživana samo po jedna vrsta. Od 13 porodica golosjemenjača, za vrste iz četiri porodice je dokazana antibakterijska aktivnost (Taxaceae, Cupressaceae, Ephedraceae i Pinaceae), a manje od pet vrsta je istraživano u porodicama velikog biodiverziteta.

Istraživanja su pokazala da je skupina Magnolidae vrlo dobro izučena u ovom kontekstu, pa je istraženo oko 50% magnolidnih porodica, od čega je za desetine vrsta dokazana antibakterijska aktivnost. Magnolidae su rane skrivenosjemenjače i taksonomski obuhvataju četiri reda, 18 porodica i oko 10.000 vrsta koje su tokom svoje evolucije često bile suočene sa relativno visokim selekcionim pritiskom, najprije od strane herbivora. Stoga ovu skupinu karakteriše prisustvo jedinstvenih aromatičnih komponenata kao što su seskviterpeni, izoflavonoidi i benzilizohinolinski alkaloidi (aporfini, aristolohijska kiselina, *bis*-benzilizohinolini i sl.). Ovo sugerira da se predstavnici ove skupine, uključujući vrste redova Piperales, Magnoliales i Laurales mogu smatrati odličnim kandidatima za hemijsko profiliranje.

Ipak, statistike pokazuju da je manje od 1% vrsta istraženo u svakom navedenom redu. Lauraceae, Myristicaceae i Annonaceae su velike porodice, ali je u antibakterijskom smislu među njima istraženo samo oko 40-ak vrsta.

Kod biljaka iz reda Ranunculales, antibakterijsko djelovanje je zabilježeno za predstavnike četiri porodice. Vrlo česti hemijski konstituenti u ovoj skupini su berberin i benzilzohinolinski alkaloidi. Kod skupine Rosidae, u smislu antibakterijskog djelovanja su istraživani redovi Sapindales i Myrtales, a za vrste iz ukupno pet porodica je ono i dokazano. Preostale četiri porodice su taksonomski razdvojene relativno skoro i radi se o manje poznatim malim porodicama koje su ograničene na određene geografske regije svijeta. Ipak, to može biti i vrlo zanimljivo u budućim istraživanjima. Na primjer, Simaroubiaceae je manje istraživana mala porodica koja obuhvata oko 100 vrsta uglavnom zastupljenih u tropima, ali je hemijski jedinstvena, sa specifičnim sekundarnim metabolitima kao što su kvazinoidi (klasificirani kao triterpenoidi), a koji nisu zastupljeni kod drugih predstavnika u ovom redu. Sveukupno gledano, od preko 6.500 vrsta u kladi Rosidae, za oko 75% je zabilježena antibakterijska aktivnost.

Asteridae su najmlađa, ali i najveća klada u filogeniji skrivenosjemenjača, sa prominentnim redovima: Lamiales, Apiales, Asterales i Ericales. Među njima, Asterales je vrstama najmnogobrojniji red na kojem počiva oko 13% kompletnog biodiverziteta dikotiledonih biljaka (*Eudicots sensu lato*). Ipak, biljne vrste ovog reda nisu najbolje prezentirane u studijama antibakterijske aktivnosti. Brojna istraživanja su fokusirana na porodicu Asteraceae, najveću porodicu skrivenosjemenjača koja obuhvata preko 25.000 vrsta. Ipak, za njih svega 70-ak postoje navodi antibakterijske aktivnosti. Vrste porodice Asteraceae posjeduju terpenoide, kumarine, poliacetilene i flavonoide kao potencijalne terapijske agense. Unatoč otkriću nekoliko važnih sekundarnih metabolita kao što su artemizin i silibinin, malo pažnje je posvećeno drugim aktivnim komponentama prisutnim u porodici Asteraceae. Druge porodice reda Asterales su manje po broju vrsta, slabije poznate i geografski ograničene.

U koncipiranju strategije ovakvih studija, postoje i druge interesantne situacije. Na primjer, porodica Campanulaceae je zastupljena širom svijeta, ali nema mnogo istraženih vrsta u antimikrobnom smislu. Razlog tome može biti njena hemijska evolucija. Vrste skupine Asteridae karakteristično sadrže iridoide, supstance vrlo gorkog okusa koje su emetici za kičmenjake.

Stoga, iridoidi igraju važnu ulogu kod prehrambenih preferencija herbivora, a također štite biljku od bakterijskih i fungalnih patogena. Među Asteridama, vrste reda Asterales ne posjeduju iridoide.

S druge strane, redovi Ericales i Cornales su najranije divergirali i posjeduju i eleaginsku kiselinu i iridoidne komponente. Oba navedena reda imaju veliki broj vrsta sa dokazanom jakom antibakterijskom aktivnošću.

Lamiales je veliki red u kladi Asterida i obuhvata oko 12% ukupnog biodiverziteta dikotiledona. Od 25 porodica, sve dobro poznate porodice imaju zabilježenu antibakterijsku aktivnost. Preostalih 16 malih porodica, koje ukupno obuhvataju manje od 100 vrsta su slabije istražene i geografski ograničene. Red Lamiales obuhvata oko 1.050 rodova i oko 23.700 vrsta, od čega je istraženo 0.5% u smislu antibakterijske aktivnosti.

Red Caryophyllales u filogenetskom smislu smatra se sestrinskom kladom Asteridama i obuhvata sukulente i karnivorne biljke. Od 38 opisanih porodica, njih devet je istraživano u smislu antibakterijske aktivnosti. Različiti izoflavonoidi i druge komponente su zastupljene kod ove skupine: flavonol sulfati kod porodica Plumbaginaceae, Polygonaceae i Amaranthaceae, te sulfatirani betalaini kod porodice Phytolaccaceae. Naftohinoni koji se smatraju potencijalnim antifungalnim agensima detektovani su kod brojnih biljnih vrsta reda Caryophyllales, npr. u porodicama Plumbaginaceae, Droseraceae, Nepentaceae, Dioncophyllaceae i Polygonaceae. Izuzevši Amaranthaceae, Caryophyllaceae i Cactaceae, većina porodica ovog reda je monotipska i ograničena na tropske i subtropske regije svijeta. Ipak, sadrže jedinstvene hemijske komponente. Na primjer, porodice Dioncophyllaceae i Ancistrocladaceae koje obuhvataju liane u tropskim kišnim šumama zapadne Afrike i jugoistočne Azije posjeduju naftilizohinolinske alkaloidne koji trebaju biti razmatrani u svjetlu pronalaska novih antibiotika.

Red Santalales je manja sestrinska grupa Asteridama. Porodice Loranthaceae i Santalaceae su najpoznatije porodice u ovoj skupini i njihove vrste su široko zastupljene u svijetu. Predstavnici obje navedene porodice imaju dokazanu antibiotsku aktivnost, dok druge porodice ove skupine nisu dovoljno izučene u smislu svog osobenog hemijskog sastava i bioaktivnosti.

Redovi Fabales, Fagales, Rosales i Malpighiales su najveći redovi klade Fabidae.

Predstavnici mnogih porodica se karakterišu prisustvom cijanogenih glikozida i elaginske kiseline. Fabales je veliki red, a unutar njega najveća porodica je Fabaceae koja obuhvata oko 20.000 vrsta. Za sada, njih blizu 100 ima dokazanu antibakterijsku aktivnost. S druge strane, monokotiledone biljke su najmanje istražena skupina skrivenosjemenjača u smislu antibakterijske aktivnosti, gdje je istraživano svega 16 od 80 porodica. Do danas je opisano oko 60.100 vrsta monokotiledonih biljaka, ali od toga je za samo njih 70-ak (oko 0.1%) dokazana antibakterijska aktivnost. Opisana situacija ipak ne iznenađuje previše, jer monokotiledone biljke posjeduju i druge odbrambene mehanizme (rafide od kristalnog kalcij-oksalata i druge fizičke barijere), na koje se potencijalno više oslanjaju nego na hemijsku odbranu.

8.5.1. Taksonomska distribucija vrsta sa zabilježenim antibakterijskim djelovanjem

Na osnovu rezultata meta analize, navedene u sistematskoj studiji biljaka sa antibakterijskim potencijalom, predstavljene su biljne vrste za koje je do sada proveden najveći broj eksperimenata i za koje je dokazana antibakterijska aktivnost. Izdvojene su sljedeće porodice: Lamiaceae, Fabaceae, Asteraceae, Myrtaceae, Anacardiaceae, Rubiaceae i Apiaceae.

Iz porodice Lamiaceae, deset najčešće istraživanih vrsta sa antibakterijskim svojstvima su: *Origanum vulgare* L. (Slika 8.12.A), *O. majorana* L., *Thymus zygis* L., *T. vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. (Slika 8.12.B), *Clinopodium taxifolium* (Kunth) Govaerts, *C. vulgare* L., *Mentha × piperita* L. (Slika 8.12.D), *Stachys pubescens* Ten. i *Ocimum basilicum* L. (Slika 8.12.C). Sve navedene vrste su nativne za područje Mediterana. Vrste rodova *Thymus*, *Origanum* i *Clinopodium* posjeduju slične hemijske komponente i osobito su bogate monoterpenima kao što su: α -terpineol, karvakrol, timol, α -terpinen, γ -terpinen i *p*-cimen, koji djeluju u sinergiji i na taj način doprinose poboljšanju antimikrobne aktivnosti mješavina u odnosu na aktivnost pojedinih komponenti.

U porodici Fabaceae, od blizu stotinu vrsta sa dokazanom antibakterijskom aktivnošću, deset najistaknutijih su: *Dichrostachys cinerea* (L.) Wight & Arm. (Slika 8.13.B), *Albizia myriophylla* Benth., *Glycyrrhiza triphylla* Fisch. & C.A. Mey., *G. glabra* L., *Acacia karoo* Hayne (Slika 8.13.A), *Albizia gummifera* (J.F. Gmel.) C.A. Sm., *Calpurnia aurea* (Aiton) Benth. (Slika 8.13.C), *Copaifera reticulata* Ducke, *C. paupera* (Herzog) Dwyer i *C. pubiflora* Benth.



Slika 8.12. Poznate biljke iz porodice Lamiaceae, sa dokazanim antibakterijskim djelovanjem

A, *Origanum vulgare*; B, *Rosmarinus officinalis*; C, *Ocimum basilicum*; D, *Mentha* × *piperita*

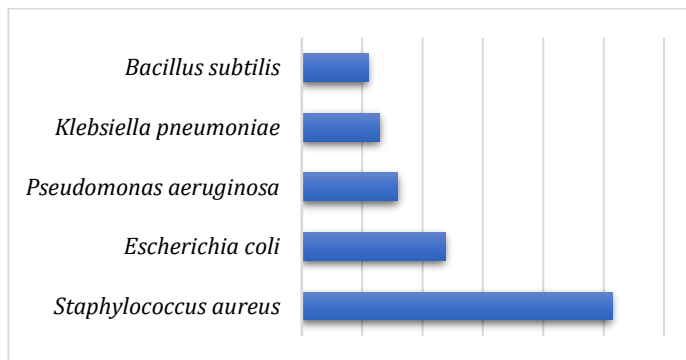


Slika 8.13. Egzotične biljke iz porodice Fabaceae sa antibakterijskim svojstvima

A, *Acacia karoo*; B, *Dichrostachys cinerea*; C, *Calpurnia aurea*

U sklopu porodice Asteraceae, u navedenom kontekstu je istraženo 76 biljnih vrsta, a najistaknutije su: *Tanacetum polycephalum* Sch. Bip., *Xanthium strumarium* L., *Echinops kebericho* Mesfin, *Cota palaestina* Reut. ex Unger & Kotschy, *Mikania glomerata* Spreng., *Artemisia abyssinica* Sch. Bip. ex A. Rich., *Matricaria chamomilla* L., *Rhanterium suaveolens* Desf., *Litogyne gariepina* (DC.) Anderb. i *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Vrste sa najprominentnijim antibakterijskim svojstvima u sklopu porodice Myrtaceae su: *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *E. globulus* Labill., *Syncarpis glomulifera* (Sm.) Nied., *Corymbia torelliana* (F.Muell.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson, *Myrtus communis* L., *Syzygium cordatum* Hochst. ex Krauss, *Melaleuca armillaris* (So. ex Gaertn.) Sm., *Eugenia brevistyla* D. Legrand, *E. catharinae* O. Berg., i *Psidium guajava* L. Kod porodice Anacardiaceae ističu se vrste: *Anacardium occidentale* L., *Schinus terebinthifolia* Raddi, *Pistacia terebinthus* L., *P. lentiscus* L. i *Mangifera indica* L. Porodica Rubiaceae odlikuje se vrstama bogatim hininom, koje je antimalarijski alkaloid, svrstanim u rod *Cinchona*. Nadalje, zabilježene su vrste sa antimikobakterijskim učincima kao što su: *Pavetta lanceolata* Eckl., *Cephalanthus natalensis* Oliv. i *Sarcocephalus latifolis* (Sm.) E.A. Bruce. Prema objavljenim naučnim podacima, najistaknutije biljke sa antibakterijskim potencijalom iz porodice Apiaceae su *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague, *Coriandrum sativum* L. i *Eryngium* sp.

U metodologiji provedenih istraživanja, od bakterijskih vrsta uglavnom su istraženi tipični predstavnici Gram-pozitivnih i Gram-negativnih vrsta, kao što su: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* i *Bacillus subtilis* (Slika 8.14.).



Slika 8.14. Bakterijske vrste koje se uglavnom istražuju u smislu osjetljivosti na biljne antimikrobne supstance

POGLAVLJE 9

ISPITIVANJE ANTIMIKROBNOG DJELOVANJA TVARI BILJNOG PORIJEKLA

Anesa Jerković-Mujkić



Najveća nagrada za rad je prilika da se uradi još više.

Jonas Salk

Rastući problem antimikrobne rezistencije potakao je naučnike širom svijeta na traženje alternativnih antimikrobnih tvari prirodnog porijekla. Imajući u vidu da je veliki broj vrsta iz carstva biljaka još uvijek nedovoljno istražen, postoji jasna potreba za sistemskim istraživanjima njihove biološke aktivnosti i većom terapijskom primjenom antimikrobnih tvari biljnog porijekla.

Za *in vitro* ispitivanje antimikrobnih efekata biljnih supstanci mogu se primjenjivati različite metode. Pri odabiru odgovarajuće metode bitno je procijeniti koji je postupak primjenjiv u određenom laboratoriju za određene supstance i testirane mikroorganizme te koje su prednosti i ograničenja pojedinih metoda. Od tvari biljnog porijekla najčešće se testiraju biljni ekstrakti u različitim organskim rastvaračima, eterična ulja ili njihove komponente. Danas postoje standardizirane referentne metode ispitivanja osjetljivosti mikroorganizama propisane od strane *International Standards* (ISO), *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) i *The European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). Iako se navedene smjernice koriste u laboratorijama širom svijeta za testiranje antimikrobnih lijekova, one se često moraju modificirati da bi bile primjenjive za testiranje biljnih supstanci. Metode ispitivanja mikrobne osjetljivosti se klasificiraju u difuzione (kvalitativne) i dilucione (kvantitativne) metode.

9.1. Difuzione metode

U tekstu koji slijedi opisane su sljedeće difuzione metode: disk difuziona metoda, agar difuziona metoda i tzv. tehnika otrovane hrane (engl. *Poisoned food technique*).

9.1.1. Disk difuziona metoda

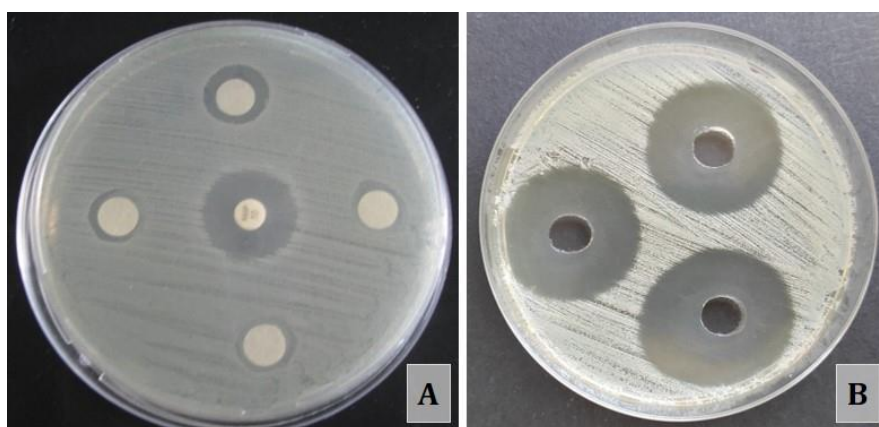
Disk difuziona metoda, poznata i kao standardni Kirby-Bauerov test, je jednostavna fenotipska metoda ispitivanja koja se najčešće primjenjuje u brojnim laboratorijama. Postupak je zasnovan na principu difuzije biljnog ekstrakta kroz čvrstu hranjivu podlogu. Ovom metodom se istovremeno ispituje osjetljivost jednog soja mikroorganizma na veći broj testiranih supstanci. Od prekončne mikrobne kulture u sterilnom fiziološkom rastvoru pripremi se suspenzija turbiditeta 0.5 McFarland-a koja odgovara koncentraciji bakterija od $1-2 \times 10^8$ CFU/ml (engl. *Colony Forming Unit* - jedinica za formiranje kolonija) ili koncentraciji gljivica od $1-5 \times 10^6$ CFU/ml. Sterilni vateni bris se uroni u suspenziju mikroorganizama i višak tekućine ocijedi uz zid epruvete. Zasiijavanje inokuluma na površinu Mueller-Hinton agara (bakterije) ili RPMI agara sa 2% glukozom i 0.5 mg/ml metilensko plavog (gljivice) izvodi se razmazivanjem brisa po cijeloj površini agara, ponavljajući ovu proceduru tri puta, rotirajući ploču svaki put za 60° da bi se inokulum ravnomjerno rasporedio i dobio uniforman (konfluentan) rast mikroorganizama. Nakon zasiijavanja, podloga se ostavi najviše do 15 minuta na sobnoj temperaturi da upije višak vlage. Na površinu agar ploče sterilnom pincetom se postavljaju sterilni, fabrički proizvedeni celulozni diskovi ili diskovi filter-papira (Whatmann No. 1), prečnika od 6 mm, tako da rastojanje od centra do centra diska ne bude manje od 24 mm. Na Petri ploču dijametra 90 mm može se postaviti najviše šest diskova. Disk po postavljanju treba lagano pritisnuti pincetom da bi se obezbijedio potpuni kontakt sa površinom agara. Mikropipetom se u sterilnim uslovima na svaki disk nanosi određeni volumen testirane supstance poznate koncentracije. Kao negativna kontrola koristi se rastvarač u kojem je razrijeđena supstanca, a kao pozitivna kontrola određeni antibiotik ili antimikotik. U roku od 15 minuta nakon postavljanja diskova, Petrijeve zdjelice se ostavljaju na inkubaciju u termostatu na temperaturi od $35 \pm 2^\circ\text{C}$ u trajanju od 18 sati (bakterije) ili 16 -24 sata za *Zygomycetes*, ili 24, 48 i 72 sata za druge vrste gljivica.

Ukoliko je istraživana supstanca bila djelotvorna protiv testiranog mikroorganizma, oko diska sa biljnim ekstraktom pojavljuje se koncentrična prozirna zona koja se naziva zona inhibicije rasta mikroorganizama (Slika 9.1.A). Nakon inkubacije, pomoću lenjira izmjere se prečnici zona inhibicije u milimetrima. Svi eksperimenti se izvode u triplikatu, pa se nakon mjerenja izračuna srednja vrijednost zone inhibicije. Mikroorganizam kod kojeg je prečnik zone inhibicije veći od 12 mm smatra se osjetljivim na testiranu supstancu. Prednosti disk difuzione metode u odnosu na druge metode su: jednostavnost izvođenja postupka, niska cijena, mogućnost testiranja velikog broja antimikrobnih agensa i lakoća interpretacije dobijenih rezultata. Pored toga, istraživanja pokazuju dobru korelaciju između *in vitro* dobijenih podataka i *in vivo* terapije kod pacijenata zasnovane na rezultatima antibiograma. Međutim, pošto inhibicija rasta mikroorganizama nužno ne znači mikrobnu smrt, ovom metodom ne možemo razlikovati mikrobiocidne i mikrobiostatske efekte ispitivane supstance. Nedostatak ove metode je što se ne može odrediti minimalna inhibitorna koncentracija (engl. *Minimum inhibitory concentration*, MIC), a moguće su i pogreške prilikom očitavanja zone inhibicije usljed nejednake difuzije biljnog ekstrakta kroz agar. Zbog navedenih prednosti, a najvećim dijelom zbog jednostavnosti izvođenja i malih troškova, disk difuziona metoda se uveliko primjenjuje u mikrobiološkim laboratorijama za dobijanje preliminarnih kvalitativnih podataka o antimikrobnom djelovanju supstanci biljnog porijekla.

9.1.2. Agar difuziona metoda

Ova metoda je vrlo slična disk difuzionojoj metodi. Koriste se ploče u Petrijevoj zdjelici sa Mueller-Hinton agarom za bakterijske, odnosno ploče sa Sabouraud dekstroza agarom za gljivične sojeve. Sterilni bris umočen u pripremljeni inokulum pojedinog soja se ravnomjerno razmaže po površini odgovarajućeg agara u vodoravnim i okomitim smjerovima. Pomoću sterilnog bušača promjera 6-8 mm u podlozi se izbuše bunarići (jamice), pri čemu njihova međusobna udaljenost, kao i udaljenost od ruba Petrijeve zdjelice treba da iznosi najmanje 20 mm. Zatim se u bunariće dodaju već prije pripremljeni biljni ekstrakti. Koncentracija, ali i volumen ekstrakta koji će se unositi u bunarić ovisi o vrsti ekstrakta i biljke. Kao pozitivna kontrola koristi se odgovarajući antimikrobni lijek poznate koncentracije ($\mu\text{g/ml}$), a kao negativna kontrola primijenjeni rastvarač. Difuzija ispitivanih supstanci u podlogu omogućena je ostavljanjem Petrijeve zdjelice jedan do dva sata na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ u frižideru.

Bakterijske kulture inkubiraju se 18 sati, a kulture gljivica ovisno o taksonomskom statusu od 24-72 sata na 35 ± 2 °C. Očitavanje rezultata se izvodi mjerenjem zone inhibicije u milimetrima oko bunarića u kojima nema rasta mikroorganizama (Slika 9.1.B). Postupak se izvodi u najmanje tri ponavljanja. Prednosti ove metode su kratko vrijeme inkubacije za očitavanje rezultata, jednostavna laboratorijska oprema i mogućnost istovremenog ispitivanja više različitih biljnih ekstrakta. Budući da metode difuzije nisu najbolji izbor za testiranje nepolarnih uzoraka koji teško difunduju u agar, najčešće se koriste za procjenu antimikrobnog djelovanja biljnih ekstrakta u različitim organskim rastvaračima.



Slika 9.1. Izgled rezultata nakon provođenja difuzionih tehnika
A, Zone inhibicije kod disk difuzije; B, Zone inhibicije kod agar difuzije

9.1.3. Tehnika otrovane hrane (*Poisoned Food Technique*)

Ova metoda se rutinski koristi za procjenu antifungalnih efekata supstanci biljnog porijekla. U pokusu se upotrebljavaju Petrijeve zdjelice promjera 90 mm i PDA (engl. *Potato Dextrose Agar*, krompir dekstrozni agar) podloga. Za inokulaciju se koriste miceliji gljivica stari sedam dana. Iz perifernog dijela aktivno rastućeg micelija sterilnim bušačem promjera 5 mm se iskruže diskovi podloge zajedno sa micelijem određenog soja gljivice. Testirana supstanca određene koncentracije se pomiješa sa otopljenom i na 45 °C ohlađenom PDA podlogom, te razlije u sterilnu Petrijevu zdjelicu. Kao kontrola se koristi čista PDA podloga. Na sredinu agar ploče sterilnom pincetom postavi se disk testiranog micelija tako da je prilikom nanošenja micelij okrenut prema podlozi.

Nakon inkubacije u uslovima pogodnim za određeni gljivični soj, mjere se prečnici rasta gljivice na podlozi sa dodanom testiranom supstancom (Ds) i na kontrolnoj podlozi bez dodane supstance (Dc). Test se izvodi u triplikatu. U slučaju da ispitivana supstanca ispoljava antimikrobno djelovanje, doći će do redukcije rasta micelija na pločama koje sadrže supstancu u odnosu na kontrolu. Antifungalno djelovanje ispitivane supstance se procjenjuje po sljedećoj formuli:

$$\text{Antifungalno djelovanje (\%)} = 100 \left(\frac{D_c - D_s}{D_c} \right)$$

9.2. Dilucione metode

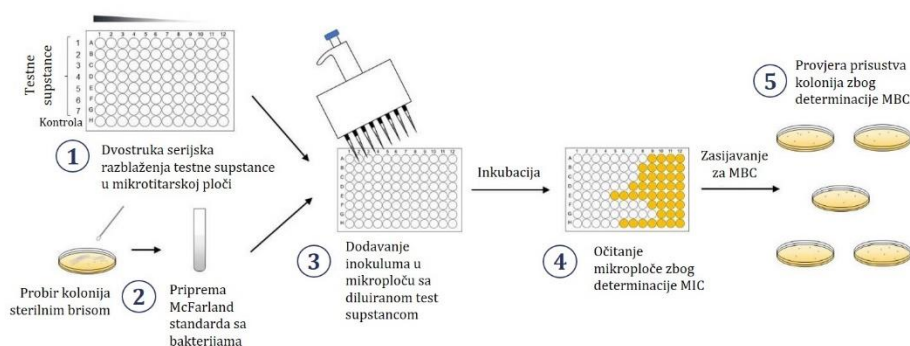
U tekstu koji slijedi opisana su načela sljedećih dilucionih metoda: mikrodiluciona metoda, makrodiluciona metoda i agar diluciona metoda.

9.2.1. Mikrodiluciona metoda

Mikrodiluciona metoda se koristi za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne/fungicidne koncentracije (MBC/MFC) supstanci biljnog porijekla. Određivanje MIC predstavlja zlatni standard tj. najpouzdaniji parametar u laboratorijskom ispitivanju antimikrobnog djelovanja fitohemikalija. Za izvođenje postupka koristi se mikrotitarska ploča sa 96 testnih mjesta (Slika 9.2). Od prekonoćnih kultura ispitivanih mikroorganizama napravi se suspenzija u sterilnom fiziološkom rastvoru zamućenosti 0.5 McFarlanda koja odgovara gustoći stanica od $1-2 \times 10^8$ CFU/ml. Koncentrovani (tzv. *stock*) rastvor priprema se razblaživanjem ispitivane supstance u odgovarajućem rastvaraču do željene koncentracije izražene u µg/ml. Nakon toga se u mikrotitarskoj ploči napravi serija dvostrukih razrjeđenja uzorka. U prvu kolonu se doda 200 µl koncentrovanog rastvora, a u ostale kolone po 100 µl mikrobne suspenzije u Mueller-Hinton bujonu (bakterije) ili RPMI podlozi sa 2% glukoze (gljivice) koncentracije 1×10^6 CFU/ml. Dvostruka razrjeđenja uzorka se pripremaju prebacivanjem po 100 µl sadržaja iz prve u drugu kolonu, zatim iz druge u treću, sve do posljednje kolone, iz koje se odbaci 100 µl rastvora. Na taj način se dobije finalna koncentracija bakterija od $0.5-2.5 \times 10^5$ CFU/ml, a koncentracija gljivica od 10^3-10^4 CFU/ml. U ispitivanje svakog soja uključene su pozitivna kontrola rasta (inokulirana tečna podloga bez dodane testirane supstance) i negativna kontrola rasta (sterilna tečna podloga).

Kao pozitivna kontrola koristi se antibiotik za sojeve bakterija i antimikotik za sojeve gljivica. Mikrotitarska ploča sa zasijanim mikroorganizmima obavijena parafilmom se ostavlja na inkubaciju. U slučaju bakterija inkubacija traje 24 sata, a u slučaju gljivica 24-48 sati na temperaturi od 35 ± 2 °C, nakon čega se određuje minimalna inhibitorna koncentracija. Najniža koncentracija testirane supstance pri kojoj nema vidljivog rasta mikroorganizama (odsustvo zrnastog ili homogenog taloga na dnu bunarića) predstavlja minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIC). Za bolje očitavanje rezultata, u bunariće se dodaje po 30 μ L 0.015 % resazaurina, indikatora oksidacije i redukcije koji se koristi za procjenu mikrobnog rasta. To je plava boja koja nakon dva sata inkubacije postaje ružičasta, ukoliko se djelovanjem oksidoreduktaza iz živih mikrobnih stanica, reducira na resorufin. Stoga se podloga u bunariću u kojem je prisutan rast mikroorganizama boji ružičasto. Vrijednost MIC predstavlja najmanju koncentraciju testiranog ekstrakta koja je spriječila promjenu boje resazurin iz plave u ružičastu, odnosno koja je inhibirala mikrobnog rast. Mikrobnog rast se može očitavati i uz pomoć 20 μ L 0.5% vodenog rastvora trifetil tetrazolijum hlorida (TTC). Koncentracija u kojoj nema vidljivog rasta (nema crvenog obojenja) predstavlja minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIC).

Da bi se odredila minimalna baktericidna koncentracija (MBC) ili minimalna fungicidna koncentracija (MFC), iz svih bunarića u kojima nije bilo rasta, tj. iz onih koji se nalaze do bunarića sa minimalnom inhibitornom koncentracijom, zasijava se po 10 μ L sadržaja na nove agar ploče sa odgovarajućim čvrstim podlogama (Mueller-Hinton agar ili Sabouraud dekstroza agar). Nakon toga ploče se inkubiraju 24 sata na 35 ± 2 °C te se vrši posmatranje rasta mikroorganizama. MBC/MFC vrijednost predstavlja najmanju koncentraciju biljnog ekstrakta pri kojoj nije zapažen rast kolonija. Inače se MBC/MFC definira kao najniža koncentracija aktivne supstance koja ubija 99.5% mikroorganizama. Test se izvodi u triplicatu. Ova metoda je osobito dobra za određivanje relativne jakosti biljnih ekstrakta ili eteričnih ulja i za uspostavljanje njihovog antimikrobnog djelovanja jer omogućava istovremeno testiranje ekstrakta protiv različitih mikrobnih sojeva na jednoj mikrotitarskoj ploči. Pored toga, mikrodilucionom metodom moguće je odrediti i minimalnu baktericidnu/fungicidnu koncentraciju koja označava najnižu koncentraciju ekstrakta, ulja ili aktivne komponente koja ne pokazuje rast u subkulturi.



Slika 9.2. Osnovni koraci u mikrodilucionoj metodi

(1, priprema dvostrukih serijskih razblaženja testne supstance; 2, probir kolonija i priprema inokuluma; 3, dodavanje inokuluma; 4, očitavanje mikroploče i MIC; 5, determinacija MBC)

9.2.2. Makrodiluciona metoda

Osnovni princip izvođenja postupka je isti kao i u mikrodilucionoj metodi. Budući da se test izvodi u epruvetama, poznata je i kao postupak razrjeđenja u epruvetama. Koriste se epruvete volumena minimalno od 2 ml. Pripremi se serija epruveta koje sadrže isti volumen dvostruko opadajućeg razrjeđenja ispitivane supstance u sterilnom Mueller-Hinton bujonu ili RPMI. Potom se epruvete inokuliraju sa standardnom koncentracijom test-mikroorganizma. Nakon 24 sata inkubacije, određuje se minimalna inhibitorna koncentracija (MIC), tj. najniža koncentracija ispitivane supstance koja je inhibirala rast mikroorganizama u kojoj nije došlo do zamućenja bujona u epruveti. Danas se makrodiluciona metoda rjeđe koristi u odnosu na mikrodilucionu metodu. Prednost ove metode je mogućnost određivanja MIC, a njeni nedostaci što se ispituje osjetljivost jedne vrste mikroorganizma na jednu supstancu, relativno velika količina reagensa i prostora potrebnog za ispitivanje te složenost izvođenja i dužina trajanja postupka.

9.2.3. Agar diluciona metoda

U metodi agar dilucije različite koncentracije testirane supstance su sastavni dio čvrste hranjive podloge. Postupak se izvodi tako da se pripremi serija dvostruko opadajućih razrjeđenja ispitivane supstance. Fitohemikalija poznate koncentracije se miješa sa otopljenim Mueller-Hinton agarom (bakterije) ili PDA agarom (gljivice) prethodno ohlađenim na temperaturu od 45°C i izliva u sterilnu Petrijevu zdjelicu.

Nakon toga se na agar ploču mikropipetom na odgovarajućim pozicijama (tačkama) dodaju kapljice (1-5 μl) standardne koncentracije mikroorganizama ($1-2 \times 10^8$ CFU/ml koja odgovara zamućenju od 0.5 McFarland-a), tako da se dobije finalna koncentracija inokuluma od 10^4 CFU po tački. Ova tehnika omogućava da se na jednoj ploči višestruko testira jedan soj mikroorganizma ili istovremeno više različitih mikroorganizama. Alternativno se po cijeloj površini agar ploče koja sadrži testiranu supstancu homogeno inokulira jedan soj mikroorganizma u koncentraciji od $1-2 \times 10^8$ CFU/ml. Kao kontrola rasta mikroorganizama koristi se agar ploča bez dodane testirane supstance. Ploče se zatim inkubiraju 16 do 18 sati na 35 ± 2 °C. Nakon inkubacije kolonije će rasti na onim pločama koje ne sadrže dovoljno antimikrobne tvari koja bi ih inhibirala. Najniža koncentracija ispitivanog ekstrakta koja je uzrokovala potpunu inhibiciju mikrobnog rasta predstavlja MIC. Svi eksperimenti se rade u tri ponavljanja.

Ova metoda je prikladna za ispitivanje osjetljivosti kako bakterija, tako i gljivica, a posebno za testiranje probirljivih bakterija za čiji su uzgoj potrebne specijalne hranjive podloge. Prednosti agar dilucije su u tome što se istovremeno može odrediti MIC za više vrsta mikroorganizama, kao i da se može koristiti u slučaju da se ne može odrediti vrijednost MIC u bujonu, tj. kada spoj ili ekstrakt svojim bojenjem zamaskira rast mikroorganizma. Nedostaci ove metode su što je za njeno izvođenje potrebno više osoblja, podloga, reagensa i posuđa te može biti skuplja i zahtjevnija prilikom testiranja većeg broja mikroorganizama na veći broj supstanci u odnosu na druge metode ispitivanja.

POGLAVLJE 10

RACIONALNA UPOTREBA LJEKOVITIH BILJAKA I BIODIVERZITET

Irma Mahmutović-Dizdarević



Pažljivo pogledajte prirodu. Svaka vrsta je remek djelo, izvrsno prilagođeno okruženju u kojem je opstalo. Ko smo mi da uništavamo ili čak smanjujemo biodiverzitet!

E. O. Wilson

Živi svijet Planete i svi njegovi povezani sistemi pružaju beskonačne **ž**dobrobiti čovječanstvu. Pojedinci, zajednice i kompletne svjetske ekonomije direktno ili indirektno ovise o intaktnim nativnim ekosistemima. U smislu korištenja biljnih prirodnih resursa, ljekovite biljke zauzimaju posebno mjesto i njihov značaj u održanju ljudskog zdravlja je poznat.

Procjene su da jedna od šest vrsta viših biljaka posjeduje neka ljekovita svojstva. Svi svjetski komiteti za procjenu biodiverziteta su konzistentni u izvještavanju da se kontinuirano pronalaze lijekovi iz ranije nepoznatih biljnih izvora, što stavlja u direktni fokus i problem zaštite ljekovitih biljaka od pretjerane eksploatacije i drugih antropogenih pritisaka.

Najveće antropogene prijetnje očuvanju diverziteta ljekovitih biljaka su: destrukcija staništa, bioprospekting (traženje alternativnih izvora supstanci) i prekomjerna eksploatacija. Kritičnu ulogu u promjeni distribucije vrsta imaju i klimatske promjene. Globalno zatopljenje pored ostalog, nosi rizik i od čestih požara, što može biti pogubno za populacije ugroženih biljnih vrsta.

10.1. Destrukcija staništa

Destrukciji i konverziji prirodnih staništa direktno je pridonio čovjek, jer se zbog sve većeg broja stanovnika šire gradovi i zauzimaju područja koja su nekada nativno nastanjivale biljke u svojim populacijama. Izgradnja saobraćajnica, deforestacija, infrastruktura, također su u vezi sa procesom uništavanja prirodnih staništa, a uz to je i polucija sve veća. Nadalje, prekomjerna upotreba različitih sredstava za zaštitu biljaka također je povezana sa destrukcijom staništa brojnih biljnih vrsta. Svi navedeni trendovi, izolirano i u kombinaciji, povećavaju broj ugroženih biljaka na globalnom nivou. Koliko je destrukcija staništa povezana sa istraživanjem antimikrobnog potencijala biljaka ilustrira trend degradacije tropskih ekosistema. Prema dostupnim podacima, izuzetno mali procenat (<5%) tropskih biljnih vrsta je testirano u smislu farmakološke primjene. Staništa ovakvih biljaka se naprosto uništavaju mnogo brže nego što same biljke i njihova bioaktivna svojstva mogu biti istražena.

10.2. Bioprospekting, pronalaženje novih izvora aktivnih supstanci

Ljekovite biljke su vrlo profitabilne. Procjene govore da svaki novi lijek biljnog porijekla donese blizu 100 miliona dolara kompaniji koja ga proizvede i oko 500 miliona dolara datoj društvenoj zajednici. Na svjetskom nivou godišnje cirkulira oko 25 milijardi dolara za biljne lijekove koji se mogu kupiti bez recepta u slobodnoj prodaji, odnosno nekih 85 milijardi dolara za ordinirane biljne lijekove. Ovakve statistike čine da tradicionalno korištene, dostupne i priuštive ljekovite biljke postaju potpuno nedostupne za populacije koje se na njih tradicionalno oslanjaju stoljećima. Pojam „*biopiracy*“ (biopiratizam) skovan je da opiše praksu privatnih kompanija koje patentiraju tradicionalne lijekove od samoniklih biljaka i prodaju ih za vlastitu dobit, ne uzimajući u obzir ekonomske dobrobiti koje bi iz toga mogle proisteći za cijelu lokalnu zajednicu. U ovom smislu, aktuelni su problemi intelektualnog vlasništva i nacionalnog vlasništva, zbog čega se konstantno pojavljuju brojne afere i kontroverze koje pokušavaju riješiti za to nadležne svjetske i lokalne institucije.

10.3. Prekomjerna eksploatacija

Visoko konzervativne procjene navode da je trenutni gubitak biljnih vrsta između 100 i 1000 puta veći od očekivane prirodne stope izumiranja, te da Planeta gubi najmanje jedan potencijalno važan lijek svake dvije godine.

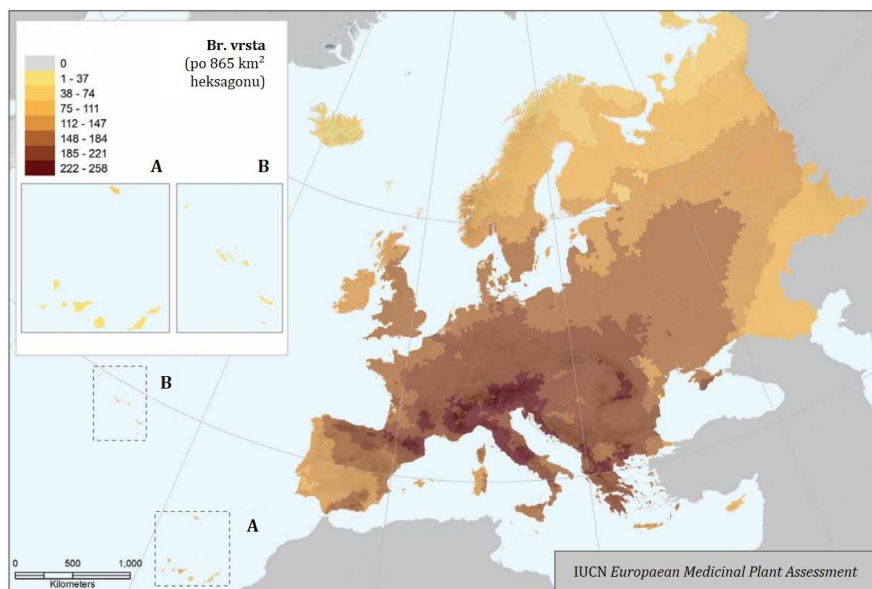
Prema podacima Međunarodne unije za zaštitu prirode (engl. *International Union for Conservation of Nature*, IUCN) i Svjetskog fonda za prirodu (engl. *World Wildlife Fund for Nature*, WWF), između 50 i 80 hiljada biljaka cvjetnica se koristi u ljekovite svrhe, širom svijeta. Među njima, oko 15.000 vrsta je pod prijetnjom od izumiranja, najprije zbog prekomjerne eksploatacije i destrukcije staništa.

Estimacije navode da će do 2032. godine preko 70% površine Planete biti uništeno ili degradirano. Prirodni fenomeni, kao što su geološke i klimatske promjene predstavljaju manje od 20% prijetnje biljkama, dok najveću prijetnju predstavljaju antropogene aktivnosti koje vode do gubitka i konverzije staništa. Okolišne promjene koje su inducirane čovjekom uključuju povećan nivo atmosferskog CO₂, fosfora, kalcija, pH vrijednosti, te druge klimatske promjene koje ubrzavaju izumiranje biljaka jer ih prisiljavaju da se rapidno adaptiraju na nivou fizioloških procesa. Ljudske aktivnosti imaju dodatni uticaj na biodiverzitet kroz introdukciju alohtonih vrsta.

IUCN definira devet kategorija ugroženosti vrsta: EX - izumrla (engl. *extinct*), EW - izumrla u prirodi (engl. *extinct in the wild*), CR - kritično ugrožena (engl. *critically endangered*), EN - ugrožena (engl. *endangered*), VU - osjetljiva (engl. *vulnerable*), NT - gotovo ugrožena (engl. *near threatened*), LC - najmanje zabrinjavajuća (engl. *least concern*), DD - nedovoljno poznata (engl. *data deficient*), NE - nije procjenjivana (engl. *not evaluated*).

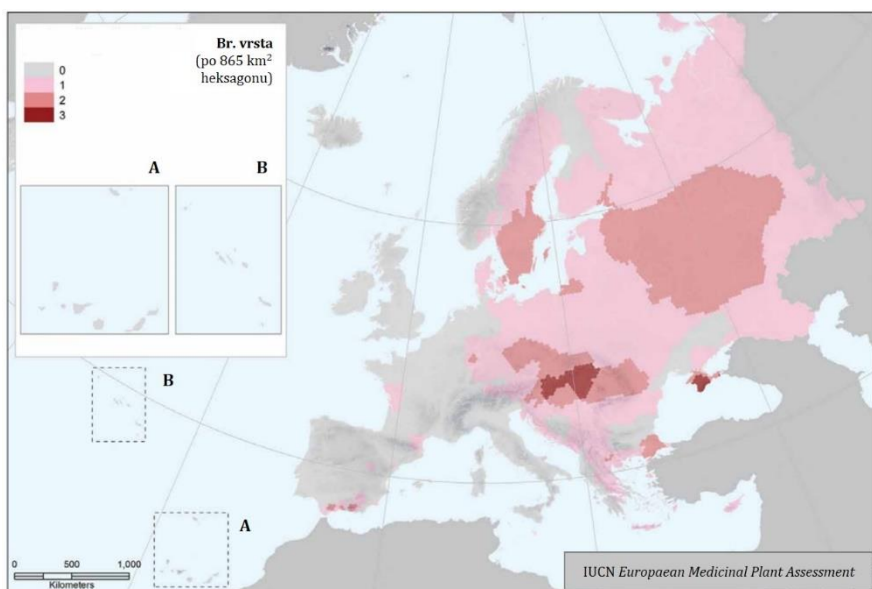
Evropska Crvena lista ljekovitih biljaka navodi neke primjere ljekovitih biljaka na nivou Evrope kojima je dodijeljena IUCN kategorija EN ili VU, a to su: *Artemisia granatensis* (EN), *Tetraclinis articulata* (EN), *Sideritis reverchonii* (EN), *Himantoglossum comperianum* (EN), *Crataegus nigra* (EN), *Atropa baetica* (EN), *Plantago maxima* (EN), *Chimaphila umbellata* (VU), *Iris spuria* (VU), *Dactylorhiza iberica* (VU).

Slika 10.1. prikazuje područja od posebnog značaja u smislu koncentracije ljekovitih biljnih vrsta. Najveći broj vrsta detektovan je u Mediteranskoj regiji, te planinskim područjima kao što su Alpi i Pirineji, Centralni Masiv u Francuskoj, te na Balkanskom poluotoku. Ostala bogata područja obuhvataju Krim i Karpate.



Slika 10.1. Distribucija ljekovitih biljaka prema Evropskoj Crvenoj listi ljekovitih biljaka

Na Slici 10.2. prikazana je distribucija ugroženih taksona na području Evrope.



Slika 10.2. Distribucija ugroženih vrsta ljekovitih biljaka prema Evropskoj Crvenoj listi ljekovitih biljaka

10.4. Mjere zaštite

Resursi ljekovitih biljaka se eksploatiraju povećanim intenzitetom i to uglavnom iz divljerastućih populacija. Do sada je definirano mnogo različitih preporuka u vezi sa konzervacijom ljekovitih biljaka, a ističu se *in situ* i *ex situ* konzervacija. Rezervati prirode i divlja uzgajališta su tipični primjeri održavanja ljekovite učinkovitosti biljaka u prirodnim staništima, dok botanički vrtovi i banke sjemena predstavljaju važne paradigme *ex situ* konzervacije i budućeg zasijavanja.

10.4.1. *In situ* konzervacija

In situ konzervacija podrazumijeva očuvanje i održavanje ekosistema i prirodnih staništa, te održavanje i obnavljanje populacija u njihovom prirodnom okruženju, a u slučaju kultiviranih ili odomaćenih vrsta u okolišu u kojem su razvile svoja specifična svojstva. Širom svijeta *in situ* očuvanje usmjereno je na proglašavanje zaštićenih područja i na očuvanje čitavih ekosistema, a ne samo pojedinih biljnih vrsta. Više od 12.700 zaštićenih područja proglašeno je u cijelom svijetu, što iznosi oko 8.81% Zemljine površine, odnosno preko 13 miliona kvadratnih kilometara. *In situ* očuvanje cjelokupnih biljnih zajednica omogućava zaštitu autohtonih biljnih vrsta i prirodnih biljnih zajednica, te se ovom strategijom također čuva bioraznolikost i jača veza između očuvanja biljnih genetičkih izvora diverziteta i njihove održive upotrebe.

Veliki broj ljekovitih biljaka su endemične vrste i njihove ljekovite odlike su u vezi sa prisustvom sekundarnih metabolita koji odgovaraju na stimuluse u prirodnom okruženju, odnosno ne moraju biti eksprimirani pod vještačkim uvjetima. *In situ* konzervacija cijelih zajednica omogućava zaštitu nativnih sastojina u skladu sa njihovom međusobnom mrežom odnosa i interakcija. Nadalje, *in situ* konzervacija povećava nivo diverziteta koji može biti očuvan, te ojačati veze između konzervacije resursa i održive upotrebe. Uspješna *in situ* konzervacija ovisi o pravilima, regulativama, ali operativno i o potencijalnoj usklađenosti ljekovitih biljaka unutar nativnog staništa.

Rezervati prirode su zaštićena područja sa značajnim nativnim resursima, kreirani da očuvaju i povrate biodiverzitet. Konzervacija ljekovitih biljaka putem zaštite ključnih prirodnih staništa zahtijeva razumijevanje individualnih staništa u okviru ekosistema.

Ipak, nemoguće je svako pojedinačno stanište markirati kao zaštićeno područje. Stoga se mogu uspostaviti tzv. divlja uzgajališta za specijski orijentirano kultiviranje i domestikaciju ugroženih ljekovitih biljaka u zaštićenim područjima, prirodnom staništu ili mjestu u neposrednoj blizini mjesta u kojem biljka prirodno raste. Iako su populacije brojnih divljerastućih biljaka pod velikim antropogenim pritiskom, divlja uzgajališta mogu predstavljati učinkovit pristup za *in situ* konzervaciju onih ljekovitih biljaka koje su endemične, ugrožene i onih za kojima su istaknuti veliki zahtjevi.

10.4.2. *Ex situ* konzervacija

Ex situ konzervacija podrazumijeva svojevrsno očuvanje biološke raznolikosti izvan prirodnog okruženja. U tu svrhu globalno su osnovane brojne banke sjemeni, banke DNK, *in vitro* kolekcije, te poljske kolekcije. Budući da je očuvanje biljnih genetičkih izvora putem sjemeni jedan od najpraktičnijih i ekonomski najisplativijih tehnika, 90% biljnih genetičkih izvora održava se upravo na taj način. Kako bi se očuvali genetički resursi, potrebno je poticati osnovne aktivnosti koje se odvijaju za svaku kolekciju resursa, a to su: opisivanje i umnožavanje, vođenje evidencije, te čuvanje genetskog materijala.

Ex situ konzervacija nije uvijek strogo odvojena od *in situ* konzervacije, ali je učinkovit komplement, osobito za one biljke koje se prekomjerno eksploatiraju, koje su ugrožene, sporo rastu, slabo su zastupljene ili su osjetljive na bolesti tokom presađivanja. *Ex situ* konzervacija primarno ima za cilj kultiviranje i naturaliziranje ugroženih vrsta, s ciljem osiguranja njihovog kontinuiranog preživljavanja, ali i s ciljem produkcije veće količine biljnog materijala korištenog u kreiranju lijekova. U tom smislu, *ex situ* prakse konzervacije mogu biti shvaćene kao trenutne akcije koje se poduzimaju zbog održavanja datog biljnog resursa.

Botanički vrtovi imaju važnu ulogu u *ex situ* konzervaciji i mogu održavati ekosisteme tako da povećaju stopu preživljavanja rijetkih i ugroženih biljaka. Iako se prirodne sastojine načelno sastoje od svega nekoliko individua svake vrste (i na taj način imaju ograničen potencijal upotrebe u smislu genetičke konzervacije), botanički vrtovi imaju drugačije odlike. Oni mogu uključiti različite biljne vrste koje su vrlo često taksonomski i ekološki divergentne forme.

Botanički vrtovi mogu igrati važnu ulogu u konzervaciji ljekovitih biljaka kroz razvoj propagacijskih i kultivacijskih protkola, kao i u provođenju programa domestifikacije i ukrštanja.

Banke sjemena nude bolji način evidentiranja i očuvanja genetičkog diverziteta brojnih ljekovitih biljaka *ex situ*, nego što bi to moglo biti ostvareno kroz botaničke vrtove. Jedan od najpoznatijih je *Millenium Seed Bank Project* u sklopu Kraljevskog botaničkog vrta (engl. *Royal Botanic Gardens*) u Velikoj Britaniji. Banke sjemena omogućavaju relativno brz pristup biljnim uzorcima za evaluaciju njihovih svojstava, pružajući informacije za konzervaciju preostalih prirodnih populacija.

10.5. Kultivacijske prakse

Iako se resursi ljekovitih biljaka izuzeti iz prirode smatraju efikasnijim u odnosu na kultivirane, kultivacija se često koristi i generalno je prihvaćena praksa. Kultivacija pruža mogućnost korištenja novih tehnika u rješavanju problema s kojima se susreće u produkciji ljekovitih biljaka, kao što su prisustvo toksičnih komponenti, kontaminacija pesticidima, nizak sadržaj aktivnih sastojaka, te pogrešna identifikacija botaničkog materijala. Kultivacija pod kontroliranim uvjetima može povećati prinos aktivnih komponenti, a to su uglavnom različiti sekundarni metaboliti, te osigurati stabilnost produkcije. Kultivacijske prakse su dizajnirane da pruže optimalan nivo vode, nutrijenata, aditiva i okolišnih faktora (temperatura, svjetlo i vlaga) s ciljem postizanja poboljšanog prinosa ciljanih produkata.

10.6. Dobre agrikulturne prakse (engl. *Good Agricultural Practices, GAP*)

Dobre agrikulturne prakse za ljekovite biljke su formulire da reguliraju produkciju, osiguraju kvalitet i olakšaju standardizaciju biljnih droga. GAP pristupi osiguravaju visok kvalitet, sigurnost i odsustvo polutanata u biljnoj drogi (ili grubom ekstraktu), primjenom dostupnih spoznaja za rješavanje različitih problema. GAP uključuju sveobuhvatne elemente, kao što su ekološko okruženje mjesta produkcije, kultivacija, sakupljanje i kvalitativni aspekti detekcije pesticida, makroskopska i mikroskopska autentifikacija, hemijska identifikacija bioaktivnih komponenti, detekcija prisustva metala itd.

10.7. Održivi razvoj

Prekomjerna eksploatacija svih ljekovitih biljaka, a osobito onih sa ograničenim rasprostranjenjem i spororastućih, neminovno rezultira iscrpljivanjem resursa ili čak izumiranjem vrste. Stoga se održiva upotreba ljekovitih biljaka nužno mora razmatrati na svim operativnim nivoima i praksama. Na primjer, sakupljanje korijena i cijele individue ljekovite biljke je potencijalno opasnije za biljku, u odnosu na sakupljanje drugih cvjetnih dijelova kao što su list, cvijet i pupovi. U tom smislu, kod biljnih droga koje se prave od cijele biljke ili korijena (ili nekog drugog podzemnog dijela kao što je rizom, gomolj, lukovica i sl.), korištenje listova, ako ih ima, u izradi lijeka može biti odgovarajuća alternativa. Dokazano je u velikom broju slučajeva da ekstrakti napravljeni od različitih dijelova ljekovite biljke posjeduju slične farmakološke odlike. U takvim situacijama strategija je korištenje onog biljnog organa koji neće dovesti do odumiranja kompletne individue, odnosno neće ugroziti opstanak populacije.

Razvoj tehnika genetičkog inženjerstva i biotehnologije olakšao je biosintezu biljnih aktivnih komponenti na široj skali. Nadalje, nove spoznaje u domenu kulture biljnih tkiva otvorile su brojne mogućnosti sinteze ciljanih bioaktivnih spojeva. Kultura tkiva predstavlja dobru alternativu za produkciju rijetkih i visokovrijednih skundarnih metabolita od kliničkog značaja. U tom kontekstu važne su i tehnike mikropropagacije, usmjerene hibridizacije korištenjem molekularnog pristupa itd.

Ljekovite biljke su oduvijek cijenjene zbog svojih blagotvornih svojstava, a kao što je navedeno, usljed globalnih trendova javnog zdravlja, potražnja za ljekovitim biljkama i njihovim bioaktivnim supstancama je u stalnom porastu. Ipak, uz potražnju neminovno dolazi i do prekomjernog iskorištavanja samoniklih ljekovitih biljnih vrsta. Nekontroliranim sakupljanjem i uništavanjem prirodnih staništa, brojnost pojedinih prirodnih biljnih populacija se drastično smanjuje, što kontinuirano dovodi i do njihovog izumiranja u prirodi. Racionalan odnos prema takvim biljakama, koji podrazumijeva brojne različite mjere monitoringa i konzervacije mora nametnuti konkretne akcije s ciljem restauracije i očuvanja prirodnih populacija.

LITERATURA

- Adibah, K.Z.M. & Azzreena, M.A. (2019). Plant toxins: alkaloids and their toxicities. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 6(2), 21-29.
- Ahmed, A. (2011). Antiviral treatment of cytomegalovirus infection. *Infectious Disorders Drug Targets*, 11(5), 475-503.
- Alamgir, A.N.M. (2017). Pahrmacognostical Botany: Classification of Medicinal and Aromatic Plants (MAPSs), Botanical Taxonomy, Morphology, and Anatomy of Drug Plants. U: Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts: Volume 1. *Progress in Drug Research*, 73, 177-293.
- Ali Ibrahim, M., Na, M., Oh, J., Schinazi, R.F., McBrayer, T.R., Whitaker, T., Doerksen, R.J., Newman, D.J., Zachos, L.G. & Hamann, M.T. (2013). Significance of endangered and threatened plant natural products in the control of human disease. *Biophyysics and Computational Biology*, 110(42), 16832-16837.
- Allen, D., Bilz, M., Leaman, D.J., Miller, R.M., Timoshyna, A. & Window, J. (2014). *European Red List of Medicinal Plants*. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D.G., & Lightfoot, D.A. (2017). Phytochemicals: Extraction, Isolation, adn Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants*, 6(4), 42.
- AMBOSS: Medical knowledge platform. (2022). *Overview of antibiotic therapy*.
- Ardalani, H., Avan, A. & Ghayour-Mobarhan, M. (2017). Podophyllotoxin: a novel potential natural anticancer agent. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 7(4), 285-294.
- Balouiri, M., Sadiki, M. & Ibensouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
- Beran, F., Köllner, T. G., Gershenzon, J. & Tholl, D. (2019). Chemical convergence between plants and insects: biosynthetic origins and functions of common secondary metabolites. *New Phytologist*, 223(1), 52-67.
- Berger, S. & Sicker, D. (2009). *Classics in spectroscopy: isolation and structure elucidation of natural products*. John Wiley & Sons.
- Bernal, J. L., del Nozal, M. J. & Jimenez, J. J. (1992). Use of a high-pressure Soxhlet extractor for the determination of organochlorine residues by gas chromatography. *Chromatographia*, 34(9), 468-474.
- Bouyahya, A., Dakka, N., Et-Touys, A., Abrini, J. & Bakri, Y. (2017). Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(8), 729-743.
- Braun, L. & Cohen, M. (2010). *Herbs & Natural Supplements*. An evidence-based guide, 3rd edition. Elsevier.
- Buhaescu, I. & Izzedine, H. (2007). Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications. *Clinical Biochemistry*, 40(9-10), 575-84.

- Cañizares-Macías, M.P., García-Mesa, J.A. & Luque de Castro, M.D. (2004). Determination of the oxidative stability of olive oil, using focused-microwave energy to accelerate the oxidation process. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 378(2), 479-483.
- Cazes, J. & Scott, R.P. (2002). Chromatography theory (Vol. 88). CRC press.
- Chamberlain, N. (2017). *Common Causes of Infectious Diseases*. Medical Microbiology; Neal Chamberlain's Look at the Microbial World. Still University of Health Sciences/Kirksville College of Osteopathic Medicine.
- Chassagne, F., Samarakoon, T., Porras, G., Lyles, J.T., Dettweiler, M., Marquez, L., Salam, A.M., Shabih, S., Farrokhi, D.R. & Quave, C.L. (2021). A Systematic Review of Plants With Antibacterial Activities: A Taxonomic and Phylogenetic Perspective. *Frontiers in Pharmacology*, 11: 586548.
- Chen, S.L., Yu, H., Luo, H.M., Wu, Q., Li, C-F. & Steinmetz, A. (2016). Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. *Chinese Medicine*, 11, 37.
- Chouhan, K.B.S., Tandey, R., Sen, K.K., Mehta, R. & Mandal, V. (2019). Extraction of phenolic principles: Value addition through effective sample pretreatment and operational improvement. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(1), 177-186.
- Clinical Laboratory and Standards Institute (2022). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 30th edition. CLSI document: M100. Clinical Laboratory and Standards Institute, Wayne, USA.
- Cooper, R. & Nicola, G. (2014). *Natural products chemistry: sources, separations and structures*. CRC press.
- Cos, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V. & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of ethnopharmacology*, 106(3), 290-302.
- Costa, S.S., Sobkowiak, B., Parreira, R., Edgeworth, J.D., Viveiros, M., Clark, T.G. & Couto, I. (2019). Genetic Diversity of norA, Coding for a Main Efflux Pump of *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Genetics*, 9, 710.
- Couch, R.B. (1996). Introduction to Infectious Diseases. U: Baron, S. (ed.), *Medical Microbiology*, 4th edition. University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Cowan, M.M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
- Cremer, E. & Prior, E. (1951). Application of the Chromatographic Method to the Separation of Gases and to the Determination of Adsorption Energies. *Z. Elektrochem*, 55, 217-220.
- Cseke, L.J., Kirakosyan, A., Kaufman, P.B., Warber, S., Duke, J.A. & Briemann, H.L. (2016). *Natural products from plants*. CRC press.
- Cserhádi, T. (2010). Chromatography of aroma compounds and fragrances. Springer Science & Business Media.
- Damier-Piolle, L., Magnet, S., Brémont, S., Lambert, T. & Courvalin, P. (2008). AdelJK, a Resistance-Nodulation-Cell Division Pump Effluxing Multiple Antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(2), 557-562.

- De Castro, M.L. & Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of chromatography A*, 1217(16), 2383-2389.
- De Clerq, E. (2001). Strategies in the Design of Antiviral Drugs. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 1(1), 13-25.
- Dell'Anno, M., Sotira, S., Rebutti, R., Reggi, S., Castiglioni, B. & Rossi, L. (2020). *In vitro* evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of algal extracts. *Italian Journal of Animal Science*, 19(1), 103-113.
- Dhaniaputri, R., Suwono, H., Amin, M. & Lukiati, B. (2022). Introduction to Plant Metabolism, Secondary Metabolites Biosynthetic Pathway, and In-Silico Molecular DOCKING FOR Determination of Plant Medicinal Compounds: AAn Overview. *Advances in Biological Sciences Research*, 22, 373-382.
- Drmić, H. & Režek Jambrak, A. (2010). Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian Journal of Food and Science Technology*, 2(2), 22-33.
- Duraipandiyan, V., Ayyanar, M. & Ignacimuthu, S. (2006). Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. *BMC complementary and alternative medicine*, 6(1), 1-7.
- Fabricant, D.S. & Farnsworth, N.R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental health perspectives*, 109(suppl 1), 69-75.
- Falkow, S. (1988). Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Reviews of Infectious Diseases*, 10(2), 74-76.
- Fang, C., Fernie, A.R. & Luo, J. (2019). Exploring the diversity of plant metabolism. *Trends in Plant Science*, 24(1), 83-98.
- Feng, W., Li, M., Hao, Z. & Zhang, J. (2019). Analytical methods of isolation and identification. U: *Phytochemicals in human health*. IntechOpen.
- Galle Toplak, K. (2016). *Domaće ljekovito bilje*. Mozaik knjiga, Zagreb.
- Gladstar, R. (2012). *Rosemary Gladstar's Medicinal Herbs. A Beginner's Guide*. Storey Publishing.
- Gordaliza, M., Castro, M.A., del Corral, J.M., Feliciano, A.S. (2000). Antitumor properties of podophyllotoxin and related compounds. *Current Pharmaceutical Design*, 6(18), 1811-1839.
- Götte, M. & Feld, J.J. (2016). Direct-acting antiviral agents for hepatitis C: structural and mechanistic insights. *Nature Reviews. Gastroenterology and Hepatology*, 13(6), 338-351.
- Grozdanić, Đ, Šilješ, I. & Grgesina, I. (1992). *Poznavanje, uzgoj i prerada ljekovitog bilja*. Školska knjiga, Zagreb.
- Guerriero, G., Berni, R., Muñoz-Sanchez, J.A., Apone, F., Abdel-Salam, E.M., Qahtan, A.A., Alatar, A.A., Cantini, C., Cai, G., Hausman, J.F., Siddiqui, K.S., Hernández-Sotomayor, S.M.T. & Faisal, M. (2018). Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists. *Genes*, 9(6), 309.
- Guzmán-Soto, I., McTiernan, C., Gonzalez-Gomez, M., Ross, A., Gupta, K., Suuronen, E.J., Mah, T.F., Griffith, M. & Alarcon, E.I. (2021). Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in *in vitro* and *in vivo* biofilm models. *iScience*, 24(5), 102443.

- Ha., T.K.Q., Lee, B.W., Nguyen, N.H., Cho, H.M., Venkatesan, T., Doan, T.P., Kim, E. & Oh, W.K. (2020). Antiviral Activities of Compounds Isolated from *Pinus densiflora* (Pine Tree) against the Influenza A Virus. *Biomolecules*, 10, 711.
- Harborne, A.J. (1998). *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Springer science & business media.
- Harvey, D. (2000). Chromatography and Electrophoretic Methods. U: *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hall Higher Education, Boston: 578-589.
- Hegel, P.E., Mabe, G.D., Zabaloy, M.S. & Brignole, E.A. (2005). Extraction Of Fixed Oils From Grounded Seeds With Near Critical CO₂+ Propane Mixtures. 4th MERCOSUR Congress on Process Systems Engineering; 2nd MERCOSUR Congress on Chemical Engineering. *Book of Proceedings, ENPROMER*.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S. & Williamson, E.M. (2012). *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*, Second Edition. Elsevier.
- Hernando-Amado, S., Coque, T. M., Baquero, F. & Martínez, J. L. (2019). Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nature microbiology*, 4(9), 1432-1442.
- Herrmann, K.M. & Weaver, L.M. (1999). The Shikimate Pathway. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 473-503.
- Huda, S.N. & Ch'ng, H.Y. (2020). *Curry Leaf (Murraya koenigii). The Story of Potential Miracle Plant*. LAP Lambert Academic Publishing.
- Huie, C.W. (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 373(1), 23-30.
- Hunter, W.N. (2007). The Non-mevalonate Pathway of Isoprenoid Precursor Biosynthesis.
- Inglis, T.J.J. (2007). Principia aetiologica: taking causality beyond Koch's postulates. *Journal of Medical Microbiology*, 56(Pt 11), 1419-1422.
- International Standard (2019). ISO 20776-1. Susceptibility Testing of Infectious Agents and Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices—Part 1: Broth Micro-Dilution Reference Method for Testing the In Vitro Activity of Antimicrobial AGENTS Against Rapidly Growing Aerobic Bacteria Involved in Infectious Diseases. 2nd ed. International Organization for Standardization; Geneva, Switzerland:
- Jain, C., Khatana, S. & Vijayvergia, R. (2019). Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review. *International Journal of Pharmaceutical Science Research*, 10(2), 494-504.
- Jan, R., Asaf, S., Numan, M., Lubna, Kim, K-M. (2021). Plant Secondary Metabolite Biosynthesis and Transcriptional Regulation in Response to Biotic and Abiotic Stress Conditions. *Agronomy*, 11, 968.
- Jayaprakasha, G.K., Patil, B.S. & Gattuso, G. (2018). *Advances in Plant Phenolics: From Chemistry to Human Health*. American Chemical Society. *Journal of Biological Chemistry*, 282(30), 21573-21577.
- Kaur, G.J. & Arora D.S. (2009). Antibacterial and phytochemical screening of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi*. *BMC complementary and alternative medicine*, 9(1), 1-10.

- Kausar, S., Khan, F. S., Ur Rehman M.I.M., Akram, M., Riaz, M., Rasool, G., Khan, A.H., Saleem, I., Shamim, S. & Malik, A. (2021). A review: Mechanism of action of antiviral drugs. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, Jan-Dec; 35:20587384211002621.
- Keenleyside, W. (2019). *Microbiology: Canadian Edition*. Simple Book Publishing.
- Kessler, A. & Kalske, A. (2018). Plant secondary metabolite diversity and species interactions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 49, 115-138.
- Khameneh, B., Iranshahy, M., Soheili, V. & Bazzaz, F. (2019). Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8, 118.
- Kimberlin, D. & Whitley, R.J. (2007). Antiviral therapy of HSV-1 and HSV-2. U: Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E. et al. (eds.), *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press.
- Klein, D.R. (2020). *Organic chemistry*. John Wiley & Sons.
- Koo, H., Allan, R.N., Howlin, R.P., Stoodley, P. & Hall-Stoodley, L. (2017). Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews. Microbiology*, 15(12), 740-755.
- Last, J.M. (2007). *A Dictionary of Public Health*. Oxford University Press.
- Leistner, E. (1999). The Role of Isochorismic Acid in Bacterial and Plant Metabolism. U: Barton, D., Nakanishi, K. & Meth-Cohn, O. (eds.), *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Pergamon, 609-622.
- Ling, K.H., Kian, C.T., Hoon, T.C. (2009). *A Guide to Medicinal Plants. An Illustrated, Scientific and Medicinal Approach*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
- Lundanes, E., Reubsaet, L. & Greibrokk, T. (2013). *Chromatography: basic principles, sample preparations and related methods*. John Wiley & Sons.
- Luo, Y.M. (2016). *Technology and Method of Extraction and Separation of Chemical Constituents of Traditional Chinese Medicine*. Shanghai Scientific & Technical Publishers, Shanghai, China.
- Luque-Garcia, J.L. & De Castro, M.L. (2004). Focused microwave-assisted Soxhlet extraction: devices and applications. *Talanta*, 64(3), 571-577.
- Luque-Garcia, J.L. & De Castro, M.L. (2004). Ultrasound-assisted soxhlet extraction: an expeditive approach for solid sample treatment: application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. *Journal of Chromatography A*, 1034(1-2), 237-242.
- Maffei, M. (2018). *Plant Bioactive Molecules*. Cambridge Scholars Publishing.
- Magaldi, S., Mata-Essayag S., De Capriles C.H., Pérez C., Colella M.T., Olaizola C. & Ontiveros Y. (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International journal of infectious diseases*, 8(1), 39-45.
- Matuschek, E., Brown, D.F.J. & Kahlmeter, G. (2014). Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. 20: 0255-0266

- Melendez, D.P. & Razonable, R.R. (2015). Letemovir and inhibitors of the terminase complex: a promising new class of investigational antiviral drugs against human cytomegalovirus. *Infection and Drug Resistance*, 8, 269-77.
- Nahar, L. & Sarker, S.D. (2019). *Chemistry for pharmacy students: general, organic and natural product chemistry*. John Wiley & Sons.
- Namieśnik, J., Jastrzębska, A. & Zygmunt, B. (2003). Determination of volatile aliphatic amines in air by solid-phase microextraction coupled with gas chromatography with flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*, 1016(1), 1-9.
- Naresh, Y.G. & Nagendraswamy, H.S. (2015). Classification of medicinal plants: An approach using modified LBP with symbolic representation. *Neurocomputing*, 173, 1789-1797.
- Oliver, P. & Villem, A. (2017). *Phenolic compounds: Structure, uses and health benefits*. Nova Science Publishers.
- Pang, Z., Chen, J., Wang, T., Gao, C., Li, Z., Guo, L., Xu, J. & Cheng, Y. (2021). Linking plant secondary metabolites and plant microbiomes: a review. *Frontiers in Plant Science*, 12, 621276.
- Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S. & Vyvyan, J.A. (2014). *Introduction to spectroscopy*. Cengage learning.
- Phillipson, J.D. (2007). Phytochemistry and pharmacognosy. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2960-2972.
- Phrompittayarat, W., Wittaya-Areekul, S., Jetiyanon, K., Putalun, W., Tanaka, H. & Ingkaninan, K. (2007). Determination of saponin glycosides in *Bacopa monnieri* by reversed phase high performance liquid chromatography. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*, 2(1), 26-32.
- Pico, Y. (2013). Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 43, 84-99.
- Prasad, K. & Bansal, V. (2017). *Plant Secondary Metabolites*. Apple Academic Press.
- Rai, M. & Kon, K. (eds.). (2013). *Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their components*. Academic Press.
- Reygaert, W.C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482-501.
- Richards, S.A. & Hollerton, J.C. (2010). *Essential practical NMR for organic chemistry*. John Wiley & Sons.
- Rouessac, F. & Rouessac, A. (2008). *Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Rouessac, F. & Rouessac, A. (2013). *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*. John Wiley & Sons.
- Sanford, K.J. & Heinz, D.E. (1971). Effects of storage on the volatile composition of nutmeg. *Phytochemistry*, 10(6), 1245-1250.
- Sasidharan, R., Chinnappa, C.C., Voeselek, L.A. & Pierik, R. (2008). The regulation of cell wall extensibility during shade avoidance: a study using two contrasting ecotypes of *Stellaria longipes*. *Plant Physiology*, 148(3), 1557-1569.

- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K.M. & Latha, L.Y. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African journal of traditional, complementary and alternative medicines*, 8(1), 1-10.
- Savić, L. (2014). *Metode ekstrakcije biljnih materijala: uporedna analiza cirkulatorne ekstrakcije i ekstrakcije primenom superkritičnog ugljen-dioksida*. Institut za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić", Beograd.
- Schilcher, H., Imming, P. & Goeters, S. (2005). Pharmacology and Toxicology. U: Franke, R., Schilcher, H. (eds.), *Chamomile: Industrial Profiles*, CRC Press, Boca Raton, 245.
- Scholsky, K.M. (1993). Fractionation of low molecular weight polyethylene by high-pressure soxhlet extraction. *Journal of applied polymer science*, 47(9), 1633-1641.
- Shea, J.J. (1998). Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. *IEEE Electrical Insulation Magazine*, 14(6), 42-42.
- Sicker, D., Zeller, K.P., Siehl, H.U. & Berger, S. (2019). *Natural products: isolation, structure elucidation, history*. John Wiley & Sons.
- Singh, R. & Geetanjali (2018). Chemotaxonomy of Medicinal Plants: Possibilities and Limitations. U: Mandal, S.C., Mandal, V. & Konishi, T. (eds.), *Natural Products and Drug Discovery*. Elsevier, 119-136.
- Sohail, M.N., Rasul, F., Karim, A., Kanwal, U. & Attitalla, I.H. (2011). Plant as a Source of Natural Antiviral Agents. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6(12), 1125-1152.
- Sutton, D. (2007). Pedanios Dioscorides: Recording the Medicinal Uses of Plants. U: Huxley, R. (ed.), *The Great Naturalist*. Thames & Hudson with the Natural History Museum of London, 32-37.
- Šoljan, D. (2000). *Kormofiti kao biološki resursi*. Univerzitetska knjiga, Sarajevo.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2020). Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents. EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 7.3.2 EUCAST E.DEF 7.3.2
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2020). Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.3.2
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2020). EUCAST Reading Guide for Broth Microdilution. Version 2.0.
- Tiwari, R. & Rana, C.S. (2015). Plant secondary metabolites: a review. *International Journal of Engineering Research and General Science*, 3(5), 661-670.
- Tompa, D.R., Immanuel, A., Srikanth, S. & Kadhivel, S. (2021). Trends and strategies to combat viral infections: A review on FDA approved antiviral drugs. *International Journal of Biological Macromolecules*, 172, 524-541.

- Tracy, R.P. (2006). The Five Cardinal Signs of Inflammation: Calor, Dolor, Rubor, Tumor... and Penuria (Apologies to Aulus Cornelius Celsus, *De Medicina*, c. A.D. 25). *The Journals of Gastroenterology: Series A*, 61(10), 1051-1052.
- Van Seventer, J.M. & Hochberg, N.S. (2017). Principles of Infectious Disease: Transmission, Diagnosis, Prevention, and Control. *International Encyclopedia of Public Health*, Second Edition. Elsevier.
- Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C. & Bezirtzoglou, E. (2021). Towards Advances in Medicinal Plant Antimicrobial Activity: A Review Study on Challenges and Future Perspectives. *Microorganisms*, 9, 2041.
- Vermerris, W. & Nicholson, R. (2007). *Phenolic compound biochemistry*. Springer Science & Business Media.
- Vijayakumar, R. & Raja, S.S. (2018). *Secondary Metabolites: Sources and Applications*. BoD–Books on Demand.
- Volova, T.G., Mahapatra, D.K., Khanna, S. & Haghi, A.K. (2020). *Natural Products Chemistry: Biomedical and Pharmaceutical Phytochemistry*. CRC Press.
- Wilson, K. & Walker, J. (2010). *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. Cambridge university press.
- Winnipeg Regional Health Authority Infection Prevention & Control Manual (2008). The Chain of Infection. Section 3, 1-6.
- Yuen, M.F., Chen, D.S., Dusheiko, G.M., Janssen, H.L.A., Lau, D.T.Y., Locarnini, S.A., Peters, M.G. & Lai, C.L. Hepatitis B virus infection. *Nature Reviews. Disease Primers*, 4, 18035.
- Zhao, Y., Wu, Y. & Wang, M. (2015). Bioactive Substances of Plant Origin. U: Cheung, P.C.K., Mehta, B.M. (eds.), *Handbook of Food Chemistry*. Springer Verlag.

<https://www.seeds-gallery.eu/uk/home/valerian-seeds-herb-medicinal-plant.html>
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Juniperus_communis_Stara_Planina.jpg
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Kamomillasaunio_%28Matricaria_recutita%29.JPG
<https://auntiedogmasgardenspot.wordpress.com/2013/05/29/sage-salvia-officinalis-plant-care-guide/>
<https://www.premierseedsdirect.com/product/st-johns-wort-hypericum-perforatum/>
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vaccinium_myrtillus_30999834.jpg
<https://satinflower.ca/products/achillea-millefolium>
<https://www.monaconatureencyclopedia.com/atropa-belladonna/?lang=en>
<https://gobotany.nativeplanttrust.org/species/colchicum/autumnale/>
<https://homeopathyplus.com/know-your-remedies-hyoscyamus-niger-hyos/>
<https://homeopathyplus.com/know-your-remedies-veratrum-album-verat/>
<https://www.bostonbulbswholesale.co.uk/allium-bulbs/ursinum-wild-garlic-allium-bulbs-227.html>
<https://swbiodiversity.org/seinet/imagelib/imgdetails.php?imgid=218888>
https://www.crocus.co.uk/plants/_/convallaria-majalis/classid.2000009455/
<https://spain.inaturalist.org/taxa/147321-Digitalis-lanata>
https://ukrbin.com/show_image.php?imageid=87257&big=1
<http://plantworld2.blogspot.com/2016/02/tussilago-farfara.html>

<https://dspermaculture.wordpress.com/2015/04/17/narrowleaf-plantain-plantago-lanceolata/>
<https://www.ebben.nl/en/treeebb/bevulgar-berberis-vulgaris/>
https://commons.wikimedia.org/wiki/Pancratium_illyricum
<https://colplanta.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:682369-1>
<https://www.amazon.in/M-Tech-Gardens-Medicinal-Thippali-Pippalli/dp/B07KRG8WSY>
<https://www.planetayurveda.com/library/sarpagandha-rauwolfia-serpentina/>
<https://www.ayurtimes.com/holarrhena-antidysenterica-pubescens-kurchi-kutaj/>
<https://homeopathyplus.com/know-your-remedies-sanguinaria-canadensis-sang/>
<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:269359-1>
<https://gardenerspath.com/garlic-allium-sativum/>
<https://www.saltspringseeds.com/products/baikal-skullcap-scutellaria-baicalensis>
<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:282186-1>
<https://plants.ces.ncsu.edu/plants/alliaria-petiolata/>
<https://en.wikipedia.org/wiki/Horseradish>
<https://www.wikidata.org/wiki/Q21872049>
<https://www.healthline.com/nutrition/camellia-sinensis-leaf-extract>
<https://antropocene.it/en/2018/09/26/citrus-paradisi/>
<https://www.wildflowersprovenance.fr/plant/thymus-capitatus/>
https://stock.adobe.com/images/origanum-vulgare-compactum/336420370?as_campaign=ftmigration2&as_channel=dpcft&as_campaignclass=brand&as_source=ft_web&as_camptype=acquisition&as_audience=users&as_content=closure_as-set-detail-page
<https://westernstarnurseries.com/plants/rosmarinus-officinalis-prostrata/>
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mentha_piperata_Peppermint_%E1%83%91%E1%83%90%E1%83%A6%E1%83%98%E1%83%A1_%E1%83%9E%E1%83%98%E1%83%A2%E1%83%9C%E1%83%90.JPG
<https://plants.ces.ncsu.edu/plants/ocimum-basilicum/>
https://en.wikipedia.org/wiki/Dichrostachys_cinerea
<https://www.randomharvest.co.za/South-African-Indigenous-Plants/Show-Plant/PlantId/23/Plant/Calpurnia-aurea>
https://www.wikiwand.com/en/Vachellia_karoo
<https://emerypharma.com/biology/minimum-inhibitory-concentration/>



UNIVERZITET U SARAJEVU
PRIRODNO-MATEMATIČKI
FAKULTET